

博士学位論文

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

名古屋大学大学院 理学研究科 生命理学専攻

松田 光司

目次

要約	2
第1章. 序論.....	4
第2章. 小脳神経回路の発生過程・機能解析が可能な Gal4 ゼブラフィッシュトランス ジェニック系統の樹立	
実験材料と方法	10
結果.....	15
考察.....	32
第3章. 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	
実験材料と方法	36
結果.....	39
考察.....	45
第4章. 古典的恐怖条件付け学習における小脳の役割	
実験材料と方法	46
結果.....	49
考察.....	67
第5章. 総括.....	71
参考文献.....	72
謝辞	82
副論文.....	83
参考論文.....	116

要約

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、バーク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 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。

第 1 章. 序論

脳が司る記憶や学習メカニズムは未だに多くの謎に包まれている。小脳は運動調節や運動学習において重要な役割を演じている[1-4]が、近年では認知や恐怖などの情動といった高次脳機能にも関与していることが示されている。小脳機能の異常は運動失調だけでなく、自閉症などの精神疾患にも繋がるということが報告されており[5, 6]、小脳神経回路を理解することは高次脳機能のメカニズムの解明に繋がる可能性がある。しかしながら、情動において小脳神経回路がどういった役割を果たしているか詳細な理解に至っているとは言い難い。それは、マウスなどの哺乳類を用いた従来の研究では、脳神経細胞が多く構造が複雑で、無傷で内部を観察できないことに起因する。近年ではこの問題を解決するため、モデル生物であるゼブラフィッシュが注目されている。脊椎動物であるゼブラフィッシュの小脳構造は比較的単純にも関わらず、我々ヒトを含む哺乳類と非常に良く似ている[7]。現在までに、小脳の発生様式や神経回路に至るまで、脊椎動物間でよく保存されていることが分かっている[8-10]。そこで私はゼブラフィッシュを用い、恐怖条件付け学習における小脳の役割について研究を行った。

哺乳類と真骨魚類の小脳神経回路

小脳は表層から分子層、プルキンエ細胞層、顆粒細胞層の 3 層構造から成り、いくつかの主要なニューロンで構成されている(図 1)。哺乳類・真骨魚類いずれの場合も、グルタミン酸を伝達物質とした興奮性のニューロンである顆粒細胞、 γ -aminobutyric acid(GABA)を伝達物質とした抑制性のニューロンであるプルキンエ細胞を有する。プルキンエ細胞は、2 種類の興奮性入力を受けている。一つは、様々な脳領域に位置する小脳前核からの軸索を含む苔状線維(mossy fibers: MFs)から情報を受け取った顆粒細胞が、平行線維(parallel fibers: PFs)と呼ばれる軸索を介してプルキンエ細胞へ入力する経路である。もう一つの経路は、後脳の腹側後方に位置する下オリーブ核(inferior olive nuclei: IOs)を起始核とした登上線維(climbing fibers: CFs)からの入力である。プルキンエ細胞はこれらの情報を統合し、投射神経により小脳外へと出力される。この投射神経は哺乳類において深部小脳核(deep cerebellar nuclei: DCNs)である。一方、真骨魚類は小脳深部核を持たない代わりに、プルキンエ細胞の近傍に eurydendroid 細胞と呼ばれる投射神経を有し、プルキンエ細胞と平行線維の軸索投射を受けていることが知られている[11, 12]。また、放射状グリアの 1 種であるバグマングリアはプルキンエ細胞の

細胞体周辺に位置し、小脳の発生と機能に参与している[13]。

ゼブラフィッシュ小脳は 4 つの主要な領域に分けることができる(図 2)。小脳弁(valvula cerebelli: Va)・小脳体(corpus cerebelli: CCe)・顆粒隆起(eminentia granularis: EG)・小脳尾葉(lobus caudalis cerebelli: LCa)である[8]。小脳弁と小脳体は 3 層構造から成るが、顆粒隆起と小脳尾葉は顆粒細胞層のみを有する。小脳弁と小脳体に存在する顆粒細胞は分子層のプルキンエ細胞樹状突起に軸索投射している。一方、顆粒隆起と小脳尾葉に位置する顆粒細胞は、小脳内のプルキンエ細胞樹状突起と、背側後脳の小脳陵(crista cerebellaris: CC)において crest 細胞樹状突起に軸索投射している[14, 15]。crest 細胞の細胞体は内側聴側線系核(medial octavolateralis nucleus: MON)に存在し、側線器官と小脳様神経回路を構成している[16]。

小脳と運動学習

小脳は、円滑な運動調節や無意識の運動学習に重要な役割を果たしている。平行線維と登上線維を同時に刺激すると、平行線維からプルキンエ細胞への入力 が長期間低下する長期抑圧(Long-term depression: LTD)と呼ばれる現象が起こる[17, 18]。この長期抑圧が、小脳における運動学習に必要であると提唱されている[1]。小脳の運動学習における機能を明らかにするため、古典的条件付けに分類される瞬目反射条件付けが用いられてきた[19]。これは、光や音の条件刺激(conditioned stimulus: CS)と、角膜へ空気のふきつけや上脛への電気刺激といった無条件刺激(unconditioned stimulus: US)が結びつく連合学習であり、条件刺激と無条件刺激を組み合わせると何度も繰り返す提示すると、無条件刺激に先行してまばたきや瞬膜の伸張が起こるようになる(conditioned response: CR)。小脳皮質を損傷したウサギや、小脳核に GABA_A 受容体アゴニストであるムシモルの投与を行ったウサギは瞬目反射条件付けの獲得と保持に障害が起きることが報告されている[20, 21]。また、長期抑圧が生じない代謝型グルタミン酸受容体 1(mGluR1)欠損マウスやデルタ 2 型グルタミン酸受容体(GluD2)欠損マウスでは、瞬目反射条件付けの獲得に障害が認められることが示されている[22, 23]。また、顆粒細胞からプルキンエ細胞への入力を時期特異的に遮断したマウスを用いた研究から、記憶の獲得と表出には小脳皮質が、貯蔵には小脳核が参与していることが示唆されている[24]。これらの一連の研究から、小脳皮質と小脳核、さらには平行線維とプルキンエ細胞間の長期抑圧が瞬目反射条件付けにおいて重要な役割を果たしていることを示している。

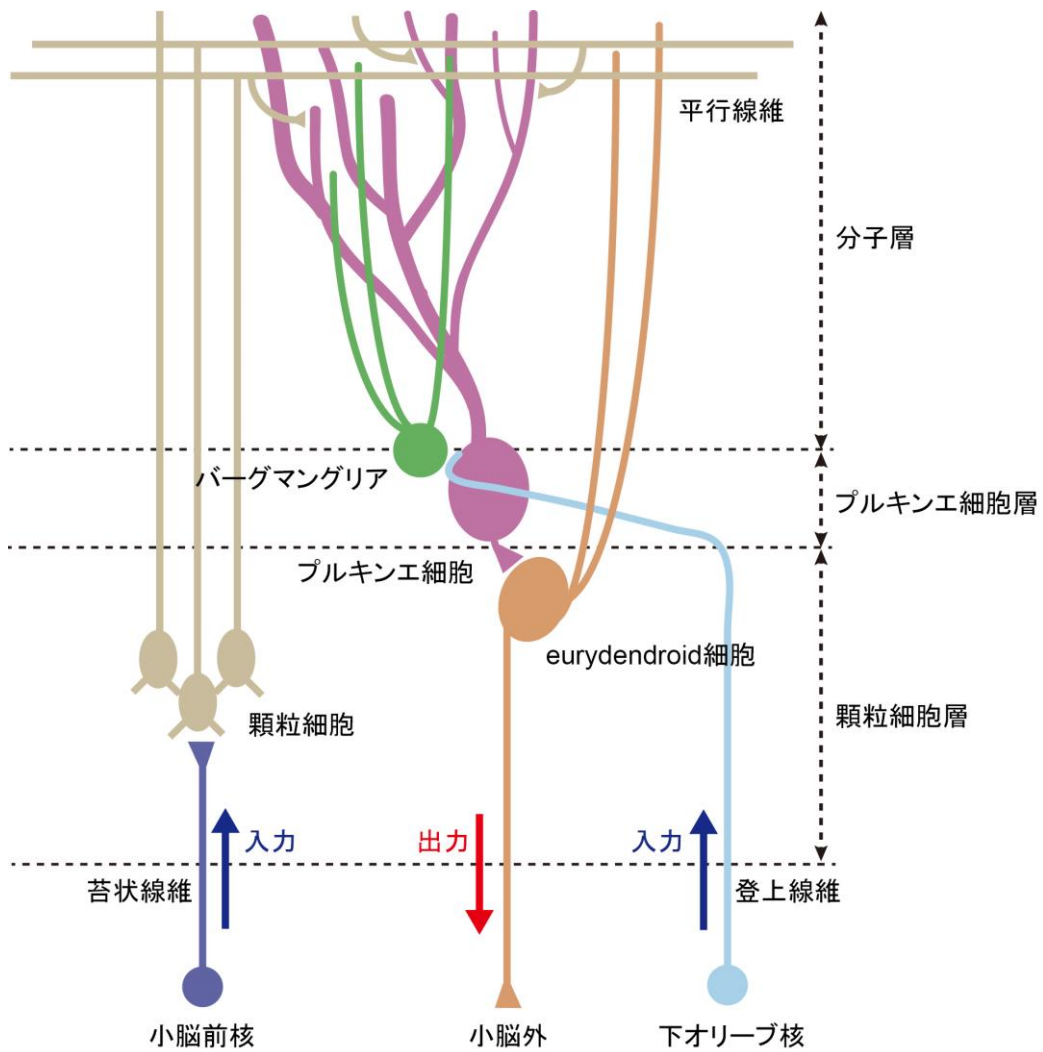


図 1. ゼブラフィッシュにおける小脳神経回路

ゼブラフィッシュの小脳は、小脳前核と下オリーブ核の 2 種類の入力を受け取っている。これらの情報はプルキンエ細胞により統合され、eurydendroid 細胞と呼ばれる投射神経を介して小脳外へと情報が出力される。

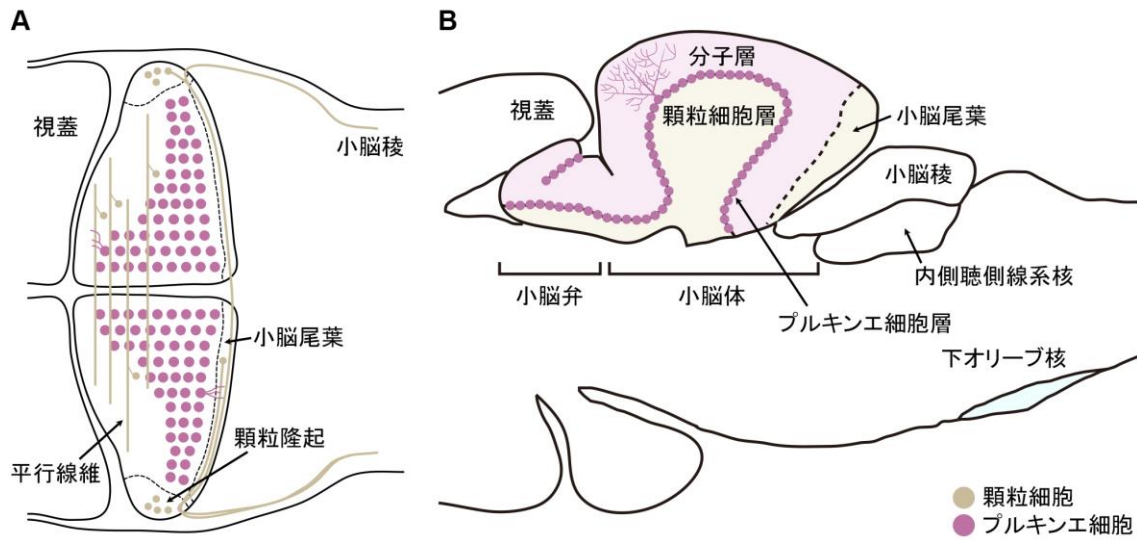


図 2. ゼブラフィッシュ小脳領域模式図

(A) 受精後 5 日目(5 days post-fertilization: 5 dpf)の背側像模式図。(B) 成魚の矢状切片模式図。小脳は分子層・プルキンエ細胞層・顆粒細胞の 3 層構造を有している。ゼブラフィッシュを含む真骨魚類は背側に隆起した小脳体と、中脳視蓋の脳室に潜りこむ小脳弁と呼ばれる構造を持っている。

