

令和2年度 博士学位論文

# Neuronal Circuits That Control Rhythmic Pectoral Fin Movements in Zebrafish

ゼブラフィッシュにおける胸びれリズム運動を  
制御する神経回路の解析

Uemura Yuto

植村 悠人

Division of Biological Science  
Graduate School of Science,  
Nagoya University

名古屋大学大学院 理学研究科 生命理学専攻

## 【目次】

要旨	1
序論	3
手法	6
結果	12
考察	24
図と図の説明	30
参考文献	52
謝辞	58

## 【要旨】

陸上を移動する多くの四足脊椎動物は、歩行を行う為に左右の四肢を協調させて動かしている。そして四肢は歩行に必要な運動を適切に行う為に、多数の屈筋と伸筋を協調させて動いている。この歩行運動は生存に必須で基本的な運動であり、100年以上研究されている。これまでの研究により歩行に必要な屈筋-伸筋の協調や、左右の四肢の協調は脊髄内の神経回路によってつくられることが明らかにされた。しかしながら、歩行に必要なこれらの協調を制御する神経回路メカニズムは非常に複雑であり、未だに完全には解明できていない。

私は進化的に前肢の相同器官であるゼブラフィッシュの胸びれに着目して、付属肢（脚、翼、ひれ等）の協調を制御する神経回路メカニズムの解明を目指した。ゼブラフィッシュ稚魚の胸びれは外転筋と内転筋の2種類の筋肉だけで構成され、左右交互の開閉運動を行う。胸びれの運動はこのように非常に単純でありながら、外転筋-内転筋の協調（屈筋-伸筋の協調に相当する）や、左右の協調を示す。以上のことから、ゼブラフィッシュ稚魚の胸びれは、四足動物と共通する基本的な付属肢の制御メカニズムを解明するための理想的なモデルとなる可能性がある。

本研究では多様な遺伝子組換えゼブラフィッシュを利用して、胸びれリズム運動を制御する神経回路メカニズムを詳細に調べた。まず、外転筋運動神経細胞（外転筋 MN）と内転筋運動神経細胞（内転筋 MN）が交互に発火していることを示した。次に、どちらの MN も発火するタイミングで興奮性入力を受け、発火しないタイミングで抑制性入力を受けていることを明らかにした。続いて、これらの入力を行う脊髄内の上流介在ニューロンを探した。私は *dmrt3a* という遺伝子が発現するニューロン（*dmrt3a* ニューロン）が反対側の外転筋 MN に選択的に抑制性シナプス結合を持つことを示した。さらに胸びれ周辺の *dmrt3a* ニューロンを破壊することで、外転筋 MN の発火タイミングが変化することや、外転筋 MN が受ける抑制性入力が増加することを示した。これらの結果は、*dmrt3a* ニューロンが外転筋 MN の発火タイミングの決定に重要な役割を果たしていることを強く示唆している。

本研究では非常に単純なモデルであるゼブラフィッシュ稚魚の胸びれを用いて、MN の発火タイミングと MN が受けるシナプス入力を明らかにした。さらに、上流の介在ニューロンの一つを同定し、その機能を明らかにした。脊髄内で発現する転写因子群は脊椎動物間で広く保存されており、哺乳類の脊髄内では *dmrt3a* の相同遺伝子である *dmrt3* が発現するニ

ニューロンが存在している。哺乳類の *dmrt3* ニューロンはゼブラフィッシュの *dmrt3a* ニューロンと同様に、交差性、抑制性のニューロンで、四肢の制御に関与することが知られている。しかしながら神経回路内で果たす具体的な役割は明らかになっていない。単純でありながら四足動物と多くの共通点を持つゼブラフィッシュ稚魚の胸びれを研究することで、今まで解明できなかった付属肢を制御する神経回路メカニズムの解明が進むと期待できる。

## 【序論】

陸上を歩行する脊椎動物の多くは、屈筋と伸筋を協調させ、左右の四肢を交互に動かす運動を行い、移動している (Grillner, 1975)。魚類の胸びれと腹びれは四足動物の前肢と後肢の相同器官であり、四肢の原型と考えられる。四肢やひれの交互運動の存在は進化的に、軟骨魚類までさかのぼることができる。ある種のエイは腹びれを左右交互に動かして海底を歩くような運動を示す (Jung et al., 2018)。また、四足哺乳動物以外にも多くの脊椎動物が付属肢を協調させた運動を示す。ハイギョの 1 種である *Protopterus annectens* は棒状の胸びれ、腹びれを組み合わせる歩行様の運動を示し (King et al., 2011)、イモリも四肢を組み合わせる歩行する (Delvolvé et al., 1997)。このように四足動物以外の動物も含めて、多くの脊椎動物は付属肢を協調させ、周期的に動かすリズム運動を行っている。

歩行を制御する神経回路は 100 年以上研究されている。高次の中枢神経系から入力をおくすために除脳したネコにおいて、後肢の拮抗筋(前脛骨筋と腓腹筋)の収縮が協調するという研究がある (Brown, 1911)。この研究をはじめとする多くの研究で筋肉を適切なタイミングで収縮させ、協調させる基本的な仕組みは、**Central Pattern Generators (CPG)** (Grillner, 2003、Kiehn, 2006) と呼ばれる脊髄内の神経回路であると示されている。また、分子遺伝学の発達により、特定の性質を持つニューロン群について可視化や、破壊、活動制御をすることが可能になった。これらの技術の発達に従ってマウスを中心に CPG を構成する様々なニューロン群について研究が進んだ (Goulding and Pfaff, 2005、Goulding, 2009、Arber, 2012、Kiehn, 2016)。しかしながら哺乳類の脊髄内 CPG の神経回路の詳細な構造や活動パターンは完全には解明できていない。

哺乳類の脊髄内 CPG の解明が難航している理由は主に 3 つある。1 つは哺乳類の四肢の複雑な構造である。哺乳類の四肢は多数の関節と多くの筋肉で構成されており (図 1A)、四肢を滑らかに動かす為にそれぞれの筋肉が少しずつ異なるタイミングで収縮する (Markin et al., 2011)。その為、それらの筋肉を制御する神経回路は非常に複雑であると考えられる。2 つ目の理由は哺乳類が示す運動が複雑な点である。哺乳類は様々な感覚系からのフィードバックを受け運動を調整する (Rossignol et al., 2006)、単純で自発的な運動以外の運動も行う、という性質があるため解析が困難である。最後は哺乳類の脊髄の大きさが非常に大きい点である。これにより脊髄内のニューロン数が多いことに加え、脊髄内回路を保った状態

で特定の細胞群を狙って電気生理実験やカルシウムイメージングを行うことが難しい。これらの要因によって哺乳類の脊髄内 CPG を構成するニューロン間のシナプス接続や運動中の活動パターンを正確に知ることは難しい。

ゼブラフィッシュ稚魚の胸びれはより単純な構造をしており、哺乳類の付属肢と共通する性質を示すので、脊髄内 CPG を研究するうえでのより良いモデルになる可能性があると考えた。稚魚の胸びれは、外転筋と内転筋の 2 種類の筋肉だけで構成されており、非常に単純な構造をしている (Thorsen and Hale, 2005)。また、3dpf のゼブラフィッシュ稚魚の胸びれは、基本的には体幹の運動に合わせた単純な開閉運動だけを行う (図 1B)。さらに体や脊髄の大きさが小さく、ニューロン数も少ないことにより、脊髄内回路をほぼ無傷の状態、仮想遊泳中 (神経-筋の伝達を阻害して不動化した状態で起きる遊泳のための神経活動) に、胸びれ MN をはじめとする脊髄内ニューロンの生理学的記録を取ることができる (Green and Hale, 2012)。このような単純な構造、運動にもかかわらず、稚魚の胸びれと哺乳類の四肢は、2 つの基本的な性質を共有している。1 つは外転筋-内転筋の協調 (哺乳類の四肢における屈筋-伸筋の関係に相当する)、もう一つは左右の付属肢の協調である。以上の理由からゼブラフィッシュ稚魚の胸びれは脊椎動物の付属肢制御に普遍的な協調のメカニズムを研究するうえで理想的なモデルとなりうる。

さらなる利点として、脊髄内の転写因子の発現パターンが脊椎動物間で広く保存されている点がある。脊髄内の神経前駆細胞は様々な転写因子の発現に従って異なる性質を持つニューロンに分化していく。この時、神経前駆細胞は背腹軸に従っていくつかの領域に分かれ、その領域ごとに異なる転写因子が発現することで、細かく分化してゆく (図 1C) (Lai et al., 2016, Goulding, 2009)。これらの転写因子群はゼブラフィッシュにおいても同様の発現パターンが見られ、相同な転写因子が発現するニューロンの伝達物質や軸索走行、シナプス形成などの性質は魚類から哺乳類で共通している (*chx10* について、Kimura et al., 2006, Lundfald et al., 2007、*en1* について、Saueressig et al., 1999, Higashijima et al., 2004、*dmt3a* について、Andersson et al., 2012, Satou et al., 2020 等)。このことから脊髄内ニューロンの分化メカニズムは脊椎動物内で広く保存されていると考えられる。

多様な実験が可能で、単純なモデルであるゼブラフィッシュを用いることで、他の脊椎動物では解明しきることができなかつた、CPG を構成する様々なニューロン群の形態や運動中の神経活動などを高い精度で研究することができる (Kimura and Higashijima, 2019、

Satou et al., 2020)。そしてそれらのニューロン群の性質は哺乳類でも共通する可能性が高く、魚類で解明した性質を手掛かりにして哺乳類において解明できていない性質を見出す手掛かりになると期待できる。また、魚類の胸びれのリズム運動を制御している脊髄内 CPG を解析して哺乳類のものと比較することで、付属肢のリズム運動を制御する神経回路メカニズムへの進化的な理解を深めることができると期待できる (Jung et al., 2018)。

私はゼブラフィッシュ稚魚の胸びれのリズム運動を制御する脊髄神経回路を対象に研究を進めた。はじめに外転筋 MN と内転筋 MN の発火タイミング調べ、MN が受ける興奮性入力と抑制性入力のタイミングを比較した。その結果、外転筋 MN と内転筋 MN は特定のタイミングで重ならないように交互に発火しており、どちらの MN も発火するタイミングで興奮性入力を受け、発火しないタイミングで抑制性入力を受けていることが分かった。この結果から胸びれ MN の発火は興奮性入力と抑制性入力の組み合わせによって特定のタイミングに限定されると考えられる。このような興奮性入力と抑制性入力による push-pull 制御はひっかき運動を行うカメや (Robertson and Stein, 1988)、歩行中の哺乳類にみられる (Shefchyk and Jordan, 1985、Cazalets et al., 1996、Hochman and Schmid, 1998、Endo and Kiehn, 2008)。さらに胸びれ MN にシナプス入力を行っている上流の介在ニューロンを探索し、*dmrt3a* (哺乳類の *dmrt3* と相同) という遺伝子が発現するニューロン (*dmrt3a* ニューロン) が上流の介在ニューロンの可能性が高まった。哺乳類の *dmrt3* ニューロンは四肢の MN とシナプスを持ち、交差性の抑制性入力を行うと考えられている (Andersson et al., 2012、Perry et al., 2019)。本研究によって *dmrt3a* ニューロンが交差性、抑制性ニューロンであり、外転筋 MN へ選択的に抑制性入力を行っていることが分かった。さらに *dmrt3a* ニューロンの発火パターンや、破壊したときの表現型を解析することで、*dmrt3a* 発現ニューロンは外転筋の発火タイミングを制御するうえで重要な介在ニューロンであると強く示唆する結果を得ることができた。本研究は胸びれのリズム運動を制御する神経回路の一部だけしか解明できていないが、さらなる研究が期待される。

## 【研究方法と手法】

### 実験動物

実験には遺伝子組み換えゼブラフィッシュの成魚を交配し、得られた受精卵を 28.5°C のインキュベーター内で育成した稚魚を用いた。成魚は室温 28.5°C で蛍光灯によって 14 時間点灯-10 時間消灯の昼夜サイクルを設定した。ゼブラフィッシュは光照射が始まると産卵行動を行い、多くが 1 時間以内に受精を終える。受精卵を得られた日を受精後 0 日として、基本的にすべての実験は受精後 3 日目 (3 days post fertilization, 3dpf) の魚を用いた。本研究の実験はすべて室温下 (25~28°C) で行った。

使用した既存の遺伝子組換えゼブラフィッシュを以下に羅列する。Tg[zCREST2-hsp70:GFP] (Uemura et al., 2005)、Tg[UAS:Kaede]、Tg[UAS:GFP] (Kimura et al., 2013)、Tg[UAS:RFP] (Asakawa et al., 2008)、Tg [hspzGFFgDMC26A] (川上研のエンハンサーラップラインからスクリーニングして得られた系統; Asakawa et al., 2008)、Tg[dmrt3a:GFP]、Tg[dmrt3a:loxP-DsRed-loxP-DTA]、Tg[glyt2:loxP-DsRed-loxP-GFP] (Satou et al., 2020)、Tg[zCREST2-hsp70:Gal4]、Tg[hoxa4a:Cre]、Tg[dmrt3a:tTA]、Tg[tetO:Dendra2]、Tg[tetO:ChR]、Tg[dmrt3a:tTA]、Tg [tetO:ChR] (Natsubori et al., 2017)、Tg[lhx1a:GFP]、Tg[lmx1bb:GFP]、Tg[evx2:GFP] (本研究で作成)、Tg[chx10:GFP] (Kimura et al., 2006)、Tg[en1b:GFP] (Kimura and Higashijima, 2019)。Tg[zCREST2-hsp70:Gal4]は、zCREST2-hsp70:GFP (Uemura et al., 2005)のコンストラクトのGFPをGal4FF (Asakawa et al., 2008)に置き換えて作成した。Tg[hoxa4a:Cre]はhoxa4a gene (Kimura and Higashijima, 2019)とhsp70 promoter、Cre-mCherry-NLS (Satou et al., 2012)を用いて作成した。Tg[tetO:ChR]のチャンネルロドプシン(ChR)はChR-WideReceiver (Wang et al., 2009)を利用している。Tg[zCREST2-hsp70:Gal4]、Tg[hoxa4a:Cre]、Tg[tetO:Dendra2]、Tg[tetO:ChR]はTol2システムを利用して作成した(Urasaki et al., 2006)。Tg[dmrt3a:tTA]とTg[lhx1a:GFP]、Tg[lmx1bb:GFP]はCRISPR/Cas9を利用して作成した(Kimura et al., 2014)。



## 行動実験

3.1~3.5 dpf のゼブラフィッシュ稚魚を実験に用いた。ハイスピードカメラ(FASTCAM-ultima 1024)を用いて魚の自発的な遊泳を上から 1000 fps で撮影した。直径 35mm のグラスボトムディッシュに 2%アガロース溶液を注ぎ、固まったら 1 辺が 10mm 程度の正方形に切り抜いて、その中に魚を入れて撮影した。画像は 1024×1024 の画素数で、画像解析のために魚の全長が 380 ピクセル程度の大きさに映るように撮影した。

魚の遊泳周期は片側の胸びれの開き始めたタイミングを起点として、次にその胸びれが開き始める直前までの一連の運動を 1 周期として計算し、遊泳の周波数 (Hz) を算出した。安定した遊泳時の体幹と胸びれの協調を記録するために、28~34Hz (遊泳の 75%程度が含まれる) で行われた遊泳のみを解析の対象とした。遊泳開始時の周波数の高い遊泳や、遊泳が終わる直前の周波数の低い遊泳は除外した。画像解析では、魚の輪郭を定義するために左右の眼で中心を検出し、2 点を結んだ線に直行する直線を魚の頭部の中心線とした。この中心線に沿って 8 ピクセル間隔で円弧上にピクセルの明度を計算し、明度の変化が大きい部分を体と水の境界線と定義し、その中央を体の正中とした。この操作を頭部から尾部に向けて 1 ピクセルずつずらして行い、それらの点に平滑化スプライン法を適用して体幹の滑らかな正中線を得た。得られた正中線の頭部側 1/3 程度の範囲を直線にフィットさせ (線形回帰)、体の前半部の向きの指標とした。この直線と全長の後半部 1/2 の範囲の正中線との距離を測定し、最も距離があるピクセルを決めた。頭部先端を 0、尾部先端を 1 として最も距離がある点を数値化して同一個体の試行間、複数個体間で比較した。

## 共焦点顕微鏡による撮影

GFP、RFP、Kaede、Dendra2 が発現しているゼブラフィッシュ稚魚を生きている状態で共焦点画像を撮影した。ゼブラフィッシュ稚魚はグラスボトムのディッシュの底に 2%アガロース溶液を用いて固定して、倒立型の SP8, Leica もしくは FV 1200, Olympus を使って下から撮影した。Kaede の構造変化には 405nm のレーザーを利用した。Dendra2 の構造変化には 488nm と 635nm のレーザーを使った (Taniguchi et al., 2017)。レーザー照射後、細胞体の蛍光タンパク質が十分に構造変化して蛍光が変化したことを確認した。その後、2 時間以上静置して構造変化した Kaede や Dendra2 が軸索に十分に拡散する時間を確保してから撮影を行った。

