

ゼブラフィッシュ胸びれの内転・外転運動を制御する 運動神経回路に関する研究

[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

私たちの上・下肢は屈筋群と伸筋群の収縮-弛緩の連動によってスムーズな関節運動が可能となっている。この運動は脳幹部および脊髄レベルで統合される神経活動がそれぞれの筋肉群に投射する運動神経を適切に作動することによって制御されているが、回路の詳細には不明な点が多い。本研究では初期胚が透明で神経回路が単純なゼブラフィッシュを利用し、ヒトの上肢に対応する胸びれの運動に着目して、拮抗運動を統合するニューロン・ネットワークモデルの解析を試みた。

今年度の研究では、前年度に作成した改変型チャンネルロドプシン-トランスジェニック系統と、蛍光カルシウムプローブである GCaMP が組み込まれた系統 (Muto et al., 2011) を用い、脊髄運動ニューロンおよび脊髄・後脳レベルの介在ニューロンの光刺激による胸びれの運動解析、またそれに伴う神経活動の追跡を行った。4月中旬に加齢医学研究所で研究打ち合わせを開催し、八尾研究室の大学院生一名が一年間、加齢医学研究所に滞在して研究活動を行った。

[3] 成果

(3-1) 研究成果

ゼブラフィッシュ胸ヒレの羽ばたき運動は姿勢の制御を行うことを目的として受精後3日目から開始される間欠的な自発運動であり、硬組織を挟んで相対する内転筋・と外転筋の交互の収縮により達成され

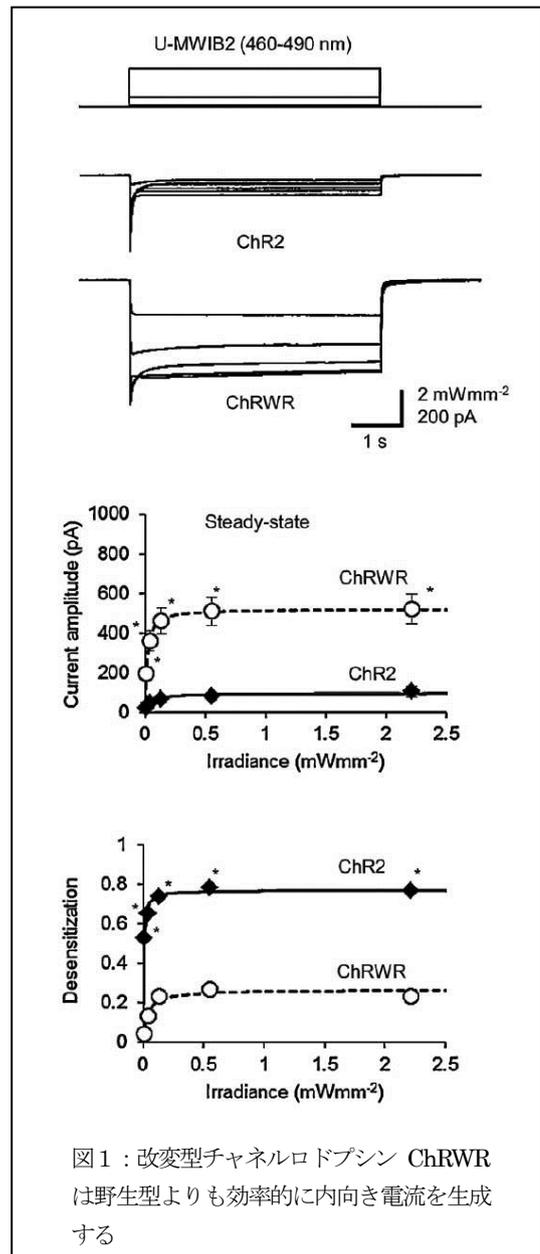


図1：改変型チャンネルロドプシン ChRWR は野生型よりも効率的に内向き電流を生成する

る。これまでの解剖学的な観察からは成魚・幼生のどちらにおいても脊髄前方の体節レベル1-4に位置する運動神経が背側枝・腹側枝を形成してヒレの基部から筋肉へと連絡していること、しかし脊髄内の神経細胞の位置と内転筋・外転筋の連絡には関連性がなく、広い範囲の脊髄レベルに由来する運動神経が背側枝・腹側枝の両方を経由して内転筋にも外転筋にも幅広く連絡すると結論されていた(Thorsem

and Hale, 2007)。これに対し、私たちはチャンネルロドプシンを神経細胞に発現するトランスジェニック・ゼブラフィッシュを用いて生きたままの個体で神経細胞への光刺激による運動解析を行い、以下の成果を得た。

1. 脊髄内で前方に位置する神経細胞が主に腹側枝を經由して外転筋を支配し、後方の位置する神経細胞が背側枝を經由して内転筋を支配することを見いだした。

2. 胸ヒレ運動時の神経活動をカルシウム・イメージングにより計測し、脊髄腹側に位置する運動神経のなかでも、やや外側よりで大きな細胞体をもつ神経細胞がヒレの動作に一致した活動パターンを示すことを発見した。

3. 胸ヒレの運動形成に関わる中枢領域の探索を目的として、中脳から脊髄までの領域を細分化しそれぞれの領域の神経細胞をチャンネルロドプシンで光駆動させたところ、後脳第4-5分節内にヒレの運動を指令する介在神経が存在することが判明した。

また、本研究で用いた改変体のチャンネルロドプシン・ワイドレシーバー(ChRWR)の特性を詳細に解析し、ChR2 に比べ微弱光で大きな応答が得られることを報告した(図1)。すなわち、ゼブラフィッシュなどのモデル動物の *in vivo* 研究に最適化されていると結論した。

今後はこれらの研究成果を手がかりとし、付属肢の拮抗運動を制御するニューロン・ネットワークの実体を明らかにしていく予定である。

(3-2) 波及効果と発展性など

本研究の最大の成果は、発生生物学研究で用いられてきた遺伝学的手法と神経科学研究で用いられてきた電気生理学的手法の融合により、行動を制御する神経活動をリアルタイム、かつ個体レベルで観察することが可能となったことである。本研究をもとに開始した、国立遺伝学研究所・岡崎統合バイオサイエンスセンター、名古屋大学の研究者らとの共同研究がそれぞれ成果を結びつつある。

また既存のチャンネルロドプシン・ゼブラフィッシュ系統と比べて飛躍的に性能の向上した、本研究の改変型チャンネルロドプシン・トランスジェニック系統は世界各国の研究者から次々と譲渡を依頼されている。今後は研究者コミュニティへの便宜を図るために、ナショナル・バイオリソースプロジェクト(NBRP)の遺伝資源として寄託する予定である。

[4] 成果資料

Umeda, K., Shoji, W., Sakaia, S., Muto, A., Kawakami, K., Ishizukaa, T., Yawo H., Targeted expression of a chimeric channelrhodopsin in zebrafish under regulation of Gal4-UAS system, *Neurosci. Res.* 75 (2013) 69-75