小脳と恐怖条件付け学習

恐怖条件付け学習は古典的条件付けの一種であり、光や音などのそれ自体では恐怖反応を示さない条件刺激と、電気刺激などの嫌悪刺激(無条件刺激)を組み合わせると、条件刺激提示のみで恐怖反応を示す様になる。無拘束下の動物の場合、学習後の条件刺激は逃避行動を誘発する。しかしながら、動物を拘束した場合においては、条件刺激は自律神経系の反応である心拍数の減少(恐怖条件付け徐脈)といったフリージング反応を引き起こす。哺乳類において、恐怖条件付けには扁桃体が関与していることが知られている[25, 26]。ゼブラフィッシュでは、腹側と背側の手綱核が恐怖条件下での行動の選択に重要な役割を果たしていることが報告されている[27, 28]。しかしながら、近年の研究成果により、小脳もまた恐怖条件付けに重要な役割を果たしていることが分かってきた。哺乳類において、小脳虫部や登上線維の起点である下オリーブ核を破壊すると、恐怖条件付け徐脈反応の獲得が阻害される[29-31]。また、ラット小脳虫部へテトロドトキシンを注入すると、恐怖記憶の固定が阻害される[32]。PETを用いたヒトの機能的脳撮影により、恐怖の経験を思い出している時に、小脳正中線の領域が活動していることが明らかとなっている[33]。金魚においても、小脳への薬物投与や破壊実験の結果、条件付け徐脈が減弱されることが示されている[34, 35]。これらの報告は、哺乳類・真骨魚類いずれにおいても、小脳は自律神経制御を含む古典的恐怖条件付けに重要な役割を果たしていることを示している。しかしながら、これらの研究は小脳の破壊や薬物投与といった侵害的な研究に留まり、個々の小脳神経回路素子がどのように恐怖条件付け徐脈に関与し制御しているか、その詳細は明らかとなっていない。

ゼブラフィッシュにおける小脳の役割

小脳神経回路は、ゼブラフィッシュと哺乳類の間で非常によく保存されている。ゼブラフィッシュにおいては、受精後 5 日(5 days post-fertilization: 5 dpf)までに、顆粒細胞とプルキンエ細胞を含む単純な小脳神経回路が形成される[8, 36]。電気生理学的研究により、5 dpf に達するとプルキンエ細胞は苔状線維-平行線維の入力で単純スパイクを、登上線維の入力で複雑スパイクを生じることが知られている[37-39]。これらの観察と同様に、動く視覚刺激を提示して遊泳行動を誘発させる視運動反応(optomotor response: OMR)への順応中に、小脳神経回路が活動していることが報告されている[38]。また、ゼブラフィッシュ仔魚において、登上線維を除去すると運動順応に障害を起し[40]、プルキンエ細胞の活動を操作することで遊泳行動に影響が出ることが示されている[41]。

これらの報告は、初期の仔魚の段階において小脳は運動順応を制御していることを意味している。また、ゼブラフィッシュ仔魚(6~8 dpf)は古典的条件付けを獲得することができるという報告がある。条件刺激(光)と無条件刺激(尾部への侵害刺激)を組み合わせると、条件刺激依存的な尾の動きが増加し、小脳ニューロンをレーザーで破壊するとこのような条件反応が阻害される[42]。しかしながら、ゼブラフィッシュは受精後 3 週間以降であれば、古典的条件付けが可能となるという報告もある[43]。従って、ゼブラフィッシュの成長過程において、どの時期から古典的恐怖条件付けが可能であるかは依然として明白ではない。

本研究の構成

小脳は、円滑な運動制御や運動学習だけではなく、恐怖条件付け学習に関与していることは明白である。しかしながら、恐怖条件付け学習における小脳神経回路の役割について詳細な解析は未だになされていない。本研究では、ゼブラフィッシュを用いて、恐怖条件付け学習における小脳の役割について解明を行った。本研究は以下の 3 章から構成される。第 2 章においては、ゼブラフィッシュ小脳神経回路を自由に操作可能な Gal4 トランスジェニックゼブラフィッシュ系統の樹立について記載した。第 3 章には、光と電気刺激を組み合わせた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について記載した。第 4 章においては、樹立した Gal4 トランスジェニックゼブラフィッシュを用い、顆粒細胞特異的にボツリヌス毒素を発現させた際の恐怖条件付け学習への影響について記載した。さらに、全てのニューロンで Ca^{2+} インジケーター GCaMP7a を発現させた系統を用いた、恐怖条件付け学習中の小脳ニューロン活動のリアルタイムイメージングについて記載した。

第2章. 小脳神経回路の発生過程・機能解析が可能な Gal4 ゼブラフィッシュトランスジェニック系統の樹立

Gal4/UAS システムは遺伝子発現を時空間特異的に制御可能なシステムであり、無脊椎動物・脊椎動物において発生生物学や神経科学の研究に広く使われている[44-49]。これまでに、Tol2 トランスポゾンシステムを用いたジーン/エンハンサートラップ法と Gal4/UAS システムを組み合わせることで、様々なニューロン特異的に遺伝子を発現するトランスジェニックゼブラフィッシュ系統が確立されている[50-52]。Gal4 系統は蛍光タンパク質だけではなく、様々なレポーターあるいはエフェクター系統と組み合わせることで、ゼブラフィッシュの神経回路構造や機能解析が可能となった[45, 49, 53]。本研究において、顆粒細胞、プルキンエ細胞、eurydendroid 細胞、下オリブ核ニューロン、バグマングリアに改変型 Gal4-VP16(GFF)を発現する Gal4 ドライバー系統を単離した。これらの Gal4 系統と、蛍光タンパク質[53, 54]や経シナプストレーサーWGA(小麦胚芽レクチン) [55, 56]を発現可能な UAS レポーター系統と交配させることで、ゼブラフィッシュ小脳神経回路の解剖学的な知見が得られた。

実験材料と方法

実験動物

本実験は、「名古屋大学における動物実験等に関する取扱規定」に基づいて行われた。野生型ゼブラフィッシュ(*Danio rerio*)として、遺伝的背景 Oregon AB 系統を用いた。幾つかのトランスジェニック (transgenic: Tg) 系統は、神経堤細胞由来の色素細胞を欠く変異体 *casper* (*mitfa*^{w2}; *roy*^{a9}) と交配させた[57]。GFF(Gal4 の DNA 結合ドメインと VP16 の最小転写活性化ドメインを 2 つ繋いだ融合タンパク質)を発現するジーン/エンハンサートラップ系統は Tol2 トランスポゾンを経た遺伝子組換えにより樹立された[50, 58]。hspGFFDMC と hspzGFFgDMC は、GFF と *hsp70l* プロモーターを持つエンハンサートラップコンストラクトである。gSAG は GFP と *gata6* のスプライスアクセプターを持つジーントラップコンストラクトである。gSAIGFF、gSAIzGFFM、gSA2AzGFF は GFF と *gata6* のスプライスアクセプターを持つジーントラップコンストラクトであり、加えて脳心筋炎ウイルス(encephalomyocarditis virus: EMCV)由来の内部リボソーム導入部位(internal ribosome entry site: IRES)(gSAIGFF と gSAIzGFFM)、あるいは豚テシ

オウウイルス(porcine teschovirus-1: PTV-1)由来の 2A ペプチド(gSA2AzGFF)を導入している。これらのコンストラクトを遺伝子導入したジーン/エンハンサートラップ系統は国立遺伝学研究所の川上浩一教授らにより作製され、私の所属研究室との共同研究によりスクリーニングが行われた。GFF を可視化するため、これらの系統と *Tg(UAS:GFP)*、*Tg(UAS:RFP)*、あるいは *Tg(UAS:Kaede)* を交配させた(nkuasgfp1aTg, nkuasrfp1aTg, and rk8Tg in ZFIN: <http://zfin.org/>)[50, 54]。小脳神経回路で GFP を発現しているトランスジェニック系統を選択するためには Leica 実体蛍光顕微鏡 MZ16FA を用いた。プルキンエ細胞特異的な系統の解析に用いた *Tg(aldoca:gap43-Venus)* の樹立については、本研究室により既に報告されている[59]。*Tg(aldoca:GFF)* の樹立には Tol2 ベクターである T2KXIG を改変した Gateway ベクター[58]を使用し、GFF の cDNA とポリアダニル化シグナル SV40 polyA を約 5 Kbp の *aldoca* プロモーター[59]下に挿入した。*Tg(UAS:AcGFP-P2A-WGA)* は、理化学研究所脳科学総合研究センターの吉原良浩教授らにより作製された。オワンクラゲ *Aequorea coerulea* GFP(AcGFP) と WGA の cDNA が 2A を介してインフレーム融合となるような UAS:AcGFP-2A WGA プラスミドを作製する為に、AcGFP-2A WGA カセットを pGEM-T Easy-AcGFP1-P2A-tWGA[60] から切断し、pT2MUASMCS[50] の *EcoRI* と *EcoRV* サイトに挿入されている。トランスジェニック系統を作製するため、25 pg の Tol2 ドナープラスミド DNA と 25 pg の Tol2 トランスポゼース mRNA を 1 細胞期胚に注入した。*Tg(olig2:EGFP)^{vu12}* 系統については既に報告されている[61]。

ゼブラフィッシュは、名古屋大学生物機能開発利用研究センター内の小型魚類飼育装置(名東水園)を使用し、28.5°C、14 時間明期/10 時間暗期の条件で飼育した。5 dpf の仔魚における免疫組織化学実験のため、受精後 12 時間(12 hours post-fertilization: 12 hpf) から黒色素胞の着色阻害が可能である 0.005 % のフィニルチオ尿素(PTU)で処理を行った。発生ステージは ZFIN に従い決定した。第 2 章においては 5 dpf の仔魚、少なくとも 90 日以上経過した成魚を実験に用いた。

免疫染色

免疫染色には、anti-GFP (1/1000, ラット, Nacalai)、anti-parvalbumin 7 (1/1000, マウスモノクローナル, 腹水) [8]、anti-Vglut1 (1/1000, ラビットモノクローナル, アフィニティー精製済み) [8]、anti-Neurod1 (1/500, マウス, 腹水) [36]、anti-DsRed (1/1000, ラビットモノクローナル, Takara-Clontech)、anti-Fabp7a (1/1000, マウスモ

ノクローナル, 腹水) [8]、and anti-WGA (1/10000, ラビットモノクローナル, Sigma)を1次抗体として用いた。*in situ* hybridization 後に免疫染色を行う場合は、GFPの対する抗体として anti-GFP (1/1000, ラビットポリクローナル, MBL)を用いた。2次抗体には Alexa Fluor 405 goat anti-rabbit、Alexa Fluor 488 goat anti-rat、Alexa Fluor 568 goat anti-mouse、anti-rabbit IgG (1/400, H+L, Molecular Probes, Life Technologies)を使用した。

ゼブラフィッシュ仔魚のホールマウント免疫染色では、4% paraformaldehyde in phosphate-buffered saline (PBS)で4℃、1時間固定した。固定後はPBST (PBS, 0.1% Triton X-100)で3回洗浄し、-20℃で12分間 acetone を浸透させた。PBSTで3回、PBS-DT (PBS, 1% BSA, 1% DMSO, 1% Triton X-100)で2回洗浄後、5% goat serum (Vector) in PBS-DT に置換し、室温で1時間ブロッキングを行った。上述の希釈倍率になるよう 5% goat serum in PBS-DT に1次抗体を加え、4℃で一晩浸透した。PBS-DTで15分間の洗浄を6回行い、上述の希釈倍率になるよう 5% goat serum in PBS-DT に2次抗体を加え、遮光して4℃で8時間から10時間浸透した。PBS-DTで15分間の洗浄を6回行った後は遮光して保存し、場合によっては SeeDB[62, 63]を用いて組織透明化を行った。標本をペトリデッシュ(35×10 mm, FALCON)に移し 20% (wt/vol) fructose (0.1% PBS, 0.5% α -thioglycerol)を加え、室温で4時間浸透した。40% (wt/vol) fructose (0.1% PBS, 0.5% α -thioglycerol)に置換し室温で4時間、60% (wt/vol) fructose (0.1% PBS, 0.5% α -thioglycerol)に置換し室温で4時間、80% (wt/vol) fructose (0.1% PBS, 0.5% α -thioglycerol)に置換し室温で12時間、100% (wt/vol) fructose (0.1% PBS, 0.5% α -thioglycerol)に置換し室温で12時間浸透した。最後に SeeDB (80.2% wt/wt fructose, 0.1% PBS, 0.5% α -thioglycerol)に置換し、室温で24時間浸透した。

ゼブラフィッシュ成魚の脳切片免疫染色では、剃刀を用いて切断した脳を含む頭部を4% paraformaldehyde in PBSで4℃、一晩固定した。固定した脳を慎重に頭部から取り出し、PBSで3回洗浄した。5% sucrose in PBSTに4℃で1時間、10% sucrose in PBSTに4℃で1時間、15% sucrose in PBSTに4℃で1時間、20% sucrose in PBSTに4℃で一晩浸透した。20% sucrose in PBSTとOCT compound (Sakura Finetechnical)が1:1の割合となるように置換し、室温で1時間浸透した。サンプルを包埋容器に移し、OCT compoundを充填した後、-80℃で急速に凍結した。3時間程度凍結させた後、クリオスタットを用いて12~14 μ mの厚さで薄切し、スライ

ドガラスに貼り付けた。1時間以上風乾し、PBSTで3回、PBS-DTで2回洗浄後、5% goat serum in PBS-DTに置換し、室温で1時間ブロッキングを行った。上述の希釈倍率になるよう5% goat serum in PBS-DTに1次抗体を加え、パラフィルムでカバーし4℃で一晩浸透した。PBS-DTで15分間の洗浄を6回行い、上述の希釈倍率になるよう5% goat serum in PBS-DTに2次抗体を加え、パラフィルムでカバーし、遮光して4℃で8時間から10時間浸透した。PBS-DTで15分間の洗浄を6回行った後、退色防止剤入り水溶性封入剤(PermaFluor Aqueous Mounting Medium, Thermo Fisher Scientific)を用いてカバーガラスで封入した。

