

# 研究報告書

## 「遊泳運動を規定する神経回路の発生と動作原理の解明」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 23 年 10 月～平成 27 年 3 月

研究者: 堀江 健生

### 1. 研究のねらい

神経系の機能を理解するためには、個体レベルで神経回路の全体像を明らかにするとともに神経回路を構成する一つ一つのニューロンの機能を解明することが重要である。しかしながら、脊椎動物の脳神経系は膨大な数のニューロンから構成されており、神経回路の全体像とその機能を一つ一つの細胞レベルで解明することは現時点ではほとんど不可能に近い。尾索動物ホヤ幼生の中枢神経系は脊椎動物の脳神経系の基本構造を備えているが、わずか 100 個程度のニューロンから構成されている。ホヤ幼生を用いれば、脊椎動物の中枢神経回路の全体像とその機能を細胞一つ一つのレベルまで掘り下げて解明することが可能である。本研究課題では、ホヤ幼生の中枢神経回路のうち、遊泳運動を規定する神経回路に着目し、その発生と動作原理を細胞レベル、遺伝子レベルでの解明することを目的とした。

### 2. 研究成果

#### (1) 概要

尾索動物ホヤの幼生はオタマジャクシ型の形態をしており、背側に神経管が位置するなど脊椎動物の脳神経系の基本設計を備えているが、その中枢神経系はわずか 100 個程度と少数の細胞から構成されている。本研究課題では、ホヤ幼生の中枢神経回路のうち、遊泳運動を規定する神経回路に着目し、その発生と動作原理を細胞レベル、遺伝子レベルでの解明することを目的として研究を行った。

種々のニューロンを可視化したトランスジェニック系統を用いた形態学的な解析から、ホヤ幼生の遊泳運動神経回路は左右 5 対 10 個のコリン作動性ニューロンと 2 対 4 個の GABA/グリシン作動性の抑制性介在ニューロンの合計わずか 14 個のニューロンから構成されることが明らかとなっている。本研究課題では、このようなシンプルなホヤ幼生の遊泳運動神経回路について『神経回路の活動イメージング』、『ニューロンの機能を修飾した個体の遊泳運動解析』、『特定のニューロンを欠損、または置換させた個体の遊泳運動解析』、『遊泳運動変異体の神経回路と原因遺伝子の解析』以上 4 つの研究を行い、遊泳運動を規定する神経回路の発生とその動作原理の解明を試みた。その結果、遊泳運動に必須の役割をしているニューロン、繰り返し運動(リズム形成)に必須の役割をしているニューロンを同定し、ホヤ幼生の遊泳運動を生み出す神経回路メカニズムの一端を示すことに成功した。また、本研究の過程において、ホヤにおいて従来よりも高効率で突然変異体を作製する方法を開発することに成功した。以下にその詳細を記す。

## (2) 詳細

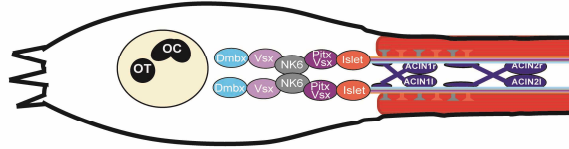
### (1) 遊泳運動を規定する神経回路の活動イメージング

ホヤ幼生の遊泳運動神経回路は左右 5 対 10 個のコリン作動性ニューロンと 2 対 4 個の GABA/グリシン作動性の抑制性介在ニューロン (ACIN) から構成される (図 1A)。また、コリン作動性ニューロンはそれぞれ発現する転写因子が異なっており、転写因子のエンハンサーを利用することにより、コリン作動性ニューロンを 1 対ずつ区別してラベルすることが可能である (図 1A)。これらの 5 対 10 個のコリン作動性ニューロンと 2 対 4 個の抑制性介在ニューロン (ACIN) において、Ca<sup>2+</sup> 指示蛍光タンパク質 GCaMP8 を個々のニューロンで発現させ、高速共焦点顕微鏡を用いて遊泳運動を行う際の神経活動イメージング

