

脊椎動物の運動システムの発達

平田 普三

多くの動物は動く、つまり運動する。成体の運動システムについては基礎科学、臨床医学、スポーツ科学の研究が精力的に進められ、多くの知見が蓄積されている。その一方で、神経回路が未熟な胎児期、幼児期を通じて、運動システムがどう形成され、どう発達していくのかについては不明の点が多かった。筆者らは脊椎動物の運動システムの形成と発達の分子基盤とそれが破綻するとどうなるのかを、受精から2日で成体（成魚）なみの運動能力を獲得するゼブラフィッシュを材料にして研究を進めてきた。本稿では胚期の未熟な神経回路による個々の不安定な神経出力を補正する仕組みや適正レベルの抑制性グリシン作動性シナプス伝達の重要性など、運動システムの形成・発達とその分子基盤を概説する。

1. はじめに

動物とは動く生き物と書く。たしかに、多くの動物は出生後、生きるために自ら動く。では、動物はどうやって動くのか？ その答えは当たり前だが、神経が指令を出して筋が収縮して動く、である。神経系と筋からなる脊椎動物の運動システムは出生前の胎児期（胚期）に形成され、胚期から幼児期にかけて発達し、成体でこれを維持してさらに鍛える。ヒトや他の哺乳動物の運動システムについては、これまで主に成体個体やその損傷モデルを用いて研究が進められ、多くの生理的知見が得られてきた^{1,2)}。しかし、胎児期の運動は哺乳動物では盛んでなく、発生過程を通じて運動システムが機能的にどのように獲得されていくのかは解析しにくかった。他の脊椎動物ヤツメウナギやサンショウウオ、カエルなどを用いた生理学研究からも運動システム、特に運動リズム生成回路の理解が進んできたが³⁻⁵⁾、遺伝学的手法の制約から分子基盤の解明は容易ではなかった⁶⁾。筆者らはゼブラフィッシュの変異体を足がかりに、脊椎動物の運動システムの分子基盤の研究を進めてきた。ゼブラフィッシュの変異体が運動障害の新しい疾

患モデルとなることもわかり、本研究は治療や創薬を視野に入れた運動障害治療の研究に発展することも期待される。

2. ゼブラフィッシュ

ゼブラフィッシュはインドのガンジス川支流のコシ川で発見された青色と銀色の縞模様をもつ熱帯魚として、1822年に報告されている⁷⁾。コイ目コイ科に属し、学名は *Danio rerio* である⁸⁾。日本のペットショップではゼブラ・ダニオという通称で、1尾100円程度で観賞用に売られている。ゼブラフィッシュ研究の開祖である故 George Streisinger 博士（1927～1984）は脊椎動物モデルとしてのゼブラフィッシュの有用性をいち早く見抜き、1970年代にオレゴン大学で飼育システムを確立し、ゼブラフィッシュ遺伝学の基礎を築いた⁹⁾。変異原ENU (*N*-ethyl-*N*-nitrosourea) を用いた変異体作製が可能なることから初期発生や器官形成の研究に使われるようになり¹⁰⁾、ドイツのチュービンゲンとアメリカのボストンで同時期に行われた大規模変異体スクリーニングが1996年の *Development* 誌に発表されて以降は発生学の実験動物として急速に広まった¹¹⁻¹³⁾。胚期、稚魚期は体が透明で、またメラニン形成細胞や虹色素胞といった色素を欠く透明な成魚系統も作られたことで、あらゆるステージで生体内イベントをライブイメージングすることが可能となり、現在では、神経科学、免疫学、腫瘍学などあらゆる分野で有用性が増している¹⁴⁻¹⁶⁾。従来から胚

国立遺伝学研究所（〒411-8540 静岡県三島市谷田 1111）
Motor development in vertebrates
Hiromi Hirata (National Institute of Genetics, 1111 Yata,
Mishima, Shizuoka 411-8540, Japan)
本総説は2011年度奨励賞を受賞した。

期、稚魚期の一過的遺伝子機能阻害実験が可能な脊椎動物として使われてきたが²⁷⁾、ゲノム編集の幅が広がり^{18~26)}、生命科学実験材料としてはショウジョウバエや線虫を補完し、マウスに次ぐモデル脊椎動物として期待されている。

3. ゼブラフィッシュの運動発達

哺乳動物は胎生であり、胎児期（受精から出産まで）はヒトでは266日、マウスでは19日である。ゼブラフィッシュは卵生なので、胚期を厳密に定義することは難しいが、受精から2~3日で孵化することや、主要な内臓器官が3日以内に形成されることから、胚期は2~3日とされ、発生はきわめて早いといえる（図1）²⁷⁾。受精後9時間には筋や骨の前駆体である体節の形成が始まり、17時間には胚は自発的運動を始める²⁸⁾。これはメトロノームのように尾部を体の左右に振る運動であり、ヒトの胎動に相当すると考えられている。24時間までに胚は侵害刺激に应答して尾を左右に振る逃避運動をするようになる（図2A）^{28~30)}。このことからゼブラフィッシュでは受精から1日以内に、感覚ニューロン→介在ニューロン→運動ニューロン→筋から成る一連の運動神経回路が機能的に形成されることがわかる。

ゼブラフィッシュの逃避運動は発生が進むと複雑かつ効果的になり、反転と泳動の二つの成分に明確に区別できるようになる。2日齢のゼブラフィッシュに侵害刺激を与えると、まず刺激から遠ざかる向きに体を大きく反転させ、続いて尾を左右に30 Hzで振る泳動が見られる（図2B）^{28~30)}。成魚が逃避する時も体を反転させた後に尾を30 Hzで振り泳動することから、ゼブラフィッシュは受精から2日以内に成魚並みの運動能力を獲得するといえる。これらのことから、ゼブラフィッシュは運動システムの形成と発達を研究するのに適した脊椎動物であると考えられる。

4. ゼブラフィッシュの運動異常変異体

筆者らは受精1~2日のゼブラフィッシュをピンセットでつついて侵害刺激を与えた時に見られる逃避運動をひたすら観察するスクリーニングを行い、運動に異常のあるゼブラフィッシュ変異体を単離した³¹⁾。その際、外見上の異常を伴うものを除外することで、発生は正常だが、運動システムに異常のあるものだけを効率よく得ることができた。これらの変異体は感覚ニューロン、介在ニューロン、運動ニューロン、神経筋接合部、筋のいずれかに異常があると予想される³²⁾。