Dendra2 による *dmrt3* ニューロンの形態解析 (図 7A、B) では CoLo と呼ばれる、逃避に関わり形態的特徴があるニューロンを除外している (Satou et al., 2009)。このニューロンは球状の細胞体と太く短い軸索を持つことにより判別できる。

### 電気生理学による発火タイミングの記録

以降の電気生理の記録は全て、増幅器として MultiClamp 700B、デジタルデータ変換に Degidata 1440A を用いて記録した。データは 20,000Hz で記録した。

ゼブラフィッシュ稚魚をシリコンディッシュ上にのせて、細胞外液 (in mM: NaCl 134, KCl 2.9, MgCl<sub>2</sub> 1.2, HEPES 10, glucose 10, CaCl<sub>2</sub> 2.1, pH7.8 adjusted with NaOH) に D-tubocurarin が 0.25mg/mL となるように加え、尾の先端を傷つけ 15 分程度静置して不動化した。稚魚を側面が上となるように動かし、前脳と、第 6 筋節、第 17 筋節周辺の脊索を、先端をとがらせたタングステン針で刺して固定した。鋭く研磨したピンセットでゼブラフィッシュの第 3 筋節から第 11 筋節までの表皮を剥ぎ、第 4 筋節の筋肉を取り除いて脊髄を露出させた。シリコンディッシュに細胞外液を 2ml ほど加え、正立顕微鏡 (BX51WI, Olympus) にのせた。

実験は体幹の MN 軸索束 (VR) の活動と特定のニューロンの発火を同時に記録した (図 3A、模式図)。VR の記録は、ガラス電極 (直径 1.5 mm のガラス管を熱伸展した) の先端を斜め 30° 程度、長径 20-50  $\mu$  m 程度の楕円系に切断し、断面に熱を加え滑らかにしたものを用いた。VR 用のガラス電極に細胞外液を入れ、ゼブラフィッシュの第 9 筋節と第 10 筋節の間に軽く押し当て、1-2mmHG 程の陰圧をかけて VR の活動を記録した。ニューロンの発火の記録はゼブラフィッシュの第 4 筋節で、ホールセル記録、若しくはルースパッチ記録で行った。ホールセル記録は以下の方法で記録した。ガラス電極 (直径 1.5mm のガラス管を熱伸展させ、抵抗を 11~15M $\Omega$  にした) を細胞内液 (in mM: 119 K-gluconate, 6 KCl, 2 MgCl<sub>2</sub>, 10 HEPES, 10 EGTA, and 4 Na<sub>2</sub> ATP adjusted to pH 7.2 with KOH) で満たし、狙った細胞に接触させる。電極と細胞膜と密着してギガオームシールが形成されたら、短時間の強い陰圧をかけて細胞膜を破り、電流固定法で膜電位を記録した。ルースパッチ記録ではガラス電極 (直径 1.5mm のガラス管を熱伸展させ、抵抗を 9~12M $\Omega$  にした) を細胞外液で満たし、狙った細胞に接触させて、細胞外から活動電位を記録した。

## 外転筋 MN および内転筋 MN へのシナプス入力の実験

MN へのシナプス入力は VR と同時に記録した。事前にルースパッチで発火タイミングを記録し、その後、ガラス電極に陽圧をかけてガラス電極から細胞を離す。その後、ホールセル用のガラス電極（抵抗 11~15M $\Omega$ ）に電位固定法用の細胞内液（in mM: 140 CsMeSO<sub>4</sub>, 1 QX314-Cl, 1 TEA-Cl, 3 MgCl<sub>2</sub>, 10 HEPES, 1 EGTA, and 4 Na<sub>2</sub>-ATP, adjusted to pH 7.2 with CsOH）を入れて、同一の細胞に対してホールセル記録を取った。興奮性入力を記録する際は電位固定法で-74mV に固定することで、Cl<sup>-</sup>の流出入による影響を非常に小さくして興奮性入力を個別に記録した。抑制性入力を記録するときは+10mV に固定することで、陽イオンの流出入による影響を小さくして抑制性入力を個別に記録した。ニューロンの膜電位を+10mV で固定してもニューロンに致命的な影響が出ないように、電位固定法用に用いた細胞内液は電位依存性チャネルのブロッカーやイオン径の大きいセシウムを含む組成となっている。

## チャンネルロドプシン (ChR) による MN と *dmrt3a* ニューロン間のシナプス結合を調べる実験

Tg[*dmrt3a*:tTA]; Tg[tetO:ChR]の魚を使うことで *dmrt3a* ニューロンに ChR を発現させた。その魚に Tg[zCREST2-*hsp70*:GFP]（外転筋 MN で GFP が発現する）もしくは Tg[hspzGFFgDMC26A]; Tg[UAS:GFP]（内転筋 MN で GFP が発現する）を掛け合わせた。ChR による実験は、まず MN へのシナプス入力の実験と同様の手順で MN へのシナプス入力を記録する段階まで進める。続いて、外転筋 MN もしくは内転筋 MN のホールセル記録中に、第 4 筋節を中心に 2 節分（3.5~5.5 筋節）の範囲で青色光を 20ms 照射し、MN へのシナプス入力を記録した。MN のホールセル記録は電位固定法で膜電位を+10mV に固定し、抑制性のシナプス入力記録される条件で記録を行った。実験では照射開始時点から 40ms 以内に記録される抑制性シナプス入力の有無とその振幅を記録した。1 つの細胞につき 10 回以上青色光を照射して記録を取った。Probability は全試行中にシナプス入力記録された割合を示し、amplitude は照射開始後 40ms 以内で入力の平均値を算出し、その期間中の最大値を示す。

## データ解析について

電気生理のデータは **Data view** (イギリス、セントアンドルーズ大学の William Heitler が開発したソフトウェア) と **Excel (Microsoft)** を用いた。

VR の記録は整流化し、120 サンプルで単純移動平均を 3 回取ることによって平滑化した。仮想遊泳中は VR の振幅が増減を繰り返すので、平滑化を行うと VR の振幅の増減に合わせて波形の波形が得られる。波形の 1 周期中での最小値から最大値に移行する際の midpoint を VR 活動の開始点とし、最大値から最小値に移行する際の midpoint を VR 活動の終了点とした。その VR 活動の開始点と終了点の midpoint を VR 活動の中心と定義し、仮想遊泳中の遊泳周波数の算出や、ニューロンの発火や MN へのシナプス入力の時系列解析を行う際の基準とした。時系列解析では、ある VR 活動の中心を 0、次の VR 活動の midpoint を 1 とし、0~1 を遊泳の 1 周期として定義した。

胸びれ MN や *dmrt3a* ニューロンについては未成熟のニューロンを除外するために、VR の活動に対して 60%以上の割合で発火していたニューロンを解析対象にした。また、安定した遊泳時の活動を記録するために、解析は VR の周波数が 28~34Hz の場合に限定した。*dmrt3a* ニューロンを破壊した魚では遊泳周期がやや早くなるため、解析は VR の周波数が 29~35Hz の場合に限定した。

VR と、MN や *dmrt3a* ニューロン等の発火の関係を示す円状グラフでは、マウスの VR 記録を解析した先行研究を参考として、同様の解析を行った (Kjaerulff and Kiehn, 1996)。発火タイミングの解析では、解析対象の周波数で遊泳しているときのニューロンの発火を一つの細胞で 30 個無作為に選出し、30 個の発火タイミングについて半径を 1 とする円周上に配置する。円周上の 30 個の座標を平均し、そのニューロンの平均発火タイミングとした。このグラフでは原点から平均発火タイミングの座標への向きが発火タイミングの平均値を示し、原点から平均発火タイミングまで距離は発火タイミングの集中度を示す(原点からの距離が長いほど発火が集中していることを示す)。

MN へのシナプス入力の記録は各細胞で 20 周期分を採用した。VR の 1 周期に合わせて、MN へのシナプス入力の記録を切り抜いた。MN へのシナプス入力の記録は 1 周期あたり 580~720 個のサンプル数になる (解析する VR が 28~34Hz、記録は 20000Hz)。そこで Excel を用いて、1 周期のデータ数を 200 個に計算しなおして比較した。

*dmrt3a* ニューロンから下流のニューロンへの抑制性入力の伝達遅延は以下の理由で

1.5ms と想定した。まず、dmrt3a ニューロンの軸索は約 200  $\mu$  m (反対側に伸ばすために 100  $\mu$  m、その他の軸索の長さが 100  $\mu$  m) として、軸索を活動電位が伝達する時間を 0.2m/s (Menelaou and McLean, 2019) で計算すると、1ms の遅延が生じる。また、シナプス伝達には 0.5ms 程度の遅延が生じる。この 1.5ms の遅延は VR の周期 (0~1) の 0.05 に相当する。

## 【結果】

### 1、ゼブラフィッシュ稚魚（3dpf）の自由遊泳時の胸びれと体幹のリズム運動の解析

5dpf のゼブラフィッシュ稚魚では胸びれが左右交互に周期的に開閉しており、外転筋 MN と内転筋 MN が交互に活動することが示されている。さらに、胸びれ MN の活動は体幹の MN の活動と協調していることが示されている (Thorsen et al., 2004; Green and Hale, 2012)。本研究では安定した遊泳に着目するために、5dpf の魚より比較的長時間ゆっくりと遊泳する (30Hz 程度の遊泳を 1 秒程度) 3dpf のゼブラフィッシュ稚魚を対象とした。初めに 3dpf のゼブラフィッシュ稚魚について、胸びれ運動と体幹運動の関係性を解析した。図 2A に示すように、稚魚は波を後ろに伝えるように体をくねらせて遊泳し、同時に左右の胸びれを交互に開閉させる。最初に右の胸びれが最も開いている時点 (0ms) と次に右の胸びれが最も開いている時点 (32ms) を比較すると、体幹の形が似ており、5dpf の時と同様に体幹の運動と胸びれの運動は強く相関していると思われた。図 2B に示したように 3dpf のゼブラフィッシュ稚魚は 24Hz~40Hz 程度で遊泳し、30Hz 前後の遊泳が最も多い (平均  $31.1 \pm 2.5$ Hz)。ゼブラフィッシュ稚魚は、遊泳の開始時は周波数が 35~40Hz 程度のやや早い遊泳を行い、その後それよりも遅い 30Hz 前後で安定した遊泳を続け、遊泳を終了する直前はさらに周波数の低い 25Hz 程度の遊泳を示してから停止する。そこで最も安定していると考えられる  $31 \pm 3$ Hz (28~34Hz) の遊泳を対象に、遊泳中の体幹と胸びれの状態を比較した。図 2C ではハイスピードカメラによって得られた画像をどのように解析したかを示している。胸びれが開き始めた時点 (図 2C では右胸びれ) を解析の対象として、体幹の正中線 (白い曲線) の中で、魚の向き (ピンクの直線) で最も離れている点 (屈曲点と表記する) を測定した。図 2D は同一個体において、異なる試行での遊泳している時の正中線と屈曲点だけを抽出して並べた図である。同一個体において胸びれが開き始めた時点での体幹の屈曲位置は概ね同じであるように見える。図 2E では同一個体の 15 周期分の遊泳について、正中線の頭部先端を 0、尾部先端を 1 として屈曲点の位置を数値化した。同一個体の胸びれが開き始めた時点での体幹の状態は非常に似ていることが分かった ( $0.81 \pm 0.016$ )。さらに複数個体間で屈曲点の平均値を比較した場合においても非常に差が小さかった (図 1F、 $0.82 \pm 0.010$ )。以上の結果から 3dpf のゼブラフィッシュ稚魚における胸びれと体幹の運動は強く相関しており、その相関関係は全ての個体で共通している事が分かった。

## 2、外転筋 MN と内転筋 MN の可視化

本研究を進めるうえで外転筋 MN と内転筋 MN を選択的に可視化することは非常に重要である。外転筋 MN を可視化するために、先行研究で知られている Tg [*zCREST2-hsp70:GFP*]を利用した (Uemura et al., 2005; Green and Hale, 2012)。図 3A1 (側面から脊髄を撮影した画像) では細胞体が脊髄の第 2 筋節から第 5 筋節の腹側に集中しており、束になって脊髄内から胸びれに伸びていく軸索 (白い三角) が見える。図 3A2 (背側から胸びれを撮影した画像) では胸びれの外側に軸索が投射している様子が見える。一方、内転筋 MN を可視化するために、エンハンサートラップラインの一つである Tg [*hspzGFFgDMC26A*]; [*UAS:GFP*]を利用した (Asakawa et al., 2008)。図 3B1 では内転筋 MN の細胞体が第 3 筋節から第 5 筋節の腹側にあり、外転筋 MN と同様に束になって胸びれに伸びてゆく軸索 (白い三角) が見える。図 3B2 では胸びれの内側に軸索が投射している様子が見える。以上の結果から Tg [*zCREST2-hsp70:GFP*]と Tg [*hspzGFFgDMC26A*]; [*UAS:GFP*]を利用することで、外転筋 MN と内転筋 MN を同定することができた。

先行研究において 5dpf では外転筋 MN と内転筋 MN の細胞体は脊髄内で混在していると示唆されていた (Thorsen and Hale, 2007)。そこで私は 3dpf の魚において外転筋 MN と内転筋 MN の細胞体が脊髄内でどのように分布しているのかを調べた。外転筋 MN と内転筋 MN を同時に可視化するために、3 種類の組換え遺伝子を持つゼブラフィッシュを掛け合わせ、外転筋 MN に GFP が、内転筋 MN に RFP が同時に発現するゼブラフィッシュ (Tg [*zCREST2-hsp70:GFP*]; [*hspzGFFgDMC26A*]; [*UAS:RFP*]) を作成した。そのゼブラフィッシュの脊髄の側面から画像 (図 3C1) と脊髄の背側からの画像 (図 3C2) を観察すると、先行研究と同様に外転筋 MN (GFP) と内転筋 MN (RFP) の細胞体はきれいに別れて分布しているわけではないことが分かった。しかし、頭部に近い脊髄 (図 3C2 の白い矢印) では外転筋 MN がより多く分布しており、外転筋 MN と内転筋 MN で少し分布が異なることも明らかになった。

さらに先行研究では脊髄内の細胞体の位置と軸索の投射パターンに関係性があることが示唆されていたため、脊髄内の細胞体の位置と軸索の投射パターンの相関性について調べた (Thorsen and Hale, 2007)。外転筋 MN もしくは内転筋 MN に、特定の波長を当てると蛍光が変化する蛍光タンパク質の Kaede を発現させた (Tg [*zCREST2-hsp:Gal4*]; [*UAS:Kaede*])、もしくは Tg [*hspzGFFgDMC26A*]; [*UAS:Kaede*])。脊髄の特定の 1 筋節に紫外光

を照射し、その筋節に細胞体が存在する MN で発現する蛍光タンパクの蛍光を変化させ、その MN が胸びれのどの部位に投射するかを観察した (図 3D)。図 3D から細胞体の位置と軸索の投射パターンには強い相関があり、外転筋 MN および内転筋 MN において、脊髄の頭部側にある細胞は胸びれの背側に投射し、尾部側にある細胞は胸びれの腹側に投射する傾向があると分かった。この実験により外転筋 MN と内転筋 MN の細胞体の位置と軸索の投射パターンの関係性を今までの研究より詳細に明らかにできた。

### 3、仮想遊泳中の外転筋 MN と内転筋 MN の発火タイミング

外転筋 MN と内転筋 MN を同定することができたので、遊泳中の外転筋 MN と内転筋 MN の発火タイミングを調べた。図 4A のように MN の発火と VR の活動を同時に記録する実験を行った。実験 1 で遊泳中の体幹と胸びれの運動に強い相関があることを明らかにできたので、VR の活動を周期解析のタイミングの基準として利用した。

魚を不動化して横向きに固定した実験条件において VR の記録を取ると、体幹の MN 軸索束の活動電位が振幅となって記録される (図 4C 左、上の VR の波形)。この VR の活動周期は 30Hz 前後に集中していた ( $30.8 \pm 7.8$  Hz; 図 4B)。この仮想遊泳で記録された周波数は実験 1 で観察した実際の遊泳 ( $31.1 \pm 2.5$  Hz) の周波数とおおむね似た値を示しており、実際の遊泳を再現できていると考えた。

図 4C 左の図は外転筋 MN のホールセル記録を示している。上の波形が VR の記録であり、下の波形が外転筋 MN のホールセル記録である。外転筋 MN は VR の活動の周期に合わせて発火していた。そこで VR の活動を基準に外転筋 MN の発火タイミングを解析した。ある VR の活動の中心を 0、次の活動の中心を 1 として、その間にある発火を数値化した (図 4C、D 中央の図)。この数値を 1 細胞につき無作為に 30 個選出し、半径を 1 とする円上にプロットし (図 4C 右、円上の黒い点)、それらの座標を平均してその細胞の平均発火タイミングとする (図 4C 右、円中の赤い点)。この時、中心から赤い点の向きは平均発火タイミングを示し、中心からの距離が長いほど発火タイミングが集中している事を示す。この外転筋 MN は 0.6 周辺で発火が集中していた。

外転筋 MN と同様に、内転筋 MN も VR に合わせて発火が見られた (図 4D 左)。そこで内転筋 MN に対して同様の周期解析を行ったところ、この内転筋 MN は 0.07 周辺に発火が集中していた (図 4D 中央、右)。



