

ゼブラフィッシュ発達期における 逃避反射神経回路形成の活動依存性に関する研究

[1] 組織

代表者：八尾 寛
(東北大学大学院生命科学研究科)
対応者：東海林 互
(東北大学加齢医学研究所)
分担者：梅田 桂子
(東北大学大学院生命科学研究科)

研究費：物件費 40 万円、旅費 0 円

[2] 研究経過

ゼブラフィッシュの幼生においては、表皮への接触刺激が脊髄の Rohon-Beard ニューロンにより感知され、介在神経を中継して対側の運動神経を作動させることによって接触を回避するような遊泳行動を引き起こすことが知られている。この逃避反射行動は受精後 24 時間以内に形成されるが、48 時間以降は Rohon-Beard ニューロンが消失し、代わって脊髄後根神経節ニューロンなどの体性感覚ニューロンを介する反射が発達する。

昨年度の共同研究では、これらの逃避反射行動の発達における神経活動の関与を明らかにすることを目的として、光駆動可能なイオンチャネルであるチャンネルロドプシンを神経細胞にコンディショナルに発現する手法を開発した。本年度はこれに引き続き、Rohon-Beard ニューロンの活動により引き起こされる逃避反射行動が減衰するプロセスを解明し、「仮説 1：2 次ニューロンに対する活動の競合が Rohon-Beard ニューロンの消失を促進する」「仮説 2：Rohon-Beard ニューロンの消失は intrinsic であり、競合に依存しない」という仮説の検証を計画した。しかし東日本大震災でトランスジェニック・ゼブラフィッシュの大半を失ったため、まずはじめにこれらの系統の復旧を行う必要が生じた。

上記の研究活動を遂行するために、1 月 26 日に加齢研において研究打ち合わせを開催した。

[3] 成果

(3-1) 研究成果

1. トランスジェニック系統の復旧
喪失したトランスジェニック・ゼブラフィッシュ系統の復旧には、(1) 国内の研究者との共同研究として分譲していたものの子孫を貰い受け再生、(2) NBRP(日本)、ZIRC(米国)といったバイオリソース・センターからの無償供与、(3) 凍結精子から人工授精による再生を行い、本年度末までに震災前の 70%までを回復した。

2. 改変型チャンネルロドプシンを発現するゼブラフィッシュ知覚神経の電気生理学的特性の解析

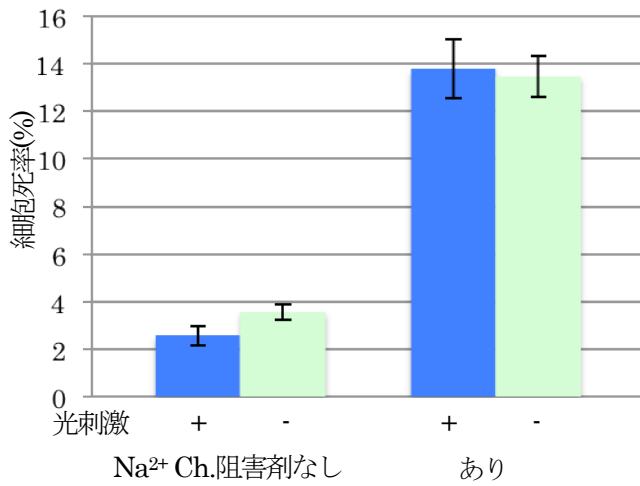
改変型チャンネルロドプシン (ChRWR) を発現させたゼブラフィッシュ Rohon-Beard ニューロンに対して光刺激を与え、同時にパッチクランプ法でニューロン周囲、および電位固定したニューロンに流入する電流量を測定した。この結果、光刺激に同期して、活動電位とそれに伴う内向き電流がきわめて効率的に発生することを明らかにした。本研究の成果を 8th IBRO World Congress of Neuroscience (Florence, Italy, 2011 年 7 月) および第 34 回日本神経科学大会 (横浜, 2011 年 9 月) において報告した (原著論文準備中)。

3. Rohon-Beard ニューロンの電気活動が発達に伴う細胞死を制御する可能性の検証

神経細胞の電氣的興奮と細胞死の関係には、例えば過剰興奮が細胞死を引き起こす一方で、神経筋接合の競合によって刺激伝達の可能な運動神経のみに生存が選択されるといった、各々の場面によって正負の異なる対応関係が報告されている。

そこで、発達に伴い消失することが知られる Rohon-Beard ニューロンに対して、チャンネルロドプシンの光刺激により誘発した電気活動が細胞死に与える影響を検討した。ゼブラフィッシュ胚をトリケイン処理することにより、電位依存性 Na⁺チャネルを阻害したところ、Rohon-Beard ニューロンの細胞死が促進された (図)。この結果は、先行研究と矛盾しない。しかし、この細胞死は、Rohon-Beard ニューロンの光刺激により抑制されなかった。したがっ

て、Rohon-Beard ニューロンの脱分極の阻害が細胞死を促進したのではなく、Rohon-Beard ニューロンを介するシナプス伝達の阻害が細胞死を促進した可能性がある。しかし、これを検証するにあたり、新しい実験システムの構築が必要になった。



(3-2) 波及効果と発展性など

本研究において確立した UAS:ChRWR-EGFP ゼブラフィッシュを用いて、チャンネルロドプシンを利用してゼブラフィッシュ胸鰭の運動を支配する運動神経細胞体の脊髄内プールの同定を試み、光刺激によりヒレに外転運動・内転運動をそれぞれ独立に制御可能な実験系を開発した。これを利用して拮抗筋の協調運動を制御する神経ネットワークを解明することを目的とし、平成 24 年度東北大学加齢医学研究所共同研究に応募した。

[4] 成果資料
なし