



2023年2月2日

報道関係者各位

慶應義塾大学

一対の神経細胞が一生の“泳ぎ”のリズムを生み出し続ける！？

慶應義塾大学大学院 理工学研究科の修士1年 内海円花、同大学理工学部の岡浩太郎教授、堀田耕司准教授らは、カタユレイボヤ発生初期のリズミカルな自発運動を生み出す一対の運動神経細胞が、発生に伴い7段階の神経活動変化を示すことを明らかにしました。

歩行や遊泳といったリズミカルな運動パターンは、脊髄に位置する中枢パターン生成器 (CPG) によって生成されています。しかし、この回路を司る個々の神経細胞の動態や、リズミカルな神経活動を担う CPG 回路の形成機構は未だ解明されていません。

本研究では、脊椎動物に最も近縁であり、細胞系譜※1 や幼生期における全神経接続情報が判明しているカタユレイボヤを用いて、この謎に迫りました。カタユレイボヤの遊泳幼生は、尾部の筋肉を左右交互に収縮させることで尾を振って泳ぐことができます。我々の先行研究から、ホヤ後期尾芽胚期での初期運動行動である Early Tail Flick (ETF) のリズムは、運動神経節にある左右一対の運動神経細胞 MN2 によって生成されることがわかりました (Akahoshi *et al.*, 2021)。しかし、この研究では孵化前 (St. 24) までの MN2 の神経応答を観察したにすぎず、MN2 が遊泳幼生期以降における尾を左右に振る際のリズムの生成に関わっているかどうかは不明でした。

本研究では、左右 MN2 のカルシウム応答の長時間計測に成功し、その発火間隔や同期・非同期などを基準にして、MN2 の発火パターンは7つのフェーズに分けられることを示しました。フェーズⅢまでに MN2 のリズムは数十秒周期に収束すること、フェーズⅤから左右の MN2 のリズムが同期し始めること、フェーズⅥでは周期が伸びること、最後に、変態により尾部が退縮して運動が停止し神経活動が必要なくなったフェーズⅦにおいても、MN2 は発火し続けました。これにより、ホヤの尾が動き始めてから、遊泳運動を経て、尾がなくなる時までの、遊泳幼生の一生における尾の運動を MN2 が制御し続けていることが示唆されました。本研究成果は、CPG 回路の形成過程の解明に寄与する重要な発見と期待されます。

研究成果は、2023年1月13日にスイスの科学誌『*Frontiers in Cell and Developmental Biology*』にオンライン掲載されました。

1. 研究の背景

歩行や遊泳、咀嚼といったリズミカルな運動パターンは、脊髄に位置する中枢パターン生成器 (Central Patterning Generator ; CPG) によって生成されています。ハーフセンター仮説 (Brown, 1911) によると、CPG は運動神経・介在神経・抑制性交連神経から構成されると考えられており、運動神経細胞がリズム生成に寄与していることが示唆されています (図1)。

遊泳運動時のリズミカルなバースト※2 を生成する機能に関しては、多くの動物の CPG 回路を用いて研究が進められています。しかし、CPG 回路が実際に発生する過程を見た先行研究はなく、この回路を司る個々の神経細胞の動態や、リズミカルな神経活動を生み出すに至る CPG 回路の形成機構は未だ解明されていません。

