

連載講座

ヒトを知るモデル動物としてのゼブラフィッシュ-3

脳全体のイメージングからわかること

久保 郁

Key words : 全脳イメージング, カルシウムイメージング, ゼブラフィッシュ

小型で透明な脳を持つゼブラフィッシュは、脳を構成するすべての細胞を顕微鏡で可視化することができる唯一のモデル脊椎動物である。ゼブラフィッシュ脳が持つこのようなユニークな性質を利用することにより、脳全体にわたって散在する一つひとつの神経細胞の活動をくまなく記録する“全脳イメージング”が可能となる。脊椎動物に共通した基本脳構造を持つゼブラフィッシュを用いて全脳イメージング解析を行うことにより、ヒト脳機能の理解が進む可能性があると期待されている。

I なぜ脳の全体を調べる必要性があるのか？

脳には多数の神経細胞が存在し、これら多数の神経細胞が互いに複雑に連結することにより神経ネットワークが形成されている。このような複雑な神経ネットワークのおかげで、精巧な情報処理や柔軟な学習・意思決定など、われわれの脳が持つ様々な機能が発揮されていると考えられている。

動物がある特定の行動をとるとき、脳内の実に様々な領域が関与する。例えば、「自分のほうに近づいてくるボールを避ける」という行動を例にとってみよう。まず、網膜がボールを認識し、またボールがどこから、どのぐらいのスピードで近づいてくるかということを脳へ伝達する。脳では、ボールが向かってくる進行方向を予測し、そ

こから外れるようにからだを動かす運動指令を出し、結果的に衝突を回避する。つまり、脳内では視覚情報を受容し、その視覚情報に基づいてどのような運動を生み出すべきか計算し(感覚情報から運動情報への変換)、最終的に目的の筋肉を収縮させる必要がある。このような比較的シンプルな行動であっても、一連の行動の制御には、感覚系から運動系に至るまでの脳の広い領域が関与している。したがって、特定の行動を制御する神経ネットワークの入力から出力までの“全体像”を理解するために、脳のすべてを解析するのが理想的である。

II 脳の全体を調べるうえでの技術的な障壁

脳全体の神経活動を記録することは容易なことではない。脳の活動は時々刻々と変化するため、ある1時点における活動の“スナップショット”ではなく、脳活動の継時的な変化“ダイナミクス”を調べる必要がある。このようなダイナミクス解析を脳全体に展開するうえで、2つの制約が存在する。1つが解析対象とする脳の範囲であり、もう1つが解像度である。従来、脳活動の解析範囲と解像度は相反する関係にあり、両者のせめぎ合いが生じる。例えば、古典的な電気生理学的手法を用いれば、ある一部の脳領域における神経活動を個々の細胞レベルで詳細に調べることはできる

Insights from whole-brain imaging in zebrafish

Kubo Fumi : 国立遺伝学研究所システム神経科学研究室 (〒411-8540 静岡県三島市谷田1111)

0370-9531/02/¥500/ 論文/JCOPY

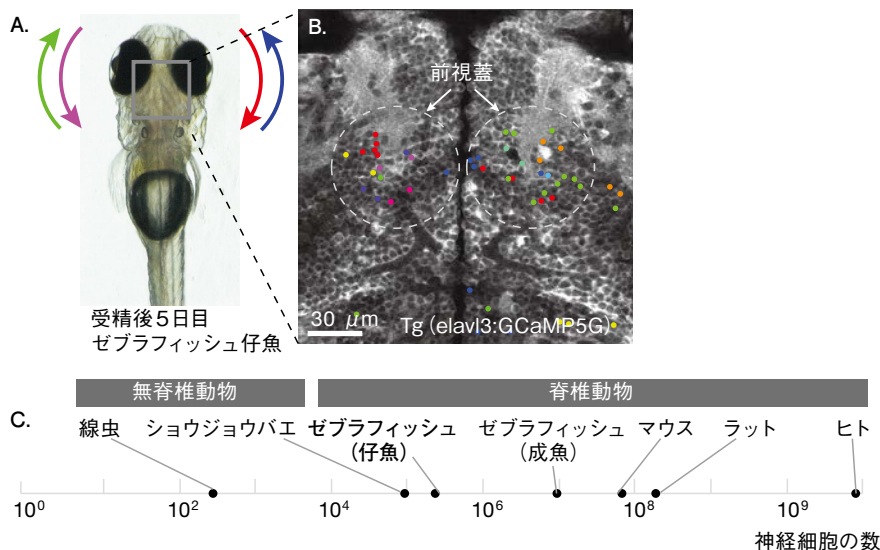


図 ゼブラフィッシュの小型で透明な脳におけるイメージング

- A. 受精後5日目のゼブラフィッシュ仔魚における小さく透明な脳
 B. トランスジェニック系統 (elavl3:GCaMP5G) を用いたイメージング結果の例。前視蓋に様々な視野の動き (オプティックフロー) に反応する神経細胞が存在することが、全脳・大規模イメージングから明らかになった¹¹⁾。一つひとつの点はオプティックフロー反応細胞で、色は動きの向きに対するチューニングを示す。
 C. 各種モデル生物の脳を構成する神経細胞の数。ゼブラフィッシュは脊椎動物モデル生物のなかでも小型な脳を持つ。