ここで、ゼブラフィッシュの逃避運動における刺激から逃避までの情報の流れを説明しよう。頭部への侵害刺激は頭部の感覚ニューロンである三叉神経感覚ニューロンが、

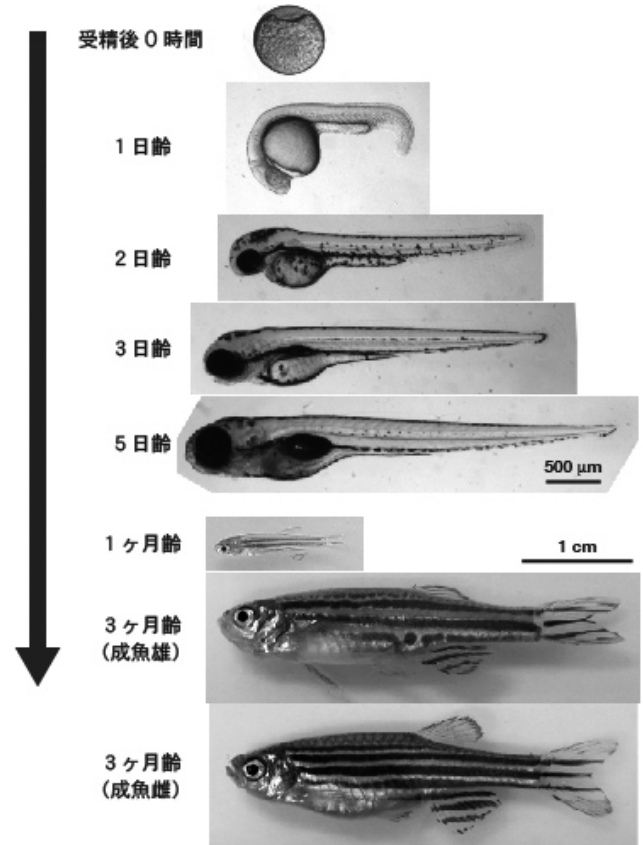


図1 ゼブラフィッシュの発生・成長の過程

ゼブラフィッシュは受精後から活発に分裂して、1日齢までに頭部と尾部が区別できる形態に発生する。球状の組織は卵囊であり、胚に栄養分を供給しつつ小さくなり、5日で消失する。3ヶ月で成魚になり、交配可能になる。

胴部尾部への刺激は一次感覚ニューロンである Rohon-Beard ニューロンが受容し^(註1)、どちらも後脳や脊髄の介在ニューロンに情報を伝達する³³⁾。介在ニューロンの一部は逃避の開始時に刺激方向から体を反転させるのにはたらく。後脳の第4菱脳領域に左右一対のみ存在する Mauthner 細胞はその代表格で、侵害刺激を受けると、刺激入力側の Mauthner 細胞が活動し、反対側の運動ニューロンを一齐に活動させて反対側の胴部尾部の筋を一齐に収縮させることで、逃避開始時に刺激方向から体を遠ざけるように反転させる運動をトリガーする³⁴⁾。介在ニューロンの他の一部はリズム生成回路を形成し、これが体の左右に並ぶ運

注1: Rohon-Beard ニューロンは発生期の魚類や両生類の神経管背側部に一過的に存在する一次感覚ニューロンで、発生が進むと細胞死を起こして消滅する^{36~38)}。その頃までには神経堤由来の後根神経節ニューロンが分化し、Rohon-Beard ニューロンに代わり一次感覚ニューロンとして機能するようになる。Rohon-Beard ニューロンをもたない哺乳動物でも胚期に細胞死で消滅するニューロンが神経管背側部に存在し、Rohon-Beard ニューロンの進化的痕跡と考えられている。

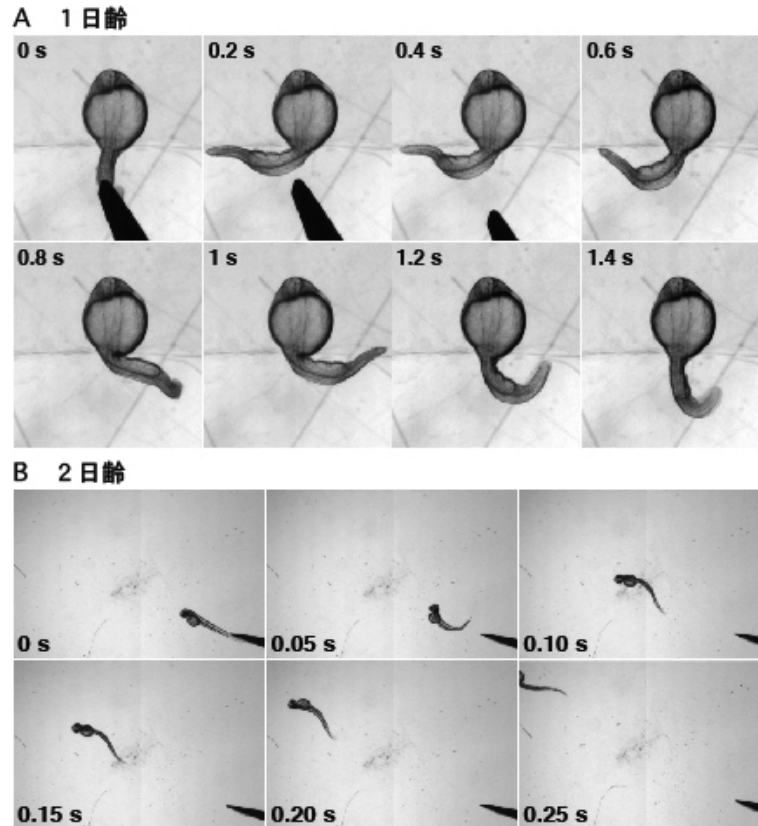


図2 ゼブラフィッシュの運動

(A) 1日齢のゼブラフィッシュの運動。

1日齢のゼブラフィッシュに侵害刺激を与えると、尾を左右に振る運動をする。頭部から卵嚢までをアガロースゲルに埋めて、尾部の動きを見やすくしている。図では胴部に刺激を与えているが、頭部への刺激でも同じ運動が見られる。