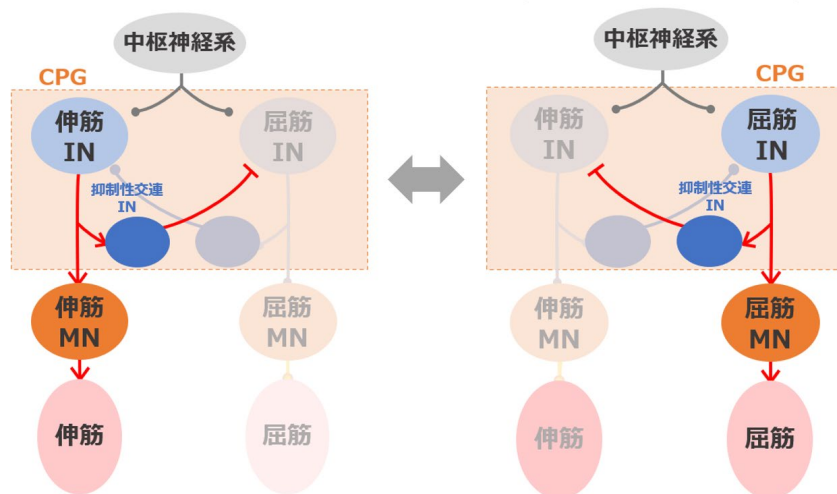


図1 ハーフセンター回路

中枢パターン生成器 (CPG) のハーフセンター仮説 (Brown, 1911) に基づくハーフセンター回路。運動神経 (例: 伸筋 MN/屈筋 MN)・介在神経 (例: 伸筋 IN/屈筋 IN)・抑制性交連神経 (IN) から構成される。伸筋が活動するときは、抑制性交連神経を介して反対の屈筋側が抑制される。このパターンを交互に繰り返すことでリズム運動が生まれると考えられている。

本研究では、脊椎動物に最も近縁であり、細胞系譜や幼生期における神経接続情報が明らかにされている尾索動物カタユレイボヤを用いてこの謎に迫りました。カタユレイボヤの遊泳幼生は、受精後わずか 18 時間で得られ、尾部の筋肉を左右交互に収縮させることで尾を振って泳ぐことができます。また、その神経系はたった 330 個の神経細胞から成り、神経回路の発生を 1 細胞レベルで解析できるという利点があります。以上の理由から、カタユレイボヤは神経系の発生をその活動とともに調べるのに非常に適した実験動物であると言えます。

当研究グループは、先行研究において、ホヤ後期尾芽胚期での初期運動行動である Early Tail Flick (ETF) のリズムは、ホヤ運動神経節に左右一対ある運動神経細胞 MN2 によって生成され、発生が進むにしたがって 1 度の ETF が MN2 の複数の膜電位スパイクからなる 1 バーストに対応することを明らかにしました (Akahoshi *et al.*, 2021)。この MN2 は、単離した状態でもメトロノームのように一定の周期で発火することができる非常に興味深い運動神経細胞です。しかし、先行研究では、孵化前 (St. 24) までの MN2 の神経応答を観察したに過ぎず、MN2 が孵化後の遊泳幼生期においても尾を振るリズムの生成を司っているのかどうかは不明でした。そこで、本研究では左右 MN2 神経活動の長時間計測に挑戦し、ホヤの尾が動き始めてから変態時に退縮するまでの尾の運動は MN2 により制御し続けているのかどうか検証しました。

2. 研究の概要

まず、ホヤ胚を背側下向きに固定することで左右 MN2 の神経応答を同時に撮影する新たな手法を考案しました (図 2)。この手法を用いて、カルシウム (Ca^{2+}) センサー GCaMP6s を導入したホヤ胚を長時間撮影し、ホヤが後期尾芽胚期から孵化を経て遊泳幼生となり、その後尾部退縮するまでの間の MN2 のカルシウム応答を計測しました。