画像取得・画像処理

蛍光画像は、共焦点レーザー顕微鏡(LSM700, Zeiss)あるいはAxioCam CCDカメラを搭載した正立顕微鏡(AxioPlan-2, Zeiss)で取得した。SeeDBによる透明化サンプルの場合は、SeeDB(あるいは100% fructose)に浸けた状態で撮影する必要がある。3枚重ねたビニールテープにサンプルサイズに応じた長方形の窓を作り、スライドガラスに貼り付けた。サンプルとSeeDBを充填し位置調整を行った後、カバーガラスで封入し撮影を行った。撮影したZ-スタック画像は、画像処理ソフトウェア(Zen, Zeiss)やImaris(Bitplane)を用いて3次元画像に再構築した。図の作成には、Adobe PhotoshopやAdobe Illustratorを利用した。

光変換型蛍光タンパク質 Kaede

Kaedeタンパク質の色を緑から赤に変換する為、共焦点顕微鏡のブリーチング機能を用いて局所的に紫外光照射(405 nm)を行った。照射して7~10時間後に観察を行った。

in situ hybridization

上述の方法により脳切片を作製し、風乾させた。Tris-buffered saline (TBS)/DEPC treated water (DEPC)で3回洗浄し、0.2 M HCl/DEPCで10分処理した。TBS/DEPCで3回洗浄し、acetylation buffer (0.1M Tris-HCl (pH 8.0), 0.25% acetic anhydride in DEPC)で10分間処理した。再びTBS/DEPCで3回洗浄し、hybridization buffer (50% formamide, 5× standard saline citrate [SSC], 50 µg/ml heparin, 0.1% Tween20, 5 mg/ml torula RNA)を添加し、パラフィルムでカバーし65℃で1時間恒温放置した。45分程度経過したら、

hybridization buffer に加えた digoxigenin (DIG)標識 RNA プローブに対し、85°Cで 15 分間熱変性を行った。なお、本研究で用いた *vglut2a* プローブは以前の報告を参考にし て作製した[64, 65]。熱変性処理した DIG 標識 RNA プローブ in hybridization buffer を 添加しパラフィルムでカバーし、65°Cで一晩恒温放置した。50% formamide/2x SSC、 50% formamide/1x SSC、20% formamide/0.5x SSC で各々65°C、30 分毎に洗浄した。 TBS/DEPC で 3 回洗浄し、blocking solution (1x Roche blocking reagent, 5% heat- inactivated fetal bovine serum, TBS)を添加し、室温で 30 分間ブロッキングを行った。 blocking solution に POD 標識抗 DIG 抗体(1/500, Roche)を加えパラフィルムでカバー し、4°Cで一晩恒温放置した。TBST (TBS, 0.1% Tween 20)で 30 分間の洗浄を 3 回行 い、tyramide signal amplification (TSA) kit (Invitrogen)による発色を行った。amplification buffer (Alexa Fluor 555 [1/100, Molecular Probe, Life Technology], 0.15% H₂O₂)を添加 し、室温で約 2 時間恒温放置した。

結果

ジーン/エンハンサートラップシステムスクリーニング

ゼブラフィッシュにおける小脳神経回路の機能を調べるため、To12 トランスポゾンシステムを用いて小脳ニューロンや入力細胞に **GFF** や **GFP** を発現するトランスジェニックシステムの樹立を行った。これまでに、国立遺伝学研究所の川上浩一教授らにより、大規模ジーン/エンハンサートラップスクリーニングが行われている[50, 66]。システムスクリーニングは、**GFF** トラップシステムと *Tg(UAS:GFP)*を交配させ、5 dpf の仔魚を顕微鏡下で観察することで行った。既に私の所属研究室との共同研究により、小脳神経回路で **GFP** 蛍光が観察されるシステムが多数単離されていた。本研究ではこれらのシステムにおいて、小脳ニューロンの様々な抗体マーカーを用いて免疫組織学的解析を行った。**Vglut1**(vesicular Glutamate Transporter 1)は分子層と小脳陵における顆粒細胞の軸索を標識する。**Neurod1**(neurogenic differentiation 1)は顆粒細胞の発生に重要な役割を果たしていると考えられており[67-69]、分子層内の未成熟な顆粒細胞の核及び、顆粒細胞層、顆粒隆起、小脳尾葉内の成熟した顆粒細胞の核を標識する。**Pvalb7**(parvalbumin 7)はブルキンエ細胞のマーカーであり、神経突起(軸索と樹状突起)、細胞体のいずれも標識する。**Fabp7a**(fatty acid binding protein 7)は **Blbp**(brain lipid binding protein)としても知られ、バグマングリアのマーカーである。これらのマーカーを用い、顆粒細胞で **GFF** あるいは **GFP** を発現する 8 システム、eurydendroid 細胞で **GFF** を発現するシステム、下オリブ核ニューロンで **GFF** を発現するシステム、バグマングリアで **GFF** を発現する 2 システムを同定した(表 1)。

表 1. 小脳神経回路を標識可能な遺伝子組み換えゼブラフィッシュ系統

系統名	発現するタンパク質	細胞の種類
gSA2AzGFF152B	GFF	顆粒細胞
gSAIzGFFM765B	GFF	顆粒細胞
gSAIG23C	GFF	顆粒細胞(小脳隆起・小脳尾葉)
gSAG6A	GFP	顆粒細胞(小脳隆起・小脳尾葉)
SAGFF(LF)128A	GFF	顆粒細胞
SAGFF(LF)157B	GFF	顆粒細胞
hspGFF57A	GFF	顆粒細胞
hspGFFDMC90A	GFF	顆粒細胞
hspzGFFgDMC156A	GFF	eurydendroid 細胞
hspGFFDMC28C	GFF	下オリーブ核・登上線維
SAGFF(LF)251A	GFF	バーグマングリア
SAGFF(LF)226B	GFF	バーグマングリア
aldoca:GFF	GFF	プルキンエ細胞
aldoca:gap43-venus	Venus	プルキンエ細胞
aldoca:gap43-mCherry	mCherry	プルキンエ細胞

顆粒細胞特異的 GFF 系統の解析

ゼブラフィッシュ小脳において、成熟した顆粒細胞は小脳弁/小脳体の顆粒細胞層、顆粒隆起/小脳尾葉の顆粒細胞層の 2 つの領域に位置する。そして、各々異なった神経回路接続や発生過程を示す[15, 36]。本研究により、仔魚や成魚の小脳において、小脳弁/小脳体や顆粒隆起/小脳尾葉の顆粒細胞で GFF を発現する様々な系統が得られた(表 1)。gSA2AzGFF152B は小脳弁/小脳体の大部分の顆粒細胞に発現し、顆粒隆起/小脳尾葉ではわずかな顆粒細胞に発現していた(図 3)。GFP 発現は成魚でも維持されており(図 3D)、GFP 陽性細胞と顆粒細胞の核内 Neurod1 の発現が重なっている(図 3E-H)ことから、これらの GFP 陽性細胞は顆粒細胞であることが示唆された。この系統における GFP 発現は小脳に限定して観察されることから、小脳顆粒細胞特異的に GFF を発現しており、解剖学・機能解析実験に利用可能であることが示唆された。

プルキンエ細胞特異的系統の解析

本研究室により、zebrin II[70]をコードしている *aldolase Ca (aldoca)* 遺伝子の翻訳開始点上流約 5 Kb の領域はプルキンエ細胞特異的に蛍光タンパク質を誘導できることが報告されており、*Tg(aldoca:gap43-Venus)*が既に樹立されている[59]。3 dpf から仔魚において gap43-Venus は、Pvalb7 陽性プルキンエ細胞の軸索、樹状突起、細胞体で発現していることは分かっていた。本研究により、成魚においても gap43-Venus の発現は Pvalb7 陽性プルキンエ細胞で観察され、特に細胞膜での蛍光が強いことが分かった (図 4A-D)。さらに、*aldoca* プロモーターを用い、プルキンエ細胞で GFF を発現する *Tg(aldoca:GFF)*を樹立した。*Tg(UAS:EGFP)*と交配させ、Pvalb7 と共染色を行った結果、GFP 陽性細胞は Pvalb7 陽性プルキンエ細胞であることが分かった(図 4E-L)。しかしながら、GFP はモザイクに発現しており、仔魚から成魚において正中線付近と側方のプルキンエ細胞でのみ発現が観察された。これらの結果から、*aldoca* プロモーターは全てのプルキンエ細胞で遺伝子発現を誘導可能ではあるが、全てのレポーターが同様に発現できる訳ではないことが示唆された。

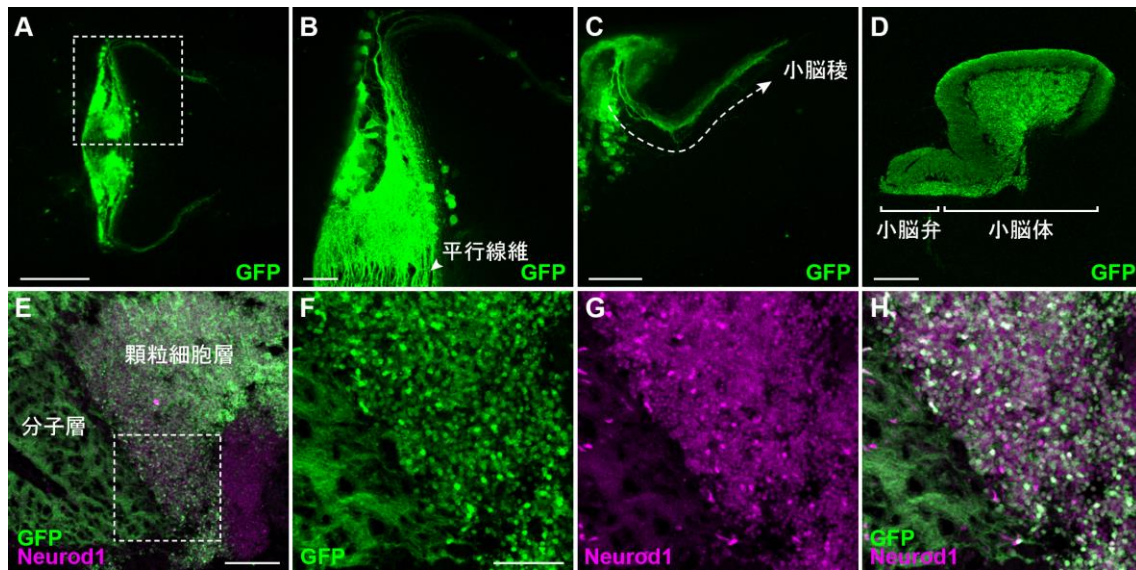


図 3. 顆粒細胞特異的 GFP 系統

gSA2AzGFF152B; *Tg(UAS:GFP)*の 5 dpf(A-C)及び成魚脳(D-H)を用いて、蛍光観察を行った。(A) 5 dpf における背側像(左:前方)。(B) A の破線枠内拡大図。矢印は平行線維を示している。(C) 5 dpf における側方像。破線矢印は小脳外背側後脳の小脳陵への軸索投射の様子を示している。(D) 成魚脳矢状断切片。小脳弁・小脳体で GFP 蛍光が観察される。(E) 成魚脳切片において、抗 GFP 抗体と抗 Neurod1 抗体による二重免疫染色を行った。小脳体の顆粒細胞層及び分子層を示している。(F-H) E の破線枠内拡大図。顆粒細胞層内の GFP 陽性細胞は顆粒細胞の核内に発現する Neurod1 と共局在していることが観察できる。Scale bars: (A) 100 μ m, (B) 20 μ m, (C) 50 μ m, (D) 200 μ m, (E) 100 μ m, (F-H) 50 μ m

