

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 13 日現在

機関番号：63801

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25290009

研究課題名(和文) 視覚認知に関わる機能的神経回路の可視化

研究課題名(英文) Visualization of the functional neural circuits for visual cognition

研究代表者

武藤 彩 (Muto, Akira)

国立遺伝学研究所・個体遺伝研究系・助教

研究者番号：00525991

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,400,000円

研究成果の概要(和文)：ゼブラフィッシュ稚魚の捕獲行動を実験モデルとして、餌となる物体の視覚認知に関わる神経回路の探索を神経活動を指標として行った。脳部域特異的な神経活動を検出するための手法として、遺伝学的手法であるGal4-UASシステムをまず構築し、これを利用して餌が近くに存在するときのみ活動性を示す神経細胞集団を探索した結果、前視蓋領域が特異的な反応性を示すことを見出した。レーザー破壊法や、神経毒の特異的な導入により前視蓋領域の神経細胞の機能を消失させたところ、餌に対する稚魚の捕獲行動も抑制された。これらの結果から、前視蓋領域が「餌検出器」としての役割を担うことを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：We aimed to identify a neuronal population that has a specific role in visual prey detection. For this goal, first we established a genetic system in which we can introduce a genetically encoded calcium indicator GCaMP into any cell types of our interest, using the Gal4-UAS system. We examined the neuronal activity in the zebrafish larval brain to identify neurons that responded to the prey. We successfully identified a subpopulation of neurons in the pretectal area that showed specific response to paramecia in the proximity of the larva. Furthermore we demonstrated that the prey capture behavior was abolished when these neurons were ablated by either expression of a neurotoxin or two photon laser. Thus we propose that these neurons act as "prey detector" in the zebrafish.

研究分野：神経科学

キーワード：捕獲行動 視覚系 ゼブラフィッシュ カルシウムイメージング

1. 研究開始当初の背景

ヒトや動物の行動を作り出しているのは脳の働きである。脳は多数の神経細胞とそれらの結合により成り立っているため、行動が作り出されるメカニズムを理解するためには脳の構成要素である神経細胞集団の活動を調べる必要がある。神経細胞集団からの同時記録を行う方法として、活動電位の発生に伴うカルシウムイオン(Ca)流入を間接的に測定する手法が広く用いられている。Caプローブとしては低分子蛍光化合物とDNAでコードされるタンパク質性Ca蛍光指示薬の2種類に大別されるが、タンパク質性Ca蛍光指示薬を用いると遺伝学的な手法を利用して特定の神経細胞集団だけにCaプローブを導入することが可能である。タンパク質性Ca蛍光指示薬の発明は非常に画期的であったが、Ca検出感度が低いと検出可能な脳機能シグナルがかなり限定されるという困難が明らかとなり、これを改良する試みが国内外で続けられてきた。我々もタンパク質性Ca蛍光指示薬GCaMPの改良型を用いて、遺伝学的に同定された機能的神経回路の可視化を行うことができることをゼブラフィッシュ神経系を例として実証している。

2. 研究の目的

動物は常に変化する外界からの情報に応じて適応的な行動を取る必要がある。脳に対する感覚情報の入力、情報の意味づけ、それに基づく行動の選択という一連の神経プロセスはどのようなものであろうか？この問いに答えるために、本研究では脳が透明なゼブラフィッシュ稚魚とカルシウム蛍光プローブを用いて、捕獲行動中の脳機能イメージングを行う。ゼブラフィッシュの摂食行動は視覚依存的事であることから、捕獲行動中は視覚認知の過程に関わる神経細胞集団の活動を伴うことが予想される。また、視覚情報処理中枢である中脳視蓋だけでなく、前脳、間脳、小脳などが視覚認知機能を調節している可能性もある。そこで全脳のCaイメージングを行い、感覚情報の処理から行動の発現に至るまでの機能的神経回路を明らかにする。

3. 研究の方法

GAL4遺伝子トラップ系統のコレクションを用いて様々な特異的神経回路・神経細胞集団にGCaMPを発現させ、Caイメージングにより餌などの視覚認知及び捕獲行動に参与する神経回路を探索的に同定することを試みる。この目的には高い時間・空間分解能が必要なため、ニポウディスク方式の共焦点レーザー顕微鏡を用いてCaイメージングを行う。アガロース中に半固定して捕獲行動(輻輳眼球運動、尾部の運動)を同時測定することにより、餌が餌として認識される際の認知過程および捕獲行動に参与する神経細胞を同定する。

