

## 別紙 4

報告番号	※ 甲 第 号
------	---------

## 主 論 文 の 要 旨

論文題目 古典的恐怖条件付け学習におけるゼブラフィッシュ小脳の役割の解明  
氏 名 松田 光司

## 論 文 内 容 の 要 旨

小脳は、円滑な運動制御や運動学習だけではなく、不安・恐怖などの情動や、認知といった高次脳機能にも関与していることが注目されている。しかしながら、小脳神経回路が実際どのような役割を演じているか、詳細な理解には至っていない。それは、マウスなどの哺乳類を用いた研究では、無傷で脳内部を観察することができない上、構造が複雑でニューロンの数が多く、解析が困難という要因が挙げられる。そこで私は、脊椎動物モデルとして優れた特性を持つゼブラフィッシュを用いて研究を行った。ゼブラフィッシュ小脳は哺乳類と比較すると、基本的な構造や神経回路は非常によく保存されている。また、身体が透明な *casper* 系統を用いることで、無傷で脳の観察が可能であり、近年では全脳の活動イメージングが可能となっている。そこで私は、ゼブラフィッシュ仔魚を用い、恐怖条件付け学習における小脳の役割の解析を行った。

まず、**Tol2** トランスポゾンを用いたジーン/エンハンサートラップ法により、小脳神経回路の構成要素である顆粒細胞、プルキンエ細胞、投射神経(*eurydendroid* 細胞)、下オリーブ核ニューロン、バーグマングリアに改変型 **Gal4-VP16(GFF)**を発現するトランスジェニックゼブラフィッシュ系統を単離した。顆粒細胞特異的に **GFF** を発現する系統と神経軸索トレーサー**WGA**(小麦胚芽レクチン)を **UAS(upstream activating sequence: 上流活性化配列)**下流で発現するレポーター系統を交配し解析した結果、顆粒細胞とプルキンエ細胞、*eurydendroid* 細胞、下オリーブ核との神経結合が確認された。この結果は、樹立した **Gal4** ゼブラフィッシュ系統が小脳神経回路の機能解析に有用であることを示している。

次に、ゼブラフィッシュ仔魚における古典的恐怖条件付け学習の確立を行った。LED 照明の消灯を条件刺激、電気ショックを無条件刺激として用い、顕微鏡ステージ上で学習させ、条件刺激により恐怖応答反応(心拍数の減少: 徐脈)を誘導する学習システムを確立した。条件刺激と無条件刺激を組み合わせて繰り返し提示すると、約 40%のゼブラフィッシュ仔魚で条件刺激提示に誘発された徐脈反応を示した。

恐怖条件付け学習における小脳の役割の解析を行うため、顆粒細胞特異的に GFF を発現する系統と神経伝達物質放出阻害を起こすボツリヌス毒素を UAS 下流で発現するレポーター系統を交配し、恐怖条件付け学習を行った。その結果、顆粒細胞でボツリヌス毒素を発現させた系統・発現していない対照群いずれも、学習後の条件刺激に対する徐脈反応は起きた。しかしながら、顆粒細胞でボツリヌス毒素を発現させた系統において、徐脈からの回復が遅くなることが分かった。

最後に、全てのニューロンで  $\text{Ca}^{2+}$ インジケーターGCaMP7a を発現させた系統を用いて、恐怖条件付け学習中の小脳ニューロンリアルタイムイメージングを行った。その結果、小脳内の特定の領域内に限局した条件付け依存的な活動が観察された。これらのニューロンの活動は、条件付けの間次第に上昇し、その後条件刺激のみの提示を繰り返すと徐々に下降した。興味深い事に、条件刺激提示に対して即座に活動するニューロンと遅れて活動するニューロンの 2 種類が存在することが分かった。さらに、顆粒細胞やプルキンエ細胞のマーカーを用いた免疫染色の結果、条件付け依存的に活動しているニューロンは顆粒細胞であることが示唆された。本研究により、小脳内の限局した領域内の顆粒細胞が、恐怖条件付け学習における条件反応に重要な役割を果たしていることが示唆された。