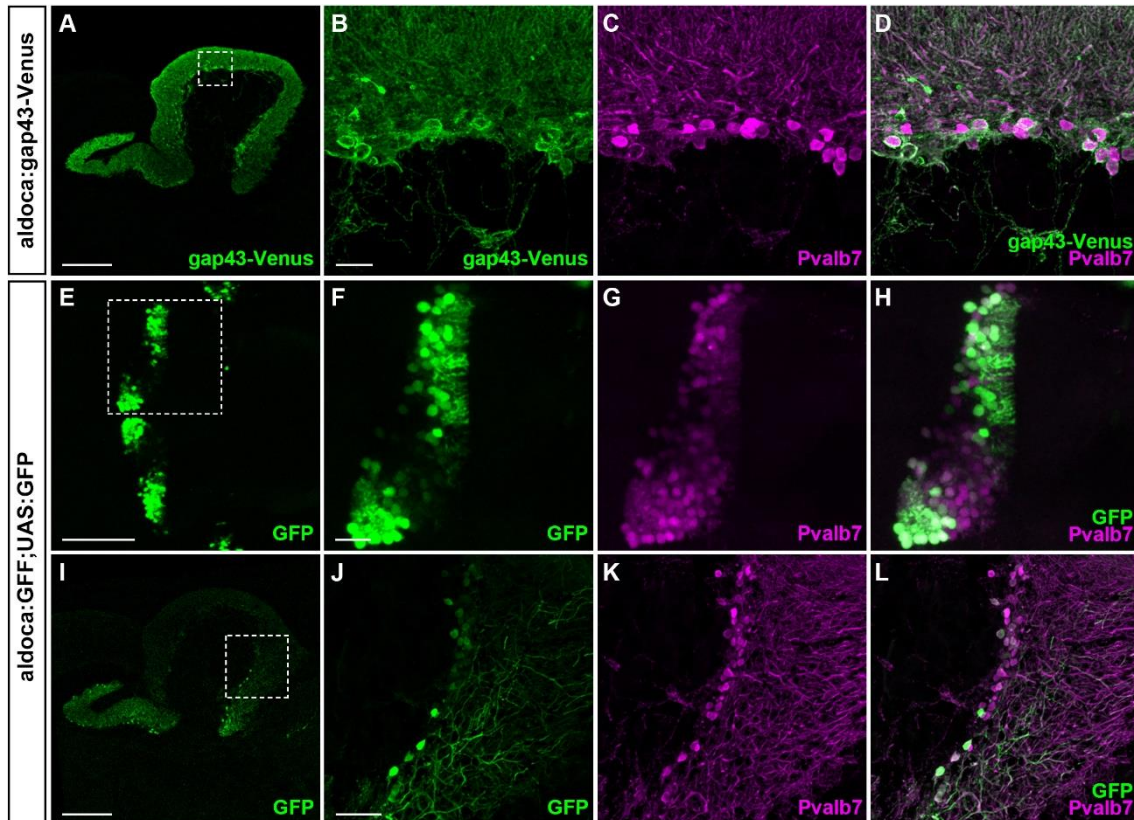


図 4. プルキンエ細胞特異的系統

*Tg(aldoca:gap43-Venus)*の成魚脳(A-D)及び、*Tg(aldoca:GFF); Tg(UAS:GFP)*の 5 dpf(E-H)・成魚脳(I-L)を用いて、抗 GFP 抗体と抗 Pvalb7 抗体による二重免疫染色を行った。(A) *Tg(aldoca:gap43-Venus)*成魚脳切片において、プルキンエ細胞層及び分子層に gap43-Venus の発現が観察される。(B-D) A の破線枠内拡大図。プルキンエ細胞層内の膜局在 gap43-Venus 陽性細胞は、プルキンエ細胞の軸索・樹状突起・細胞体に発現している Pvalb7 と共局在していることが観察できる。(E) *Tg(aldoca:GFF); Tg(UAS:GFP)*の 5 dpf における背側像(左：前方)。(F-H) E の破線枠内拡大図。GFP 陽性細胞は Pvalb7 と共局在しているが、モザイクに発現している。(I) *Tg(aldoca:GFF); Tg(UAS:GFP)*成魚脳矢状断切片。(J-L) I の破線枠内拡大図。正中線付近と側方の Pvalb7 陽性プルキンエ細胞でのみ、GFP が発現している。Scale bars: (A) 200 μ m, (B-D) 20 μ m, (E) 100 μ m, (F-H) 20 μ m, (I) 200 μ m, (J-L) 50 μ m

eurydendroid 細胞特異的 GFF 系統の解析

eurydendroid 細胞の細胞体はプルキンエ細胞層付近に位置し、プルキンエ細胞や顆粒細胞から軸索投射を受けており、小脳外の標的へ軸索を伸ばしている[11, 12, 71]。hspzGFFDMC156A; *Tg(UAS:GFP)*の仔魚及び成魚において、GFP 蛍光は *Pvalb7* 陽性プルキンエ細胞の細胞体や樹状突起に近接した細胞体で観察された(図 5D, L-P)。また、脳深部まで観察を行うため、透明化試薬 SeeDB を用いて処理した[62, 63]。その結果、GFP 陽性細胞は小脳から吻側に軸索を伸ばしていることが分かった(図 5A, C, E-G)。また、成魚の小脳体において 75%以上の GFP 陽性細胞の細胞体が *Pvalb7* 陽性プルキンエ細胞からの軸索投射を受け取っていることが分かった(図 5N-P, 表 2)。これらの結果から、この系統における GFP 陽性細胞は eurydendroid 細胞であることを示している。しかしながら、幾つかの GFP 陽性細胞はプルキンエ細胞からの軸索投射を受けておらず(表 2)、これらの eurydendroid 細胞集団は、プルキンエ細胞ではなく顆粒細胞から軸索投射を受けている可能性が考えられる。

これまでの研究により、一部の eurydendroid 細胞はプロニューラル遺伝子である *olig2* を発現しており、*Tg(olig2:EGFP)*において、プルキンエ細胞層近傍に存在する *Olig2:GFP* 陽性細胞は eurydendroid 細胞であることが示されている[8, 36, 72]。この系統でも同様の結果が得られるかどうか、*Tg(olig2:EGFP)*と hspzGFFDMC156A; *Tg(UAS:RFP)*を交配させて検証した。その結果、仔魚においても成魚においても *olig2* 陽性細胞・*olig2* 陰性細胞いずれも RFP を発現していることが観察され(図 5H-K, Q-S)、ゼブラフィッシュにおいては *olig2* 陽性・*olig2* 陰性の eurydendroid 細胞が存在することを示している以前の報告と一致する[8]。さらに、GFP 陽性の軸索は小脳の吻側腹側で交差して反対側の被蓋領域に投射していることから(図 5E-G)、一部の eurydendroid 細胞は直接この脳領域に情報を出力していることが示唆された。

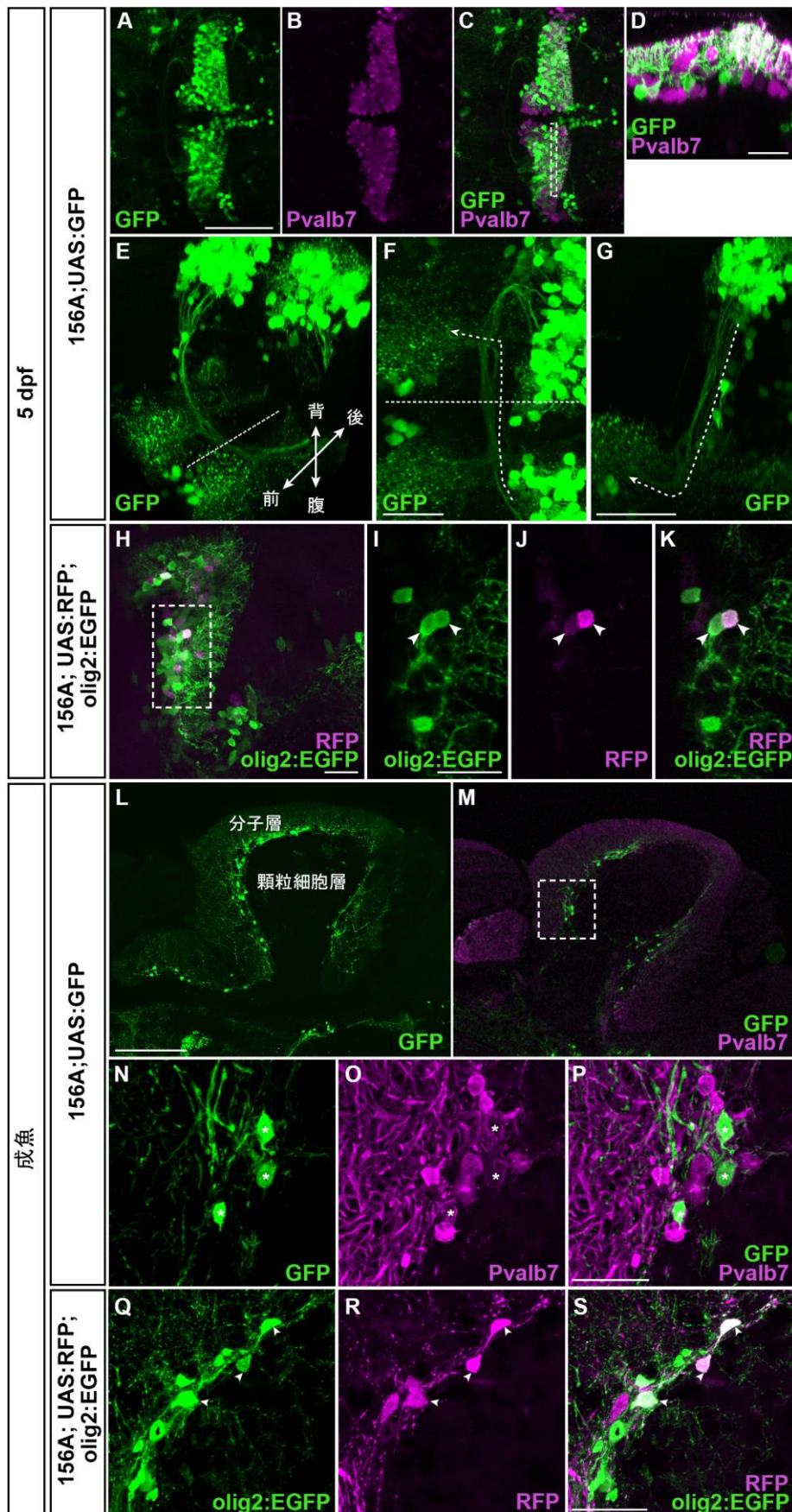


図 5. eurydendroid 細胞特異的 GFF 系統

(A-G, L-P) *hspzGFFDMC156A; Tg(UAS:GFP)* の 5 dpf(A-G) 及び成魚脳(L-P) を用いて、抗 GFP 抗体と抗 Pvalb7 抗体による二重免疫染色を行った。(A-C) 5 dpf における背側像(左:前方)。(D) C の破線枠内における横断面図。Pvalb7 陽性プルキンエ細胞近傍に、GFP 陽性 eurydendroid 細胞が位置していることが分かる。(E) GFP 陽性 eurydendroid 細胞の深部形態観察。(F,G) GFP 陽性 eurydendroid 細胞の背側像(F)、側方像(G)を示している(左:前方)。E と F における破線は正中線を示しており、GFP 陽性 eurydendroid 細胞の軸索は F と G における破線矢印で示している。(L-M) *hspzGFFDMC156A; Tg(UAS:GFP)* 成魚脳における GFP 及び Pvalb7 の発現を示している。GFP 陽性 eurydendroid 細胞の細胞体はプルキンエ細胞層近傍に位置していることが分かる。(N-P) M の破線枠内拡大図。星印は、GFP 陽性 eurydendroid 細胞が Pvalb7 陽性プルキンエ細胞の軸索投射を受けている様子を示している。(H-K, Q-S) *hspzGFFDMC156A; Tg(UAS:RFP); Tg(olig2:EGFP)* の 5 dpf(H-K) 及び成魚脳(Q-S) における EGFP、RFP 共発現観察。(H) 5 dpf における側方像。(I-K) H の破線枠内拡大図。(Q-S) 成魚脳矢状断切片。I-K 及び Q-S で示している矢印は、RFP 陽性 eurydendroid 細胞のうち Olig2(EGFP) を発現している細胞を示している。Scale bars: (A-C) 100 μm , (D) 20 μm , (F) 50 μm , (G) 50 μm , (H) 20 μm , (I-K) 20 μm , (L, M) 200 μm , (N-P) 50 μm , (Q-S) 50 μm

表 2. hspzGFFDMC156A; Tg(UAS:GFP)における GFP 陽性細胞の特徴

	領域	GFP 陽性細胞	プルキンエ細胞の軸索投射 を受ける GFP 陽性細胞	比率 (%)
標本 1	小脳弁	23	8	34.8
	小脳体	90	79	87.8
標本 2	小脳弁	30	5	16.7
	小脳体	41	33	80.5
標本 3	小脳弁	32	2	6.3
	小脳体	118	92	78.0

3 個体の hspzGFFDMC156A; Tg(UAS:GFP)の成魚脳矢状断切片(14 μ m)を作製し、各々 7 切片を解析に用いた。小脳弁と小脳体において、GFP 陽性細胞及び Pvalb7 陽性プルキンエ細胞の軸索投射を受ける GFP 陽性細胞の数を計測した。GFP 陽性細胞の総数に対する、プルキンエ細胞の軸索投射を受ける GFP 陽性細胞の比率を示している。

下オリーブ核ニューロン特異的 GFF 系統の解析

*hspGFFDMC28C; Tg(UAS:GFP)*において、GFP 蛍光は後脳の後腹側に位置する細胞体で観察された(図 6)。これらの GFP 陽性細胞の軸索は 5 dpf までにプルキンエ細胞に達していることから(図 6A-H)、GFP 陽性細胞は下オリーブ核ニューロンであり、小脳プルキンエ細胞へ登上線維を伸ばしていることが考えられる。GFP 陽性細胞の軸索の少なくとも一部は、左右の下オリーブ核間の正中線を交差(図 6D)した後、吻側に曲がる。成魚になると GFP の発現は下オリーブ核ニューロンに限局して発現し、正中線を交差する GFP 陽性登上線維は多く観察された(図 6K)。興味深いことに、GFP 陽性登上線維は小脳へ異なった経路で達していた(図 6I, Jb)。幾つかの登上線維は吻側方向に垂直に曲がり、他の登上線維は吻側方向に緩やかに曲がっていた。そして、GFP 陽性の軸索末端はプルキンエ細胞の細胞体、あるいは近位に投射していることが観察された(図 6H, M)。さらに、後脳の後腹側に位置する GFP 陽性細胞は *vglut2a* 陽性であることも確認された(図 7)。これは、下オリーブ核ニューロンが *vglut2a* 陽性グルタミン酸作動性ニューロンであるという知見と一致する[8, 73, 74]。次に、*hspGFFDMC28C* と光変換型蛍光タンパク質 *Kaede*[54]を UAS の下流に持ったレポーター系統を交配させ登上線維の投射についてさらなる解析を行った(図 8)。軸索に発現している光変換型赤色蛍光タンパク質 *Kaede* は逆行性に細胞体に輸送される[75]。仔魚において、片側の小脳へ投射している登上線維の軸索末端へ UV 照射を行い、7 時間後に観察した結果(図 8F-I)、赤色蛍光タンパク質 *Kaede* が主に反対側の下オリーブ核ニューロンの細胞体で検出された(図 8L, M)。これらの結果から、哺乳類同様にゼブラフィッシュにおいても登上線維は主に対側に投射していることが確認された(図 8N)。