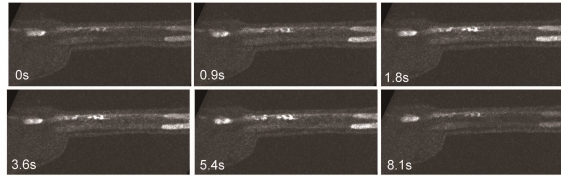
を行った。その結果、前方から 3 番目に位置する NK6 発現細胞、最も後方に位置する Islet 発現細胞が、遊泳運動を行う際に強く活動することが明らかとなった。この結果は、NK6 発現細胞、Islet 発現細胞が筋肉に対してエンドプレート形成しているという、形態学的な観察結果と一致しており、これら 2 対のニューロンが筋肉の収縮を生み出し、遊泳運動を制御していることを示唆している。一方、尾部の前端部に位置している ACIN についても神経活動イメージングを行ったところ、ACIN も遊泳運動を行う際に強く活動した。したがって、ホヤ幼生の遊泳運動はこれらのニューロンの活動によって生み出されることが示唆された。

図1. 遊泳運動神経回路を規定する神経回路の活動イメージ

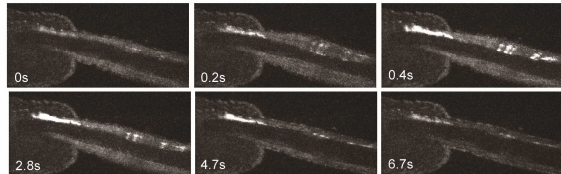
A: ホヤ幼生の遊泳運動神経回路



B: NK6 発現細胞の活動イメージング



C: Islet 発現細胞の活動イメージング

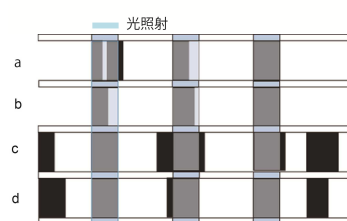


### (2)ニューロンの機能を修飾した個体の遊泳運動解析

ホヤ幼生が遊泳運動を行う際に強く活動する Islet 発現細胞において、光制御型チャネル/ポンプ (ChR2/NpHR) を発現するトランスジェニック個体を作製し、機能解析を行った。Islet 発現細胞において ChR2 を発現させた個体に青色光を照射し、Islet 発現細胞

の活動を活性化したところ、実験を行った全ての個体において遊泳運動が引き起こされた (図 2A)。一方、Islet 発現細胞において NpHR を発現させた個体に緑色光を照射し、Islet 発現細胞の活動を抑制したところ、遊泳運動中の個体は急激に遊泳を停止した (図 2B)。以上の結果から、Islet 発現細胞は遊泳運動に必須の役割をしていることが示された。

A: ChR2発現



B: NpHR発現

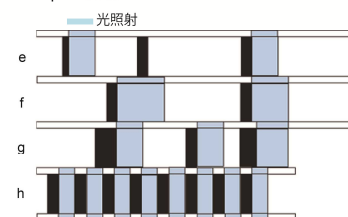


図2. Islet発現細胞の機能を修飾した個体の遊泳運動解析

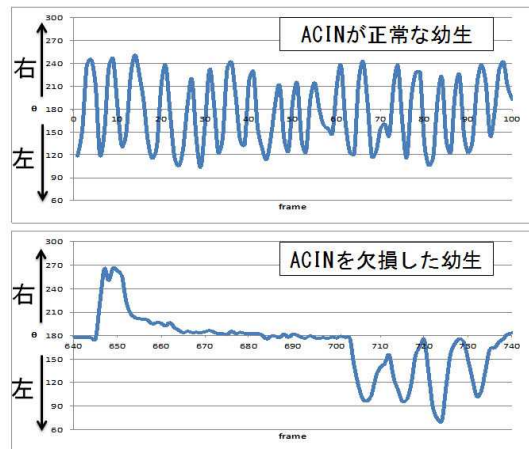
A: ChR2発現: 光を照射により遊泳運動が引き起こされる。

B: NpHR発現: 光を照射により遊泳運動が停止する。

縦軸の黒色のバーはホヤ幼生が遊泳していることを示している。

### (3)特定のニューロンを欠損、または置換させた個体の遊泳運動解析

特定のニューロンが欠損、または置換した個体を得ることを目的として、遊泳運動神経回路に存在するニューロンで発現する種々の転写因子について、機能阻害実験および過剰発現実験を行った。その結果、尾部前端部に存在する ACIN と名付けた 2 対 4 個の抑制性介在ニューロンが完全に欠損した個体を得ることに成功した。この個体では ACIN 以外のニューロンは正常に分化している。正常な個体と ACIN が欠損した個体について遊泳運動の解析、特に尾部運動の交互性と遊泳運動



