

脊髄内リズム運動生成回路の発生および機能解析

自然科学研究機構岡崎統合バイオサイエンスセンター
東島 真一

1. 研究の背景、および目的

脊椎動物は移動の際に体の各部を協調させたリズム運動を行う。たとえば、陸上哺乳動物の歩行運動は四肢のリズミカルな協調運動からなる。このリズム運動を作り上げる神経回路は脊髄内に存在し、脊髄 Central Pattern Generator (CPG) と呼ばれている。しかし、脊髄 CPG の回路を構成するニューロンの種類や機能的役割の詳細については、哺乳動物においては多くの点が不明である。

上記の背景の元、本研究では、脊髄神経回路の重要な研究素材となっているゼブラフィッシュを用い、外転筋と内転筋の左右交互のシンプルな運動からなる、遊泳中の胸びれリズム運動の神経回路の完全解明を進める。そして、その神経回路の構成因子を、進化的に保存された脊椎動物脊髄神経発生の基本スキームの中に位置づける。胸びれは哺乳動物前肢の相同器官であり、シンプルな胸びれの運動は、陸上脊椎動物四肢の運動のプロトタイプと考えることができる。すなわち、本研究により、屈筋伸筋の交互運動と左右の交互運動の協調運動からなる、脊椎動物四肢のリズム運動を司る神経回路の根本的な理解、およびその成立過程を明らかにすることができると考えられる。

2. 方法

受精後三日目のゼブラフィッシュを、ツボクラリンにより神経-筋の伝達を阻害して不活動化した状態で、自発的に誘発される遊泳リズム運動活動（仮想遊泳）を電気生理学手法により記録する。仮想遊泳の状況は体壁筋 MN 軸索束の活動記録（第 9-10 体節）でモニターし、同時に、内転筋運動ニューロン、外転筋運動ニューロンから記録を取り、それぞれの運動ニューロンの発火パターンを調べる。また、膜電位固定法による記録を行うことにより、リズム運動中に、それぞれのニューロンへどのような興奮性、抑制性のシナプス入力が入っているかを検討する。ついで、さまざまなタイプの介在ニューロンの、リズム運動中における発火パターンを調べる。さらに、光遺伝学手法と電気生理学手法を組み合わせることにより、介在ニューロンと運動ニューロンとのシナプス結合様式を調べる。

3. 結果

仮想遊泳中には、(i) 外転筋運動ニューロン、(ii) 体幹運動ニューロン、(iii) 内転筋運動

ニューロンの順に、リズムックに活動することが分かった。この胸びれ運動ニューロンの神経活動がどのようなシナプス入力を受けて作り上げられるかを調べるため、外転筋運動ニューロン、内転筋運動ニューロンの膜電位固定法による全細胞記録を行った。その結果、双方とも、それらの細胞が発火するフェーズにリズムックな興奮性入力を受けており、それ以外のフェーズでは、抑制性の入力を受けていることが明らかとなった。すなわち、リズムックに興奮性入力と抑制性入力が入り交互に入ることが、胸びれ運動ニューロンのリズムックな神経活動の主たる原因と考えられる。

この運動ニューロンへシナプス入力を与える介在ニューロンを明らかにするため、さまざまなクラスの介在ニューロンから電気生理学記録を行った。その結果、転写因子、En1, Chx10, Gata3, Evx1, Dmrt3 を発現する神経細胞が、胸びれリズム運動の際にリズムックに発火活動することが明らかとなった。現在、光遺伝学手法と電気生理学手法を組み合わせることにより、介在ニューロンと運動ニューロンとのシナプス結合様式を調べている。

4. 考察

現在、光遺伝学手法と電気生理学手法を組み合わせることにより、介在ニューロンと運動ニューロンとのシナプス結合様式を調べている。この解析を進めることにより、介在ニューロンと運動ニューロンとの結合様式の全貌が見えてくるものと期待される。そのうえで、光遺伝学手法を用いて特定のクラスの介在ニューロンの活動を人為的に変化させることで、想像された結合様式から期待される表現型が得られるかどうかを検討していきたいと考えている。

5. 参考文献

Ota, S., Taimatsu, K., Yanagi, K., Namiki, T., Ohga, R., Higashijima, S., and Kawahara, A. (2016). Functional visualization and disruption of targeted gene using CRISPR/Cas9-mediated eGFP reporter integration in zebrafish. *Scientific Reports* 6, Article 34991.

Chou, M-Y., Amo, R., Kinoshita, M., Cherng, B-W., Shimazaki, H., Agetsuma, M., Shiraki, T., Aoki, T., Yamazaki, M., Higashijima, S., and Okamoto, H. (2016). Social conflict resolution regulated by two dorsal habenular subregions in zebrafish. *Science* 352, 87-90..

Kawamura, A., Ovara, H., Ooka, Y., Kinoshita, H., Hoshikawa, M., Nakajo, K., Yokota, D., Jujino, Y., Higashijima, S., Takada, S., and Yamasu, K. (2016). Posterior-anterior gradient of zebrafish *hes6* expression in the presomitic mesoderm is established by the combinatorial functions of the downstream enhancer and 3'UTR. *Developmental Biology* 409, 543-554.

Marquart, G.D., Tabor, K.M., Brown, M.R., Strykowski, J.L., LaFave, M.C., Varshney, G.K.,

Mueller, T., Burgess, S.M., Higashijima, S., and Burgess, H.A. (2015). A 3d-searchable database of transgenic zebrafish Gal4 and Cre lines for functional neuroanatomy studies. *Frontiers in Neural Circuits* 9, Article 78