図 4E、F では複数の外転筋 MN と内転筋 MN の平均発火タイミングをそれぞれ一つのグラフにまとめた。赤い点が 1 細胞のデータを示している。外転筋 MN の平均発火タイミングは  $0.5\sim 0.75$  であり ( $0.63\pm 0.06$ )、内転筋 MN の平均発火タイミングは  $0\sim 0.35$  だった (平  $0.14\pm 0.11$ )。この結果から外転筋 MN と内転筋 MN は互いが全く重ならないタイミングで発火していることが明らかになった。また外転筋 MN と内転筋 MN の平均発火タイミングの分布を比較すると、内転筋 MN の方がより広い分布をしていた。一方、中心からの距離 (中心が 0、円周上が 1) は外転筋 MN が  $0.79\pm 0.08$ 、内転筋 MN が  $0.79\pm 0.09$  で大きな差は見られなかった ( $p=0.72$ , t test)。外転筋 MN と内転筋 MN の平均発火タイミングの分布傾向は少し異なっているが、基本的には交互に重ならないように発火している。

#### 4、外転筋 MN へのシナプス入力 of 記録

結果 3 から、外転筋 MN と内転筋 MN は互いに重ならないように特定のタイミングで発火することが分かった。そこで、MN の発火タイミングを決定していると考えられる、上流の介在ニューロンからのシナプス入力を記録した。シナプス入力の記録では事前に MN の発火をルースパッチによって記録し、その後同一の MN をホールセルで記録した。シナプス入力の記録は電位固定法で記録し、興奮性入力を記録するときは膜電位を  $-74\text{mV}$  に固定し、抑制性入力を記録するときは膜電位を  $+10\text{mV}$  に固定することで、興奮性入力と抑制性入力を分離して記録した。

図 5A は全て同一の外転筋 MN からの記録で、図 5A1 はルースパッチの記録、図 5A2 はホールセル電位固定法で膜電位を  $-74\text{mV}$  に固定した記録、図 5A3 はホールセル電位固定法で  $+10\text{mV}$  に固定した記録である。膜電位を  $-74\text{mV}$  に固定した時、興奮性入力は負 (下向き) に記録される。膜電位を  $+10\text{mV}$  に固定した時、抑制性入力は正 (上向き) に記録される。興奮性入力と抑制性入力は VR の周期に合わせて周期的に変動していた (図 5A2、A3)。さらに外転筋 MN への興奮性入力 (図 5A2) に注目すると、遊泳中は常に一定の興奮性入力が入っており、さらに VR の活動の周期に合わせた周期的な興奮性入力が見られた。このことから仮想遊泳中の外転筋 MN に入る興奮性入力は、持続的に入る要素と周期的に入る要素が組み合わさっていると考えられる。一方外転筋 MN への抑制性入力について注目すると、遊泳中に一定の抑制性入力は見られず、周期的な要素のみで構成されていると考えられる。

続いて外転筋 MN への興奮性入力と抑制性入力について詳細な周期解析を行った。VR の活動周期に合わせて興奮性入力の記録と抑制性入力の記録を 20 周期分切り抜いて重ね合わせ、平均値を算出した (図 5B1、B2) 灰色の波形が 20 周期のトレースを示し、B1 の赤の波形は興奮性入力の平均、B2 の青い波形は抑制性入力の平均を示している。ホールセル記録の前に取った発火タイミングの記録 30 個を図 5B1、B2 のグラフ上部の赤い点で示しており、その平均発火タイミングを縦の点線で示している。外転筋 MN への興奮性入力は遊泳中一定の強さで入り続けているが、平均発火タイミングに近いタイミングで最も強くなっていた (図 5B1、Max)。一方、外転筋 MN への抑制性入力は平均発火タイミング周辺では強く入っておらず、MN がほとんど発火していないタイミングで強く入っていた (図 5B2)。図 5C は複数の外転筋 MN への平均の興奮性入力と平均の抑制性入力の記録を、VR の活動の周期に合わせてまとめた図である (n=8)。どちらの入力も Min と Max で標準化している (Normalized input)。各ニューロンの平均発火タイミングは図上部の赤い点で示している。図 5B1、2 で見られたように、複数の外転筋 MN についても、平均発火タイミングの周辺で興奮性入力が強くなり、抑制性入力が弱い。また、外転筋 MN が発火していないタイミングでは興奮性入力が弱く、抑制性入力が強い。図 5D は個々の外転筋 MN の平均発火タイミングを中心として、平均の興奮性入力と平均の抑制性入力を並べなおした図である。図 5D から平均発火タイミング前後で興奮性入力と抑制性入力がきれいに組み合わさっていることが分かる。これらの結果から、外転筋 MN の発火タイミングは周期的に入る興奮性入力と抑制性入力の組み合わせによって決定されると考えられる。

## 5、内転筋 MN へのシナプス入力の記録

図 6A は同一の内転筋 MN からの記録で、図 5A と同様に、図 6A1 がルースパッチ、図 6A2 がホールセルで膜電位を $-74\text{mV}$ に固定、図 6A3 がホールセルで膜電位を $+10\text{mV}$ に固定した記録である。いずれの記録も VR の周期に合わせて変動していた。内転筋 MN も外転筋 MN と同様に、遊泳中に一定の強さで入り続けている持続的な興奮性入力と VR の活動の周期に合わせて変動する周期的な興奮性入力を受けていた (図 6A2)。抑制性入力は周期的な入力のみで構成されていた (図 6A3)。

図 6B1、B2 では図 5B1、B2 と同じ解析を内転筋 MN について行った。内転筋 MN への興奮性入力は平均発火タイミング周辺で強まり、抑制性入力は弱くなっている。内転筋 MN

が発火しないタイミングでは興奮性入力弱くなり、抑制性入力強く入っていた。図 6C は図 5C と同様に、複数の内転筋 MN の記録をまとめたものである (n=7)。内転筋 MN も外転筋 MN の記録と同様に興奮性入力と抑制性入力組み合わせ入っていた。しかし、外転筋 MN へのシナプス入力と比較すると、内転筋 MN へのシナプス入力はニューロン間での差が大きく、各ニューロンが少し異なるタイミングでシナプス入力を受けていると分かった。一方で個々の内転筋 MN について平均発火タイミングを基準にシナプス入力の波形を並べなおしたところ、ニューロン間での入力のタイミングのずれが小さくなった (図 6D)。以上から、内転筋 MN に対するシナプス入力は、外転筋 MN へのシナプス入力と比較するとニューロン間でタイミングに差が見られるが、個々の内転筋 MN に着目すれば興奮性入力と抑制性入力がしっかりと組み合わせ入り、発火タイミングが決定されていると分かった。図 4E、F で見られた外転筋 MN と内転筋 MN の平均発火タイミングの分布の差は、個々の内転筋 MN が受けるシナプス入力のタイミングが少しずつ異なることによつて起きていると考えられる。

以上の実験から、外転筋 MN と内転筋 MN の両方が、周期的に変動する興奮性入力と抑制性入力が組み合わせ入り、発火タイミングが決定されていることが分かった。この MN の発火制御は興奮性入力と抑制性入力の push-pull 制御とみることができる (Endo and Kiehn, 2008; Johnson et al., 2012)。

## 6、外転筋 MN の上流介在ニューロン候補の *dmrt3* ニューロンについての実験

結果 4、5 で明らかになった MN への入力は、上流の介在ニューロンからのシナプス入力である。そこで、MN への入力を行っている上流の介在ニューロンを探した。平均発火タイミングがやや幅広い分布をする内転筋 MN や、仮想遊泳中に一定の入力が見られた興奮性入力は解析が難いため、特に外転筋 MN への抑制性入力について注目して、上流候補の介在ニューロン群を探した。脊髄内で発現する転写因子を利用して、上流候補となる介在ニューロン群を同定し、電気生理実験を行った。MN が受けるシナプス入力と、介在ニューロン群の伝達物質や、軸索の投射パターン、発火タイミングを手掛かりにして、MN への入力を行っている介在ニューロン候補を絞りこんだ。その結果、転写因子の一つである *dmrt3a* を発現するニューロン (*dmrt3a* ニューロン) が外転筋 MN への抑制性入力を行っている可能性があると分かった。

ゼブラフィッシュの体中央部の *dmrt3a* ニューロンは先行研究により、形態や性質、機能がある程度知られている。*dmrt3a* ニューロンは交差性の抑制性ニューロンであり、反対側の体幹 MN 抑制性入力を行い、発火するタイミングと真逆のタイミングで MH が発火しないように抑制し、左右の筋肉が同時に収縮することを防いでいる (Satou et al., 2020)。また、*dmrt3a* 変異体のゼブラフィッシュ稚魚は遊泳の速度と加速度が減少した (Def pozo et al., 2020)。このように体の中央部の *dmrt3a* ニューロンは体幹の運動で MN の制御に関わっていると考えられている。

一方で胸びれ周辺である第 4 筋節の脊髄内にある *dmrt3a* ニューロンについては知見が全くない。そこで第 4 筋節の脊髄内にある *dmrt3a* ニューロンについて詳しく調べた。特定の光を照射することで蛍光波長が変化する *dendra2* を使い、単一の *dmrt3a* ニューロンの *dendra2* のみを変化させて 1 細胞レベルで形態を観察した。観察された第 4 筋節の *dmrt3a* ニューロンはすべて交差性であったが、軸索の長さにはニューロン間で大きな差があった。図 7A1、B2 に軸索が短いニューロンと軸索が長いニューロンの代表例を示した。図 7B では複数の細胞の軸索の長さに表にまとめた。第 4 筋節の *dmrt3a* ニューロンの軸索の長さは  $5.9 \pm 1.7$  筋節で、体の中央部 (第 12~14 筋節周辺) の *dmrt3a* ニューロン ( $8.1 \pm 3.2$  筋節) (Satou et al., 2020) よりも有意に短かった ( $p=0.011$ , t テスト)。また、ほぼすべての第 4 筋節の *dmrt3a* ニューロンは抑制性ニューロンのマーカーである *glyt2* を発現しており、体の中央部と同様に抑制性ニューロンだと考えられる (図 7C)。

続いて仮想遊泳中の第 4 筋節の *dmrt3a* ニューロンの発火タイミングを電気生理で調べた。図 7D は仮想遊泳中の VR と第 4 筋節の *dmrt3a* ニューロンのルースパッチの記録であり、*dmrt3a* ニューロンは VR の活動の周期に合わせて周期的な発火をしていた。MN と同様の方法で発火タイミングを解析すると、*dmrt3a* ニューロンは  $0.67 \sim 0.90$  の範囲で発火していた (図 7F)。*dmrt3a* ニューロンは交差性のニューロンであることから、シナプス入力を記録した MN へ入力を送る可能性がある *dmrt3a* ニューロンは、反対側の脊髄に存在すると考えられる (図 7E)。反対側の *dmrt3a* ニューロンの発火は真逆の位相で起きていると考えられるので、反対側の *dmrt3a* ニューロンの発火タイミングは  $0.17 \sim 0.40$  であると考えられる (図 7F、緑の弧)。さらに *dmrt3a* ニューロンの発火から下流ニューロンへの入力の遅延が  $1.5\text{ms}$  ( $1\text{ms}$  が活動電位の伝達時間、 $0.5\text{ms}$  がシナプス伝達の時間) とすると、下流へのニューロンへの入力は  $0.22 \sim 0.45$  のタイミングに起こると考えられる (図 7F の青い

弧)。このタイミングは外転筋 MN への抑制性入力の後半部と概ね一致している (図 7G)。以上から *dmrt3a* ニューロンが外転筋 MN への抑制性入力の一部を担っている可能性が高まった。

## 7、*dmrt3a* ニューロンと外転筋 MN のシナプス結合について

私は *dmrt3a* ニューロンが外転筋 MN にシナプス結合を持つと予測した。これを確かめるために、以下の実験を行った。tet システムを用いて *dmrt3a* ニューロンに ChR を発現させ、外転筋 MN や内転筋 MN からホールセル記録を取る。この時 MN の記録は電位固定法で記録し、膜電位は+10mV に固定した。この状態で第 4 筋節を中心に 2 筋節分 (3.5~5.5 筋節) の *dmrt3a* ニューロンに青色光を当てた時に、外転筋 MN や内転筋 MN に抑制性入力が入るかどうかなを確認した (図 8A)。12 個の外転筋 MN と 6 個の内転筋 MN について、青色光を照射したときに抑制性入力記録されるかを実験した。外転筋 MN は多くの場合で、図 8B のように青色光照射時に大きい振幅の抑制性入力記録された。一方内転筋 MN では、青色光を照射しても抑制性入力が見られない場合や、抑制性入力が見られたとしても頻度や振幅が非常に小さい場合 (図 8C) がほとんどだった。図 8D では 10 回以上青色光を照射したときに抑制性入力観察された試行の割合をまとめ、図 8E では振幅の大きさをまとめた。どちらの比較においても *dmrt3a* ニューロンからの抑制性入力は外転筋 MN に強く入ることが分かった (Probability  $p=0.013$  Mann-whitney U test、Amplitude  $p=0.0017$  Mann-whitney U test)。以上から *dmrt3a* ニューロンは外転筋 MN と強いシナプス結合を選択的につくっているということが分かった (図 8F)。

## 8、*dmrt3a* ニューロンの遺伝的破壊実験

*dmrt3a* ニューロンについてのこれまでの実験により、*dmrt3a* ニューロンが反対側の外転筋 MN への抑制性入力を送っているという仮説とは矛盾しない結果が得られた。この仮説では *dmrt3a* ニューロンが外転筋 MN への抑制性入力の後半部分に貢献していると考えられる (図 7G 青い網掛け)。もし *dmrt3a* ニューロンによる抑制性入力が無くなるならば、外転筋 MN が受ける抑制性入力の後半部が減少し、より早いタイミングでも発火が起きてしまうと推測される。私は Tg[*dmrt3a:loxP-DsRed-loxP-DTA* (IRI-DTA)] (DTA、ジフテリア毒素) と前方の脊髄で Cre を発現する Tg[*hoxa4a:Cre*] を掛け合わせ、第 4 筋節周辺の脊髄内で

*dmrt3a* ニューロンを破壊することで、胸びれ運動における第 4 筋節周辺の *dmrt3a* ニューロンの機能の解明を目指した。

第 4 筋節周辺の *dmrt3a* ニューロンの破壊が狙い通りに起きているかを確認するために、Tg[*dmrt3a:loxP-DsRed-loxP-DTA* (IRI-DTA)], Tg[*hoxa4a:Cre*], Tg[*dmrt3a:GFP*]を使い、GFP 発現細胞を数えた。図 9A1 は[*hoxa4a:Cre*]を持たず、ジフテリア毒素が発現していない個体（野生型）、図 9A2 はジフテリア毒素が発現している個体（*dmrt3a-DTA*）の画像を示している。図 9B は筋節ごとに GFP 発現ニューロン数を記録したグラフである。*dmrt3a-DTA* では第 2 筋節から第 7 筋節までは GFP 発現ニューロンが大きく減少しており、第 8 筋節から第 12 筋節までは減少が続き、第 12 筋節以降は野生型と変わらなかった。このことから第 4 筋節周辺の脊髄に *dmrt3a* ニューロンをある程度選択的に破壊できていることが確かめられた。

以前の研究では脊髄内の全ての *dmrt3a* ニューロンを破壊すると仮想遊泳中の VR の活動が乱れることがあると報告されている (Satou et al., 2020)。しかし、この実験では脊髄の前方の *dmrt3a* ニューロンに限定して破壊しており、*dmrt3a-DTA* の VR は基本的には周期的な活動を示し (図 9C 下)、VR の活動が乱れる頻度は大きく減少した。図 9D で *Dmrt3a-DTA* の VR の周波数解析を行った。*dmrt3a-DTA* は野生型と比較すると、仮想遊泳中の VR の活動周波数が少し高くなった (野生型  $30.8 \pm 7.8$  Hz、*dmrt3a-DTA*  $32.0 \pm 8.1$  Hz)。

## 9、*dmrt3a-DTA* における MN の発火タイミングと MN へのシナプス入力の記録

結果 8 より胸びれ周辺の脊髄内で *dmrt3a* ニューロンを選択的に破壊することができたので、*dmrt3a-DTA* での外転筋 MN と内転筋 MN の発火タイミングと、外転筋 MN へのシナプス入力を記録した。図 10A、B はそれぞれ *dmrt3a-DTA* での外転筋 MN と内転筋 MN の発火の記録である。図 10C1、D1 は複数の *dmrt3a-DTA* の外転筋 MN と内転筋 MN の平均発火タイミングをまとめた円状のグラフを示している。*dmrt3a-DTA* の解析はより安定した遊泳を対象にするために 29~35 Hz の遊泳周期を解析対象とした (図 10C1、D1)。野生型の発火タイミング解析は、図 4E、F で行った最も安定している周期である 28~34 Hz を対象にした解析 (図 10C2 左、D2 左) と、*dmrt3a-DTA* と同じ周期である 29~35 Hz を対象にした解析 (図 10C2 右、D2 右) を行った。これにより解析の対象にする遊泳周期の差によ