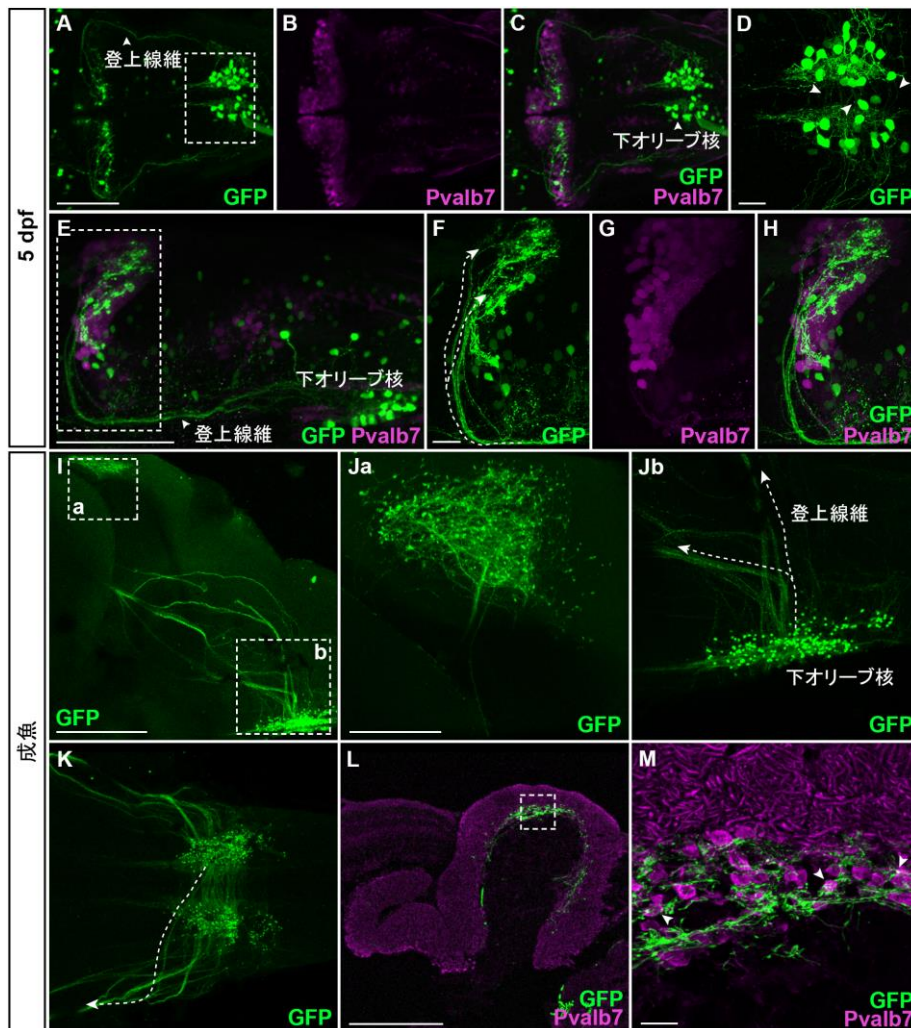


図 6. 下オリブ核ニューロン特異的 GFF 系統

hspGFFDMC28C; *Tg(UAS:GFP)* の 5 dpf (A-H) 及び成魚脳 (I-M) を用いて、抗 GFP 抗体と抗 Pvalb7 抗体による二重免疫染色を行った。(A-C) 5 dpf における背側像 (左: 前方)。(D) A の破線枠内拡大図。矢印は、正中線を交差する登上線維を示している。(E) 5 dpf における側方像 (左: 前方)。(F-H) E の破線枠内拡大図。GFP 陽性下オリブ核を起始核とした登上線維が、Pvalb7 陽性プルキンエ細胞へと軸索投射している様子を示している (破線矢印)。(I) 全脳免疫染色後に透明化を行った成魚脳側方像 (左: 前方)。(Ja, Jb) I の破線枠内拡大図。(K) 下オリブ核領域の腹側像。Jb と K における点線矢印は登上線維の方向を示している。(L) 成魚脳矢状断切片 (左: 前方)。(M) L の破線枠内拡大図。矢印は、GFP 陽性登上線維軸索終末が Pvalb7 陽性プルキンエ細胞の細胞体に達している様子を示している。Scale bars: (A-C) 100 μ m, (D) 20 μ m, (E) 100 μ m, (F-H) 20 μ m, (I) 400 μ m, (Ja, Jb, K) 200 μ m, (L) 400 μ m, (M) 20 μ m

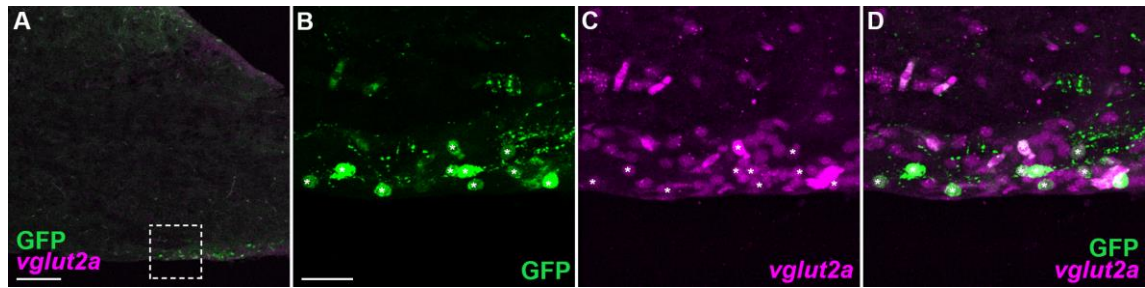


図 7. hspGFFDMC28C における GFP 陽性細胞はグルタミン酸作動性である
 hspGFFDMC28C; *Tg(UAS:GFP)* の成魚脳を用いて、抗 GFP 抗体と *vglut2a* プローブによる二重染色を行った。(A) 後脳後方の低倍率側方像。(B-D) A の破線枠内拡大図。星印は、多くの GFP 陽性下オリブ核で *vglut2a* が発現している様子を示している。
 Scale bars: (A) 100 μ m, (B-D) 20 μ m

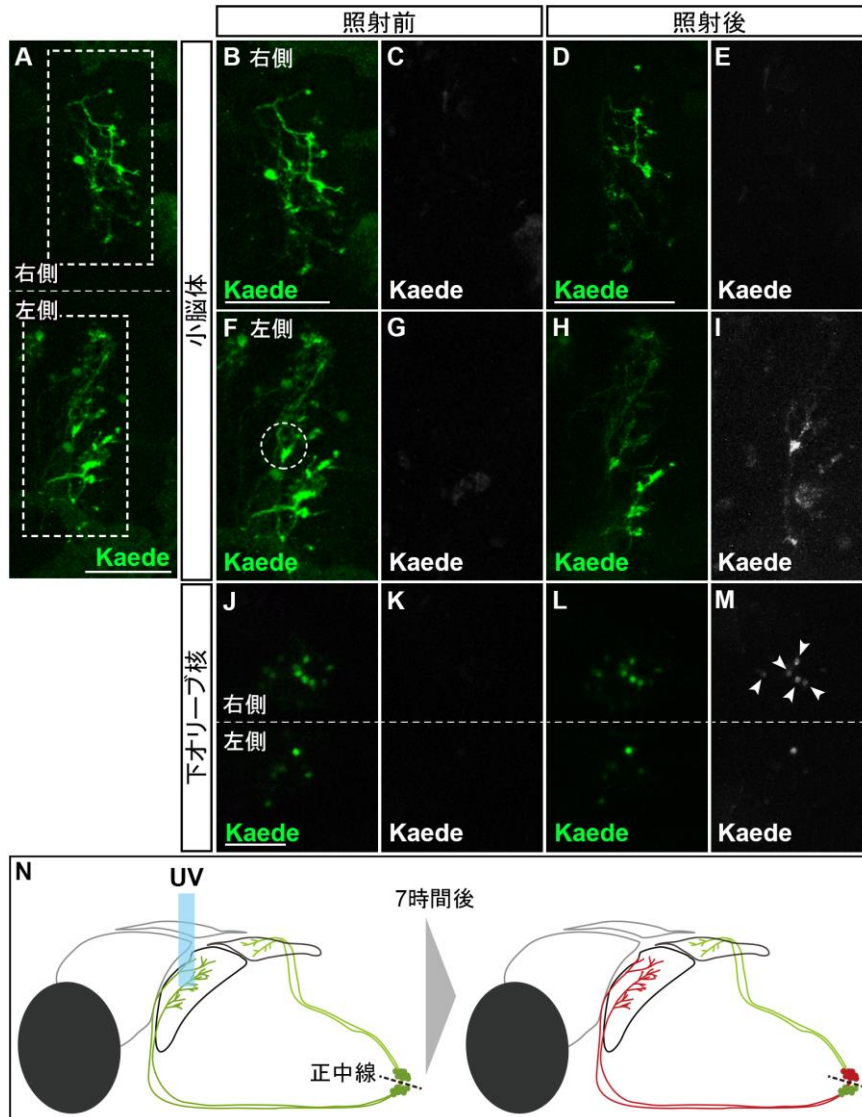


図 8. Kaede による登上線維の投射方向解析

hspGFFDMC28C と *Tg(UAS:Kaede)* を交配して得られる 5 dpf 仔魚の左側登上線維に UV 照射を行い、Kaede と光変換された Kaede の発現解析を行った。小脳体(A, B-I)と下オリーブ核(J-M)における照射前・照射後の観察を行った。(A) 小脳体の背側像(左：前方)。(B-E) A の破線枠内(右側)を示している。(F-I) A の破線枠内(左側)を示している。F の破線枠で示した領域に UV 照射を行った。(J-M) 下オリーブ核領域の背側像。UV 照射の 7 時間後、照射した左側の登上線維(I)及び右側の多くの下オリーブ核(M, 矢印)で光変換された Kaede が検出された。(N) 模式図。登上線維は主に反対側の小脳へ投射している。Scale bars: (A) 50 μm , (B, C, F, G) 50 μm , (D, E, H, I) 50 μm , (J-M) 40 μm

バーグマングリア特異的 GFF 系統の解析

SAGFF(LF)251A; *Tg(UAS:GFP)*において、バーグマングリアのマーカーである *Fabp7a* と GFP の蛍光が重なることが分かった(図 9A-C, F-H)。小脳外の *Fabp7a* 陽性放射状グリアには発現が観察されないことから(図 9D, E, I-K)、この系統はバーグマングリア特異的に GFF を発現していることが示唆された。

Gal4/UAS システムを利用した WGA 追跡による多シナプス性結合の検出

樹立した GFF 系統がゼブラフィッシュ小脳神経回路研究に有効であるか調べる為、顆粒細胞特異的 GFF 系統 *gSA2AzGFF152B; Tg(UAS:GFP)*と *Tg(UAS:AcGFP-P2A-WGA)*を交配させ、Anti-WGA 抗体を用いてゼブラフィッシュ成魚における WGA の局在を観察した(図 10)。WGA は小麦胚芽由来のレクチンの一種であり、特定の糖鎖を認識して結合する。特定のニューロンに発現させた WGA は軸索輸送され、シナプス間隙に放出される。そして、次のニューロンの糖鎖に結合し、取り込まれることが知られている。成魚において、GFP の蛍光は小脳神経回路において顆粒細胞でのみ検出され(図 10A, J, S)、プルキンエ細胞、*eurydendroid* 細胞、下オリーブ核ニューロンでは観察されない。WGA は顆粒細胞層の GFP 陽性顆粒細胞の細胞体及び、分子層の軸索において検出された(図 10C, L)。また、WGA は *Pvalb7* 陽性プルキンエ細胞(図 10B-D, F-H)や、*eurydendroid* 細胞(*Pvalb7* は発現していないがプルキンエ細胞の軸索投射を受けている細胞)の細胞体(図 10K-M, O-Q)で局在が見られた。さらに、下オリーブ核ニューロンの細胞体にまで WGA が検出され(図 10T, V)、プルキンエ細胞あるいは *eurydendroid* 細胞から輸送されたと考えられる。このように、Gal4/UAS システムを利用した WGA 追跡によって、ゼブラフィッシュ小脳における顆粒細胞とプルキンエ細胞・*eurydendroid* 細胞・下オリーブ核ニューロンが、直接的または間接的に結合していることが示された。