4. 研究成果

(1) 高感度改良型GCaMP遺伝子導入ゼブラフィッシュの作製 現在利用可能な最も感度の良いGCaMP7a, GCaMP6f, GCaMP6m, GCaMP6fに関してUASエフェクターとして遺伝子導入ゼブラフィッシュを作製し、コピー数や遺伝子導入部位の確認を行うことにより系統として確立した。導入遺伝子DNAのコンストラクト作製においては、発現レベルを高めるための工夫としてhsp70遺伝子の翻訳開始領域上流650bpをプロモーターとして利用した。この結果、今回作製したUAS:GCaMPを細胞・部域特異的なGal4系統と掛け合わせるにより、特定の細胞におけるカルシウム動態をイメージングにより簡便に観察できるようになった。この系は神経機能のみならず細胞内カルシウムシグナルが関与する生命現象の解明に役立つツールとして用いられる。

(2) 上記のUAS:GCaMPを脳部域のさまざまな領域で特異的発現を示すGal4系統と掛け合わせるにより、脳全体をカバーする範囲でGCaMPを発現した稚魚を得た。この稚魚を用いて、視覚刺激として稚魚の餌となるゾウリムシを呈示し、ゾウリムシを視覚的に認識した際に活動性を示す神経細胞の探索を試みた。中脳視蓋の領域が、ゾウリムシの視野における位置に依存的な反応性を示すこと(視野マップ)は我々が既前に示している(Muto et al., 2013)、今回の研究では視野内の位置によらずに餌の存在に反応する神経細胞に注目して観察を行った。その結果、前視蓋(pretectum)領域内で特定のGal4系統で標識された細胞集団が、餌の存在に対して反応性を示すことを発見した(図1,2)。

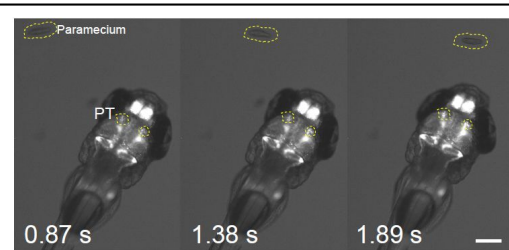


図1. ゾウリムシがゼブラフィッシュ稚魚に近づいてきたときの前視蓋(PT)の神経活動の上昇。Ca蛍光指示薬GCaMP6sの蛍光画像。スケールバー: 50 μm

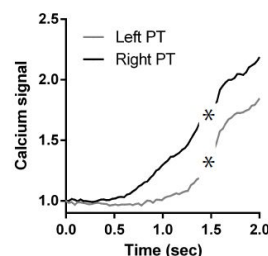


図2. 図1の前視蓋(PT)領域の蛍光強度の変化。*は稚魚の動きのために画素値が計算できなかったギャップを示す

これは、前視蓋が「餌検出器」という役割に担うことを示唆するものである(図3)。

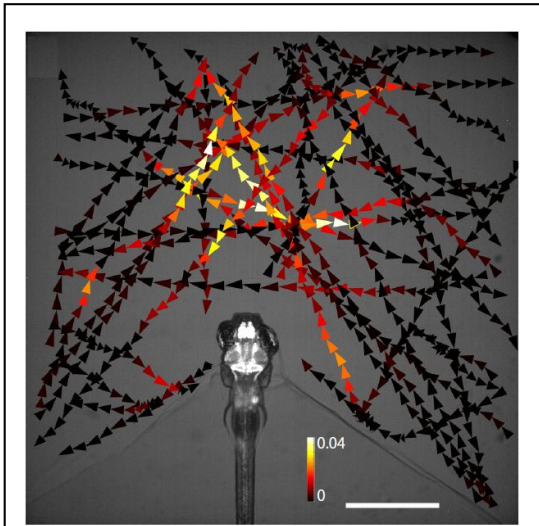


図3. アガロースに固定したゼブラフィッシュ稚魚の周囲を一匹のゾウリムシを泳がせたときの前視蓋の神経活動(左右の平均)。前視蓋GCaMP6sの蛍光強度の変化をカラーコード化して、ゾウリムシの軌跡に重ねて描いたもの。ゾウリムシが前方のある範囲に存在したときに、ゾウリムシの方向に依存せず強く反応したことがわかるスケールバー: 1000 μm

このことを確かめるために、二光子レーザー照射によりこれらの神経細胞を破壊した稚魚の捕獲行動を解析したところ、捕獲行動能が著しく低下していた(図4)。

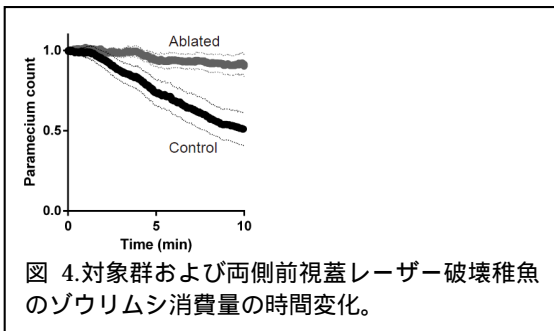


図4. 対象群および両側前視蓋レーザー破壊稚魚のゾウリムシ消費量の時間変化。

また、捕獲行動時には両眼視を行うための輻輳眼球運動が生じるが、前視蓋破壊を行った稚魚では餌となるゾウリムシを呈示しても、輻輳眼球運動がほとんど生じなかった(図5)。