て発火タイミングが変化してしまうかを確認した。その結果、野生型において外転筋 MN と内転筋 MN どちらの場合でも解析対象とする遊泳周期の違いによる差はほとんど見られなかった (図 10C2、D2)。

まず *dmrt3a*-DTA の外転筋 MN における平均発火タイミングの記録は、野生型の外転筋 MN で見られた平均発火タイミングの記録とは異なっていた (図 10C1、C2)。*dmrt3a*-DTA の平均発火タイミングの記録 (赤い点) と円の中心の距離は、野生型の記録と比較して有意に短くなっていた (*dmrt3a*-DTA  $0.62 \pm 0.17$  と野生型 28~34 Hz  $0.79 \pm 0.08$ ,  $p=1.9 \times 10^{-5}$  t テスト、*dmrt3a*-DTA  $0.62 \pm 0.17$  と野生型 29~35 Hz  $0.79 \pm 0.07$ ,  $p=1.3 \times 10^{-5}$  t テスト)。また *dmrt3a*-DTA では発火タイミングが有意に集中していない外転筋 MN もいくつか観察された (図 10C1、点線の円の内側の赤い点)。以上の結果から *dmrt3a*-RDT では、外転筋 MN の発火タイミングの集中度が低下しているもしくは失われていることが分かった。さらにすべての外転筋 MN の平均発火タイミングを平均すると、*dmrt3a*-DTA は  $0.54 \pm 0.11$ 、野生型 28~34 Hz が  $0.63 \pm 0.06$ 、野生型 29~35 Hz が  $0.60 \pm 0.09$  となったことから、*dmrt3a*-DTA では発火タイミングがより早いタイミングに移動していることが明らかになった。この結果は *dmrt3a* ニューロンが外転筋 MN への抑制性入力の後半部を担っているという仮説から予測された結果と一致した。

一方 *dmrt3a*-DTA の内転筋 MN の結果は野生型の結果と比べても大きな差は見られなかった (図 10D1、D2)。また *dmrt3a*-DTA の内転筋 MN の平均発火タイミングと円の中心の距離は野生型と比較しても有意な差は見られなかった (*dmrt3a*-DTA  $0.76 \pm 0.13$  と野生型 28~34 Hz  $0.79 \pm 0.09$ ,  $p=0.46$  t テスト、*dmrt3a*-DTA  $0.76 \pm 0.13$  と野生型 29~35 Hz  $0.77 \pm 0.09$ ,  $p=0.92$  t テスト)。さらにすべての内転筋 MN の平均発火タイミングを平均したが、*dmrt3a*-DTA と野生型に大きな差は見られなかった (*dmrt3a*-DTA  $0.12 \pm 0.08$ 、野生型 28~34 Hz  $0.14 \pm 0.11$ 、野生型 29~35 Hz  $0.15 \pm 0.13$ )。以上の実験から *dmrt3a* ニューロンの破壊は外転筋 MN の活動には強い影響を与えたが、内転筋 MN への影響は少なかったと考えられる。

さらに *dmrt3a*-DTA において、外転筋 MN へのシナプス入力を調べた。図 10F は *dmrt3a*-DTA の外転筋 MN へのシナプス入力の記録であり ( $n=7$ )、図 10E の野生型の記録 (図 5C と同じ図) である。*dmrt3a* ニューロンが外転筋 MN への抑制性入力の後半部を担っているという仮説を確認するために、*dmrt3a*-DTA と野生型で  $0.22 \sim 0.45$  (図 10E、F、青い網掛

け) のタイミングの外転筋 MN への抑制性入力を比較した。*dmrt3a*-DTA の外転筋 MN が 0.22~0.45 のタイミングで受ける抑制性入力、野生型が受ける抑制性入力と比較して有意に減少していた ( $p=2.8 \times 10^{-3}$ 、t テスト)。このことから *dmrt3a* ニューロンの破壊によって外転筋 MN が 0.22-0.45 のタイミングで受ける抑制性入力が増加していることが確かめられた。一方で、外転筋 MN への興奮性入力については *dmrt3a*-DTA と野生型で大きな差は見られなかった。

## 8、他の上流介在ニューロンの探索

胸びれ MN にシナプス入力を行う上流の介在ニューロンをさらに探索するために、*dmrt3a* ニューロン以外の介在ニューロンの発火タイミングを調べた。対象とした介在ニューロンは脊髄内での発現パターンが脊椎動物で広く保存されている転写因子群の中からいくつか選択した (図 1C、*chx10*、*en1*、*evx2*)。各介在ニューロン群の発火タイミングと MN へのシナプス入力のタイミングを比較するために、外転筋 MN と内転筋 MN へのシナプス入力の記録をそれぞれ図 11A、B に示した。

*chx10* 遺伝子が発現するニューロン (*chx10* ニューロン) は魚類や哺乳類の脊髄内に存在し、どちらの生物においても同側性で興奮性であると知られている (Kimura et al., 2006、Lundfald et al., 2007)。Tg[*chx10*:GFP]を用いて *chx10* ニューロンの発火タイミングを記録した (図 11C1)。*chx10* ニューロンは VR の活動に合わせて周期的に発火していた。MN と同様の手法で発火タイミングを解析して、平均発火タイミングを算出し、円状のグラフにまとめた (図 11C2)。*chx10* ニューロンは同側性、興奮性のニューロンであることから、0.85~1.0 のタイミングでの MN への興奮性入力と比較すると、一部の内転筋 MN への興奮性入力と *chx10* ニューロンの発火タイミングが重なっていた。

*en1* 遺伝子が発現するニューロン (*en1* ニューロン) は、魚類と哺乳類の両方で、同側性で抑制性であると知られている (Saueressig et al., 1999、Higashijima et al., 2004)。*en1* ニューロンを対象に、図 11C1、C2 と同様の実験を行い、図 11D1、D2 にその結果を示した。*en1* ニューロンは同側性、抑制性のニューロンであることから、0~0.2 のタイミングでの MN への抑制性入力と比較すると外転筋 MN への抑制性入力と *en1* ニューロンの発火タイミングが一致していた。

*evx2* 遺伝子が発現するニューロン (*evx2* ニューロン) は魚類と哺乳類の両方で交差性、



興奮性であると知られている (Moran-Rivard et al., 2001、Lai et al., 2016、Juárez-Morales JL et al., 2016)。evx2 ニューロンを対象に、図 11A1、A2 と同様の実験を行い、図 10E1、E2 にその結果を示した。dmrt3a ニューロンと同様に evx2 ニューロンが交差性であることと evx2 ニューロンは興奮性入力であることを考慮して、0.55 のタイミングでの MN への興奮性入力と比較すると、外転筋 MN への興奮性入力と evx2 ニューロンの発火タイミングが重なっていた。

## 【考察】

本研究では胸びれの周期的な運動を制御する神経回路について着手した。まず外転筋 MN と内転筋 MN がどちらも周期的な興奮性入力と抑制性入力を受けることを明らかにした。MN は興奮性入力と抑制性の組み合わせによる push-pull の法則によって制御されていると考えられる。また、*dmrt3a* ニューロンが外転筋 MN の発火タイミングの決定に重要な役割を果たしていることを強く示唆する証拠を見つけた。*dmrt3a* ニューロン以外についても、今後さらなる胸びれのリズム運動を制御する神経回路を解明が期待される。

### 1、胸びれ MN の細胞体の位置と投射パターンの関係性

胸びれ MN に Kaede を発現させて投射パターンを観察した実験により、脊髄内の細胞体の位置が頭部側の MN ほど胸びれの背側に、尾部側の MN ほど腹側に投射する傾向があることが明らかになった。この投射パターンの違いは成長が進むにしたがってより細かな胸びれの運動をするために重要である可能性がある。発生初期の 3dpf~5dpf においては、ゼブラフィッシュ稚魚は胸びれを交互に開閉する単純な運動を行う。この運動の役割は体の周囲の水をかき回すことで皮膚呼吸を補助するためであるという研究がある (Green et al., 2011)。7dpf まで成長が進むと、遊泳中の胸びれ運動は揚力 (体を上方へ移動させる力) を作り出す (Ehrlich and Schoppik, 2019)。この運動では単純な開閉運動ではなく、胸びれをひねるような細やかな動きをして水を押し下げていると考えられる。このような、より洗練された運動を行うためには、背側 (成魚ではリーディングエッジと呼ばれる) と腹側 (成魚ではトレイリングエッジと呼ばれる) を異なるタイミングで活動させる必要がある。さらに成魚の胸びれは外転筋が 3 種類 (表層外転筋、深層外転筋、腹側立筋) と内転筋が 3 種類 (表層内転筋、深層内転筋、背側立筋) で構成されており、より複雑な運動を可能にしていると考えられる (Thorsen and Hale, 2005)。3dpf で観察された胸びれ MN の軸索投射の違いは、成長するにつれて複雑化する胸びれ運動の制御に貢献している可能性がある。

### 2、外転筋 MN と内転筋 MN の発火パターンについて

3dpf のゼブラフィッシュが示す安定した遊泳において、外転筋 MN と内転筋 MN は交互に活動している。ゼブラフィッシュ稚魚の胸びれは外転筋と内転筋の 2 つの筋肉だけで構

成されており非常に単純な構造であるが、この外転筋と内転筋の協調は、歩行中の哺乳類の四肢や、甲羅を掻くカメの後肢で観察される、屈筋と伸筋の協調と非常に似た性質である (Kiehn, 2016、Stein, 2010)。

内転筋 MN の平均発火タイミングは外転筋 MN のものと比較してより幅広いタイミングに分布していたが、個々の細胞では周期性の強さ (原点から各平均発火タイミングの点の距離) は内転筋 MN と外転筋 MN に差は見られなかった (図 4E、F)。また、内転筋 MN への入力の記録を見てみると、各内転筋 MN においては平均発火タイミングの前後で興奮性入力と抑制性入力組み合わせられているが (図 6C)、複数の内転筋 MN への興奮性入力と抑制性入力は外転筋 MN のものと比較すると、ニューロン毎にタイミングに差が見られた (図 6D)。このことから内転筋 MN へのシナプス入力のタイミングはニューロンごとに少しずつ異なり、その差が図 4F で見られた内転筋 MN の幅広い内筋発火タイミングの分布の要因となっていると考えられる。本研究において、MN の発火タイミングや MN へのシナプス入力の記録は第 4 筋節の MN だけを対象にしている。そのため、内転筋 MN 間の平均発火タイミングの幅広い分布は脊髄内の細胞体の位置による違いに起因するわけではないと考えられる。一方、内転筋 MN の細胞体の分布は外転筋 MN の細胞体と比較するとより狭くなっている (図 3C1、C2、第 2 筋節には内転筋 MN の細胞体がほとんどない)。そのため一つの筋節に含まれる内転筋 MN が多様になり、外転筋 MN よりも発火タイミングが幅広くなっている可能性もある。

### 3、外転筋 MN と内転筋 MN へのシナプス入力

外転筋 MN と内転筋 MN はどちらも、周期的な興奮性入力と抑制性入力を受けていた。どちらの MN も発火するタイミングで興奮性入力が強く入り、発火していないタイミングでは抑制性入力が強く入っていた (図 5D、6D)。この結果からどちらの MN も、興奮性入力と抑制性入力が交互に組み合わせり発火タイミングが決まると考えられる (push-pull 制御、Johnson et al., 2012)。このような胸びれ MN の制御メカニズムは、後肢で甲羅を掻く動作を行うカメや (Robertson and Stein, 1988)、歩行中の哺乳類 (Shefchyk and Jordan, 1985、Cazalets et al., 1996、Hochman and Schmidt, 1998、Endo and Kiehn, 2008) で見られる MN の制御メカニズムに類似している。

#### 4、反対側の外転筋 MN を抑制する抑制性、交差性ニューロンである *dmrt3a* ニューロンについて

抑制性、交差性である *dmrt3a* ニューロンの発火タイミングは外転筋 MN が受ける抑制性入力の後半部と一致しており（図 7G、青い網掛）、*dmrt3a* ニューロンと外転筋 MN の間には選択的な抑制性シナプスが見られた（図 8D、E）。さらに、ジフテリア毒素によって胸びれ周辺の脊髄内で *dmrt3a* ニューロンを破壊した実験では、外転筋 MN の発火がより早いタイミングでも起きてしまっていた（図 10C1）。加えて、*dmrt3a* ニューロンを破壊したゼブラフィッシュで外転筋 MN へのシナプス入力を記録したところ、*dmrt3a* ニューロンに担われていると考えられるタイミングでの外転筋 MN への抑制性入力が増加していた（図 10G）。これらの結果は *dmrt3a* ニューロンが 0.22~0.45 のタイミングで外転筋 MN に抑制性入力を送っているという仮説を非常に強く支持している。

伝統的な脊髄内 CPG のモデルでは、屈筋系と伸筋系の相互抑制が四肢における屈筋-伸筋の協調に中心的な役割を果たしていると考えられている（Brown, 1911）。このモデルでは、屈筋の MN と伸筋の MN の発火制御を行う介在ニューロンが同側の脊髄内で完結していると考えても妥当ではある。しかしながら、カメの片足だけで行う引っ掻き運動を適切に完了するためには反対側の神経回路が必要であることが示されている（Stein et al., 1995）。この研究によって片側だけで行われる屈筋と伸筋の正確な制御には反対側の神経回路も必要であると示唆された。本研究の結果もこの結論と矛盾しない。さらに本研究では、ゼブラフィッシュの胸びれ MN 制御において、CPG の最も下層の介在ニューロン（MN に直接出力する介在ニューロン）が反対側から外転筋 MN を直接抑制していることを明らかにした。このような反対側の介在ニューロンによる MN の発火制御の仕組みは哺乳類を含む脊椎動物の四肢の制御にも存在していると期待できる。

#### 5、*dmrt3a* ニューロンの胸びれと体幹での役割

先行研究により、遊泳中の体幹の *dmrt3a* ニューロンは反対側の体幹 MN に発火とは逆のタイミングで抑制性入力を送っていることが示された（Satou et al., 2020）。脊髄全体の *dmrt3a* ニューロンを破壊すると、左右の体幹 MN が同時に発火し、両側で筋収縮が起きてしまい、通常の遊泳パターンができなくなってしまうことがある。実験 7 で行った *dmrt3a* ニューロンの破壊実験はこの問題を軽減するために、*dmrt3a* ニューロンの破壊を胸びれ周辺の脊髄

内に限定した。これにより遊泳パターンが乱れることがほとんどなくなった。

今のところ胸びれ周辺の脊髄内にある *dmrt3a* ニューロンの中に外転筋 MN の活動を制御するニューロンが含まれていることは明らかになった。しかし胸びれ周辺の脊髄内にある *dmrt3a* ニューロンが体幹の MN の制御に関わっているかどうかは明らかになってはいない。しかし、*dmrt3-DTA* では仮想遊泳の周期が野生型より少し早くなっていた（野生型 図 4B、*dmrt3-DTA* 図 9D）。これは胸びれ周辺の *dmrt3a* ニューロンの中に体幹の MN の制御に関わるものが含まれていることに起因すると考えられる。*dmrt3a* ニューロンの 1 細胞レベルでの形態観察では、胸びれ周辺の *dmrt3a* ニューロンの平均の軸索長は体の中央部にある *dmrt3a* ニューロンよりも短かった（図 7B、Satou et al., 2020）。その理由は *dmrt3a* ニューロンの中に非常に短い軸索を持つものがあったからである（図 7A1）。このことから、短い軸索を持つ *dmrt3a* ニューロンが胸びれ MN の制御のために使われ、長い軸索を持つ *dmrt3a* ニューロンは体幹 MN の制御に使われるなどの使い分けをしている可能性がある。

## 6、進化的な考察

本研究により *dmrt3a* ニューロンが外転筋 MN に強い抑制性シナプスを持つことが示された。*dmrt3a* は哺乳類の *dmrt3* と相同な遺伝子である。そして魚類の *dmrt3a* ニューロンと哺乳類の *dmrt3* が発現するニューロン (*dmrt3* ニューロン) の基本的な性質は保存されている。哺乳類の *dmrt3* ニューロンは抑制性で、主に交差性であり、反対側の CPG 回路や MN を抑制することで左右の協調に関わっていると考えられている (Andersson et al., 2012、Vallstedt and Kullander, 2013、Perry et al., 2019)。しかしながら実際の運動中にどのような機能を果たしているかを解明できてはいない。

筋肉や MN での遺伝子の発現パターンによると、外転筋は腹側の筋前駆体から分化する筋肉と対応し、内転筋は背側の筋前駆体から分化する筋肉と対応している。例えば *lhx1* はゼブラフィッシュの内転筋 MN で発現しているが（図 3E）、この遺伝子は哺乳類の背側から分化した筋肉に投射する MN に発現している。また *lhx1bb* という遺伝子はゼブラフィッシュ稚魚胸びれの内転筋で発現している（図 3F）。脊椎動物の四肢の背側ではゼブラフィッシュと相同な遺伝子が発現している (vogel et al., 1995)。このことから外転筋は哺乳類の前肢の腹側の筋肉に相当し、内転筋は前肢の背側に筋肉に相当すると考えられる。本研究では *dmrt3a* ニューロンが外転筋 MN への抑制性入力を行っており、外転筋 MN の発火タイム