(B) 2日齢のゼブラフィッシュの運動。

2日齢のゼブラフィッシュに侵害刺激を与えると、泳いで逃げる。図ではゼブラフィッシュの尾部左側に刺激を与えているが、まず体を右側に大きく屈曲させて反転し、その後泳動を行い前方へ逃げる。

動ニューロン群を交互に一定時間活性化することで、体を反転させた後に尾を左右に振る運動、すなわち泳動が可能になる³⁵⁾。ここでは同側、反対側、両側という体の左右の話をしているので、運動ニューロンはそれぞれ同側の骨格筋に投射し、同側の筋収縮を指示することを強調しておく(図3)。以下で変異体を分類し、運動神経回路の理解につながる変異体について説明しよう。

5. 感覚ニューロン

ゼブラフィッシュをピンセットでつついても侵害刺激に応答しない、つまり逃避運動をしない変異体が複数単離された。しかし、逃避運動をしない変異体には、例えば筋のアクチンを欠損して全く動かないものもありうるので、感覚ニューロンに異常があるというためには、それ以下の経路、すなわち介在ニューロン、運動ニューロン、筋が(完全に正常でなくてもある程度)正常に機能しうることを示

さなくてはならない。一般に、円形の水槽をゆすって水流を作ると、ゼブラフィッシュは流されないように水流に逆らって泳ぐ。この時、側線器官(魚類および一部の両生類の頭部や体側の皮膚に並ぶ機械刺激受容器)の一次感覚ニューロンが水流を検知し、介在ニューロン以下の運動回路をはたらかせることが知られている³⁹⁾。筆者らが単離した侵害刺激に応答しない変異体はいずれも水流に流されないように泳ぐことが可能で、側線感覚受容と介在ニューロン以下の回路は正常に機能しうる。このことは、変異体は泳動能力を有しており、侵害刺激を受容する一次感覚ニューロンである三叉神経感覚ニューロンやRohon-Beardニューロンに主要な異常があることを示唆している。

筆者らのこれまでの解析から、神経活動、特にニューロンの電気的特性の異常は、Rohon-Beardニューロンの活動異常として現れやすいことがわかっている。電位依存性ナトリウムチャンネルは膜電位が閾値を超える時に活性化され

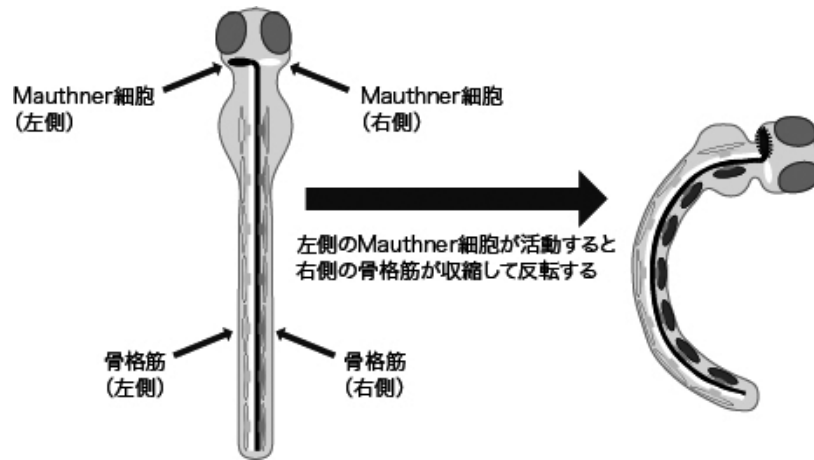


図3 Mauthner細胞による逃避の誘導

ゼブラフィッシュの後脳には一対の Mauthner 細胞がある。侵害刺激が体の左側に入ると、左側の Mauthner 細胞が活動する。Mauthner 細胞の軸索は体の左右の正中線を越えて反対側に尾部に向けて下降し、反対側にある運動ニューロンを直接活性化する。左側の Mauthner 細胞が活動すると右側の運動ニューロンが活性化され、右側の骨格筋が収縮するので、体は右に反転することになる。これは刺激から体を遠ざける動きになるので、きわめて単純な運動神経回路を用いて逃避運動を行っているといえる。

るナトリウムチャンネルであり、軸索起始部やランビエ絞輪に局在し、活動電位の生成や伝達に必須である⁴⁰⁾。電位依存性ナトリウムチャンネルの一つである Nav1.6 の変異体では Rohon-Beard ニューロンのナトリウム電流が減少する^{41,42)}。Rohon-Beard ニューロンを含めて多くのニューロンは複数の電位依存性ナトリウムチャンネルを発現するので、Nav1.6 を欠損してもナトリウム電流は完全には欠失せず減少するだけだが、Rohon-Beard ニューロンでのナトリウム電流の減少は膜興奮性の低下を起しやすく、ひいては変異体の侵害刺激への顕著な応答低下という表現型として現れやすい^{43~45)}。

侵害刺激に応答しない他の変異体では、GPI アンカータンパク質の膜アンカー反応に関わる小胞体内の酵素である GPI トランスアミダーゼのサブユニット PIG-U に変異が同定された^{46,47)}。PIG-U の変異体ではすべての GPI アンカータンパク質が膜にアンカーされないはずだが、不思議なことに変異体では明らかな発生異常は観察されなかった。

Rohon-Beard ニューロンの電気生理特性を調べると、やはりナトリウム電流が低下しており、侵害刺激に応答しないことが説明できた。抗電位依存性ナトリウムチャンネル抗体を用いた免疫染色を行うと、電位依存性ナトリウムチャンネルは正常個体では膜表出して軸索起始部に集積するが、変異体では膜表出がほとんど見られず軸索起始部への集積も消失しており、電位依存性ナトリウムチャンネル分子の輸送・局在に PIG-U が関与することが明らかになった。電位依存性ナトリウムチャンネルは膜貫通タンパク質であり GPI アンカータンパク質ではないことから、GPI トランス

アミダーゼの直接の基質ではないので、何らかの GPI アンカータンパク質を介した電位依存性ナトリウムチャンネルの輸送・局在機構が存在すると考えられる。これは GPI アンカータンパク質が細胞内のタンパク質の選別輸送に関わることを示唆する発見であり、そのメカニズムの解明が待たれる。

