

論文審査の結果の要旨および担当者

報告番号	※ 甲 第 号
------	---------

氏 名 松田 光司

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

論文審査担当者

主 査 名古屋大学生物機能開発利用研究センター

教 授 博士(医学) 日比 正彦

委 員 名古屋大学大学院理学研究科 教 授 博士(薬学) 上川内 あづさ

委 員 自然科学研究機構岡崎統合バイオサイエンスセンター

教 授 博士(理学) 東島 眞一

委 員 名古屋大学生物機能開発利用研究センター

准教授 博士(医学) 清水 貴史

論文審査の結果の要旨

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。申請者は、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、下オリーブ核ニューロン、バグマングリア細胞に改変型 Gal4 転写因子を発現するゼブラフィッシュ系統を単離した。顆粒細胞特異的に Gal4 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 Gal4 依存性に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、投射神経、下オリーブ核ニューロンとの神経接続が確認された。この結果は、樹立した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た。

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 Gal4 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 Gal4 依存的に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。ボツリヌス毒素発現による顆粒細胞の機能阻害は、恐怖条件付け学習効率には影響を与えなかったが、条件刺激依存性の徐脈反応を延長した。最後に、Ca²⁺インジケーターを発現するゼブラフィッシュ系統を用いて、恐怖条件付け学習中の小脳ニューロンの活動のライブイメージングを行った。その結果、小脳内の特定の領域内で条件付け依存的に活性化されるニューロンが観察された。これら条件付け関連ニューロンは条件付けにより徐々に活性化されること、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明らかとなった。さらに、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からの回復に重要な役割を果たしていることが示された。

以上のように、申請者は、多数のトランスジェニックゼブラフィッシュ系統を開発することで、小脳神経回路形成および機能解析の発展に貢献した。さらに、ゼブラフィッシュ仔魚を用いた古典的恐怖条件付け学習の実験系を開発し、恐怖条件付け学習における小脳神経回路の新たな役割を解明した。本研究は、脊椎動物の条件付け学習の理解に大きく寄与したと評価される。よって、申請者は博士(理学)の学位を授与される十分な資格があるものと認められる。