ングの決定に重要な役割を果たしていることを示した。脊椎動物の脊髄内における遺伝子発現パターンの一貫性を考慮すると、哺乳類の *dmrt3* ニューロンが前肢の屈筋 MN への抑制性入力を行い発火制御に関わっている可能性がある。

## 7、*dmrt3a* ニューロン以外の上流介在ニューロンの探索と今後の展望

脊椎動物において脊髄内の転写因子発現パターンは保存されており、魚類から哺乳類まで相同な転写因子が発現するニューロンは同じような性質を持つ(図 1C、*chx10* について、Kimura et al., 2006、Lundfald et al., 2007、*en1* について、Saueressig et al., 1999、Higashijima et al., 2004 等)。本研究では *dmrt3a* ニューロン以外に、3 種類の転写因子を発現するニューロンについて発火タイミングを調べた。

*chx10* ニューロンの発火タイミングは一部の内転筋 MN への興奮性入力のタイミングと一致しているため、この入力は *chx10* ニューロンに担われている可能性がある。一方で *chx10* ニューロンの発火タイミングに興奮性入力を受けていない内転筋 MN も存在していた。このことから内転筋 MN はニューロン毎にシナプス結合を持つ介在ニューロンが異なることにより、内転筋 MN がニューロン間で少し異なる発火タイミングを示している可能性がある。

*en1* ニューロンの発火タイミングは外転筋 MN への抑制性入力のタイミングと一致していた。本研究において外転筋 MN への抑制性入力の後半部は *dmrt3a* ニューロンによって担われていることが明らかになったが、*en1* ニューロンが抑制性入力の前半部を担う可能性や後半部をさらに抑制する介在ニューロンである可能性がある。*en1* ニューロンはマウスの後肢において、背側の伸筋に投射する MN より腹側の屈筋に投射する MN にシナプスを多く持つと報告されている (Britz et al., 2015)。*en1* ニューロンが腹側から分化する外転筋に投射する MN に抑制性シナプスを作っている場合、哺乳類での報告と矛盾しない。

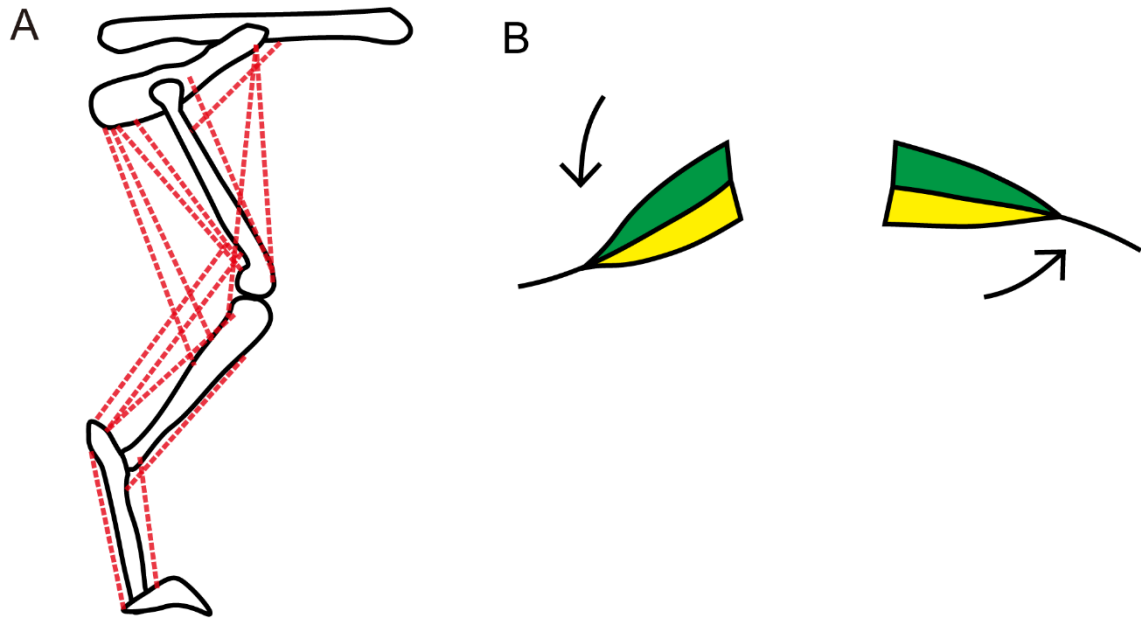
*evx2* ニューロンの発火タイミングは外転筋 MN への興奮性入力のタイミングと一致していた。*evx2* は脊髄内の V0 と呼ばれる領域から分化する興奮性ニューロンで発現しており、マウスでそのニューロン群を破壊すると、低速歩行時に後肢の左右の協調が乱れると報告されている (Talpalar et al., 2013)。外転筋 MN の制御と *evx2* ニューロンの関係を解明できれば、哺乳類で観察された表現型をより正確に解釈できると期待できる。

以上の 3 種の介在ニューロン群はゼブラフィッシュやマウスの研究により脊髄内 CPG に

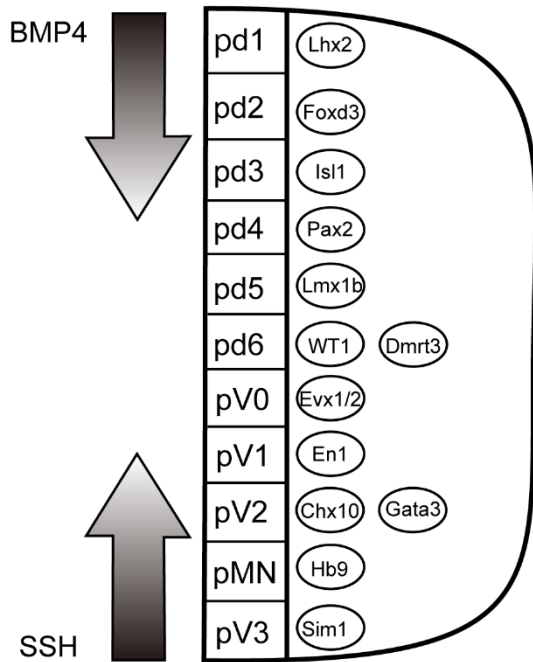
深くかかわるとされる介在ニューロン群ではある。しかしながら、本研究では介在ニューロン群の発火タイミングと胸びれ MN へのシナプス入力のタイミングの比較しか行っていない。今後これらの介在ニューロンを対象として、*dmrt3a* ニューロンで行った実験を含む様々な追加実験を行うことにより、胸びれ MN の制御に関わる介在ニューロンを発見できると期待できる。また、この 3 種類の介在ニューロン群以外にも胸びれ MN の上流となりうる介在ニューロン群が存在する。それらのニューロン群に対しても研究が進むことを期待する。

# 【図と図の説明】

図 1



**C**

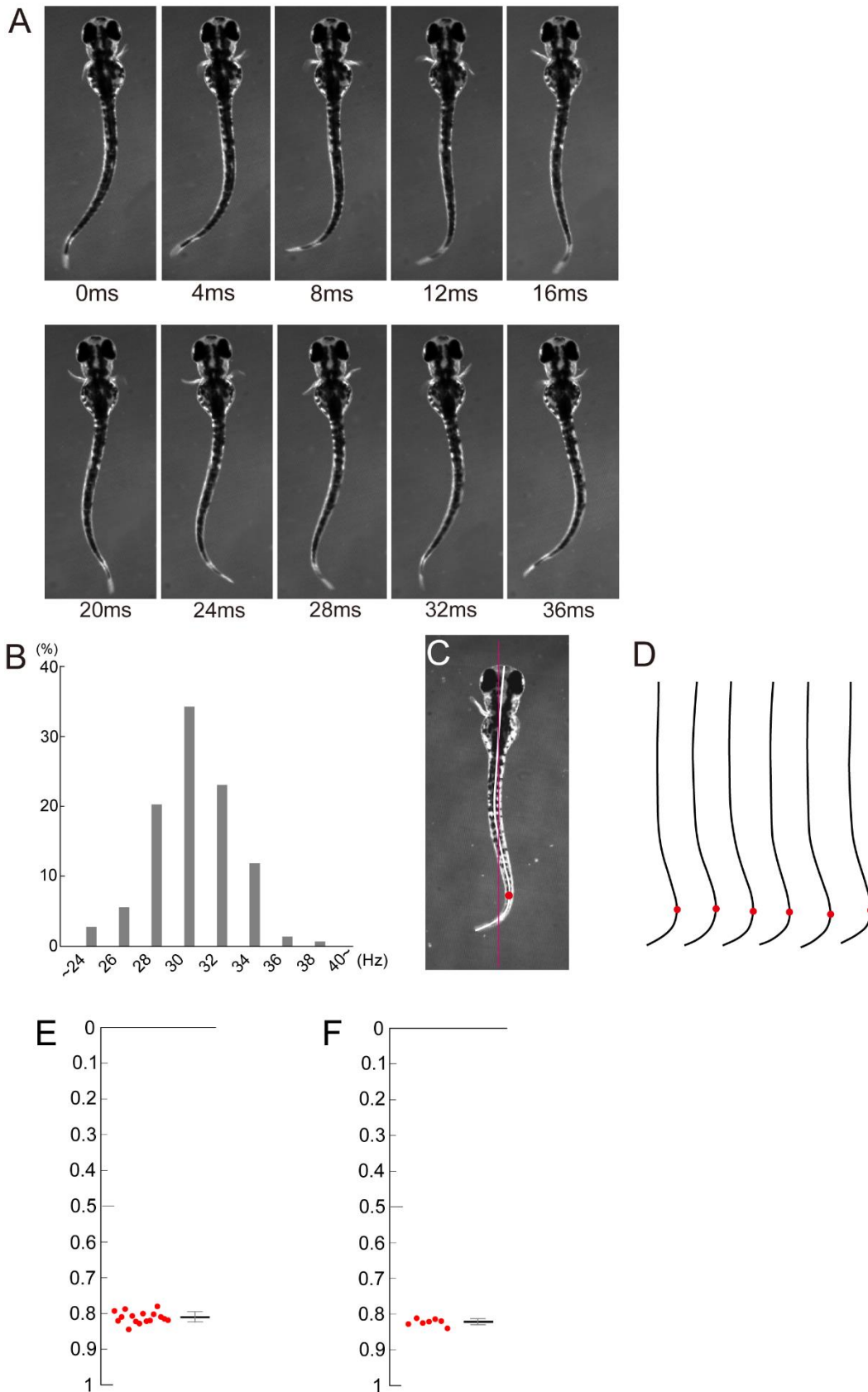




## 図 1 哺乳類と魚類の付属肢の構造と脊髄内の発生

- A 猫の後肢の模式図。主要な筋肉を赤い点線で示した。関節が多く、多数の筋肉で運動制御される。
- B ゼブラフィッシュの胸びれの模式図。外転筋（緑）と内転筋（黄色）で構成されている。図では左胸びれは内転しており、右胸びれは外転している様子を示している。3dpf では単純な左右交互の開閉運動を示す。
- C 脊椎動物の脊髄内における遺伝子の発現パターンを示した模式図。脊髄の断面図であり、上が背側、下が腹側である。背腹軸に従っていくつかの領域に分かれて、異なる転写因子が発現する。

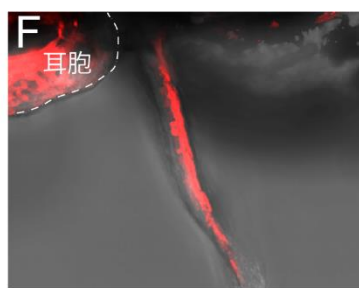
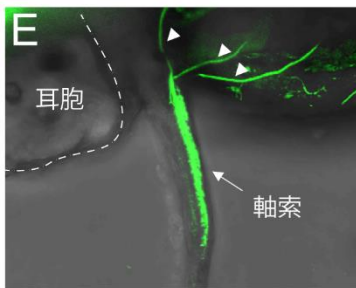
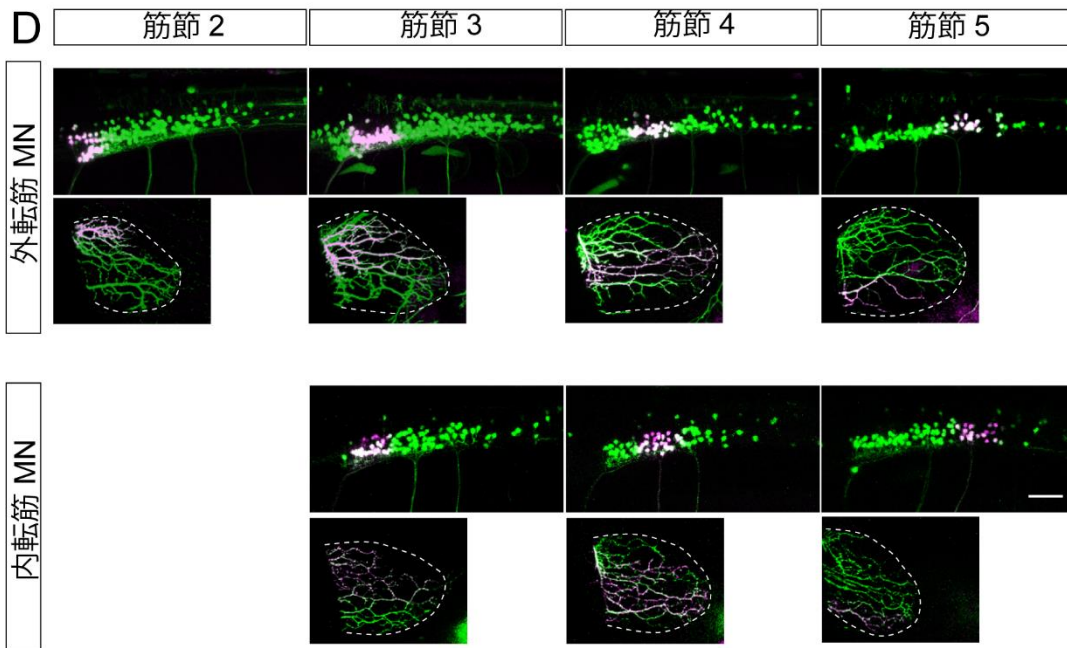
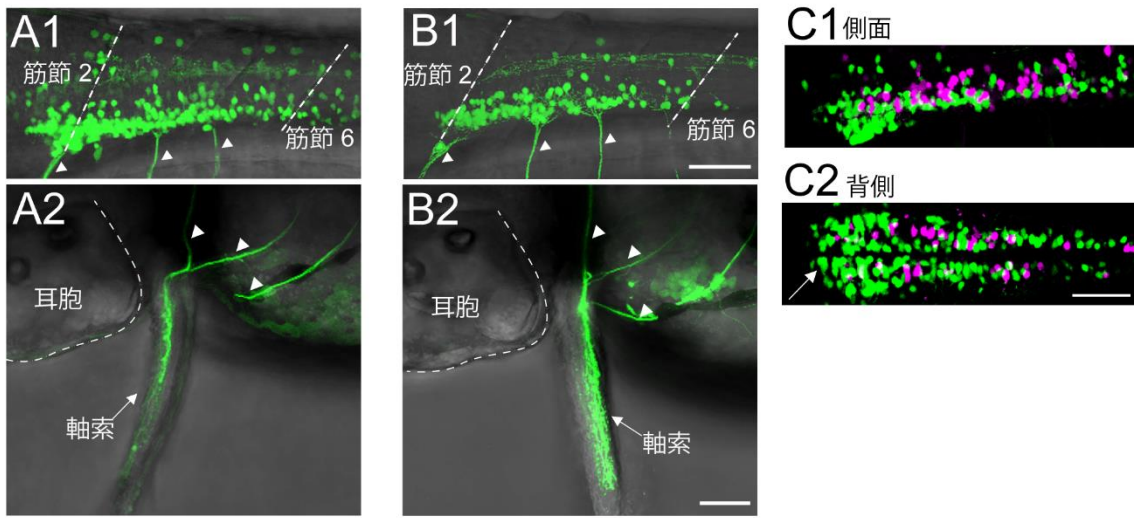
☒ 2



## 図 2 3dpf のゼブラフィッシュ稚魚の胸びれリズム運動

- A 3dpf のゼブラフィッシュ稚魚の安定した遊泳のタイムラプス画像。胸びれ交互運動と体幹の波状の運動を組み合わせることで泳ぐ。
- B 自由遊泳時の遊泳周期の分布 (11 個体、143 周期)
- C 右の胸びれを開き始めた時の画像。赤い線が魚の前半部の回帰線分を示す。白い曲線は魚の正中線を示す。赤い丸は体の正中線上で回帰線分から最も離れている点 (屈曲点) を示す。
- D 同一個体の遊泳において C で示した正中線 (白い曲線) と屈曲点を抽出し、6 周期分並べた図。
- E 同一個体の遊泳について、頭の先端を 0、尾の先端を 1 として、右の胸びれを開き始めた時の屈曲点を数値化し、グラフにまとめた (n=15)。
- F 個体毎の屈曲点の平均をグラフにまとめた (n=7)