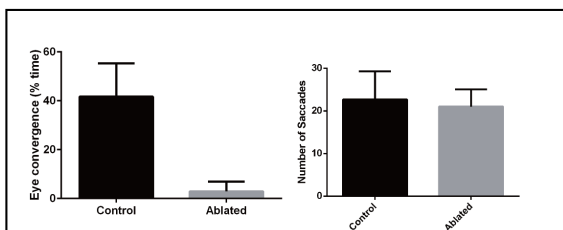


図5. 両側前視蓋レーザー破壊稚魚における輻輳眼球運動の低下(左)。視運動性眼球運動は正常(右)。

この実験結果は、餌となる物体を餌として認識できなくなったと解釈できる。

(3) 上記で見出された「餌検出器」としての役割を担う神経細胞の刺激-応答特異性を解析するため、人工的な刺激(動く丸印)をPCで作製しモニタ上で稚魚に呈示し、同時に神経活動を共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察したところ、みかけの大きさが1度-10度程度の大きさで、動く速度毎秒10度-100度程度の範囲で高い反応性を示すことが明らかとなった(図6)。

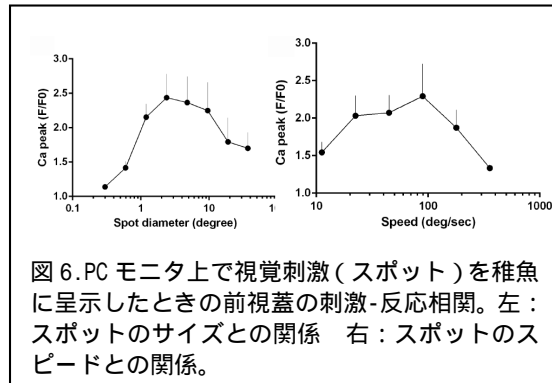


図6. PCモニタ上で視覚刺激(スポット)を稚魚に呈示したときの前視蓋の刺激-反応相関。左: スポットのサイズとの関係 右: スポットのスピードとの関係。

実際の捕獲行動との比較をおこなうため、獲物であるゾウリムシを捕獲した際の見かけ上の獲物の大きさと速さを調べたところ(図7)やはり、ゾウリムシの大きさが1度-10度程度で、動く速度毎秒10度-100度程度のときに捕獲行動が高頻度に見出され(図8)、両者が一致したことも前視蓋神経細胞が「餌検出器」であるという我々の仮説を指示するものである。