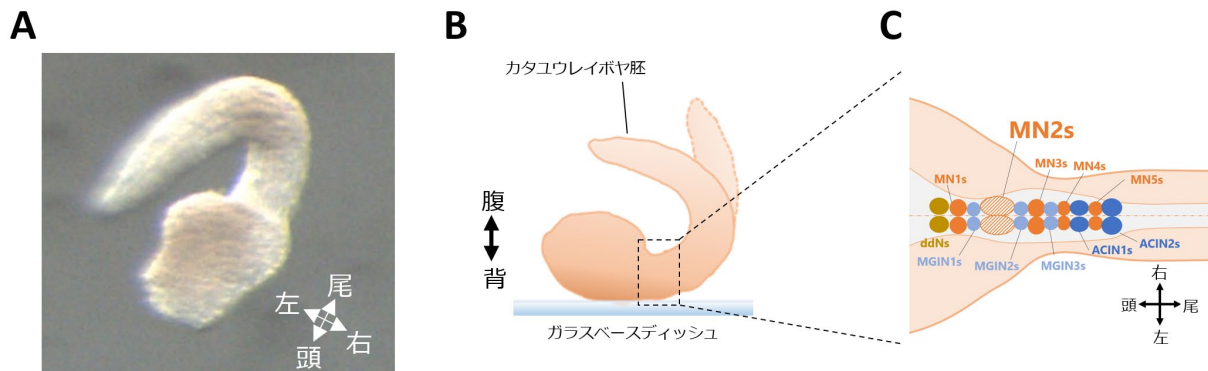


図2 カタユウレイボヤ遊泳幼生の運動神経細胞のある背側からの観察

A、B：ガラスベースディッシュに背側を下向きにして貼り付けられたカタユウレイボヤ遊泳幼生胚。
C：運動を司るホヤ運動神経節 (MG)。その中でもひと際大きく側方に位置する運動細胞が MN2 である。

その結果、左右 MN2 のカルシウム発火動態は7つのフェーズに分けられました。

- フェーズ I： 尾芽胚期において、左右 MN2 それぞれのカルシウム発火動態は、散発的かつ非同期的でした (St. 22～)。
- フェーズ II： 発生が進むにつれて右 MN2 は左 MN2 に先行して数分の周期でバーストし始め (フェーズ II、N=13/17)、遅れて左 MN2 も同様に周期的にバーストを開始しました。
- フェーズ III： 続いて、左右 MN2 は非同期のまま、いずれの周期も数分から数十秒へと収束しました (St. 24～)。
- フェーズ IV： 左右 MN2 の周期的なカルシウム発火は稀に同期するようになりました。
- フェーズ V： 遊泳幼生期から左右 MN2 の周期的なカルシウム発火が完全に同期しました (St. 27～)。
- フェーズ VI： 遊泳幼生期での発生が進むにつれて周期がフェーズ V よりも長くなり、尾の運動のタイミングと一致しました。
- フェーズ VII： 最終的に、運動が停止する変態 (尾部退縮) 期においても左右 MN2 は同期したまま発火を続けていましたが、その周期は散発的になることがわかりました (St. 31～)。

以上発生に伴う MN2 神経活動変化 7 つのフェーズは尾部運動の変化と対応していたことから、MN2 が長期的にホヤ尾部運動の司令塔として働き、ホヤ遊泳幼生の一生の“泳ぎ”のリズムを生み出し続けることが示唆されました。

フェーズ IV～V で同期現象が生じ、(左右交互に尾の筋肉を繰り出す) CPG 回路が成熟する点は、シミュラリティ生物学※3 の観点からは非常に興味深いです。この時どのような神経回路ができあがったかを調べることは、今後 CPG 回路形成機構の謎を解くカギとなると考えられます (図 3、4)。