6. 介在ニューロン

神経系の化学シナプスにはグルタミン酸作動性に代表される興奮性シナプスと、GABA 作動性、グリシン作動性の抑制性シナプスがある。抑制性シナプスのうち、GABA 作動性シナプスは前脳・中脳に多く、記憶や情動を制御するのに対し、グリシン作動性シナプスは脳幹・脊髄に多く、呼吸や運動を制御する⁴⁸⁾。筆者らは抑制性グリシン作動性シナプスが運動制御、とくに逃避運動における反転と運動リズムの生成に重要であることを見いだした。

6-1 グリシン受容体

グリシン受容体 (GlyR) は α サブユニット (GlyR α) 2 分子と β サブユニット (GlyR β) 3 分子から成るヘテロ五量体で、ポストシナプス領域に局在する^{49~52)}。プレシナプス末端からシナプス間隙に放出されるグリシンがリガンドとしてグリシン受容体に結合すると細胞内に Cl⁻ イオンが流入し、一般的には細胞の膜電位を低下させる、つまり過分極させることでニューロンの活動を抑制する⁵³⁾。ただし、胎児期の未熟なニューロンでは細胞内部には Cl⁻ イオンが多く、グリシン作動性シナプス伝達は Cl⁻ イオンが流

出、つまり脱分極に作用する⁵⁴⁾。もっとも、これは電位依存性ナトリウムチャンネルが活性化される電位閾値よりも低いレンジで起こるため、グリシン作動性シナプス伝達はニューロンの成熟・未成熟を問わず、活動電位の発生を抑えることに寄与する。

筆者らは逃避運動時に体を硬直させる変異体を単離し、GlyR β の変異を同定した⁵⁵⁾。GlyR β を欠く個体では、GlyR α だけから成るホモ五量体が形成され、これがグリシンをリガンドとしてClイオンを透過させるGlyRとして機能することがわかった。正常個体のGlyR ($\alpha 2\beta 3$ ヘテロ五量体)はシナプスに局在するが、GlyR β 変異体で形成されるGlyR ($\alpha 5$ ホモ五量体)はシナプスに局在せず、ニューロンの表面に広く分布していた(図4A, B)。プレシナプス末端からのグリシンの放出はシナプス部位だけで起こるので、変異体では抑制性グリシン作動性シナプス伝達は消失していた。逃避の開始時にはMauthner細胞が活動するが、この時、刺激入力側のMauthner細胞だけが活動し、反対側のMauthner細胞は活動せず、これが体の反転を可能にする。この際、反対側のMauthner細胞はグリシン作動性入力を受けて抑制される。GlyR β 変異体ではこの抑制が効かないために左右両側のMauthner細胞が活動し、左右両側の運動ニューロンを同時に活動させるため、体の反転ができない(図4C)。さらに反転の後にリズム生成回路が機能して尾を左右に振る泳動をする際にもグリシン作動性シナプス伝達は運動ニューロンを興奮から抑制に素早く切り替えることに関与しており、グリシン作動性シナプス伝達を欠く変異体では運動ニューロンの興奮が過度に亢進することで左右両側の運動ニューロンが活動し、左右両側の(結果的には全身の)筋を過度に収縮させるので、GlyR β 変異体は身をすくめて硬直するような異常運動をする。GlyRの阻害剤であるストリキニーネをゼブラフィッシュに作用させても、GlyR β 変異体で見られるのと全く同じ硬直が観察されることから、抑制性グリシン作動性シナプス伝達が運動制御に重要であることが確認される³²⁾。ヒトでもGlyR α やGlyR β の変異はhyperekplexia(俗称:ビックリ病)という、突然の触刺激や音に驚いた時に飛び上がったたりするなどおおげさに応答し、筋硬直する(体の姿勢を維持できず転倒することもある)驚愕反射を引き起こすことが知られている⁵⁶⁻⁵⁹⁾。

6-2 グリシントランスポーター

グリシントランスポーター(GlyT)にはGlyT1とGlyT2の二つがあり、前者はアストロサイトに発現してシナプス間隙に放出されたグリシンを取り込みグリシン作動性シナプス伝達を素早く終わらせるのに対し、後者はグリシンを放出するニューロンのプレシナプス末端に発現し、放出したグリシンを取り込んで再利用することで、グリシン作動

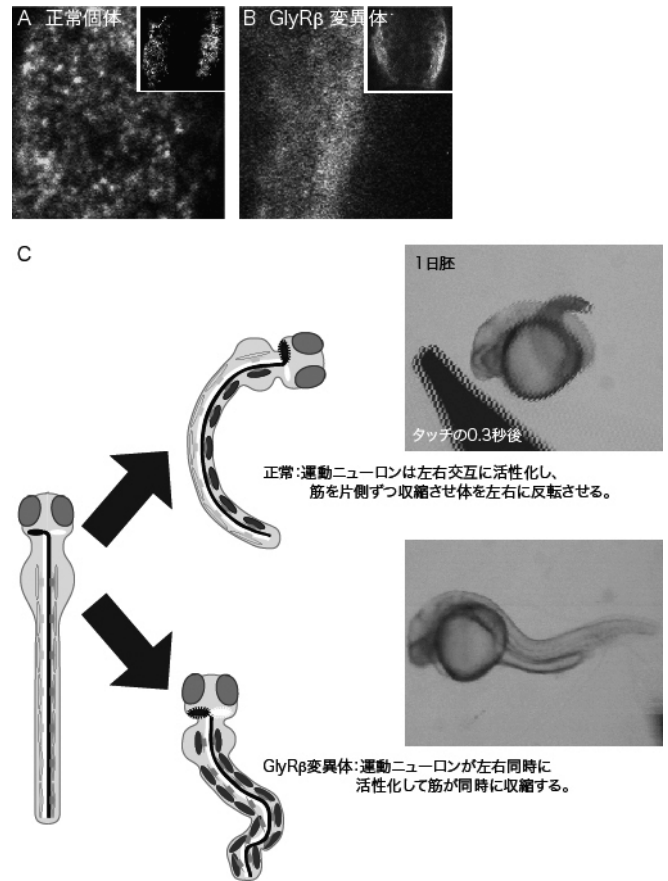


図4 GlyR β 変異体

(A, B) グリシン受容体のシナプス局在。ゼブラフィッシュの脊髄を抗グリシン受容体抗体で免疫染色すると、脊髄の外側部が標識されるが(右上)、染色像を拡大するとクラスター状のシグナルが観察され、グリシン作動性シナプスがラベルされていることがわかる。GlyR β 変異体でも脊髄外側部にシグナルが見えるが、拡大してもクラスター状の染色は見られず、グリシン受容体タンパク質がシナプスに局在していない。