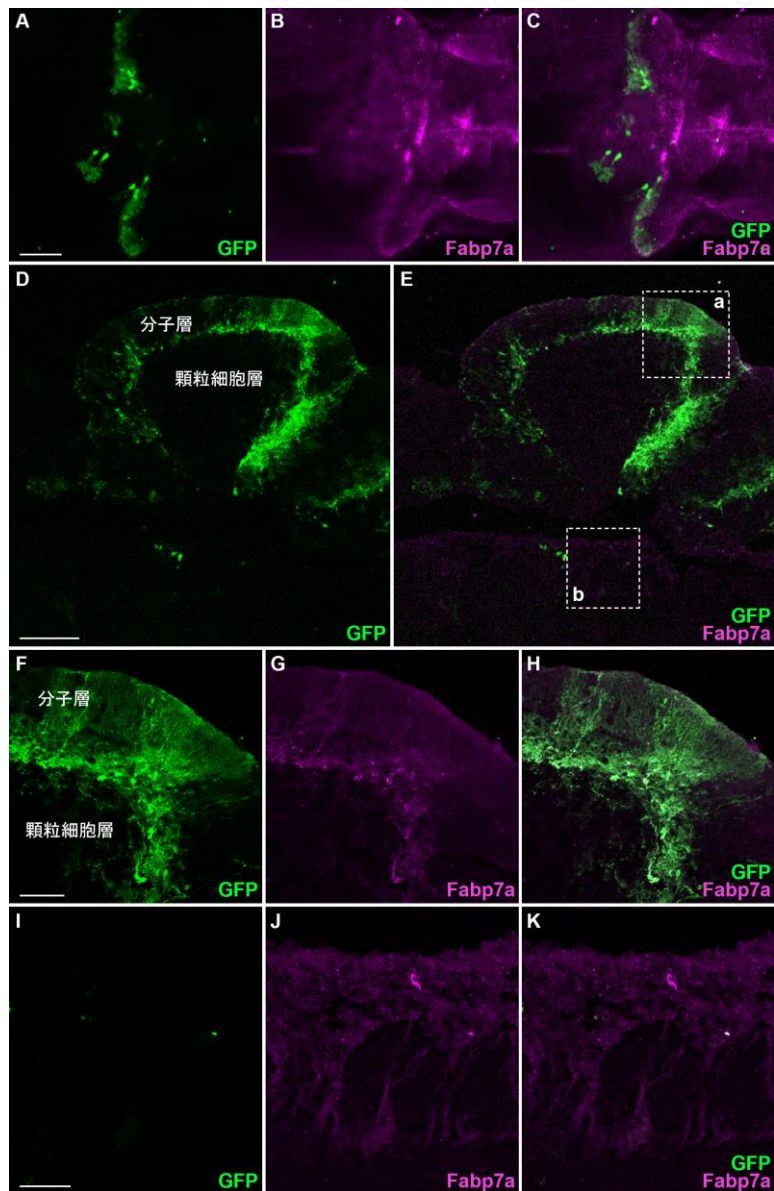


図 9. バーグマングリア特異的 GFF 系統の解析

SAGFF(LF)251A; *Tg(UAS:GFP)*の 5 dpf(A-C)及び成魚脳(G-K)を用いて、抗 GFP 抗体と抗 Fabp7a 抗体による二重免疫染色を行った。(A-C) 5 dpf における背側像(左:前方)。(D,E) 成魚脳における GFP 及び Fabp7a の発現を示している。(F-K) E の破線枠 a 及び b 内の拡大図。小脳内(a, F-H)と小脳外(b, I-K)の GFP 発現及び Fabp7a 発現を示している。小脳内の GFP は Fabp7a 陽性放射状グリアと共局在しているが、小脳外の Fabp7a 陽性放射状グリアにおいて GFP が観察されなかった。従って、SAGFF(LF)251A; *Tg(UAS:GFP)*において標識される GFP 陽性細胞は小脳内放射状グリアであるバーグマングリアである。Scale bars: (A-C) 50 μ m, (D, E) 200 μ m, (F-H) 50 μ m, (I-K) 50 μ m

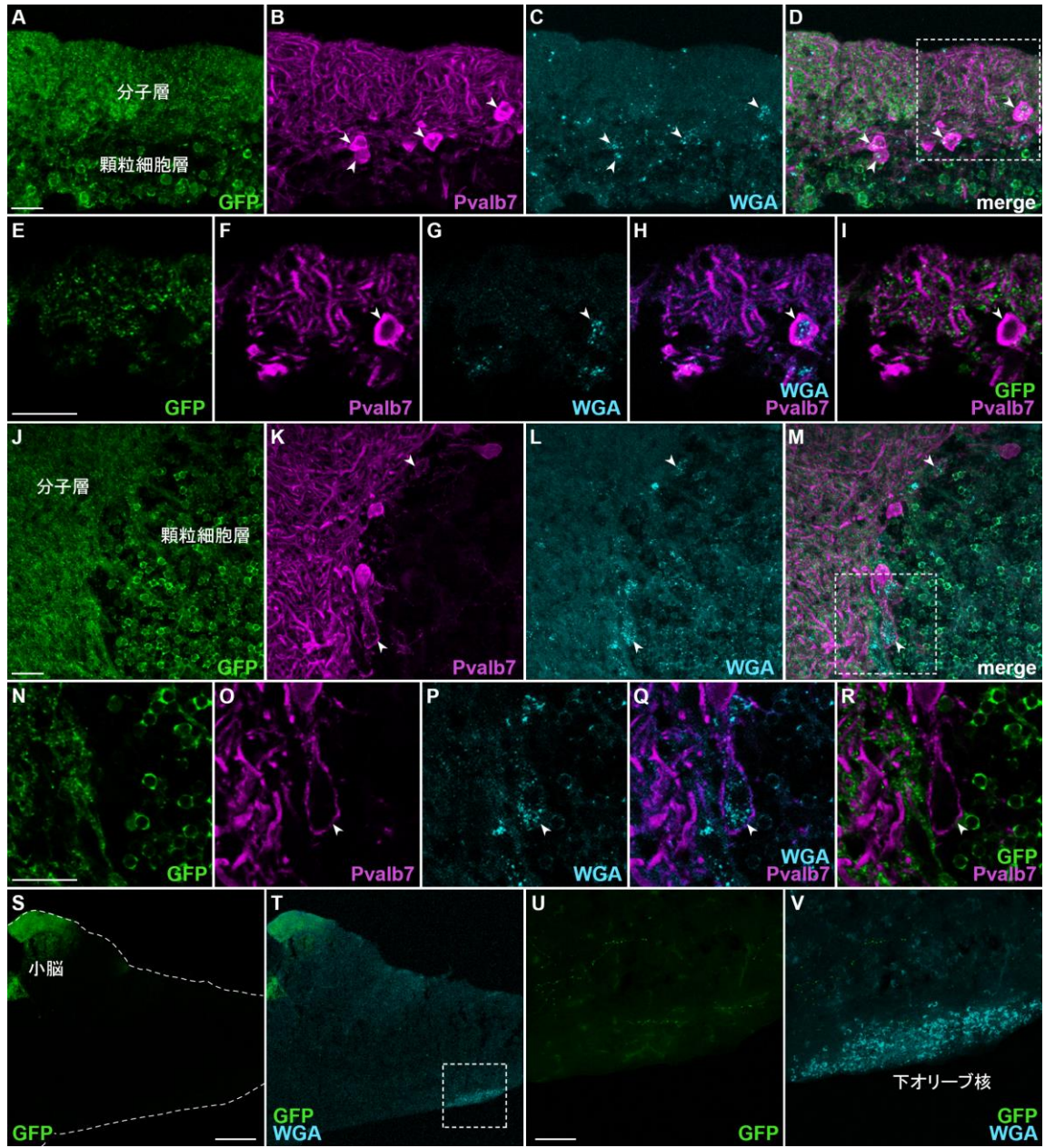


図 10. WGA 追跡による小脳神経回路の標識

gSA2AzGFF152B; *Tg(UAS:GFP)*; *Tg(UAS:AcGFP-P2A-WGA)*の成魚脳を用いて、抗 GFP 抗体・抗 Pvalb7 抗体・抗 WGA 抗体による免疫染色を行った。(A-D)及び(J-M)は小脳分子層/顆粒細胞層の異なる 2 つの領域を示している。(E-I) D の破線枠内拡大図。1 平面の像を示している。Pvalb7 陽性プルキンエ細胞の細胞体内に WGA が局在していることが分かる(B-D, F-I : 矢印)。(N-R) M の破線枠内拡大図。1 平面の像を示している。Pvalb7 陽性の軸索投射を受け、その細胞体が Pvalb7 陰性である eurydendroid 細胞の細胞体内に WGA が局在していることが分かる(K-M, O-R : 矢印)。プルキンエ細胞・eurydendroid 細胞いずれにおいても GFP は発現していない。(S,T) 後脳後方の低倍率矢状断切片(左 : 前方)。(U,V) T の破線枠内拡大図。下オリーブ核においても WGA が局在している。これらのことから、顆粒細胞特異的に発現させた WGA はプルキンエ細胞・eurydendroid 細胞・下オリーブ核にまで輸送されることが分かった。Scale bars: (A-D) 20 μ m, (E-I) 20 μ m, (J-M) 20 μ m, (N-R) 20 μ m, (S, T) 200 μ m, (U, V) 50 μ m

考察

現在までに、小脳神経回路発生の研究のため様々なトランスジェニック系統が作製されてきた。例えば、顆粒細胞で GFP を発現する *Tg(gata1a:GFP)* [76, 77]・*Tg(neurod1:EGFP)* [78]、eurydendroid 細胞で EGFP を発現する *Tg(olig2:EGFP)* [36, 72]、下オリブ核ニューロンで EGFP を発現する *Tg(pou4f1-hsp70l:EGFP)* [36]などである。しかしながら、*Tg(olig2:EGFP)*はほんの一部の eurydendroid 細胞しか標識できず、*Tg(pou4f1-hsp70l:EGFP)*においては下オリブ核ニューロン以外の他のニューロンも標識される。本研究により得られた *hspzGFFDMC156A* では主要な eurydendroid 細胞を標識しており(図 5, 表 2)、*hspzGFFDMC28C* では下オリブ核ニューロン特異的に目的遺伝子を発現できることが分かった(図 6)。また、*Tg(gata1a:GFP)*や *Tg(neurod1:EGFP)*では全ての顆粒細胞で蛍光タンパク質を発現するが、本研究で得られた *gSA2AzGFF152B* では小脳弁/小脳体に限局して目的遺伝子を誘導可能である(図 3)。さらに、顆粒隆起/小脳尾葉の顆粒細胞特異的なトランスジェニック系統も得られたことから(表 1)、顆粒細胞の領域特異的な発生・機能解析を行うことが可能になったと言える。

顆粒細胞の分布

ゼブラフィッシュにおける顆粒細胞は 2 つの主要な領域に位置する。小脳弁/小脳体と、顆粒隆起/小脳尾葉である。顆粒隆起/小脳尾葉は前庭小脳神経回路を構成していると報告されているが[8, 15]、小脳弁/小脳体と顆粒隆起/小脳尾葉の顆粒細胞が各々どのような機能を担っているか詳しいことは分かっていない。本研究により得られたトランスジェニック系統を用いることで、2 つの主要な領域に位置する顆粒細胞集団がどのような発生過程を経るか、そしてどのような機能を果たしているか研究することが可能となった。後半の章において、小脳弁/小脳体の顆粒細胞の機能に迫る。

プルキンエ細胞

*Tg(aldoca:gap43-Venus)*の解析により、他の脊椎動物同様に[79-81]、プルキンエ細胞は近傍の eurydendroid 細胞に軸索を投射しているだけでなく、後脳の前庭神経核にも直接投射していることが分かっている。一方で、マウスにおいて *Aldoca* は縞状の発現を示すが[70, 81-85]、*Tg(aldoca:gap43-Venus)*ではそのような発現の違いは見られな

かったことから(図 4A-D)、ゼブラフィッシュ小脳神経回路の方がより単純な回路を形成している可能性が示唆された。また、*Tg(aldoca:GFF); Tg(UAS:EGFP)*における EGFP の発現は縞状の様相を呈していたが(図 4E-L)、これは UAS における CpG 配列のメチル化による、遺伝子抑制の影響が考えられる[86]。

eurydendroid 細胞

真骨魚類の小脳における eurydendroid 細胞には、幾つかの特徴がある。分子層に樹状突起を伸ばし、細胞体はプルキンエ細胞層近傍に位置し、小脳外の標的に軸索を投射している[11, 71, 87, 88]。また、一部の eurydendroid 細胞集団は *olig2* を発現している[8, 36, 72]。本研究における *hspzGFFDMC156A* はこれらの特徴を満たしており(図 5)、eurydendroid 細胞特異的なトランスジェニック系統であると言える。現在まで eurydendroid 細胞特異的な分子マーカーについて報告がない。従って、これまでの研究は小脳遠心性線維の逆行性あるいは順行性標識による特定、あるいはプルキンエ細胞の軸索投射を受けている細胞を eurydendroid 細胞と見なしていた[12]。本研究で得られた系統を用いることで、eurydendroid 細胞のより詳細な機能や形態を知ることが可能となった。一方で、この系統においては小脳体に位置する細胞はプルキンエ細胞の軸索投射を受けているが、小脳弁の細胞は受けていないようであった(表 2)。これは、小脳弁の eurydendroid 細胞は顆粒細胞の軸索から投射を受けている可能性があるが、より詳細な組織学的解析及び、電気生理学解析により明らかにできると考えられる。