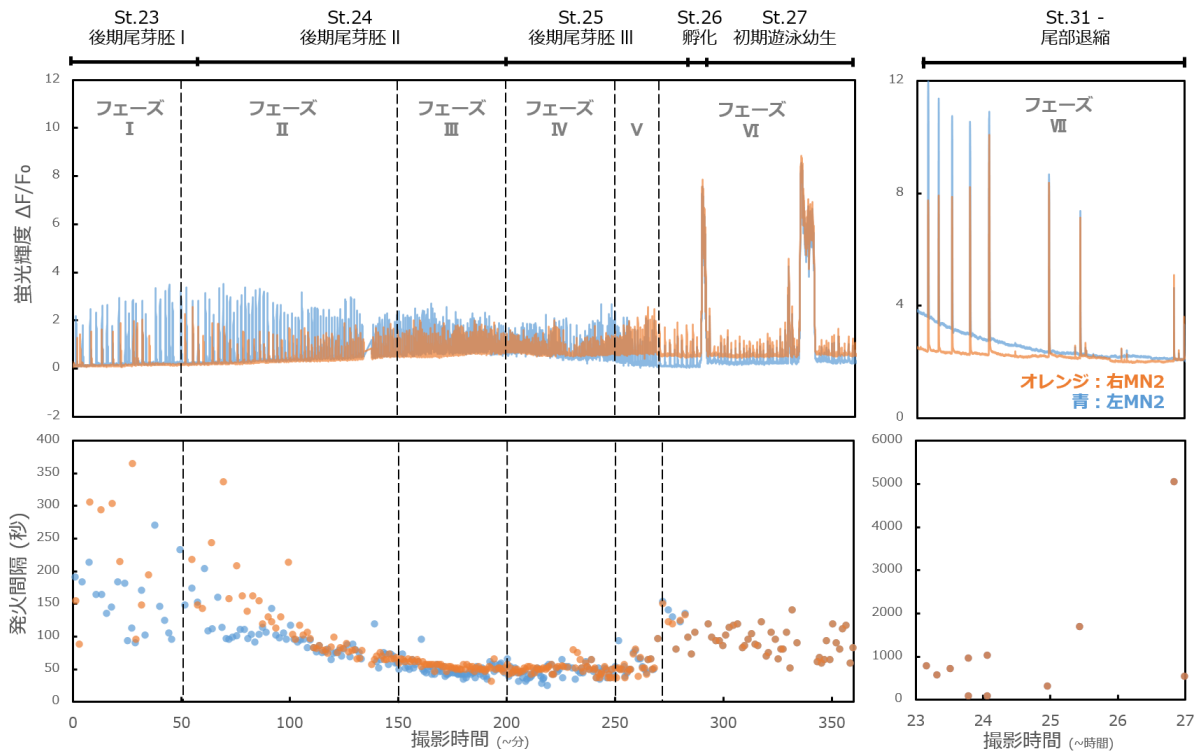


図3 左右 MN2 のカルシウム発火動態の長時間計測結果

カルシウムセンサーGCaMP6sを導入し、左右 MN2 のカルシウム発火動態を長時間イメージングした。センサーの蛍光輝度をもとに発火動態（上段）と発火間隔（下段）をグラフ化した。

	尾芽胚				遊泳幼生				付着	尾部退縮
	St.22 中期 尾芽胚 II	St.23 後期 尾芽胚 I	St.24 後期 尾芽胚 II	St.25 後期 尾芽胚 III	St.26 孵化	St.27 初期 遊泳幼生	St.28 中期 遊泳幼生	St.29 後期 遊泳幼生	St.30 付着	St.31- 尾部退縮
時間 (hpf)	10.9	11.9	13.5	15.9	17.5	17.5- 20	20-22	22-24	24-27	27- (18℃)
フェーズ	フェーズ I	フェーズ II	フェーズ III	フェーズ IV	フェーズ V	フェーズ V	フェーズ VI	フェーズ VI	フェーズ VII	フェーズ VII
発生ステージ	St.22 ~		St.24 ~			St.27 ~			St.31 ~	
Ca ²⁺ 発火の 周期	散発的	収束する	周期一定で発火する							散発的
発火周期の例	ランダム	2分から40 秒へと収束	40 秒				3 分		ランダム	
左右MN2の 発火同期性	非同期			稀に同期		完全に同期				
尾の動き	動かない		初期運動行動 (ETFs)			遊泳運動			動かない	

図4 左右 MN2 の神経活動は発火の周期や左右の同期性をもとに7つのフェーズで変化していく

最後に、MN2 が遊泳幼生期においても尾の筋肉を直接制御しているのかどうかを検証しました。オプトジェネティクス※4 を用いて左右別々に MN2 神経細胞をレーザーにより刺激したところ、右 MN2 を刺激したときは右の筋肉のみ収縮し、左 MN2 を刺激したときは左の筋肉のみ収縮することが明らかになりました。この結果から、遊泳幼生期においても、MN2 は同側の筋収縮の制御を直接担う重要な神経細胞であることが示唆されました (図 5)。