(C) GlyR β 変異体の運動異常。

正常な個体は、左側から侵害刺激を受けると左側のMauthnerニューロンが活動し、右側の運動ニューロンが活動して体を右側に反転させる運動をする。しかし、GlyR β 変異体では、刺激時に運動ニューロンが左右同時に活性化して左右の筋が同時に収縮する。全身の筋が一斉に収縮することになり、背側に反り体を硬直させる異常運動をする。

性シナプス伝達の繰り返しに寄与する⁶⁰⁻⁶³⁾。大雑把に言えば、GlyT1とGlyT2はグリシン作動性シナプス伝達をそれぞれ負と正に制御する。GlyT1の変異体は侵害刺激に应答して体を少し曲げるだけで、尾を左右に振る、あるいは反転して泳動するという逃避運動をしなかった⁶⁴⁾。この変異体ではグリシンがシナプス間隙に蓄積し、グリシン作動性シナプス伝達が亢進していた。実際、GlyT1変異体の神経管に物理的に穴をあけて神経管内腔液を生理食塩水で還流してシナプス間隙のグリシンを減らすと逃避運動の回復が見られた。同様にGlyT1の変異体に低濃度のストリキ

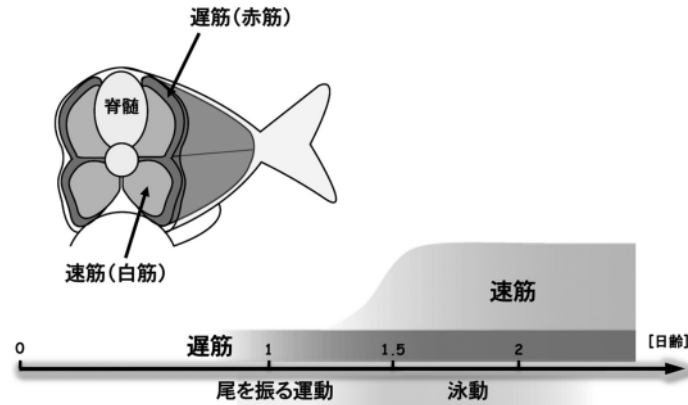


図5 遅筋と速筋

骨格筋には遅筋と速筋があり、ゼブラフィッシュでは存在部位が違う。遅筋は体表直下で薄い層を形成するのに対し、速筋は深部に広く位置する。サケの切り身を思い浮かべるとわかりやすいが、皮のすぐ内側にある、いわゆる濃い色の筋が遅筋であり、表面から深い位置にある筋が速筋である。ゼブラフィッシュの1日胚の逃避運動は遅筋のみで行う。一方、2日齢の逃避開始時の反転や泳動は主に速筋で行う。したがって、遅筋駆動型から速筋駆動型への切り替えがゼブラフィッシュの運動発達過程で重要だといえる。

ニーネを作用させるとグリシン作動性シナプス伝達が正常レベルに下がり、逃避運動の回復が見られた。したがって、GlyT1の変異体ではグリシン作動性シナプス伝達の亢進により、Mauthner細胞や運動ニューロンが過度に抑制され、逃避運動が低下したことがわかった。GlyRB変異体、GlyT1変異体の解析から、グリシン作動性シナプス伝達は少なくとも多くても具合が悪く、ほどほどのレベルであることが運動に必要なといえる。

7. 神経筋接合部・筋

運動に異常のある変異体の約半数は神経筋接合部、あるいは筋に異常のある変異体であった⁶⁵⁾。これらは神経筋接合部のアセチルコリン受容体の局在に異常のあるもの⁶⁶⁾、筋内部で活動電位をCa放出に変換する機構(興奮収縮関連)に異常のあるもの^{67,68)}、アクチン・ミオシン線維に異常のあるもの⁶⁹⁾に大別される。本稿は逃避運動を制御する神経回路に焦点を当てているので、これら筋の変異体については大きく割愛するが、発生期の不安定な神経活動を筋で補正して安定した逃避運動を可能にする機構にはふれておきたい。

一般に脊椎動物の成体の骨格筋は代謝や収縮特性の異なる二つの筋、遅筋(=赤筋)と速筋(=白筋)に大別される^{70,71)}。遅筋は持続力に優れるのに対し、速筋は瞬発力に優れ、スポーツ科学の研究から、マラソン選手では遅筋が発達し、短距離選手では速筋が鍛えられていることが知られている⁷²⁾。ヒトの筋組織では遅筋線維と速筋線維はモザイク状に均等分布しているが、魚類の筋では遅筋線維は体表直下に局在し、速筋線維は深部に位置している(図5)。

筆者らが単離した筋異常変異体の中には、遅筋だけに異常のあるもの、速筋だけに異常があるものが得られ、前者では遅筋の収縮力が低下し、1日齢の運動は低下するが、2日齢までに回復し、それ以降の逃避運動は正常に見られた。一方、後者では速筋の収縮力が低下するが、1日齢の尾を振る運動は正常で、2日齢以降の泳動速度の低下が見られた。このことからゼブラフィッシュは運動発達過程で遅筋駆動型から速筋駆動型に運動を変化させ、このことが1日齢の尾を振る運動から2日齢の泳動へと切り替えるプロセスに重要であることがわかった⁶⁹⁾。遅筋に異常がある変異体の一つで、筋に発現するコネクシン(connexin 39.9)の変異が同定され、ギャップ結合による遅筋間の連絡が1日胚の運動に重要であることが示唆された。詳細な解析から、運動ニューロンから筋への入力の一つ一つは、運動神経回路が未熟な1日胚では実は散発的で、正常個体においてもある筋細胞は入力を受けるが、ある筋細胞は入力を受けない状態が起きていることがわかった(図6)⁷³⁾。個々の筋細胞への入力は不安定だが、近隣の筋細胞同士がギャップ結合で電気的入力を分けあうので、筋全体として安定な入力を得られるというわけである。従来、分化した筋にはギャップ結合はないとされてきたが⁷⁴⁾、筋に発現するコネクシンが近年発見され、筋が電気的に結合していることが示唆されてきた⁷⁵⁻⁷⁷⁾。筋のギャップ結合が運動発達期の未熟な神経系からの入力を補正するという筆者らの発見は、筋のギャップ結合の生理機能を初めて明らかにしたものである。