図 3

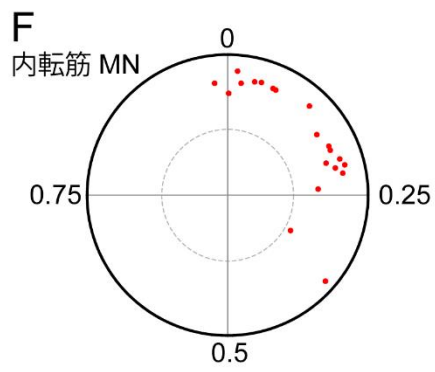
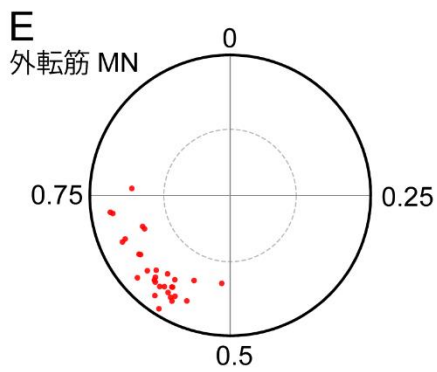
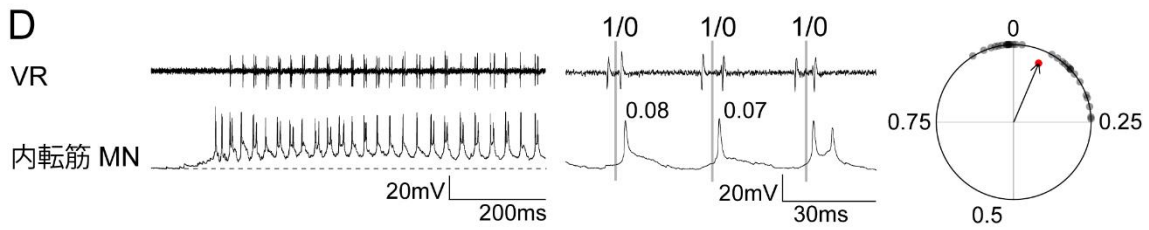
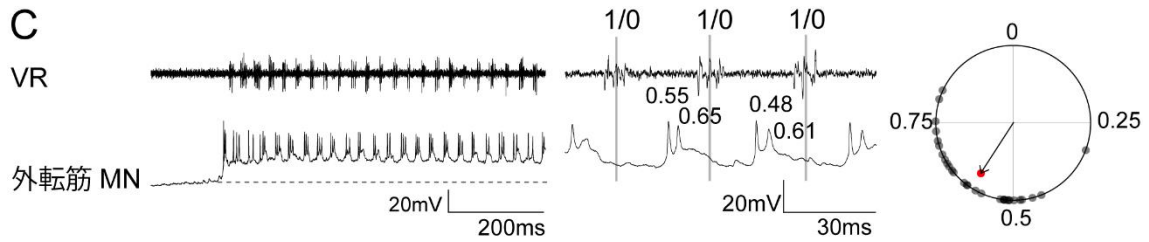
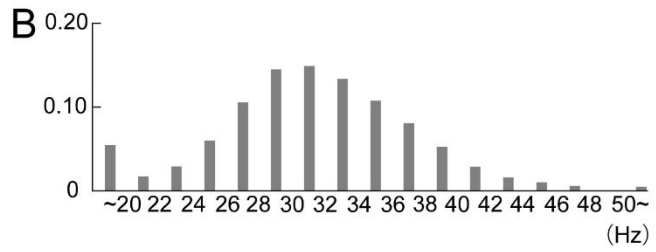


### 図3 外転筋 MN、内転筋 MN の可視化と内転筋の可視化

- A 外転筋 MN のマーカーとして用いた Tg[zCREST2-hsp70:GFP]の共焦点画像のスタック。A1 は脊髄を側面から撮影した画像、A2 は胸びれを背側から撮影した図。
- B 内転筋 MN のマーカーとして用いた Tg[hspzGFFgDMC26A];[UAS:GFP]の共焦点画像のスタック。B1 は脊髄を側面から撮影した画像、B2 は胸びれを背側から撮影した図。
- C Tg[zCREST2-hsp70:GFP];[hspzGFFgDMC26A];[UAS:RFP]の画像。外転筋 MN に GFP、内転筋 MN に RFP が発現している。C1 は脊髄を側面から撮影した画像。C2 は脊髄を背側から撮影した画像。頭部方向の脊髄内では外転筋 MN が分布しているが、内転筋 MN がほとんど分布していない部分がある（矢印）。
- D 上の列は外転筋 MN で Kaede を発現させた魚の実験。左から、第 2 筋節から第 5 筋節まで 1 筋節ごとの外転筋 MN の細胞体に紫外線を照射した魚の画像。第 2 筋節から第 6 筋節までの脊髄と胸びれを側面から撮影した。下の列は内転筋 MN で同様の実験を行った。第 2 筋節内の内転筋 MN は少ないので、内転筋 MN では第 3 筋節から実験を行った。
- E Tg[lhx1a:GFP]を背側から撮影した共焦点画像の重ね合わせ図。胸びれの内転筋に軸索が投射している。
- F Tg[lmx1bb:RFP] を背側から撮影した共焦点画像の重ね合わせ図。内転筋で GFP が発現している。

図 4

A 外転筋 MN と内転筋 MN の  
1 細胞記録 (筋節 4)



#### 図 4 外転筋 MN と内転筋 MN の発火タイミング解析

- A 発火タイミングの記録を行った実験の模式図。第 4 筋節からルースパッチ、若しくはホールセルで胸びれ MN の発火を記録し、第 9 筋節と第 10 筋節の間から VR の活動を記録した。
- B 仮想遊泳中に記録される VR の活動の周波数をまとめた図（7 個体 2920 周期）。
- C ある外転筋 MN のホールセル記録と解析。左の図は仮想遊泳中の記録で、上の波形が VR の活動、下の波形が外転筋 MN の記録。中央は仮想遊泳の 3 周期程度の波形を拡大して表示した図であり、VR の活動を基準に発火タイミングを数値化した。右の図は仮想遊泳中の外転筋 MN の発火タイミングを表示した円状のグラフ。円周上の点は無作為に選ばれた 30 個の発火のタイミングを示し、円内の赤い点は平均発火タイミングを示す。
- D C と同じ実験をある内転筋 MN に対して行った図。
- E 複数の外転筋 MN の平均発火タイミングの記録（N=30）。
- F 複数の内転筋 MN の平均発火タイミングの記録（N=20）。

図 5

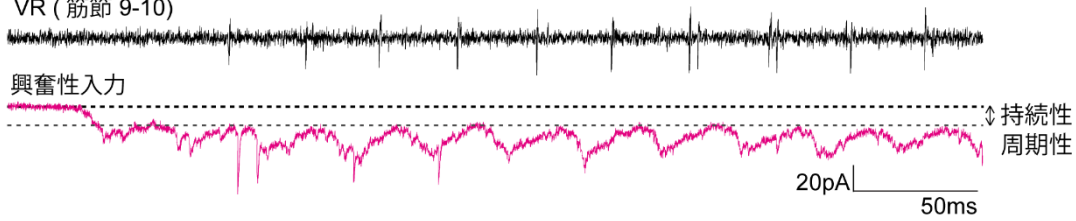
A1 ルースパッチ

VR (筋節 9-10)



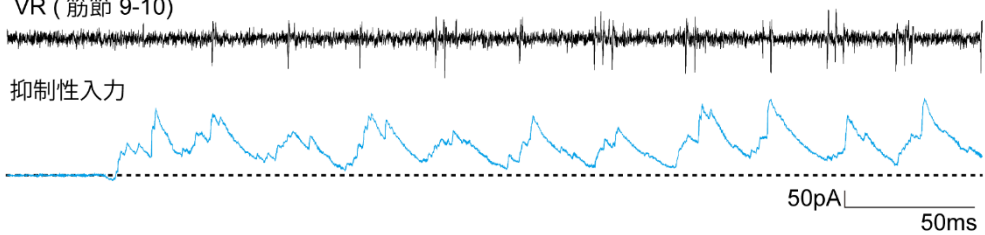
A2 電位固定法 (固定電位, -74mV)

VR (筋節 9-10)

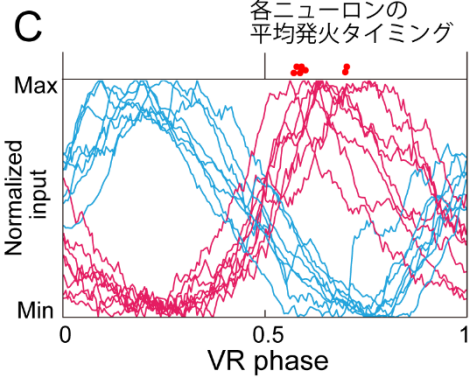
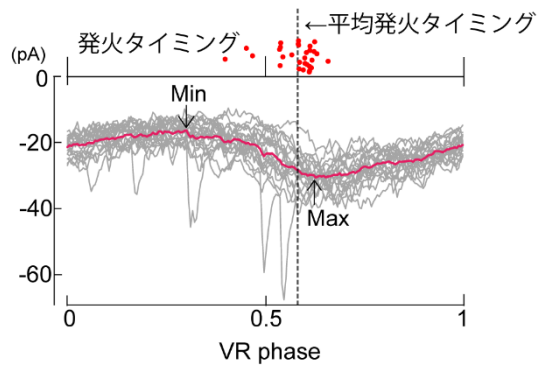


A3 電位固定法 (固定電位, +10mV)

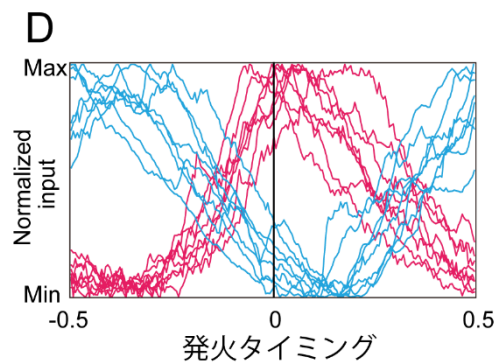
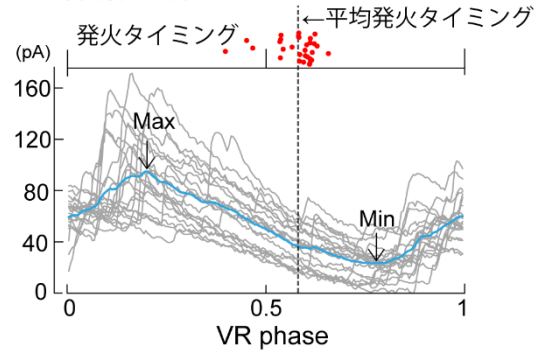
VR (筋節 9-10)



B1 興奮性入力



B2 抑制性入力





## 図 5 電位固定法による外転筋 MN へのシナプス入力記録と解析

- A A1 はある外転筋 MN のルースパッチ記録。A2、A3 は同一の外転筋 MN のホールセル記録。A2 では電位固定法で膜電位を $-74\text{mV}$  に固定して興奮性入力を記録した。A3 では電位固定法で膜電位を $+10\text{mV}$  に固定して抑制性入力を記録した。
- B B1 は A2 で記録した興奮性入力を VR の周期に合わせ、20 周期分重ね合わせたグラフ（灰色の波形）。興奮性入力の平均は赤い波形で示した。A1 で記録した発火タイミングをグラフ上部の赤い点 ( $n=30$ ) で示し、平均発火タイミングを点線で示した。B2 は A3 で記録した抑制性入力を基にした図。表示は B1 と同様だが、抑制性入力の平均は青い波形で示した。
- C 複数の外転筋 MN への平均シナプス入力の記録をまとめた図 ( $n=8$ )。興奮性入力と抑制性入力はニューロン毎に最大値 (Max) と最小値 (Min) で相対化した。各ニューロンの平均発火タイミングはグラフ上部の赤い点で示した。赤い波形は興奮性入力を示し、青い波形は抑制性入力を示す。
- D それぞれのニューロンの平均発火タイミングを 0 として前後の 0.5 周期の平均シナプス入力を表示した ( $n=8$ )。赤い波形は興奮性入力を示し、青い波形は抑制性入力を示す。

# 図 6

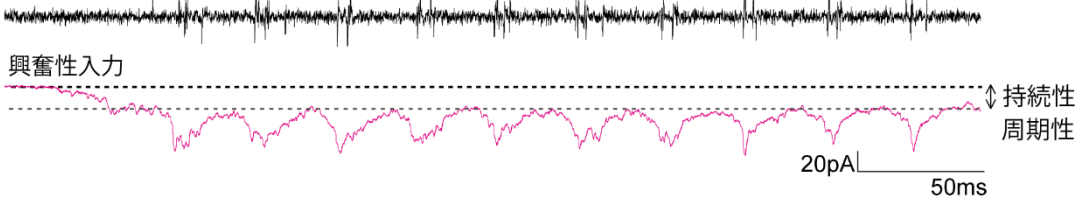
## A1 ルースパッチ

VR (体幹 9-10)



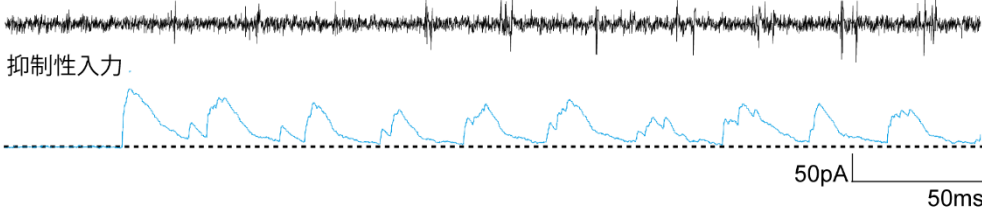
## A2 電位固定法 (固定電位, -74mV)

VR (体幹 9-10)

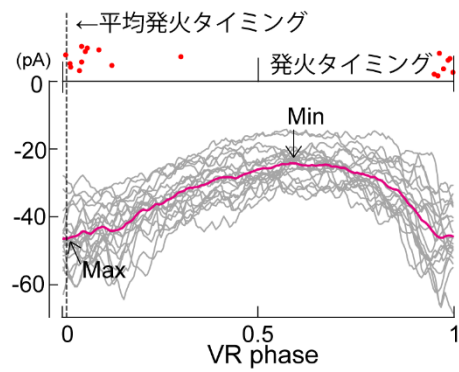


## A3 電位固定法 (固定電位, +10mV)

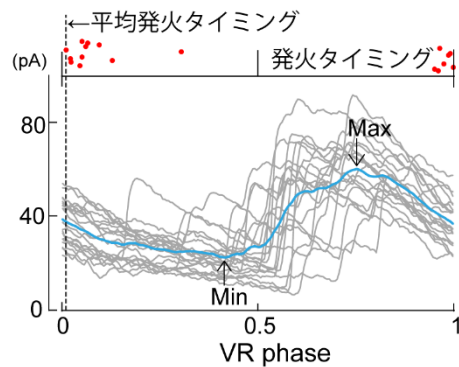
VR (体幹 9-10)



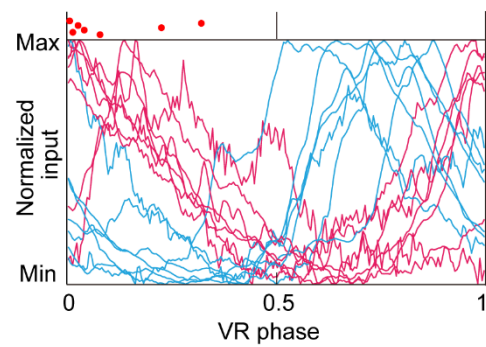
## B1 興奮性入力



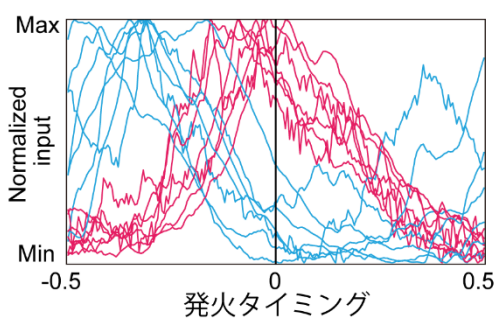
## B2 抑制性入力



## C 各ニューロンの平均発火タイミング



## D



## 図 6 電位固定法による内転筋 MN へのシナプス入力の記録と解析

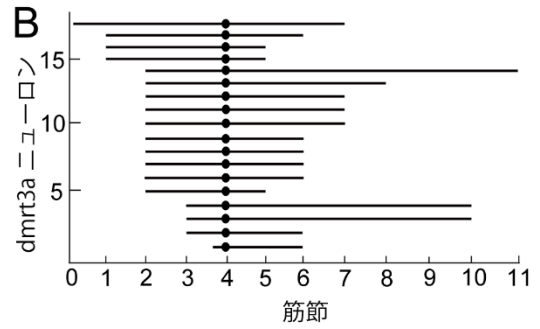
図 6 は内転筋 MN を対象に、図 5 と同様の実験や解析を行った。図 6C、D は  $n=7$  である。

図 7

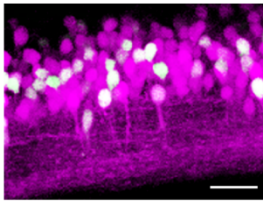
A1 *dmrt3a* ニューロン (短い軸索)



A2 *dmrt3a* ニューロン (長い軸索)