が、そのほかの解析対象外の脳領域で起こる現象については調べることはできない。したがって、詳細な解析は可能であるが全体を俯瞰することができない、言わば「木を見て森を見ず」の状態になってしまう。また逆に、ヒト脳の計測によく用いられる fMRI などの脳機能イメージングは、脳全体の活動を調べることはできるものの、空間解像度が低いと個々の神経細胞レベルを同定することはできず、「森を見て木を見ず」の状態となってしまう。

このような状況のなか、解析範囲と解像度のせめぎ合いを解消し、「木も森も見」ことを可能とするのがゼブラフィッシュの脳である。ゼブラフィッシュの脳は小型であり、受精後5-7日目のゼブラフィッシュ仔魚の脳は、800 μm (前後方向) × 450 μm (左右方向) × 320 μm (背腹方向) 程度であり、脳を構成する神経細胞の数は約 10 万個と非常に少ない。この数は、マウスと比べて約千分の一の少なさである。更に、ゼブラフィッシュ脳は透明であるため、光学的なイメージングを用いるのに適している。これらの特徴から、脳

機能イメージングの解像度を高く保ったまま、この解析を脳全体に適用することができるのである (図)。また、ゼブラフィッシュの脳は、脊椎動物間で広く保存された基本脳構造 (前脳、中脳、後脳) を持つため、ヒトをはじめとする脊椎動物の脳機能の理解に役立つ可能性が高い。

Ⅲ ゼブラフィッシュにおける全脳イメージング技術

一般的に、神経活動を可視化するためには、カルシウムイオン濃度の変化を神経活動の指標とし、GCaMP などのカルシウムセンサーを顕微鏡を用いてイメージングする方法が用いられる。ゼブラフィッシュ仔魚の脳は小型で透明であるため、生きたままの動物で脳全体にわたってこのようなカルシウムイメージングを行うことができる。ゼブラフィッシュの脳は脊椎動物のなかでは非常に小さいものの、脳の厚みは数百 μm 程度に及ぶため、脳深部のイメージングを行うことができる 2 光子顕微鏡がよく用いられる¹⁾。あるいは、薄いシート状の光を照射することによって、

厚みのある脳の一部分のみをイメージングできるライトシート顕微鏡が利用される(当技術は2014年のNature methods 誌のMethod of the yearに選ばれた)。ライトシート顕微鏡は撮影速度が速いため、ゼブラフィッシュの脳であれば脳全体を1秒当たりおよそ2回イメージングすることができる²⁾。つまり、脳のあらゆる部位に存在する神経細胞の活動を約2 Hzで記録することができる。多くの場合、ゼブラフィッシュのからだをアガロースなどで保定した状態でイメージングが行われるが、より最近では、水中を自由に遊泳しているゼブラフィッシュの全脳イメージングを行う技術も開発されている。この技術は、自由遊泳下のゼブラフィッシュを追跡することのできるシステムを用いて、ゼブラフィッシュ脳を常に顕微鏡の視野内に持ってくることにより、自由遊泳中における全脳イメージングを行うものである³⁻⁵⁾。ゼブラフィッシュが保定されている状況では、行動パターンに制約が生じてしまうが、このような自由遊泳下全脳イメージング技術を用いることで、より自然な行動下での解析が可能となる。

IV ゼブラフィッシュ全脳イメージングから明らかになった知見

以上のようなゼブラフィッシュの全脳イメージングの技術は、過去約10年の間にわたって多くの研究に用いられてきている。一般的にゼブラフィッシュにおける全脳イメージングでは、GCaMPなどのカルシウムセンサーは脳内のすべての神経細胞に広く発現され、注目する感覚刺激や特定の行動に対して活動を示す細胞を相関解析により同定する。こうすることにより、特定の神経細胞をバイアスをかけず、もれなく網羅的に探し出すことができる。このような言わばスクリーニングにも似たアプローチは、仮説に縛られることなく、従来予想もしていなかった神経細胞群の関与をあぶり出すことが可能であり、実際に脊椎動物の脳機能に関する新たな知見につながっている。例えば、ゼブラフィッシュが静止状態にあるときの自発的な脳活動状態、視覚・前庭感覚・温度感覚などの様々な感覚の情報処理、またこれら感覚情報に対して適切な反応を選択する際

