

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 6 月 19 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K07433

研究課題名(和文) 光遺伝学とイメージングによる単一ニューロンレベルでの遊泳運動神経回路の機能解明

研究課題名(英文) Functional analysis of swimming locomotor network by optogenetics and live imaging at the single cell resolution

研究代表者

堀江 健生 (HORIE, Takeo)

筑波大学・生命環境系・助教

研究者番号：10455925

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：ホヤ幼生の遊泳運動神経回路を構成する5対10個のコリン作動性ニューロンと2対4個のGABA/グリシン作動性ニューロンについて光遺伝学的な手法、および神経活動のライブイメージングにより単一細胞レベルでの機能解析を進めた。さらに、1細胞トランスクリプトーム解析により、個々のニューロンで発現する遺伝子の同定を試みた。その結果、遊泳運動の開始と維持、遊泳運動の停止、遊泳運動の修飾に関与するニューロンを同定することに成功した。さらに、単一細胞トランスクリプトーム結果をもとに遊泳運動神経回路の発生に関与する転写因子群を同定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、ホヤ幼生の遊泳運動神経回路を構成する一つ一つのニューロンについてその生理的な機能やその発生プログラムを明らかにすることに成功した。その結果、ホヤの各ニューロン遊泳運動神経回路を構成するニューロンは機能的にも、発生的にも脊椎動物の脊髄神経回路と似ていることが明らかとなった。脊髄神経回路は、歩行運動など人の行動に重要な役割をする神経回路である。本研究から、単純なホヤ幼生の遊泳運動神経回路が複雑な脊椎動物の脊髄神経回路を理解するためのシンプルなモデルになり得ることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：We performed functional analysis of swimming locomotor network of the ascidian larva which are comprised of 5 pairs of cholinergic neurons and 2 pairs of GABAergic/glycinergic neurons by optogenetics and live imaging at the single cell resolution. We also performed single cell transcriptome analysis of ascidian embryos to identify the specific marker genes for individual neurons. We identified the neurons that are essential for start swimming, keep swimming, stop swimming and modulate swimming. We also identified the transcription factors that are essential for the differentiation of individual neurons in the swimming locomotor networks in the ascidian larva by single cell transcriptome analysis.

研究分野：神経生物学

キーワード：ホヤ 遊泳運動 運動神経回路 ニューロン 光遺伝学 神経活動イメージング

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

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。しかしながら高等動物では中枢神経系を構成する細胞数の多さから、その全貌を解明することは困難である。申請者はこの問題を解明するために尾索動物ホヤをモデルとして研究を進めている。

ホヤの幼生はオタマジャクシ型の形態をしている。ホヤ幼生の中枢神経系は背側に位置するなど脊椎動物の脳神経系と多くの共通性を備えているが、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レベルまで掘り下げて解明することが可能である。ホヤ幼生は透明でライブイメージングに適しており、 Ca^{2+} 指示蛍光タンパク質を発現するトランスジェニック系統を用いることにより、個体に存在するニューロンがいつ、どこで、どのように活動するのかを一挙に捉えることが可能である。また、様々なニューロンで外来遺伝子を発現させるためのプロモーターセットが揃っており、単一のニューロンで光遺伝学ツールを発現させることにより、その活動を人為的に操作することが可能である。さらに人工ヌクレアーゼを用いて組織・細胞特異的な遺伝子ノックアウトが容易に行えるなど、脳神経回路の形成や機能発現を研究する上で優れた特性を備えている。

これまでに申請者は神経特異的な抗体を用いた免疫染色や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組織学的な解析により、ホヤ幼生に存在するほぼ全てのニューロンを同定してきた。そして、これらの研究成果から、ホヤ幼生の遊泳運動神経回路については、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わずか 14 個のニューロンによって構成されていることを報告している。しかしながら、個々のニューロンの機能は不明であり、各ニューロンがどのように協調して遊泳運動を生み出すのかは不明であった。

2. 研究の目的

上記の背景およびこれまでの研究成果をもとに、本研究はホヤ幼生の遊泳運動を生み出す神経回路の動作原理を単一ニューロンレベルで解明することを目指して研究を行った。具体的には研究期間内に以下の研究を行った。

遊泳運動神経回路の活動の高速ライブイメージング

遊泳運動神経回路を構成する各ニューロン及び筋肉細胞で Ca^{2+} 指示蛍光タンパク質 GCaMP を発現するトランスジェニック系統を用いて、遊泳運動中のホヤ幼生における神経活動の高速ライブイメージングを行う。これにより、遊泳運動を行う際にどのニューロンが応答するのかを明らかにし、遊泳運動を生み出す神経回路の活動パターンを解明する。