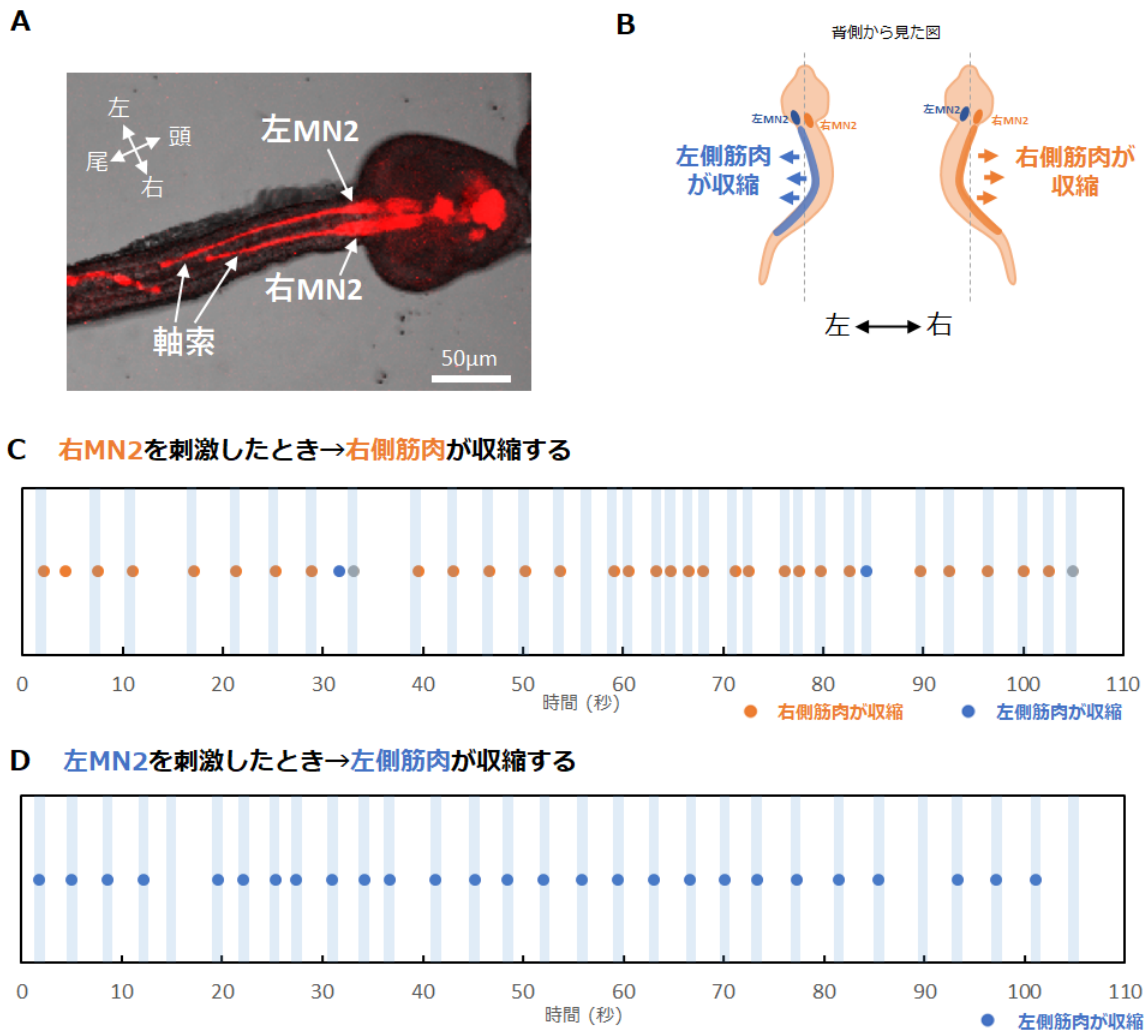


図 5 オプトジェネティクスによる左右 MN2 の個別刺激

A : 赤蛍光を発するチャンネルロドプシンを導入したカタユウレイボヤ遊泳幼生胚。

B、C、D : MN2 に照準を絞ってレーザー光照射により直接刺激すると、ターゲットの MN2 のみ任意に刺激できる。左右それぞれの MN2 を刺激した結果、右 MN2 を刺激したときは右の筋肉のみ収縮し、左 MN2 を刺激したときは左の筋肉のみ収縮することが明らかになった。レーザー照射して刺激したタイミングは C、D において水色の帯で示されている。