の行動制御などが、全脳イメージングによって明らかにされてきている。本稿ではこのような研究成果の代表例として、“動きの視覚情報処理”との“脳の内的状態(internal state)”の2点について議論する。紙幅の都合上、ゼブラフィッシュの全脳イメージングの成果を網羅的に紹介することはできないため、この点については既に出版されている総説を参照されたい⁶⁾。

1. 動きの視覚情報処理

ゼブラフィッシュは仔魚期から視覚が極めて発達しており、様々な行動が視覚に依存している。このような視覚依存的行動の一つとして、視野の動きに反応する行動が知られる。動物が空間中を動くとき、まわりの視野は自分自身の動きとは反対方向へ流れるようにして動く。このような視覚情報はオプティックフロー(optic flow)と呼ばれ、オプティックフローを感知することで、自分自身の動きを推定することができる。更に、オプティックフローは、視覚のプレを打ち消すように、自分自身の動きを補正する運動を引き起こす。つまり、自己運動によって生じた視覚上の誤差を、眼球やからだ全体を動かすことによって打ち消すため、運動中においても視野を安定化したり、身体的位置を空間中のある一点に保持したりすることができる。魚類においては、オプティックフローが時計回り・反時計回りに回転する際には、眼球が回転する反応であるoptokinetic response (OKR) がみられ、一方でオプティックフローが前後方向に並進する場合は遊泳行動(optomotor response: OMR) がみられる。OKRとOMRは、経験によらず生得的に現れ再現性が高いことから、視覚機能に異常を示す変異体をスクリーニングするための有用なアッセイとして古くから用いられてきた⁷⁻⁹⁾。しかしながら、OKRとOMRに関与する神経ネットワークは長い間明らかになっていなかった。特に、オプティックフロー刺激が回転するか並進するかという動きのパターンの違いが、どのような神経回路を介してOKRとOMRというそれぞれ異なる行動を生み出しているのかは未解明であった。

そこで、Portugessらおよび筆者らは、このような回転性・並進性オプティックフローの情報処

理を担う神経回路を同定するために、カルシウムイメージングにより大規模な神経活動の記録を行った^{10,11)}。回転性・並進性オプティックフローを呈示すると同時に、数千個ものニューロンの反応性を調べたところ、視覚をつかさどる脳領域の一つである前視蓋 (pretectum) に回転性あるいは並進性のどちらかのみに選択的に反応する神経細胞が存在することがわかった。つまり、前視蓋は回転性・並進性オプティックフローの違いを区別する神経基盤として働き得ることが明らかになった。このようなしくみは、過去の研究では見過ごされており、大規模イメージングによって網羅的に解析することによって初めてこのような特殊な機構が明らかになったと言える。

更にその後、回転性・並進性オプティックフローの反応性解析を前視蓋だけでなく、全脳にまで広げた研究がなされ、オプティックフローの反応性は、前視蓋神経ネットワークの下流に位置する後脳領域において、より行動に密接した情報へと変換されることが明らかになった¹²⁾。これら一連の研究から、オプティックフロー情報処理をつかさどる、前視蓋から後脳に至る神経ネットワークの全貌が個々の細胞レベルで明らかになった。近年、マウスでも同様にオプティックフローに反応する神経ネットワークの全脳解析が行われているが、より大型のマウス脳の全体をイメージングするために、2光子イメージングと比べてより脳深部へ透過しやすい超音波を用いたイメージングが用いられている¹³⁾。しかしながら、この超音波イメージングの空間解像度は 100 μm 程度であるため、個々の細胞を同定することが難しく、このような手法によって得られる知見は脳領域レベルでの理解にとどまっている。したがって、ゼブラフィッシュ研究から得られた知見は、脊椎動物におけるオプティックフロー情報処理の最も精密なモデルを提唱することに成功していると言える。

2. 脳の内的状態

動物が餌を捕獲する際には、長距離にわたって広い範囲を移動しながら餌を探す探索行動 (exploration) と、逆に狭い領域にとどまりながらその局所的な範囲内で得られる餌を捕獲する活用行動 (exploitation) がみられる。動物はこの“探

索”と“活用”を交互に繰り返すことによって、効率よく採餌行動を調節する行動戦略をとっている。探索と活用の両者は、同時に両立しないトレードオフの関係にあり、それぞれの行動状態は脳の異なる内部状態 (internal state) に支えられていると考えられている。Li らは、採餌行動下のゼブラフィッシュが実際に“探索”と“活用”の2つの行動状態を交互に移り変わることを見だし、その際の脳活動を自由遊泳下の全脳イメージングを用いて解析することに成功した¹⁴⁾。その結果、“探索”と“活用”、更に2つの状態を行き来する“遷移状態 (transition)”に対応して活性化する神経細胞群が存在し、これらの神経細胞群はそれぞれの内部状態を表していると考えられた。特に、活用状態においては背側縫線核 (dorsal raphe nucleus) のセロトニン作動性ニューロンが特異的に活動していた。また、遷移状態では手綱核 (habenula) が活性化しており、手綱核は背側縫線核に投射することから、手綱核-背側縫線核経路は活用状態を開始するトリガーとして働く可能性が示唆された。