の持続性について解析を行った。正常な個体は尾部を左右に交互にリズムカルに振ることにより遊泳運動を行う。一方、ACIN が完全に欠損した個体では尾部の振りの左右の交互性が失われてしまった。また、ACIN を欠損した個体は持続的な遊泳運動を行うことが出来なかった。以上の結果から、ACIN が左右の交互性を生み出し、リズムカルな遊泳運動を行うために必須の役割をしていることが明らかとなった。この結果は ACIN がリズムカルな尾部の振りを生み出す神経回路である Central Pattern Generator の重要な構成要素の一つであることを示唆している。

### (4)遊泳運動変異体の神経回路と原因遺伝子の解析

遊泳運動や遊泳運動神経回路の形成に必須の遺伝子を同定することを目的として、遊泳運動に異常を示す突然変異体のスクリーニングを行った。我々は *Minos* トランスポゾンを用いた Gal4 エンハンサートラップ法を応用することによって、約 83% という高い確率で遺伝子の近傍や内部にトランスポゾンが挿入されるトランスポゾンベクターを構築することに成功している。約 3,000 個の卵のスクリーニングにより、計 48 系統の Gal4 エンハンサートラップ系統を単離した。得られた Gal4 エンハンサートラップ系統について、トランスポゾンの挿入箇所を TAIL-PCR 法により決定したところ神経特異的 RNA 結合タンパク質 *Musashi*、 $\text{Na}^{2+}$  チャンネル、カイニン酸受容体などいくつかの神経関連遺伝子を変異体の原因候補遺伝子として同定した。得られた Gal4 エンハンサートラップ系統について、ホモ個体を作製し表現型の解析を行ったが、明確に遊泳運動に異常のある変異体は得ることが出来なかった。しかしながら、今回の突然変異体のスクリーニングから心臓の拍動やエラの形成に異常のある変異体などいくつかの変異体を単離することは出来ており、今後はスクリーニングの数を増やすことにより遊泳運動の変異体を単離することが可能であると期待される。

## 3. 今後の展開

本研究では、ホヤ幼生の遊泳運動に必須の役割をするニューロン、繰り返し運動(リズム形成)に必須のニューロンを同定することに成功し、ホヤ幼生の遊泳運動を生み出す神経回路メカニズムについてその一端を明らかにすることが出来た。しかしながら、遊泳運動神経回路に存在

する全てのニューロンの機能を明らかにすることは出来ていない。今後は、ニューロンの人為的な操作を行った個体において神経活動イメージングを行うなど、本研究で別々に行っていた実験を統合して行うことにより、遊泳運動を生み出す神経回路の動作原理を1細胞レベルで解明したい。また、ホヤから得られた知見を、マウス、ゼブラフィッシュ、線虫、ショウジョウバエ幼虫などの他のモデル動物の知見と比較することにより、進化的に保存された運動神経回路の動作原理の解明につなげていきたいと考えている。

#### 4. 評価

##### (1) 自己評価

当初の目標であった遊泳運動神経回路に存在する全てのニューロンの機能を1細胞レベルで解明することは出来なかったが、これまで技術的な困難さからほとんど研究が進んでいなかったホヤ幼生の神経回路の生理機能の研究にいくつかの新しい手法(神経活動イメージングや光遺伝学的)を取り入れることによって、遊泳運動を生み出す神経回路メカニズムについて一端を示すことは出来た。ホヤ幼生の尾部前端部に存在する抑制性介在ニューロン(ACIN)を介したリズムの形成機構は進化的に保存されたメカニズムであり、詳細な解析を進めることにより、脊椎動物の脊髄神経回路のシンプルなモデルになり得ると期待している。「遊泳運動変異体の単離と泳運動変異体の神経回路と原因遺伝子の解析」に関しては、遊泳運動変異体を得ることが出来ず、その目標を達成することが出来なかった。さきがけ研究期間中にホヤにおいてTALENやCRISPR/Cas9システムを応用することによって、組織・細胞特異的に遺伝子をノックアウトする方法が確立された。今後は、我々がカタログ化しているホヤ幼生の脳・神経系で特異的に発現する遺伝子群を、遊泳運動神経回路で特異的にノックアウトすることにより、当初の目標としていた遊泳運動や遊泳運動神経回路の形成に重要な遺伝子を単離することが出来ると考えている。そして、今後は、本研究で導入した方法を統合的に組み合わせ、当初の目標を達成出来るような研究を展開したいと考えています。