単一ニューロンの神経活動を操作した個体の遊泳運動解析

遊泳運動神経回路を構成する一つ一つのニューロンで光遺伝学ツールを発現させ、ニューロンの活動を人為的に活性化、または阻害した場合の行動パターンを解析する。これにより、遊泳運動における個々のニューロンの機能およびニューロンの機能と遊泳運動を生み出す神経回路の活動パターンとの相関を解明する。

特定のニューロンが欠損または置換した個体の遊泳運動解析

個々のニューロンで発現する転写因子・シグナル分子の機能を阻害することにより、特定のニューロンが欠損または置換した個体を作製する。得られた個体の遊泳運動パターンの解析、神経回路の活動パターンの解析を行うことにより、正常な遊泳運動を行うために、なぜ神経回路の決まった位置に特定のニューロンが分化し、機能する必要があるのかを明らかにする。これにより、ニューロンの分化パターンと神経回路の機能との関係を解明する。

3. 研究の方法

遊泳運動神経回路の活動の高速ライブイメージング

遊泳運動神経回路において Ca^{2+} 蛍光指示タンパク質 GCaMP を発現するトランスジェニック個体を用いて、遊泳運動神経回路の活動の高速ライブイメージングを行った。

単一ニューロンの神経活動を操作した個体の遊泳運動解析

遊泳運動神経回路を構成する個々のニューロンにおいて、光遺伝学的なツールを発現させ、その活動を人為的に制御した際の遊泳運動解析を行った。

特定のニューロンが欠損または置換した個体の遊泳運動解析

遊泳運動神経回路を構成する個々のニューロンが欠損した個体を作製する。個々のニューロンが欠損した個体について、遊泳運動の解析を行った。

4. 研究成果

遊泳運動神経回路の活動の高速ライブイメージング

ホヤ幼生の遊泳運動神経回路は 5 対 10 個のコリン作動性ニューロンと 2 対 4 個の GABA/グリシン作動性ニューロンの合計 14 個のニューロンによって構成される。5 対 10 個のコリン作動

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(図 1A)、転写因子のエンハンサー領域を利用することにより個々のニューロンで外来遺伝子を発現させることが可能である(図 1B)。個々のコリン作動性ニューロン、抑制性介在ニューロン(ACIN)において Ca^{2+} 蛍光指示タンパク質 GCaMP を発現させ、 Ca^{2+} イメージングを行い、遊泳運動中に活動を行うニューロンの同定を試みた。

5 対 10 個全てのコリン作動性ニューロンについて、 Ca^{2+} イメージングを行ったところ、中央に位置する 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最も強く活動することが明らかとなった。また、前方から 2 番目に位置する *Vsx* 発現細胞、4 番目に位置する *Vsx/Pitx* 発現細胞は、遊泳運動の開始前後に活動した。また、その活動の順序は前方から後方へと伝搬することも明らかとなった。一方、本研究では最も前方に発現する *Dmbx* 発現細胞については、遊泳運動の前後、遊泳運動の最中に活動を確認することは出来なかった。抑制性介在ニューロン(ACIN)については、NK6 発現細胞、*Islet* 発現細胞と同様に遊泳運動中に活動することが明らかとなった。以上の結果から、ホヤ幼生の遊泳運動中は、コリン作動性ニューロンのうち NK6 発現細胞、*Islet* 発現細胞、そして抑制性介在ニューロンである ACIN が重要な役割をすることが示唆された。



図 1. ホヤ幼生の遊泳運動神経回路

A: 5 対 10 個のコリン作動性ニューロンは前方から、*Dmbx*, *Vsx*, NK6, *Islet*, *Pitx*, *Islet* を発現する。それぞれの転写因子のエンハンサーを用いて個々のニューロンにおいて外来遺伝子を発現させることが可能である。

B: *Dmbx* 発現細胞において蛍光タンパク質遺伝子を発現させた例。

単一ニューロンの神経活動を操作した個体の遊泳運動解析

遊泳運動神経回路に存在する一つ一つのニューロンにおいて光遺伝学的なツール (ChR2/NpHR) を発現させ、その機能を人為的に操作した際の遊泳運動の解析を行った。遊泳運動を行う際に最も強く活動を行う *Islet* 発現細胞において ChR2 を発現させその活動を光により人為的に活性化させたところ、遊泳運動が開始することが明らかとなった。一方で、*Islet* 発現細胞に NpHR を発現させ、遊泳中の個体において *Islet* 発現細胞の活動を抑制すると遊泳中の個体は遊泳を停止させることが明らかとなった。この結果から、遊泳運動の開始や維持には *Islet* 発現細胞が強く関係していることが明らかとなった。また、コリン作動性ニューロンの背側には 4 対 8 個の GABA 作動性ニューロンが存在しているが、この 4 対 8 個の GABA 作動性ニューロンにおいて ChR2 を発現させその活動を光により人為的に活性化させると遊泳中の個体は遊泳を停止させることが明らかとなった。つまり、コリン作動性ニューロンの背側に存在する 4 対 8 個の GABA 作動性ニューロンは遊泳運動の停止に関連していることが示唆された。