V 全脳イメージング技術の限界と今後の展望

全脳イメージングは、前述のように、特定の感覚情報処理や行動制御を行う際に活性化する神経細胞を網羅的に、また仮説フリーに同定することができる大きな利点がある。その一方で欠点もあり、それは、神経活動イメージング自体は特定の現象と神経活動との相関関係を明らかにするに過ぎず、両者の因果関係を示すことはできないという点である。両者に因果関係があるかどうかを検証するためには、細胞消失実験や光遺伝学手法などを用いて、イメージングによって同定した神経細胞群に操作を加え、その結果を検証する必要がある。更に、神経細胞群がどこから神経入力を受けて、どこへ神経出力を送るのか、という解剖学的な神経接続を調べることも重要であり、近年ゼブラフィッシュ仔魚で整備が進んでいる解剖学的データベース^{15,16)}との統合を検討する必要がある。したがって、全脳イメージングの結果は、神経回路の機能操作実験や解剖学的解析によって補

完されることで、神経ネットワークのしくみを理解するうえでより確かな証拠となる。

従来、全脳イメージングは、カルシウムセンサーを用いて神経細胞の活動を可視化する方法が最も一般的であるが、最近はその応用範囲に広がりを見せている。例えば、脳には神経細胞だけではなくグリア細胞も存在しており、全脳カルシウムイメージングをグリア細胞に適用する研究が報告されている。興味深いことに、グリア細胞が“締め行動”に関与することが報告されている¹⁷⁾。また、カルシウムセンサーだけでなく、膜電位センサー¹⁸⁾や種々の神経伝達物質センサーなどの多様なセンサーが開発されており、これらを用いることによってカルシウムイメージングでは明らかにすることができない、より詳細な神経発火タイミングや神経伝達物質の関与などが徐々に明らかになりつつある。

おわりに

脊椎動物で唯一、ゼブラフィッシュで可能である脳全体イメージング技術は、これまで重要な脳機能の解明に貢献しており、そして今、更なる応用範囲の広がりをみせている。この技術を用いた新たな解析から、ヒトの脳機能の理解に資する更なる先導的な研究が展開されることが期待される。

●文 献

- 1) Ahrens MB, Li JM, Orger MB et al : *Nature*. **485** : 471-477, 2012
- 2) Ahrens MB, Orger MB, Robson DN et al : *Nat Methods*. **10** : 413-420, 2013
- 3) Kim DH, Kim J, Marques JC et al : *Nat Methods*. **14** : 1107-1114, 2017
- 4) Symvoulidis P, Lauri A, Stefanoiu A et al : *Nat Methods*. **14** : 1079-1082, 2017
- 5) Cong L, Wang Z, Chai Y et al : *Elife*. **6** : e28158, 2017
- 6) Loring MD, Thomson EE, Naumann EA : *Curr Opin Neurobiol*. **65** : 88-99, 2020
- 7) Brockerhoff SE, Hurley JB, Janssen-Bienhold U et al : *Proc Natl Acad Sci U S A*. **92** : 10545-10549, 1995
- 8) Neuhauss SC, Biehlmaier O, Seeliger MW et al : *J Neurosci*. **19** : 8603-8615, 1999
- 9) Muto A, Orger MB, Wehman AM et al : *PLoS Genet*. **1** : e66, 2005
- 10) Portugues R, Feierstein CE, Engert F, Orger MB : *Neuron*. **81** : 1328-1343, 2014
- 11) Kubo F, Hablitzel B, Dal Maschio M et al : *Neuron*. **81** : 1344-1359, 2014
- 12) Naumann EA, Fitzgerald JE, Dunn TW et al : *Cell*. **167** : 947-960.e20, 2016
- 13) Macé É, Montaldo G, Trenholm S et al : *Neuron*. **100** : 1241-1251.e7, 2018
- 14) Marques JC, Li M, Schaak D et al : *Nature*. **577** : 239-243, 2020
- 15) Kunst M, Laurell E, Mokayes N et al : *Neuron*. **103** : 21-38.e5, 2019
- 16) Hildebrand DGC, Cicconet M, Torres RM et al : *Nature*. **545** : 345-349, 2017
- 17) Mu Y, Bennett DV, Rubinov M et al : *Cell*. **178** : 27-43.e19, 2019
- 18) Abdelfattah AS, Kawashima T, Singh A et al : *Science*. **365** : 699-704, 2019