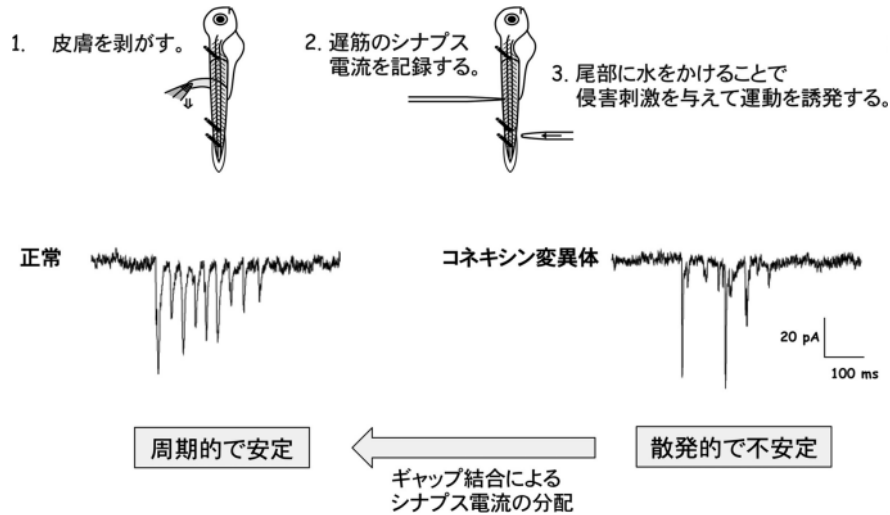


図6 ギャップ結合によるシナプス電流の分配

シナプス電流を *in vivo* で記録する実験ではまず、ゼブラフィッシュをシリコンディッシュ上で極細ピンで磔にして皮膚を剥がして、筋を露出させる。パッチクランプ法で遅筋の筋電位やシナプス電流を記録することができる。尾部に水流をかけて侵害刺激を与えると逃避を誘発することが可能で、運動時のシナプス電流の経時変化を記録することができる。筋のコネキシンを欠く変異体ではシナプス電流（神経から筋への入力）が散発的で、この時期の入力がもともと不安定であることがわかる。しかし、実際には筋細胞間にギャップ結合が形成されており、シナプス電流が近隣細胞間で平均化されるので各筋細胞は安定した入力を受けることになる。

8. おわりに

脊椎動物がどのように運動システムを獲得し、それを発達させていくのか、という質問に本質的に答えるためには、神経回路が未熟な胚期から高度な運動が可能になる時期までの神経回路と筋の理解が欠かせない。この過程がわずか2日間で完成するゼブラフィッシュを研究材料に使うことで、筆者らは運動システムの発達の分子基盤の解明に取り組んできた。運動神経回路が正しく機能するためにはニューロン間のグリシン作動性シナプスが重要で、シナプス伝達が多すぎても少なすぎても運動異常を引き起こすことはわかったが、抑制性のグリシン作動性シナプス伝達だけで全てを説明できるはずもなく、他のシナプス、特に興奮性シナプス伝達が運動システムの発達にどう関わるか、ニューロンの成熟に伴う発火特性の変化がどう影響するかなど、今後の研究で運動システム発達のさらなる理解を進めたい。

最後に、運動発達の研究以外でもゼブラフィッシュは実験材料として使いやすい脊椎動物であることを強調しておきたい。*in vitro* 転写合成したRNAや合成アンチセンスオリゴ（カスタム注文して35,000円程度）を受精卵にインジェクションすることで過剰発現、機能阻害の実験を簡便に行い、あらゆる手持ちの遺伝子の機能を、*in vivo* でアッセイできる¹⁷⁾。近年、TILLING, zinc-finger nuclease,

TALLEN（人工ヌクレアーゼ）といった新技術によるノックアウトゼブラフィッシュの作製、トランスポゾンやレトロウイルスを用いた挿入欠失個体の作製法が確立し、さらにCre-loxP組換えが利用できることが確認されるなど、ゼブラフィッシュでのゲノム改変の技術革新は急速に進んでいる^{18~26)}。このことは、成体（成魚）を用いた研究の幅が広がることにつながるだろう。魚類を用いた実験に興味のない方にも、今後、脊椎動物を用いた *in vivo* 実験としてゼブラフィッシュを都合良く使ってもらえればと思っている。

謝辞

本研究は筆者が博士研究員として在籍したミシガン大学分子細胞発生生物学科、助手・助教として在籍した名古屋大学大学院研究科、そして現所属である国立遺伝学研究所新分野創造センターにおいて行われたものです。研究の機会と場を与えてくださったアドバイザーのJohn Y. Kuwada教授、小田洋一教授、川上浩一教授、一緒に研究をしてくださった学生・研究員の皆様に心より御礼申し上げます。

文 献

- 1) Goulding, M. (2009) *Nat. Rev. Neurosci.*, 10, 507–518.