様々な真骨魚類において神経トレーサーによる順行性標識が行われ、小脳からの出力線維は間脳から延髄に分布が認められるという報告がある[11, 12, 89-94]。また、逆行性標識により、eurydendroid 細胞の小脳外の標的は視床腹内側核、赤核、動眼神経核、網様体、小脳弁外側核が考えられている[95, 96]。トレーサー実験は小脳からの軸索投射を反映しているのは確かであるが、これら全てが eurydendroid 細胞からの投射であるという直接的な証拠はまだ報告されていない。本研究における *hspzGFFDMC156A* においては、主な eurydendroid 細胞の軸索は小脳下の正中線を横切り、赤核、動眼神経核、網様体が存在する反対側の被蓋及び後脳吻側の広い範囲に軸索を伸ばしていることが示された(図 5)。また、哺乳類の投射ニューロンである深部小脳核とは大きく違う特徴を持つものの、反対側への小脳外軸索投射は共通の特徴であることが示唆された。eurydendroid 細胞は視蓋や視床にも軸索を伸ばしているという報告があるが[95-97]、本研究における系統からは観察することができなかった。これは、*hspzGFFDMC156A*

が主要な eurydendroid 細胞を標識してはいるが、視蓋や視床への投射には他の eurydendroid 細胞が行っている可能性が考えられる。

下オリーブ核ニューロン

これまでの *Tg(pou4f1-hsp70l:GFP)* を用いた研究により、登上線維は 5 dpf までに形成されることが報告されていた[8]。また、逆行性標識及び、仔魚(6~7 dpf)における下オリーブ核破壊実験により、登上線維は運動調節に関与していることが示唆されている[40]。これらの知見と本研究における *hspGFFDMC28C* の観察から、下オリーブ核からの軸索投射は 5 dpf までにプルキンエ細胞に達することが分かった(図 6)。また、様々な真骨魚類を用いたトレーサー実験により、登上線維の反対側の投射が示唆されていた[90, 92-94, 98]。本研究により、ゼブラフィッシュにおいても正中線を横切る登上線維は仔魚から成魚において観察され、光変換型蛍光タンパク質 *Kaede* を用いた実験からも下オリーブ核ニューロンは反対側のプルキンエ細胞へ軸索を伸ばしていることが明らかとなった(図 6, 8)。この結果は、哺乳類の知見と一致する。

哺乳類における登上線維のトポグラフィックマップについては既に明らかにされており、特定の領域の下オリーブ核ニューロンは、特定の領域のプルキンエ細胞に軸索投射をしている。これは、小脳内プルキンエ細胞の区画化と *zebrin II* の発現パターンに相関がある[99-104]。ゼブラフィッシュにおいても、小脳への登上線維の経路が幾つか存在することが明らかとなった(図 6)。5 dpf の時点では登上線維の経路に大きな差は見られなかったが、成魚においては多数の経路が存在することが分かった(図 6E, I)。ただし、本研究で得られた系統では大部分の下オリーブ核ニューロンでレポーター遺伝子が発現するため、個々の登上線維の走行パターンを理解することは困難であった。**Brainbow/ZebraBow** といった単一細胞標識技術[105, 106]や、モザイク状に発現させることで[107-109]、ゼブラフィッシュにおける登上線維のトポグラフィックマップを作成することができると考えられる。

Gal4 系統を利用した小脳神経回路研究

本研究において樹立した系統が、ゼブラフィッシュにおける小脳神経回路の研究に有用かどうか、神経軸索トレーサー *WGA* を用いて解析を行った。その結果、顆粒細胞とプルキンエ細胞/eurydendroid 細胞間の接続が明らかとなった(図 10)。eurydendroid 細胞は顆粒細胞とプルキンエ細胞から入力を受けているため、eurydendroid 細胞で見られ

た WGA の局在は顆粒細胞から直接受け取ったか、あるいは間接的にプルキンエ細胞から運ばれた可能性がある。また、本研究において、下オリーブ核においても WGA の局在が見られた(図 10)。マウスやゼブラフィッシュにおいて、プルキンエ細胞に WGA を発現させると、下オリーブ核に WGA が取り込まれることは既に報告されている[41, 56]。これまでの報告から、プルキンエ細胞は下オリーブ核ニューロンに情報の出力を行っていないこと[8]、eurydendroid 細胞は登上線維から入力を受けていないこと[12, 80]が示唆されており、本研究では 2 つの可能性が考えられる。一つは、WGA が eurydendroid 細胞の軸索を介して下オリーブ核ニューロンの細胞体へ運ばれた可能性である。もう一つは WGA がプルキンエ細胞から登上線維へ逆行的に移送され、下オリーブ核ニューロンの細胞体へと運ばれた可能性である。WGA は順行性に運ばれることが知られているが、一方で逆行的な輸送についても報告されている[56, 110]。これは、順行性あるいは逆行性特異的なトレーサーを用いることで、明らかにすることが可能であると考えられる。いずれにしても、WGA を用いることで単シナプス性あるいは多シナプス性の神経接続の検出が可能であることが示唆された。

これまでに、様々なレポーター/エフェクター遺伝子を発現可能な UAS 系統が作製されてきた。例えば、神経活動を可視化できる Ca^{2+} インジケーター[111, 112]、神経伝達阻害が可能なテタヌス毒素やボツリヌス毒素[50, 113, 114]、チャネルロドプシンやハロロドプシンといった神経活動の操作ができる光遺伝学ツール[75, 115-117]である。後半の章では、樹立した Gal4 系統とこれらの UAS 系統を用いて、恐怖条件付け学習における小脳の役割について研究を行った。

第3章. 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

恐怖条件付け学習における小脳の役割について解析を行うため、ゼブラフィッシュ仔魚における条件刺激(光)と無条件刺激(電気刺激)を組み合わせたパブロフ型条件付けの確立を行った。ゼブラフィッシュにおいて、5 dpf の時点で単純な小脳神経回路は形成されることが報告されている[8, 36]。また、5 dpf では単一のプルキンエ細胞に複数回の異なる時間軸で複雑スパイクが起きるが、7~8 dpf では単一のプルキンエ細胞に対して単発の複雑スパイクが起きることから[37-39]、受精後約 1 週間までにプルキンエ細胞-登上線維間のシナプス刈り込みが起きている可能性が示唆される。従って、比較的早いステージで、小脳は機能的な役割を果たすことができると考えられる。さらに、6~8 dpf の仔魚は条件刺激(光)と無条件刺激(尾部への侵害刺激)の連合学習が可能であると報告がある[42]。一方で、受精後 3 週間(21 dpf)の仔魚から、恐怖条件付け学習が可能となるという報告もあるため[43]、ゼブラフィッシュの仔魚における恐怖条件付けが、どの段階で可能になるか明白ではない。

本研究において予備的な研究により、早期のステージでは学習効率が低いことが示唆された($n = 0/10$ for 5~9 dpf; $n = 3/12$ for 10~16 dpf)。また、受精後 30 日以降の魚ではアガロースによる固定が困難な上、鰓呼吸を行うための酸素を持続的に供給しなければならないことから、技術的に難解であることが分かった。そこで、小脳神経回路が十分に完成され、且つ比較的容易に実験が可能な 17~25 dpf の仔魚を用いて条件付けを行った。以降、約 20 dpf の仔魚と表記する。

実験材料と方法

実験動物

野生型ゼブラフィッシュ(*Danio rerio*)として、遺伝的背景 Oregon AB 系統を用いた。ゼブラフィッシュは名古屋大学生物機能開発利用研究センター内の小型魚類飼育装置(名東水園)を使用し、28.5°C、14 時間明期/10 時間暗期の条件で飼育した。古典的恐怖条件付け学習は全て明期の間に行った。

実験装置

まず、約 20 dpf の仔魚を水槽室から学習実験室へ移動させ、1000 mL の水槽で 27°C、1 時間以上馴化させた。0.02% tricaine methanesulfonate で素早く麻酔をかけ、4%

agarose (low gelling temperature Type VII-A, Sigma-Aldrich) with 1/10 Evans solution (134 mM NaCl, 2.9 mM KCl, 2.1 mM CaCl₂, 1.2 mM MgCl₂, and 10 mM Hepes pH 7.8)で固定し、実験装置(図 11B)に移した。実験装置は細胞培養用 90 mm シャーレの底に、穴を開けた厚さ 1.0 mm のアクリル板を貼り付けたものを用意した。穴を開けたアクリル板の上にアガロースで拘束された仔魚を配置し、アガロースが浮いてこないよう針金と磁石で作成した固定具で位置の調整を行った。先端を研磨した厚さ 0.5 mm のステンレス板から成る電極を、仔魚の尾側方に設置し、90 mm シャーレに飼育水を注水した。シャーレ底とアガロースの間にできた空間に、注射針 27G 付きシリンジ(TERUMO, Japan) を用いて 0.1 ml の酸素(99 %, UNICOM)を注入した。アガロースに固定された仔魚の直下に酸素を注入することで、実験終了まで問題なく呼吸補助が可能となる。麻酔からの覚醒、及び条件付け学習環境に馴化させるため、正立顕微鏡(Olympus BX51; Olympus, Japan)のステージ上で 1 時間以上放置した。ステージ下には心拍計測用に高速度 CCD カメラ(GZL-CL-41C6M-C, Point Grey, Canada)を配置した。ステージ上には赤外発光ダイオード(LED, LDL2-33 × 8IR850; CCS Inc., Japan)を置くことで得られる心臓領域の赤外光動画[118]を、ソフトウェア(StreamPix6 software; Norpix, Canada)を用いてフレームレート 90 frames per second (fps)で取得した。条件刺激に用いた白色 LED は、パワーサプライ(E3631A; Agilent Technologies, USA)から DC 8.8~9.0 V 出力で電源供給した。無条件刺激である電気刺激は、電気刺激装置(MASTER-9; A.M.P.I., Israel)とアイソレーター(ISO-Flex; A.M.P.I.)を組み合わせ、80 V/cm 矩形波パルス出力を用いた。条件刺激と無条件刺激のタイミングは、USB DAQ デバイス(USB-6008; National Instruments Co., USA)と LabVIEW (National Instruments Co.)で作成したプログラムで制御した。条件付け実験終了後に仔魚をアガロースから解放すると正常に泳ぎ、その後の成長に影響がないことから、アガロースによる固定や無条件刺激は仔魚に損傷を与えないと判断した。

心拍記録方法

仔魚の心拍は、赤外光照射とステージ下の高速度 CCD カメラで記録した。撮影動画は StreamPix6 により連続した JPEG 画像に変換され、LabVIEW で解析を行った。心拍に対応した明確な明度変化が観察される心臓付近に ROI (Region of Interest)を設定し、明度変化を数値データに変換した。ソフトウェア(LabChart software, AD Instruments)を用いて、データ処理を行い、Microsoft Excel を用いて解析を行った。相

対心拍頻度は、条件刺激提示 2 秒前の平均心拍数を元に算出した。

統計解析

学習判定には、学習付け前と学習付け後の相対心拍頻度の平均値を比較し、統計解析ソフトウェア R (3.2.3) (<https://www.r-project.org/>)を用いて Welch's t 検定を行った。

結果

約 20 dpf のゼブラフィッシュ仔魚における古典的恐怖条件付け

哺乳類・真骨魚類において、条件刺激と嫌悪刺激(無条件刺激)を組み合わせると、条件刺激に対して徐脈や逃避行動を示す。恐怖条件付けにおける小脳神経回路の役割を解明するため、遅延型の恐怖条件付け学習を用いた(図 11)。遅延型の条件付けでは、条件刺激が無条件刺激に先行して呈示され、両刺激が同時に終了する。遅延型の恐怖条件付け学習は、金魚を含む動物の恐怖学習における小脳の役割を研究するための一般的な方法である[32, 34, 35]。本研究では、白色 LED の消灯を条件刺激として、電気刺激を無条件刺激として利用した(図 11B, D)。古典的条件付けは **habituation session**、**acquisition session**、**probe session** の 3 つの手順から成る。**Habituation session** では 10~15 回、5 秒間条件刺激を呈示した。**Acquisition session** では、条件刺激が呈示されてから 4 秒後に 1 ミリ秒の無条件刺激を与える試験を 20 回行った。**Probe session** では 10 回、条件刺激のみ呈示した。なお、コントロール実験(逆行条件付け)では条件刺激呈示の 2 秒前に無条件刺激を与えた。試行間の間隔時間は 50 秒に設定した。ゼブラフィッシュ仔魚の心拍を記録し、条件付け反応を評価した。**Habituation session** において、約 20 dpf ゼブラフィッシュ仔魚は、最初の 1~2 試行において条件刺激に対し反応を示したが、その後は条件刺激による心拍への影響は受けなくなった(図 12A, 左)。**Acquisition session** において、試行の前半においては無条件刺激に対してのみ徐脈が誘発された。約 10~15 試行後、条件刺激呈示後に徐脈が観察されるようになった(図 12A, 中)。**Probe session** において、条件刺激のみで徐脈が観察されるようになった(図 12A, 右)。**Habituation session** の後半 10 試行と **probe session** 10 試行の心拍数を定量化し、比較した(図 12B)。本研究において、**habituation session** 後半 10 試行では条件刺激に対して変化が見られなかった相対平均心拍数が **probe session** 10 試行では有意に減少した場合、学習が成立したと定義した (Welch's t-test, $P < 0.05$)。その結果、37.5 % ($n = 15/40$) の約 20 dpf の野生型ゼブラフィッシュ仔魚において、学習が成立した(図 12C)。これらの条件付け徐脈は、**probe session** の間では消失、あるいは徐々に回復することはなかった(図 13)。また、逆行条件付けでは学習が成立しなかった ($n = 0/10$, 図 12C, 図 14)。