C Tg [*dmrt3a*:GFP], [*glyt2*:RFP]



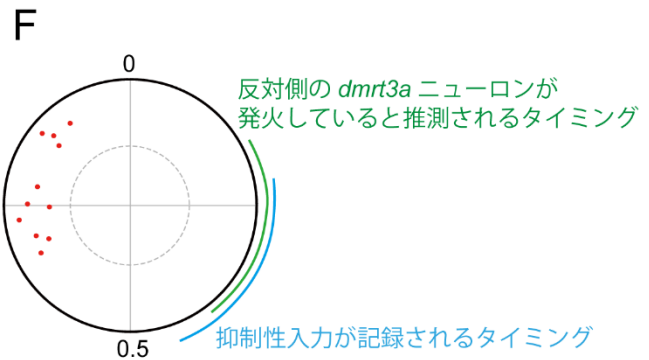
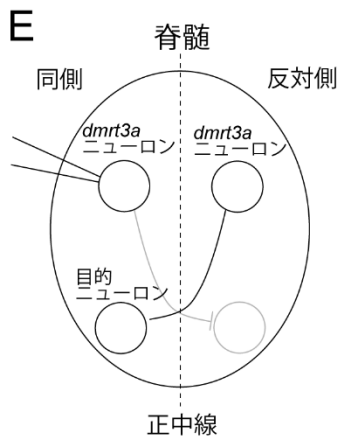
VR (筋節 9-10)



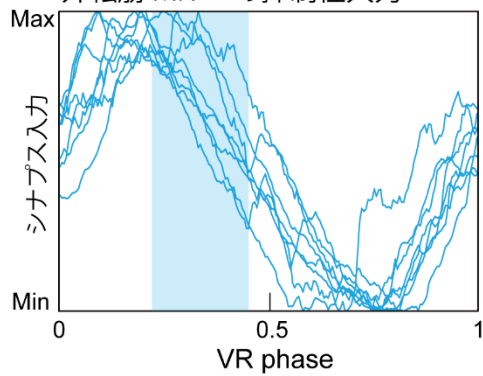
*dmrt3a* ニューロン



30ms



G 外転筋 MN への抑制性入力



## 図 7 第 4 筋節内に細胞体がある *dmrt3a* ニューロンの性質

- A *dmrt3a* ニューロンの 1 細胞レベルでの形態観察。A1 は短い軸索を持つ *dmrt3a* ニューロンの 1 例。A2 は長い軸索を持つ *dmrt3a* ニューロンの 1 例。
- B 複数の *dmrt3a* ニューロンの軸索形態をまとめた図 (n=18)。黒い丸は細胞体を示し、各ニューロンが軸索を伸ばしている筋節まで黒い線を伸ばした。
- C Tg[*dmrt3a*:GFP];[*glyt2*:RFP]の共焦点画像のスタック。第 4 筋節周辺の脊髄を側面から撮影した。
- D *dmrt3a* ニューロンのルースパッチの記録。
- E *dmrt3a* ニューロンの発火記録実験の状況を模式的に示した図。*dmrt3a* ニューロンの発火記録と MN の記録は同側で記録した。*dmrt3a* ニューロン交差性なので、シナプス入力のおこなった MN とシナプス結合を持つ *dmrt3a* ニューロンは反対側に存在すると考えられる。
- F 複数の *dmrt3a* ニューロンの平均発火タイミングを示した円状のグラフ (n=11)。緑の弧は反対側の *dmrt3a* ニューロンが発火していると予想されるタイミング (0.17-0.40) を示した。青い弧は *dmrt3a* ニューロンの軸索を活動電位が伝達する遅延やシナプス伝達を考慮し、下流のニューロンに入力が記録されると予想されるタイミング (0.22-0.45) を示した。
- G 複数の外転筋 MN への抑制性入力を示した図 (図 5C の抑制性入力のための記録)。*dmrt3a* ニューロンによる入力があると考えられるタイミング (0.22-0.45) を青い網掛けで示した。

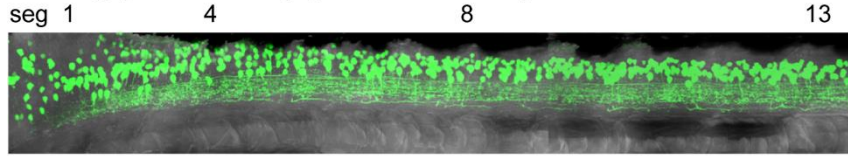


**図 8 *dmrt3a* ニューロンと胸びれ MN とのシナプス結合**

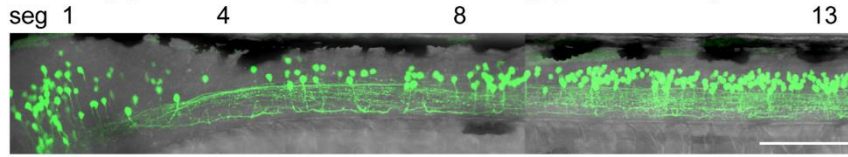
- A 実験の模式図。*dmrt3a* ニューロンに ChR を発現させ、胸びれ MN から抑制性入力を記録した（膜電位を+10mV に固定した）。青色光は第 4 筋節を中心に 2 筋節の範囲（第 3 筋節の後半部から第 5 筋節の前半部）に 20ms 照射し、胸びれ MN への入力の有無を調べた。
- B 青色光照射時の外転筋 MN へのシナプス入力の記録。複数回の青色光照射を行った際の波形を重ねている。
- C 内転筋 MN について B と同様の実験を行った。
- D 青色光照射開始から 40ms 以内に MN への抑制性入力が記録された割合をグラフにして、外転筋 MN と内転筋 MN で比較した（外転筋 MN n=12、内転筋 MN n=6）。\* $p < 0.05$  (Mann-whitney U test,  $p=0.013$ )。
- E 青色光照射開始から 40ms 以内に記録された平均シナプス入力の最大値をグラフにして、外転筋 MN と内転筋 MN で比較した（外転筋 MN n=12、内転筋 MN n=6）。\* $p < 0.005$  (Mann-whitney U test,  $p=0.0017$ )。
- F *dmrt3a* ニューロンと胸びれ MN とのシナプス結合を模式的に示した図。

図 9

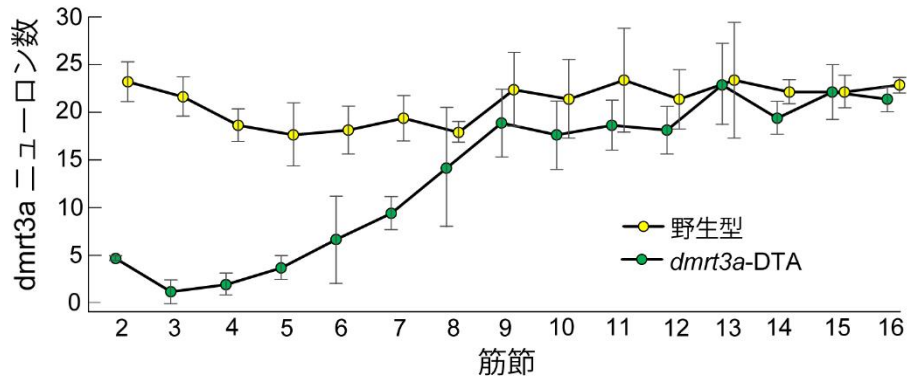
A1 Tg [*dmrt3a*:GFP]; [*dmrt3a*:IRI-DTA]



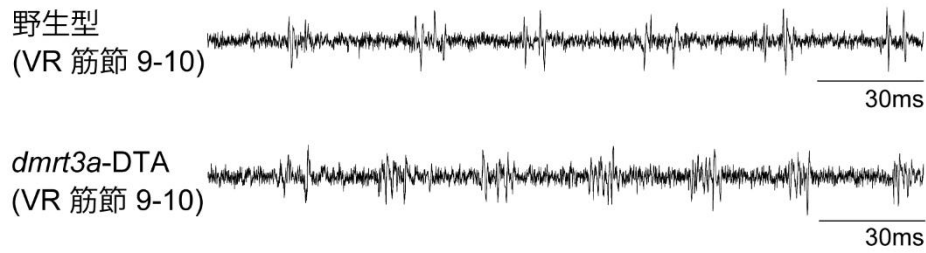
A2 Tg [*dmrt3a*:GFP]; [*dmrt3a*:IRI-DTA]; [*hoxa4a*:Cre]



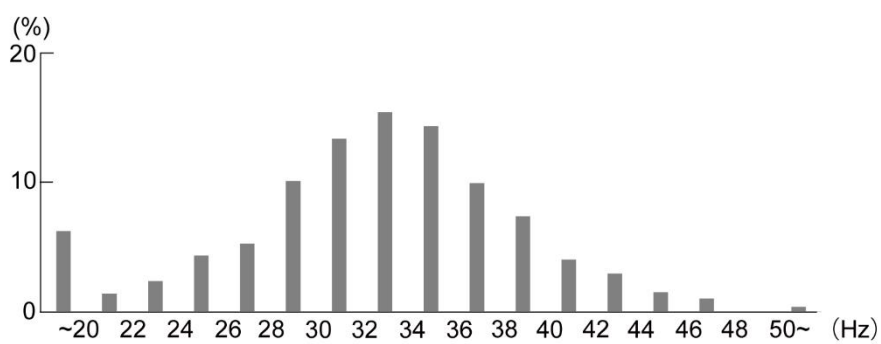
B



C



D

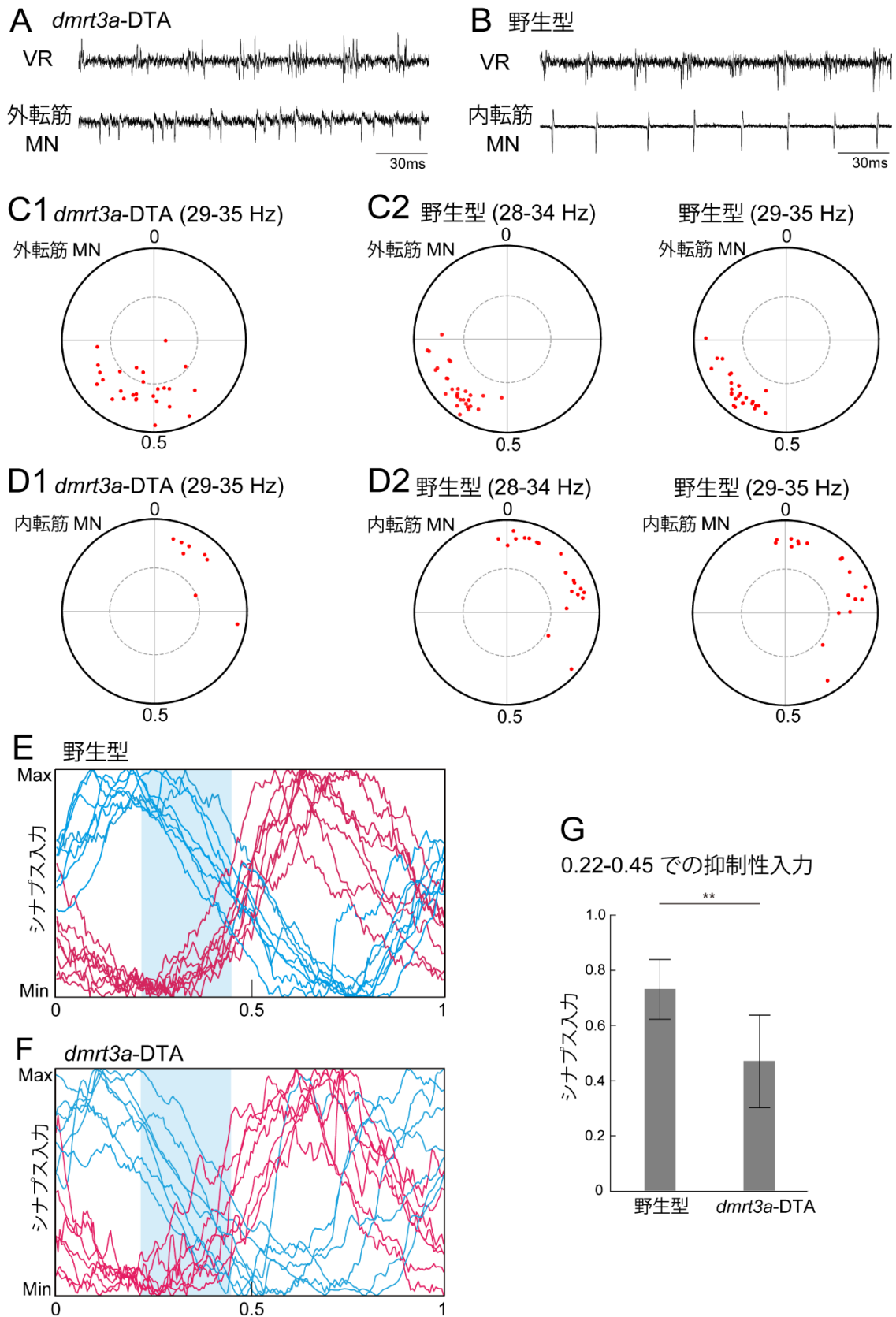




**図 9 *dmrt3a* ニューロンの遺伝学的破壊と VR の表現型**

- A A1 は Tg[*dmrt3a*:GFP];[*dmrt3a*:IRI-DTA] の GFP の蛍光画像。A2 は A1 の魚に Tg[*hoxa4a*:Cre] を掛け合わせた個体の GFP の蛍光画像。Tg[*hoxa4a*:Cre] は頭部に近い脊髄内で Cre が発現し、Cre による組換えが起こるとジフテリア毒素が発現する。A2 では *dmrt3a* ニューロン (GFP 発現ニューロン) が減少した。
- B 野生型と *dmrt3a*-DTA の、各筋節に存在する GFP 発現ニューロンの数を数えた (n=4)。
- C 野生型 (上) と *dmrt3a*-DTA (下) の仮想遊泳時の VR の記録。
- D *dmrt3a*-DTA の仮想遊泳の周期をまとめた図 (4 個体、1864 周期)

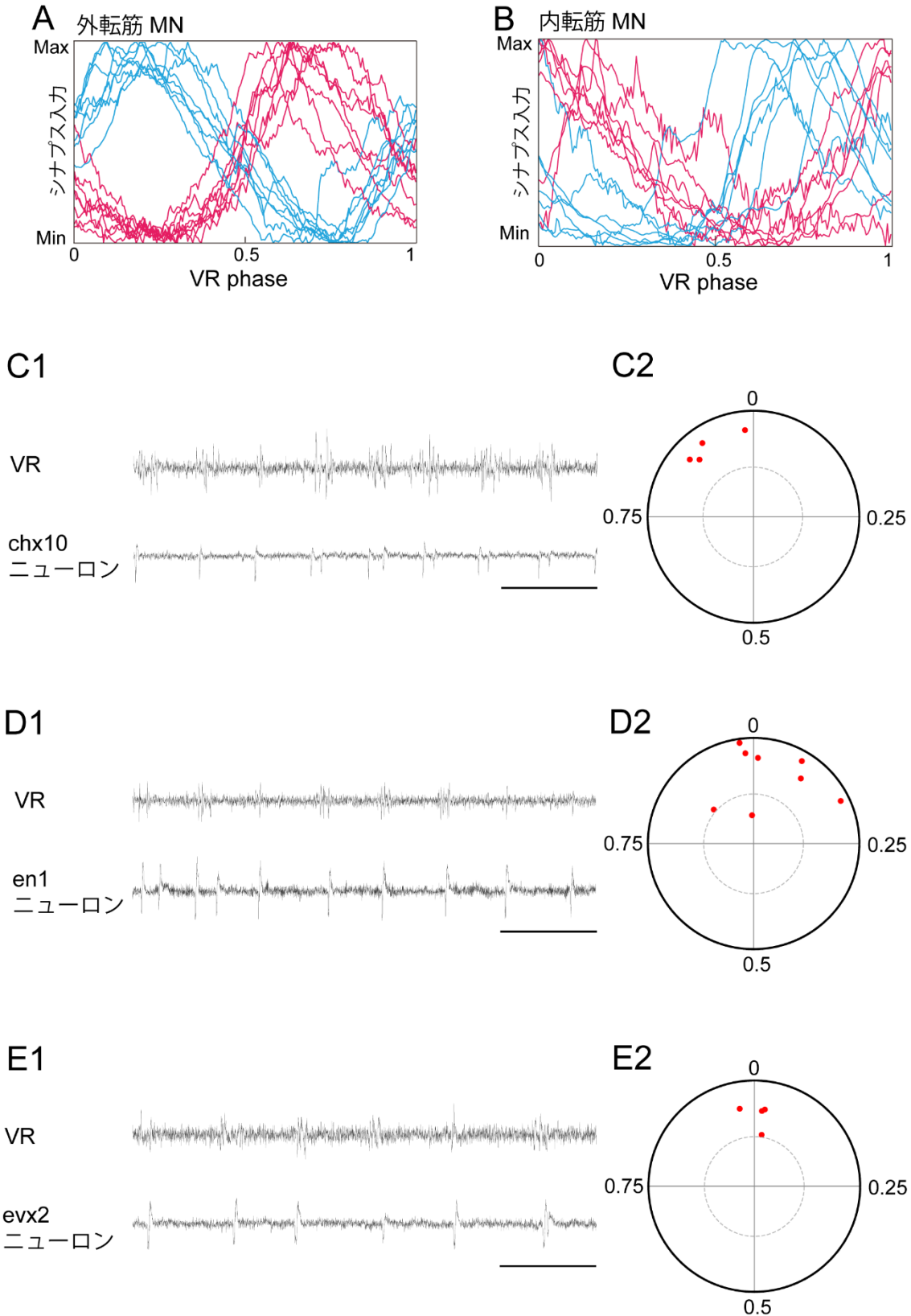
図 10



**図 10 *dmrt3a*-DTA の外転筋 MN と内転筋 MN の発火タイミングの記録と外転筋 MN へのシナプス入力**の記録

- A 仮想遊泳中の *dmrt3a*-DTA の外転筋 MN のルースパッチ記録。
- B 仮想遊泳中の *dmrt3a*-DTA の内転筋 MN のルースパッチ記録。
- C C1 は *dmrt3a*-DTA の外転筋 MN の平均発火タイミングをまとめた円状のグラフ (n=27)。C2 左は 28~34Hz の遊泳における野生型の外転筋 MN の平均発火タイミングをまとめた円状のグラフ (n=30)。C2 右は 29~35Hz における外転筋 MN の平均発火タイミングをまとめた円状のグラフ (n=30)。
- D D1 は *dmrt3a*-DTA の内転筋 MN について C と同様の解析を行った図 (n=8)。D2 は野生型の内転筋 MN について C2 と同じ解析をした図。
- E 野生型の外転筋 MN へのシナプス入力を示した。22-0.45 の範囲に青い網掛けをしている。(図 5C で示した図と同じ図)
- F *dmrt3a*-DTA の外転筋 MN へのシナプス入力を示した。22-0.45 の範囲に青い網掛けをしている (n=7)。
- G 0.22-0.45 の範囲における、野生型と *dmrt3a*-DTA の外転筋 MN への抑制性入力を比較した。\*\*p<0.01 (t test、p=0.0028)