- 2) Yuste, R., MacLean, J.N., Smith, J., & Lansner, A. (2005) *Nat. Rev. Neurosci.*, **6**, 477–483.
- 3) Chevallier, S., Jan Ijspeert, A., Ryczko, D., Nagy, F., & Cabelguen, J.M. (2008) *Brain Res. Rev.*, **57**, 147–161.
- 4) Grillner, S. (2003) *Nat. Rev. Neurosci.*, **4**, 573–586.
- 5) Roberts, A. (2000) *Brain Res. Bull.*, **53**, 585–593.
- 6) Kullander, K. (2005) *Trends Neurosci.*, **28**, 239–247.
- 7) Hamilton, F. (1822) in *An Account of the Fishes Found in the River Ganges and Its Branches*, Printed for A. Constable and company, Edinburgh.
- 8) Meyer, A., Biermann, C.H., & Orti, G. (1993) *Proc. Biol. Sci.*, **252**, 231–236.
- 9) Stahl, F.W. (1985) *Genetics*, **109**, 1–2.
- 10) Grunwald, D.J. & Streisinger, G. (1992) *Genet. Res.*, **59**, 103–116.
- 11) Driever, W., Solnica-Krezel, L., Schier, A.F., Neuhauss, S.C., Malicki, J., Stemple, D.L., Stainier, D.Y., Zwartkruis, F., Abdelilah, S., Rangini, Z., Belak, J., & Boggs, C. (1996) *Development*, **123**, 37–46.
- 12) Grunwald, D.J. & Eisen, J.S. (2002) *Nat. Rev. Genet.*, **3**, 717–724.
- 13) Haffter, P., Granato, M., Brand, M., Mullins, M.C., Hamerschmidt, M., Kane, D.A., Odenthal, J., van Eeden, F.J., Jiang, Y.J., Heisenberg, C.P., Kelsh, R.N., Furutani-Seiki, M., Vogelsang, E., Beuchle, D., Schach, U., Fabian, C., & Nusslein-Volhard, C. (1996) *Development*, **123**, 1–36.
- 14) Wenner, M. (2009) *Nat. Med.*, **15**, 1106–1109.
- 15) White, R.M., Sessa, A., Burke, C., Bowman, T., LeBlanc, J., Ceol, C., Bourque, C., Dovey, M., Goessling, W., Burns, C.E., & Zon, L.I. (2008) *Cell Stem Cell*, **2**, 183–189.
- 16) Zhang, L., Alt, C., Li, P., White, R.M., Zon, L.I., Wei, X., & Lin, C.P. (2012) *J. Int. Soc. Analyt. Cytol.*, **81**, 176–182.
- 17) Nasevicius, A. & Ekker, S.C. (2000) *Nat. Genet.*, **26**, 216–220.
- 18) Doyon, Y., McCammon, J.M., Miller, J.C., Faraji, F., Ngo, C., Katibah, G.E., Amora, R., Hocking, T.D., Zhang, L., Rebar, E. J., Gregory, P.D., Urnov, F.D., & Amacher, S.L. (2008) *Nat. Biotech.*, **26**, 702–708.
- 19) Foley, J.E., Maeder, M.L., Pearlberg, J., Joung, J.K., Peterson, R.T., & Yeh, J.R. (2009) *Nat. Protocols*, **4**, 1855–1867.
- 20) Huang, P., Xiao, A., Zhou, M., Zhu, Z., Lin, S., & Zhang, B. (2011) *Nat. Biotech.*, **29**, 699–700.
- 21) Kawakami, K., Takeda, H., Kawakami, N., Kobayashi, M., Matsuda, N., & Mishina, M. (2004) *Dev. Cell*, **7**, 133–144.
- 22) Meng, X., Noyes, M.B., Zhu, L.J., Lawson, N.D., & Wolfe, S. A. (2008) *Nat. Biotech.*, **26**, 695–701.
- 23) Sander, J.D., Cade, L., Khayter, C., Reyon, D., Peterson, R.T., Joung, J.K., & Yeh, J.R. (2011) *Nat. Biotech.*, **29**, 697–698.
- 24) Sivasubbu, S., Balciunas, D., Davidson, A.E., Pickart, M.A., Hermanson, S.B., Wangenstein, K.J., Wolbrink, D.C., & Ekker, S.C. (2006) *Mech. Dev.*, **123**, 513–529.
- 25) Wang, D., Jao, L.E., Zheng, N., Dolan, K., Ivey, J., Zonies, S., Wu, X., Wu, K., Yang, H., Meng, Q., Zhu, Z., Zhang, B., Lin, S., & Burgess, S.M. (2007) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **104**, 12428–12433.
- 26) Wienholds, E., Schulte-Merker, S., Walderich, B., & Plasterk, R.H. (2002) *Science*, **297**, 99–102.
- 27) Kimmel, C.B., Ballard, W.W., Kimmel, S.R., Ullmann, B., & Schilling, T.F. (1995) *Dev. Dyn.*, **203**, 253–310.
- 28) Saint-Amant, L. & Drapeau, P. (1998) *J. Neurobiol.*, **37**, 622–632.
- 29) Downes, G.B. & Granato, M. (2006) *J. Neurobiol.*, **66**, 437–451.
- 30) Pietri, T., Manalo, E., Ryan, J., Saint-Amant, L., & Washbourne, P. (2009) *Dev. Neurobiol.*, **69**, 780–795.
- 31) Hirata, H., Saint-Amant, L., Waterbury, J., Cui, W., Zhou, W., Li, Q., Goldman, D., Granato, M., & Kuwada, J.Y. (2004) *Development*, **131**, 5457–5468.
- 32) Granato, M., van Eeden, F.J., Schach, U., Trowe, T., Brand, M., Furutani-Seiki, M., Haffter, P., Hamerschmidt, M., Heisenberg, C.P., Jiang, Y.J., Kane, D.A., Kelsh, R.N., Mullins, M.C., Odenthal, J., & Nusslein-Volhard, C. (1996) *Development*, **123**, 399–413.
- 33) Drapeau, P., Saint-Amant, L., Buss, R.R., Chong, M., McDearmid, J.R., & Brustein, E. (2002) *Prog. Neurobiol.*, **68**, 85–111.
- 34) Korn, H. & Faber, D.S. (2005) *Neuron*, **47**, 13–28.
- 35) Fetcho, J.R., Higashijima, S., & McLean, D.L. (2008) *Brain Res. Rev.*, **57**, 86–93.
- 36) Hughes, A. (1957) *J. Anatomy*, **91**, 323–338.
- 37) Metcalfe, W.K., Myers, P.Z., Trevarrow, B., Bass, M.B., & Kimmel, C.B. (1990) *Development*, **110**, 491–504.
- 38) Meyer, W. (1977) *Experientia*, **33**, 319–321.
- 39) Whitfield, T.T. (2005) *Curr. Biol.*, **15**, R67–70.
- 40) Cantrell, A.R. & Catterall, W.A. (2001) *Nat. Rev. Neurosci.*, **2**, 397–407.
- 41) Low, S.E., Zhou, W., Choong, I., Saint-Amant, L., Sprague, S. M., Hirata, H., Cui, W.W., Hume, R.I., & Kuwada, J.Y. (2010) *Dev. Neurobiol.*, **70**, 508–522.
- 42) Wright, M.A., Mo, W., Nicolson, T., & Ribera, A.B. (2010) *Development*, **137**, 3047–3056.
- 43) Novak, A.E., Jost, M.C., Lu, Y., Taylor, A.D., Zakon, H.H., & Ribera, A.B. (2006) *J. Mol. Evol.*, **63**, 208–221.
- 44) Novak, A.E., Taylor, A.D., Pineda, R.H., Lasda, E.L., Wright, M.A., & Ribera, A.B. (2006) *Dev. Dyn.*, **235**, 1962–1973.
- 45) Pineda, R.H., Heiser, R.A., & Ribera, A.B. (2005) *J. Neurophysiol.*, **93**, 3582–3593.
- 46) Nakano, Y., Fujita, M., Ogino, K., Saint-Amant, L., Kinoshita, T., Oda, Y., & Hirata, H. (2010) *Development*, **137**, 1689–1698.
- 47) Kinoshita, T., Fujita, M., & Maeda, Y. (2008) *J. Biochem.*, **144**, 287–294.
- 48) Moss, S.J. & Smart, T.G. (2001) *Nat. Rev. Neurosci.*, **2**, 240–250.
- 49) Grenningloh, G., Pribilla, I., Prior, P., Multhaup, G., Beyreuther, K., Taleb, O., & Betz, H. (1990) *Neuron*, **4**, 963–970.
- 50) Grenningloh, G., Rienitz, A., Schmitt, B., Methfessel, C., Zensen, M., Beyreuther, K., Gundelfinger, E.D., & Betz, H. (1987) *Nature*, **328**, 215–220.
- 51) Grudzinska, J., Schemm, R., Haeger, S., Nicke, A., Schmalzing, G., Betz, H., & Laube, B. (2005) *Neuron*, **45**, 727–739.
- 52) Langosch, D., Thomas, L., & Betz, H. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**, 7394–7398.
- 53) Lynch, J.W. (2004) *Physiol. Rev.*, **84**, 1051–1095.
- 54) Ben-Ari, Y. (2002) *Nat. Rev. Neurosci.*, **3**, 728–739.
- 55) Hirata, H., Saint-Amant, L., Downes, G.B., Cui, W.W., Zhou, W., Granato, M., & Kuwada, J.Y. (2005) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **102**, 8345–8350.
- 56) Gastaut, H. (1967) *Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol.*, **23**, 494–495.
- 57) Gundlach, A.L., Dodd, P.R., Grabara, C.S., Watson, W.E., Johnston, G.A., Harper, P.A., Dennis, J.A., & Healy, P.J. (1988) *Science*, **241**, 1807–1810.