(2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)。

##### (研究総括)

ホヤは脊椎動物と同じ基本設計を有する中枢神経系を持ちながら、その神経細胞数は約100個、特に遊泳運動に直接関わる回路は14個の神経細胞からなる。本研究はこの点に着目して、回路の活動イメージング、光遺伝学による特定細胞の活動操作、転写因子機能阻害による特定神経細胞の欠損または置換などの方法により、遊泳運動神経回路の動作原理の解明を意欲的に目論んだものである。実際に高速共焦点顕微鏡を用いたカルシウムイメージングにより、遊泳運動中の14個の神経細胞の活動様式を明らかにし、特定の細胞に光制御型チャネル/ポンプを発現させてこれを強制的に活性化または抑制して遊泳運動を自在に操作することに成功し、また特定の神経細胞を欠損した個体を作成してその遊泳運動における役割を証明したことは大きい成果であり、課題の骨格を達成したものと言える。またさきがけ領域会議を機にOISTの研究者との共同研究を展開している。上記の成果も早期に論文にまとめ、今後この神経回路の全神経細胞の役割を明らかにして、脊椎動物の遊泳・爬行様式の理解に新たな視点を開くことが期待できる。

## 5. 主な研究成果リスト

### (1) 論文(原著論文)発表

1. Kamiya C, Ohta N, Ogura Y, Yoshida K, <b>Horie T</b> , Kusakabe TG, Satake H, Sasakura Y. Nonreproductive role of gonadotropin-releasing hormone in the control of ascidian metamorphosis. <i>Dev. Dyn.</i> (2014) in press
2. Hozumi A, Yohida R, <b>Horie T</b> , Sakuma T, Yamamoto T, Sasakura Y. Enhancer activity sensitive to the orientation of the gene it regulates in the chordate genome. <i>Dev. Biol.</i> (2013), 375, 79–91.
3. Razy-Krajka F, Brown ER, <b>Horie T</b> , Callebert J, Sasakura Y, Joly JS, Kusakabe TG, Vernier P. Monoaminergic modulation of photoreception in ascidians:evidence for a proto- hypothalmo- retinal territory. <i>BMC. Biol.</i> (2013), 10, 45
4. Sasakura Y, Kanda M, Ikeda T, <b>Horie T</b> , Kawai N, Ogura Y, Yoshida R, Hozumi A, Satoh N, Fujiwara S. Retinoic acid-driven Hox1 is required in the epidermis for forming the otic/atrial placodes during ascidian metamorphosis. <i>Development</i> (2012) 139, 2156–2160.
5. Nishitsuji K, <b>Horie T</b> , Ichinose A, Sasakura Y, Yasuo H, Kusakabe TG. Cell lineage and <i>cis</i> -regulation for a unique GABAergic/glycinergic neuron type in the larval nerve cord of the ascidian <i>Ciona intestinalis</i> . <i>Dev. Growth Differ.</i> (2012) 54, 177–186.
6. Sasakura Y, Mita K, Ogura Y, <b>Horie T</b> . Ascidians as excellent chordate models for studying the development of the nervous system during embryogenesis and metamorphosis. <i>Dev. Growth Differ.</i> (2012) 54, 420–437.

### (2) 特許出願

研究期間累積件数:0件

### (2) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

1. 堀江健生 「脳・神経系の発生プログラムの多様化と進化機構の研究」筑波大学研究成果フォーラム 2013 -世界を切り開くグローバル研究拠点-, 2012年1月、東京
2. Horie T, Sasakura Y. 「Ependymal cells of chordate larvae are stem-like cells that form the adult nervous system」 1<sup>st</sup> JABMIO International Symposium, Tokyo, Japan (2012, 1)
3. 堀江健生 「ホヤ幼生における遊泳運動神経回路の発生とその動作原理」 第7回 Motor Control 研究会 ワークショップ 2013年9月、東京
4. 堀江健生、大倉正道、日下部岳広、中井淳一、中川将司 「Structural and physiological analysis for a central pattern generator controlling swimming locomotion of the ascidian larva」 第91回日本生理学会大会 シンポジウム 2014年3月、鹿児島

- 堀江健生、大倉正道、日下部岳広、中井淳一、中川将司「ホヤ幼生の遊泳運動神経回路の構造と生理機能の解析」日本動物学会第85回仙台大会 シンポジウム 2014年9月、仙台