図 11



**図 11 dmrt3a ニューロン以外の介在ニューロン群の発火タイミング**

- A 複数の外転筋 MN へのシナプス入力記録をまとめた図。図 5C と同じ。
- B 複数の内転筋 MN へのシナプス入力記録をまとめた図。図 6C と同じ。
- C C1 は *chx10* ニューロンのルースパッチ記録。C2 は複数の *chx10* ニューロンの平均発火タイミングをまとめた図 (n=4)。
- D D1 は *en1* ニューロンのルースパッチ記録。D2 は複数の *en1* ニューロンの平均発火タイミングをまとめた図 (n=8)。
- E E1 は *evx2* ニューロンのルースパッチ記録。C2 は複数の *evx2* ニューロンの平均発火タイミングをまとめた図 (n=4)。

## 【参考文献】

- Andersson LS, Larhammar M, Memic F, Wootz H, Schwochow D, Rubin CJ, Patra K, Arnason T, Wellbring L, Hjälml G, Imsland F, Petersen JL, McCue ME, Mickelson JR, Cothran G, Ahituv N, Roepstorff L, Mikko S, Vallstedt A, Lindgren G, et al. (2012) Mutations in DMRT3 affect locomotion in horses and spinal circuit function in mice. *Nature* 488:642–646.
- Arber S (2012) Motor circuits in action: specification, connectivity, and function. *Neuron* 74:975–989. Asakawa K, Suster ML, Mizusawa K, Nagayoshi S, Kotani T, Urasaki A, Kishimoto Y, Hibi M, Kawakami K (2008) Genetic dissection of neural circuits by Tol2 transposon-mediated Gal4 gene and enhancer trapping in zebrafish. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:1255–1260.
- Britz O, Zhang J, Grossmann KS, Dyck J, Kim JC, Dymecki S, Gosgnach S, Goulding M. A genetically defined asymmetry underlies the inhibitory control of flexor-extensor locomotor movements. *Elife*. 2015 Oct 14;4:e04718. doi: 10.7554/eLife.04718. Erratum in: *Elife*. 2015;4:e13038.
- Brown TG (1911) The intrinsic factors in the act of progression in the mammal. *Proc Royal Acad Sci* 84:308–319. Cazalets JR, Borde M, Clarac F (1996) The synaptic drive from the spinal locomotor network to motoneurons in the newborn rat. *J Neurosci* 16:298–306.
- Del Pozo A, Manuel R, Iglesias Gonzalez AB, Koning HK, Habicher J, Zhang H, Allalou A, Kullander K, Boije H (2020) Behavioral characterization of dmrt3a mutant zebrafish reveals crucial aspects of vertebrate locomotion through phenotypes related to acceleration. *eNeuro* 7:ENEURO.0047- 20.2020.
- Delvolvé I, Bem T, Cabelguen JM. Epaxial and limb muscle activity during swimming and terrestrial stepping in the adult newt, *Pleurodeles waltl*. *J Neurophysiol*. 1997 Aug;78(2):638-50.
- Ehrlich DE, Schoppik D (2019) A primal role for the vestibular sense in the development of coordinated locomotion. *eLife* 8:e45839. Endo T, Kiehn O (2008) Asymmetric operation

- of the locomotor central pattern generator in the neonatal mouse spinal cord. *J Neurophysiol* 100:3043–3054.
- Goulding M (2009) Circuits controlling vertebrate locomotion: moving in a new direction. *Nat Rev Neurosci* 10:507–518.
- Goulding M, Pfaff SL (2005) Development of circuits that generate simple rhythmic behaviors in vertebrates. *Curr Opin Neurobiol* 15:14–20.
- Green MH, Hale ME (2012) Activity of pectoral fin motoneurons during two swimming gaits in the larval zebrafish (*Danio rerio*) and localization of upstream circuit elements. *J Neurophysiol* 108:3393–3402.
- Green MH, Ho RK, Hale ME (2011) Movement and function of the pectoral fins of the larval zebrafish (*Danio rerio*) during slow swimming. *J Exp Biol* 214:3111–3123.
- Grillner S (1975) Locomotion in vertebrates: central mechanisms and reflex interaction. *Physiol Rev* 55:247–304.
- Grillner S (2003) The motor infrastructure: from ion channels to neuronal networks. *Nat Rev Neurosci* 4:573–586.
- Hale ME, Day RD, Thorsen DH, Westneat MW (2006) Pectoral fin coordination and gait transitions in steadily swimming juvenile reef fishes. *J Exp Biol* 209:3708–3718.
- Higashijima S, Masino MA, Mandel G, Fetcho JR. Engrailed-1 expression marks a primitive class of inhibitory spinal interneuron. *J Neurosci*. 2004 Jun 23;24(25):5827-39.
- Hochman S, Schmidt BJ (1998) Whole cell recordings of lumbar motoneurons during locomotor-like activity in the in vitro neonatal rat spinal cord. *J Neurophysiol* 79:743–752.
- Johnson MD, Hyingstrom AS, Manuel M, Heckman CJ (2012) Push-pull control of motor output. *J Neurosci* 32:4592–4599. Uemura et al. · Neuronal Circuits for Rhythmic Fin Movements *J. Neurosci.*, August 26, 2020 · 40(35):6678–6690 · 6689
- Juárez-Morales JL, Schulte CJ, Pezoa SA, Vallejo GK, Hilinski WC, England SJ, de Jager S, Lewis KE. *Evx1* and *Evx2* specify excitatory neurotransmitter fates and suppress inhibitory fates through a *Pax2*-independent mechanism. *Neural Dev*. 2016 Feb 19;11:5
- Jung H, Baek M, D’Elia KP, Boisvert C, Currie PD, Tay B-H, Venkatesh B, Brown SM, Heguy A, Schoppik D, Dasen JS (2018) The ancient origins of neural substrates for land walking.

Cell 172:667–682.e15.

Kiehn O (2006) Locomotor circuits in the mammalian spinal cord. *Annu Rev Neurosci* 29:279–306.

Kiehn O (2016) Decoding the organization of spinal circuits that control locomotion. *Nat Rev Neurosci* 17:224–238.

Kimura Y, Higashijima S-i (2019) Regulation of locomotor speed and selection of active sets of neurons by V1 neurons. *Nat Commun* 10:2268.

Kimura Y, Satou C, Fujioka S, Shoji W, Umeda K, Ishizuka T, Yawo H, Higashijima SI (2013) Hindbrain V2a neurons in the excitation of spinal locomotor circuits during zebrafish swimming. *Curr Biol* 23:843–849.

Kimura Y, Hisano Y, Kawahara A, Higashijima S-i (2014) Efficient generation of knock-in transgenic zebrafish carrying reporter/driver genes by CRISPR/Cas9-mediated genome engineering. *Sci Rep* 4:6545.

Kimura Y, Okamura Y, Higashijima S. *alx*, a zebrafish homolog of Chx10, marks ipsilateral descending excitatory interneurons that participate in the regulation of spinal locomotor circuits. *J Neurosci*. 2006 May 24;26(21):5684-97. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4993-05.2006.

Kjaerulff O, Kiehn O (1996) Distribution of networks generating and coordinating locomotor activity in the neonatal rat spinal cord in vitro: a lesion study. *J Neurosci* 16:5777–5794.

Lai HC, Seal RP, Johnson JE. Making sense out of spinal cord somatosensory development. *Development*. 2016 Oct 1;143(19):3434-3448.

Lundfald L, Restrepo CE, Butt SJ, Peng CY, Droho S, Endo T, Zeilhofer HU, Sharma K, Kiehn O. Phenotype of V2-derived interneurons and their relationship to the axon guidance molecule EphA4 in the developing mouse spinal cord. *Eur J Neurosci*. 2007 Dec;26(11):2989-3002.

Markin SN, Lemay MA, Prilutsky BI, Rybak IA. Motoneuronal and muscle synergies involved in cat hindlimb control during fictive and real locomotion: a comparison study. *J Neurophysiol*. 2012 Apr;107(8):2057-71.

Menelaou E, McLean DL (2019) Hierarchical control of locomotion by distinct types of spinal



- V2a interneurons in zebrafish. *Nat Commun* 10:4197.
- Moran-Rivard L, Kagawa T, Saueressig H, Gross MK, Burrill J, Goulding M. Evx1 is a postmitotic determinant of v0 interneuron identity in the spinal cord. *Neuron*. 2001 Feb;29(2):385-99.
- Natsubori A, Tsutsui-Kimura I, Nishida H, Bouchekioua Y, Sekiya H, Uchigashima M, Watanabe M, de Kerchove d'Exaerde A, Mimura M, Takata N, Tanaka KF (2017) Ventrolateral striatal medium spiny neurons positively regulate food-incentive, goal-directed behavior independently of D1 and D2 selectivity. *J Neurosci* 37:2723–2733.
- Perry S, Larhammar M, Vieillard J, Nagaraja C, Hilscher MM, Tafreshiha A, Rofo F, Caixeta FV, Kullander K (2019) Characterization of Dmrt3- derived neurons suggest a role within locomotor circuits. *J Neurosci* 39:1771–1782.
- Robertson GA, Stein PS (1988) Synaptic control of hindlimb motoneurons during three forms of the fictive scratch reflex in the turtle. *J Physiol* 404:101–128.
- Rossignol S, Dubuc R, Gossard JP. Dynamic sensorimotor interactions in locomotion. *Physiol Rev*. 2006 Jan;86(1):89-154.
- Satou C, Kimura Y, Kohashi T, Horikawa K, Takeda H, Oda Y, Higashijima S (2009) Functional role of a specialized class of spinal commissural inhibitory neurons during fast escapes in zebrafish. *J Neurosci* 29:6780– 6793.
- Satou C, Kimura Y, Higashijima S (2012) Generation of multiple classes of V0 neurons in zebrafish spinal cord: progenitor heterogeneity and temporal control of neuronal diversity. *J Neurosci* 32:1771–1783.
- Satou C, Kimura Y, Hirata H, Suster ML, Kawakami K, Higashijima S (2013) Transgenic tools to characterize neuronal properties of discrete populations of zebrafish neurons. *Development* 140:3927–3931.
- Satou C, Sugioka T, Uemura Y, Shimazaki T, Zmarz P, Kimura Y, Higashijima SI (2020) Functional diversity of glycinergic commissural inhibitory neurons in larval zebrafish. *Cell Rep* 30:3036–3050.e4.
- Saueressig H, Burrill J, Goulding M. Engrailed-1 and netrin-1 regulate axon pathfinding by association interneurons that project to motor neurons. *Development*. 1999

Oct;126(19):4201-12.

Shefchyk SJ, Jordan LM (1985) Excitatory and inhibitory postsynaptic potentials in alpha-motoneurons produced during fictive locomotion by stimulation of the mesencephalic locomotor region. *J Neurophysiol* 53:1345– 1355.

Stein PS (2010) Alternation of agonists and antagonists during turtle hindlimb motor rhythms. *Ann N Y Acad Sci* 1198:105–118.

Stein PS, Victor JC, Field EC, Currie SN (1995) Bilateral control of hindlimb scratching in the spinal turtle: contralateral spinal circuitry contributes to the normal ipsilateral motor pattern of fictive rostral scratching. *J Neurosci* 15:4343–4355.

Talpalar AE, Bouvier J, Borgius L, Fortin G, Pierani A, Kiehn O. Dual-mode operation of neuronal networks involved in left-right alternation. *Nature*. 2013 Aug 1;500(7460):85-8.

Taniguchi A, Kimura Y, Mori I, Nonaka S, Higashijima SI (2017) Axially confined in vivo single-cell labeling by primed conversion using blue and red lasers with conventional confocal microscopes. *Dev Growth Differ* 59:741–748.

Thorsen DH, Hale ME (2005) Development of zebrafish (*Danio rerio*) pectoral fin musculature. *J Morphol* 266:241–255.

Thorsen DH, Hale ME (2007) Neural development of the zebrafish (*Danio rerio*) pectoral fin. *J Comp Neurol* 504:168–184. Thorsen DH, Cassidy JJ, Hale ME (2004) Swimming of larval zebrafish: finaxis coordination and implications for function and neural control. *J Exp Biol* 207:4175–4183.

Uemura O, Okada Y, Ando H, Guedj M, Higashijima S, Shimazaki T, Chino N, Okano H, Okamoto H (2005) Comparative functional genomics revealed conservation and diversification of three enhancers of the *isl1* gene for motor and sensory neuron-specific expression. *Dev Biol* 278:587–606.

Urasaki A, Morvan G, Kawakami K (2006) Functional dissection of the Tol2 transposable element identified the minimal cis-sequence and a highly repetitive sequence in the subterminal region essential for transposition. *Genetics* 174:639–649.

Vallstedt A, Kullander K (2013) Dorsally derived spinal interneurons in locomotor circuits. *Ann N Y Acad Sci* 1279:32–42.

Vogel A, Rodriguez C, Warnken W, Izpisua Belmonte JC (1995) Dorsal cell fate specified by chick *Lmx1* during vertebrate limb development. *Nature* 378:716-720

Wang H, Sugiyama Y, Hikima T, Sugano E, Tomita H, Takahashi T, Ishizuka T, Yawo H (2009) Molecular determinants differentiating photocurrent properties of two channelrhodopsins from *Chlamydomonas*. *J Biol Chem* 284:5685–5696.

## 【謝辞】

本研究を行うにあたり、学部生の時から多大なご指導、ご支援を頂きました自然科学研究機構生命創生探究センターの東島眞一教授に厚く御礼申し上げます。また、学部生、大学院生の時に指導教員を引き受けてくださった小田洋一名誉教授、上川内あづさ教授、副指導教員を引き受けてくださった森郁恵教授、日比正彦教授、小橋常彦特任講師にもお礼を申し上げます。小田洋一名誉教授、上川内あづさ教授、森郁恵教授、日比正彦教授、小橋常彦特任講師からは温かいご指導を受け、自分の研究を異なる視点で見直す機会を得ることができました。基礎生物学研究所多様性生物学研究室の加藤輝特任教授には動画解析について助言や解析用のソフトウェア開発をしていただきました。ありがとうございました。名古屋大学の脳回路構造学グループと脳回路構造学グループの皆さんにはセミナーや学生交流、自然科学研究機構への派遣について事務手続きや、名古屋大学での手続きについての柔軟な対応など、たくさんの支援をしていただきました。ありがとうございました。自然科学研究機構の神経行動学研究部門の木村有紀子助教、谷本昌志助教をはじめとする方々には多くの助言と支援をしていただきました。特に東島眞一教授と木村有紀子助教には研究の初期から非常に長い期間研究の手法や方針などについて手厚い指導をしていただきました。

最後に研究について様々な援助、指導をしていただいた先生方、研究生活を続けるうえで支援を続けてくれた家族、研究から私生活のことまで相談に乗っていただいた先輩、後輩、友人に心から感謝いたします。ありがとうございました。

副論文

# Neuronal Circuits That Control Rhythmic Pectoral Fin Movements in Zebrafish

Yuto Uemura, Kagayaki Kato, Koichi Kawakami, Yukiko Kimura,  
Yoichi Oda and Sin-Ichi Higashijima

J Neurosci. 2020 Aug 26;40(35):6678-6690.