- 58) Ryan, S.G., Buckwalter, M.S., Lynch, J.W., Handford, C.A., Segura, L., Shiang, R., Wasmuth, J.J., Camper, S.A., Schofield, P., & O'Connell, P. (1994) *Nat. Genet.*, **7**, 131–135.
- 59) Shiang, R., Ryan, S.G., Zhu, Y.Z., Hahn, A.F., O'Connell, P., & Wasmuth, J.J. (1993) *Nat. Genet.*, **5**, 351–358.
- 60) Eulenburg, V., Arnsen, W., Betz, H., & Gomeza, J. (2005) *Trends Biochem. Sci.*, **30**, 325–333.
- 61) Gomeza, J., Hulsmann, S., Ohno, K., Eulenburg, V., Szoke, K., Richter, D., & Betz, H. (2003) *Neuron*, **40**, 785–796.
- 62) Gomeza, J., Ohno, K., Hulsmann, S., Arnsen, W., Eulenburg, V., Richter, D.W., Laube, B., & Betz, H. (2003) *Neuron*, **40**, 797–806.
- 63) Tsai, G., Ralph-Williams, R.J., Martina, M., Bergeron, R., Berger-Sweeney, J., Dunham, K.S., Jiang, Z., Caine, S.B., & Coyle, J.T. (2004) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 8485–8490.
- 64) Cui, W.W., Low, S.E., Hirata, H., Saint-Amant, L., Geisler, R., Hume, R.I., & Kuwada, J.Y. (2005) *J. Neurosci.*, **25**, 6610–6620.
- 65) Hirata, H., Carta, E., Yamanaka, I., Harvey, R.J., & Kuwada, J. Y. (2009) *Front. Mol. Neurosci.*, **2**, 26.
- 66) Saint-Amant, L., Sprague, S.M., Hirata, H., Li, Q., Cui, W.W., Zhou, W., Poudou, O., Hume, R.I., & Kuwada, J.Y. (2008) *Dev. Neurobiol.*, **68**, 45–61.
- 67) Hirata, H., Watanabe, T., Hatakeyama, J., Sprague, S.M., Saint-Amant, L., Nagashima, A., Cui, W.W., Zhou, W., & Kuwada, J.Y. (2007) *Development*, **134**, 2771–2781.
- 68) Zhou, W., Saint-Amant, L., Hirata, H., Cui, W.W., Sprague, S. M., & Kuwada, J.Y. (2006) *Cell Calcium*, **39**, 227–236.
- 69) Naganawa, Y. & Hirata, H. (2011) *Dev. Biol.*, **355**, 194–204.
- 70) Burke, R.E., Levine, D.N., Tsairis, P., & Zajac, F.E., 3rd (1973) *J. Physiol.*, **234**, 723–748.
- 71) Close, R.I. (1972) *Physiol. Rev.*, **52**, 129–197.
- 72) Oldfors, A. & Lamont, P.J. (2008) *Adv. Exp. Med. Biol.*, **642**, 78–91.
- 73) Hirata, H., Wen, H., Kawakami, Y., Naganawa, Y., Ogino, K., Yamada, K., Saint-Amant, L., Low, S.E., Cui, W.W., Zhou, W., Sprague, S.M., Asakawa, K., Muto, A., Kawakami, K., & Kuwada, J.Y. (2012) *J. Biol. Chem.*, **287**, 1080–1089.
- 74) Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., & Walter, P. (2002) in *Molecular Biology of the Cell*, 4th ed., Garland Science, New York.
- 75) Belluardo, N., Trovato-Salinaro, A., Mudo, G., & Condorelli, D.F. (2005) *Cell Tissue Res.*, **320**, 299–310.
- 76) von Maltzahn, J., Euwens, C., Willecke, K., & Sohl, G. (2004) *J. Cell Sci.*, **117**, 5381–5392.
- 77) Sohl, G., Nielsen, P.A., Eiberger, J., & Willecke, K. (2003) *Cell Commun. Adhes.*, **10**, 27–36.
-