特定のニューロンが欠損または置換した個体の遊泳運動解析

転写因子 *Sox2* の過剰発現により、ACIN と名付けた 2 対 4 個の抑制性介在ニューロンが欠損した個体を得ることに成功した。正常な個体は尾を左右交互に振ることにより遊泳運動を行うが、ACIN が欠損した個体では、尾の振りの左右の交互性が失われてしまった。したがって、ACIN が左右の交互性に必須の役割をすることが明らかとなった。

個々のニューロンで特異的に発現する転写因子・シグナル分子を同定することを目的として、ニューロンの分化が開始している中期尾芽胚、後期尾芽胚の単一細胞トランスクリプトーム解析を行った。そして、ホヤ胚を構成する全ての細胞の遺伝子発現プロファイルを作製した。この結果、ホヤの神経系は 24 種類のニューロンのサブタイプが存在すること、さらに個々のニューロンで特異的に発現する転写因子の同定に成功した。特に、脳内に存在する 1 対 2 個の GABA 作動性ニューロンでは転写因子 *Prop1* が特異的に発現すること、*Prop1* の機能阻害により、この 1 対 2 個の GABA 作動性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。今後は、このように個々のニューロンが欠損した個体について、詳細な遊泳運動解析を行っていきたいと考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Hozumi A, Matsunobu S, Mita K, Treen N, Sugihara T, Horie T, Sakuma T, Yamamoto T, Shiraishi A, Hamada M, Satoh N, Sakurai K, Satake H, Sasakura Y.	4. 巻 30
2. 論文標題 GABA-Induced GnRH Release Triggers Chordate Metamorphosis.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Current Biology	6. 最初と最後の頁 1555-1561
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.cub.2020.02.003.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Horie R, Hazbun A, Chen K, Cao C, Levine M, Horie T.	4. 巻 560
2. 論文標題 Shared Evolutionary Origin of Vertebrate Neural Crest and Cranial Placodes.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Nature	6. 最初と最後の頁 228-232
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41586-018-0385	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Horie T, Horie R, Chen K, Cao C, Nakagawa M, Kusakabe TG, Satoh N, Sasakura Y, Levine M.	4. 巻 32
2. 論文標題 Regulatory Cocktail for Dopaminergic Neurons in a Protovertebrate Identified by Whole-embryo Single-cell Transcriptomics.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Genes & Development	6. 最初と最後の頁 1297-1302
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1101/gad.317669.118	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Li Y, Zhao D, Horie T, Chen G, Bao H, Chen S, Liu W, Horie R, Liang T, Dong B, Feng Q, Tao Q, Liu X	4. 巻 114
2. 論文標題 Conserved Gene Regulatory Module Specifies Lateral Neural Borders Across Bilaterians.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 E6352-E6360
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.1704194114	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 6件 / うち国際学会 4件）

1. 発表者名 堀江 健生
2. 発表標題 単一細胞トランスクリプトームによるホヤ胚における神経細胞分化を制御する遺伝子カクテルの同定
3. 学会等名 日本動物学会第90回大阪大会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takeo Horie
2. 発表標題 Regulatory cocktail for individual neurons identified by whole embryos single cell transcriptomics in ascidian embryos
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takeo Horie
2. 発表標題 Regulatory cocktail for individual neurons in Ciona identified by whole-embryo single-cell transcriptomics
3. 学会等名 The Ciona Conectome : creating a research network（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 堀江 健生
2. 発表標題 単一細胞トランスクリプトームによる神経細胞の分化を制御する転写因子カクテルの同定
3. 学会等名 大阪大学蛋白質研究所セミナー「高次脳機能の神経回路機構」（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Horie T, Horie R, Levine M
2. 発表標題 Neural crest and cranial placodes share a common evolutionary origin
3. 学会等名 9th International Tunicate Meeting (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Takeo Horie, Masamichi Ohkura, Kotaro Shimai, Ryoko Horie, Yasunori Sasakura, Takehiro Kusakabe, Junichi Nakai, Michael Levine, Masashi Nakagawa
2. 発表標題 Calcium imaging and single cell optogenetic analysis of a neural circuit for generating swimming
3. 学会等名 The 22nd International Congress of Zoology (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 Ryoko Horie, Michael Levine, Takeo Horie
2. 発表標題 Specification of the lateral border of the neural plate in the ascidian embryo
3. 学会等名 The 22nd International Congress of Zoology (国際学会)
4. 発表年 2016年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

筑波大学生命環境系下田臨海実験センター堀江研究室ホームページ
http://acafe.jp/Horie_Takeo/index.php

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----