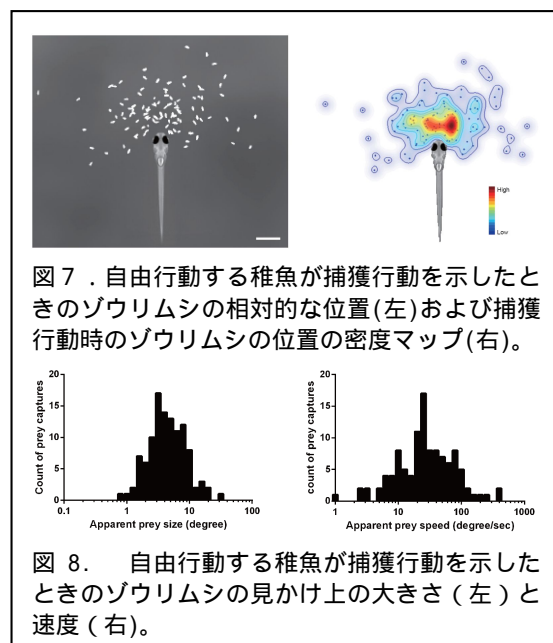


図7. 自由行動する稚魚が捕獲行動を示したときのゾウリムシの相対的な位置(左)および捕獲行動時のゾウリムシの位置の密度マップ(右)。

図8. 自由行動する稚魚が捕獲行動を示したときのゾウリムシの見かけ上の大きさ(左)と速度(右)。

(4) 今回見出した「餌検出器」としての前蓋細胞の軸索投射パターンを解析したところ、軸索が後方に伸びて視床下部下葉の領域に投射していることを見出した(図9)。

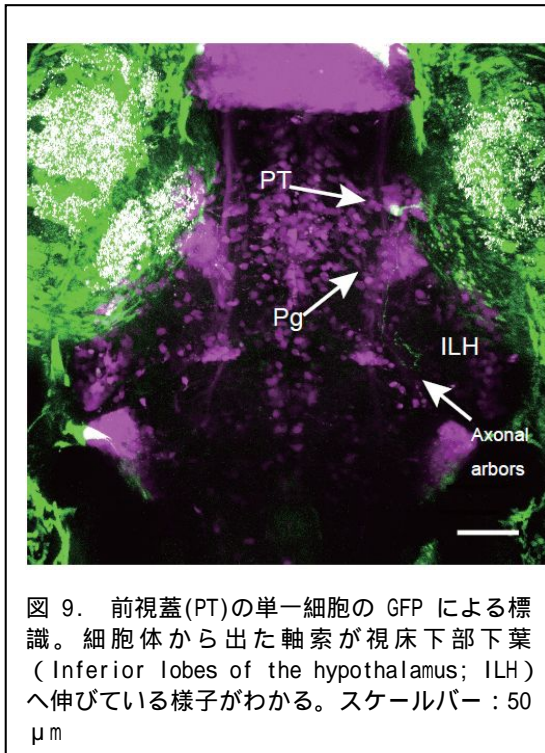


図 9. 前視蓋(PT)の単一細胞の GFP による標識。細胞体から出た軸索が視床下部下葉 (Inferior lobes of the hypothalamus; ILH) へ伸びている様子がわかる。スケールバー : 50 μm

視床下部下葉は魚類においては古くから摂食中枢として機能することが知られている。そのため、視覚的な餌の認識が、摂食行動中枢の機能を調節している可能性が示唆された。

以上述べた主要な結果は、現在論文投稿中 (in revision) である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 3 件)

- Ogino K, Low SE, Yamada K, Saint-Amant L, Zhou W, Muto A, Asakawa K, Nakai J, Kawakami K, Kuwada JY, Hirata H. RING finger protein 121 facilitates the degradation and membrane localization of voltage-gated sodium channels. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015 Mar 3;112(9):2859-64. doi: 10.1073/pnas.1414002112. 査読有
- Yokota Y, Nakajima H, Wakayama Y, Muto A, Kawakami K, Fukuhara S, Mochizuki N. Endothelial Ca²⁺ oscillations reflect VEGFR signaling-regulated angiogenic

capacity in vivo. *Elife* 5 Nov 2014. pii: e08817. doi: 10.7554/eLife.08817. 査読有

- Muto A, Kawakami K. Prey capture in zebrafish larvae serves as a model to study cognitive functions. *Front Neural Circuits*. 2013 Jun 11;7:110. doi: 10.3389/fncir.2013.00110. 査読無し

[学会発表](計 6 件)

- 武藤 彩 ゼブラフィッシュ捕獲行動における前視蓋—視床下部の神経回路の役割 第 11 回水生動物の神経系と行動シンポジウム 2015 年 12 月 5 - 6 日 (横浜市立大学医学部)
- Muto A, and Kawakami K. Genetic identification of a neural circuit for prey perception in zebrafish. 45th Annual Meeting of the Society for Neuroscience, Oct 17-21, 2015. Chicago.
- Muto A, and Kawakami K. Genetic identification of a prey detector circuit in zebrafish. The 38th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society July 28-31, 2015 (Kobe) (第 38 回 日本神経科学大会)
- Muto A. Genetic identification of prey detector neurons in zebrafish. . 6th Strategic Conference of Zebrafish Investigators, January 17-21, 2015, Pacific Grove, CA
- Muto A. Prey perception in zebrafish larvae. 2014 小型魚類研究会 2014 年 9 月 21 日 東京都港区 慶應大学
- 武藤彩 カルシウムイメージングでゼブラフィッシュの視覚認知機構に迫る 顕微鏡学会分子・細胞動態イメージング研究部会 2013 年 10 月 5 日(東京大学)

〔図書〕(計2件)

1. Akira Muto and Koichi Kawakami
Zebrafish: Methods and Protocols,
Second Edition Editors: Koichi
Kawakami, Michael Orger and
Elizabeth Patton. Springer 2016 (in
press) Chapter: Calcium Imaging of
Neuronal Activity in
Free-Swimming Larval Zebrafish
2. K.Kawakami, K.Asakawa, M.Hibi,
M.Itoh, A.Muto and H.Wada.
Genetics, Genomics and Phenomics
of Fish. Chapter:Gal4 driver
transgenic zebrafish: Powerful tools
to study developmental biology,
organogenesis and neuroscience.
Elsevier 2016 (in press)

6. 研究組織

(1)研究代表者

武藤 彩 (Akira Muto) 国立遺伝学研究所
個体遺伝研究系 助教

研究者番号 : 00525991

(2)研究分担者 なし

(3)連携研究者

川上 浩一 (Koichi Kawakami) 国立遺
伝学研究所 個体遺伝研究系 教授

研究者番号 : 70195048