3. 今後の展望

本研究により、運動神経細胞 MN2 は、孵化後の遊泳幼生期においても継続的にホヤ尾部運動を直接制御していることが示唆されたことから、MN2 はホヤ遊泳運動を司る CPG 回路における重要な因子であると考えられます。しかし、7つのフェーズがどのように切り替わっているのかというメカニズムは未だ謎に包まれています。今後の展望として、発生過程を通じて MN2 が左右交互の発火をどのように生み出しているのかという点に注目して研究を進めることで、CPG 回路の形成過程が解明されることを願っています。

4. 謝辞

本研究で用いたカタユウレイボヤは、文部科学省ナショナルバイオリソースプロジェクト (NBRP) から提供を受けました。

- 京都大学 大学院理学研究科 生物科学専攻 佐藤ゆたか 准教授
- 東京大学 大学院理学系研究科 生物科学専攻 吉田学 准教授

本研究の一部は、以下の研究助成の支援を受けて実施されました。

- JSPS 科研費：21H00440

<原論文情報>

【題名】 Transitions of motor neuron activities during *Ciona* development (カタユウレイボヤ運動神経の発生に伴う活動変化)

【著者名】 Madoka K. Utsumi, Kotaro Oka and Kohji Hotta*

【掲載誌】 *Frontiers in Cell and Developmental Biology*

【論文 URL】 <https://doi.org/10.3389/fcell.2023.1100887>

【DOI】 10.3389/fcell.2023.1100887

<参考文献>

Akahoshi, T., Utsumi, M. K., Oonuma, K., Murakami, M., Horie, T., Kusakabe, T. G., et al. (2021). A single motor neuron determines the rhythm of early motor behavior in *Ciona*. *Sci. Adv.* 7 (50), eabl6053.

<https://www.science.org/doi/10.1126/sciadv.abl6053>

Brown, T. G. (1911). The intrinsic factors in the act of progression in the mammal. *Proceedings of The Royal Society B: Biological Sciences (The Royal Society)*, 84(572), 308-319.

<https://doi.org/10.1098/rspb.1911.0077>

<用語説明>

※1 細胞系譜…細胞がどのように分裂して将来どのような細胞になるかを記したもの。

※2 バースト…1つのまとまった時間に複数の連続的な神経発火がみられること。

※3 シンギュラリティ生物学…ヒトの知能を人工知能が凌駕する技術的特異点「シンギュラリティ」(臨

界)」のように、生命現象において臨界をもたらす「シンギュラリティ細胞」に着目した生物学のこと。(シンギュラリティ生物学 - 文部科学省 科学研究費助成事業 新学術領域研究 (2018～2022年度) (singularity-bio.jp))

※4 オプトジェネティクス…光遺伝学。光でタンパク質機能を制御する手法のこと。

※ご取材の際には、事前に下記までご一報くださいますようお願い申し上げます。

※本リリースは文部科学記者会、科学記者会、各社科学部等に送信させていただいております。

・研究内容についてのお問い合わせ先

慶應義塾大学 理工学部 生命情報学科 准教授 堀田耕司 (ほったこうじ)

TEL : 045-566-1700 FAX : 045-566-1789 E-mail : khotta@bio.keio.ac.jp

・本リリースの配信元

慶應義塾広報室 (望月)

TEL : 03-5427-1541 FAX : 03-5441-7640

E-mail : m-pr@adst.keio.ac.jp <https://www.keio.ac.jp/>