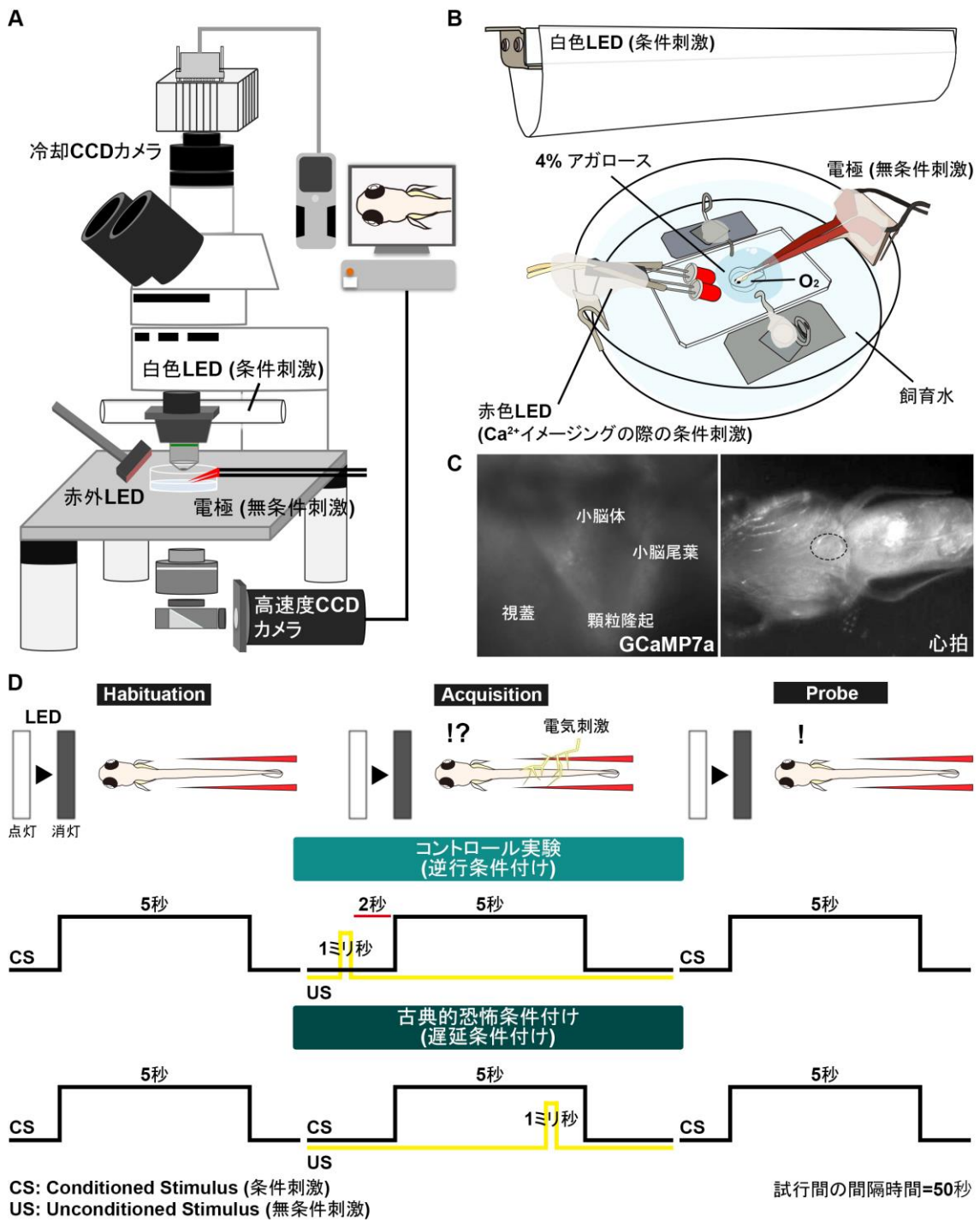


図 11. ゼブラフィッシュにおける古典的恐怖条件付け

(A,B) 約 20 dpf ゼブラフィッシュ仔魚における古典的恐怖条件付けのための実験環境 (A)及び実験装置(B)の模式図。ゼブラフィッシュ仔魚はアガロースで拘束し、呼吸補助のため腹側の空間へ O_2 を注入した。白色 LED 及び赤色 LED の消灯を条件刺激として呈示し、電気刺激を無条件刺激として与えた。(C) 冷却 CCD カメラとステージ下の高速度 CCD カメラを用い、神経活動 Ca^{2+} イメージング(左)と心拍の計測(右)の同時計測が可能である。(D) 遅延型古典的恐怖条件付けの実験パラダイム。Habituation session において、条件刺激(CS)のみ 5 秒間呈示する。試行数は 10~15 回である。Acquisition session において、条件刺激が呈示されてから 4 秒後に 1 ミリ秒の無条件刺激(US)が与えられる。試行数は 20 回である。Probe session において、条件刺激のみ 5 秒間呈示する。試行数は 10 回である。コントロール実験(逆行条件付け)は、acquisition session において条件刺激呈示の 2 秒前に 1 ミリ秒の無条件刺激を与える。試行間には 50 秒の間隔時間を設けた。

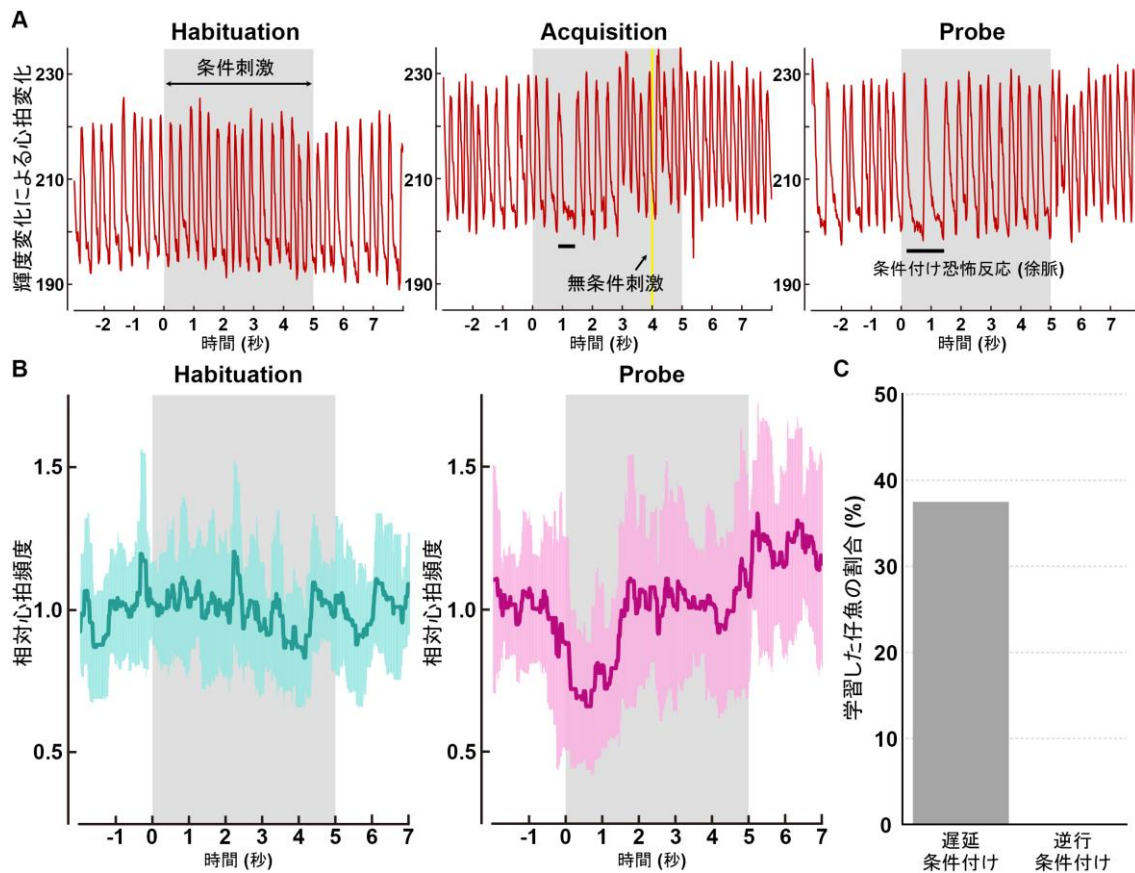


図 12. 約 20 dpf のゼブラフィッシュ仔魚は恐怖条件付け反応の獲得が可能である

(A) 古典的恐怖条件付けにおけるゼブラフィッシュ仔魚の心拍変化の典型例。単一の個体から得られた habituation session の 15 試行目、acquisition session の 16 試行目、probe session の 8 試行目の心拍変化を示している。灰色の領域は条件刺激呈示を、黄線は無条件刺激を示している。x 軸は時間(秒)を、y 軸は赤外ビデオ撮影によって得られる心臓近傍の適切な領域内輝度変化で計測される心拍を示している。太線は、acquisition session の後半や probe session において観察される、条件刺激呈示後の条件付け恐怖反応(徐脈)を示している。

(B) Habituation 及び probe session における相対心拍頻度。各々 10 試行分(habituation:後半の 10 試行、probe:10 試行)の心拍頻度を平均し、条件刺激呈示前の 2 秒間の平均心拍頻度で割った値を相対心拍頻度(y 軸)とした。各々薄い色で示される領域は標準偏差(SD)であり、単一の個体から得られた代表的なデータを示している。Habituation と probe session の相対心拍頻度を比較し、条件刺激呈示後 2 秒間の相対心拍頻度が有意に減少した場合、学習個体であると定義した。

(C) 遅延・逆行条件付けにおける学習した野生型仔魚の割合。遅延条件付けにおいて、40 匹中 15 匹(37.5%)が学習した。一方、逆行条件付けでは学習が成立しなかった($n=0/10$)。

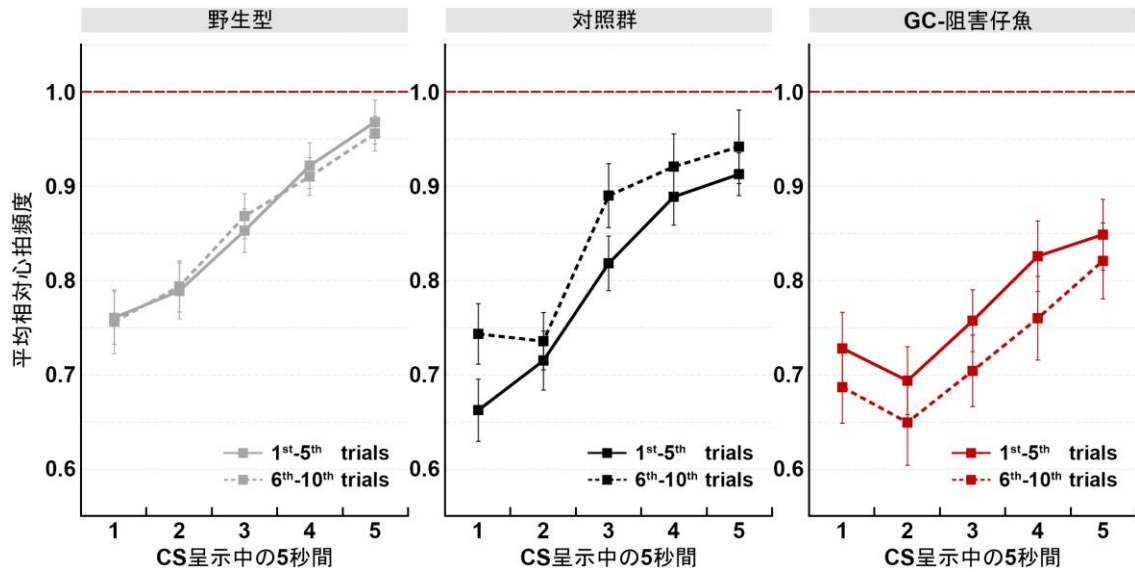


図 13. 条件付け徐脈は probe session 10 試行では消失しない

Probe session の前半(1~5 試行)と後半(6~10 試行)における相対心拍頻度。図は、野生型($n = 15$, 灰色)、顆粒細胞障害仔魚($gSA2AzGFF152B; Tg(UAS:BoTxBLC-GFP)$) ($n = 16$, 赤色)、対照群($n = 20$, 黒色)から得られた相対心拍頻度の平均値±標準誤差(SEM)を示す。いずれの個体でも、前半(点線)と後半(実線)を比較しても獲得した条件付け徐脈に有意な差はなく、probe session 10 試行では消失あるいは減退しなかった(野生型: group effect $P = 0.952$; 対照群: group effect $P = 0.193$; 顆粒細胞障害仔魚: group effect $P = 0.325$, two-way repeated measures ANOVA)。

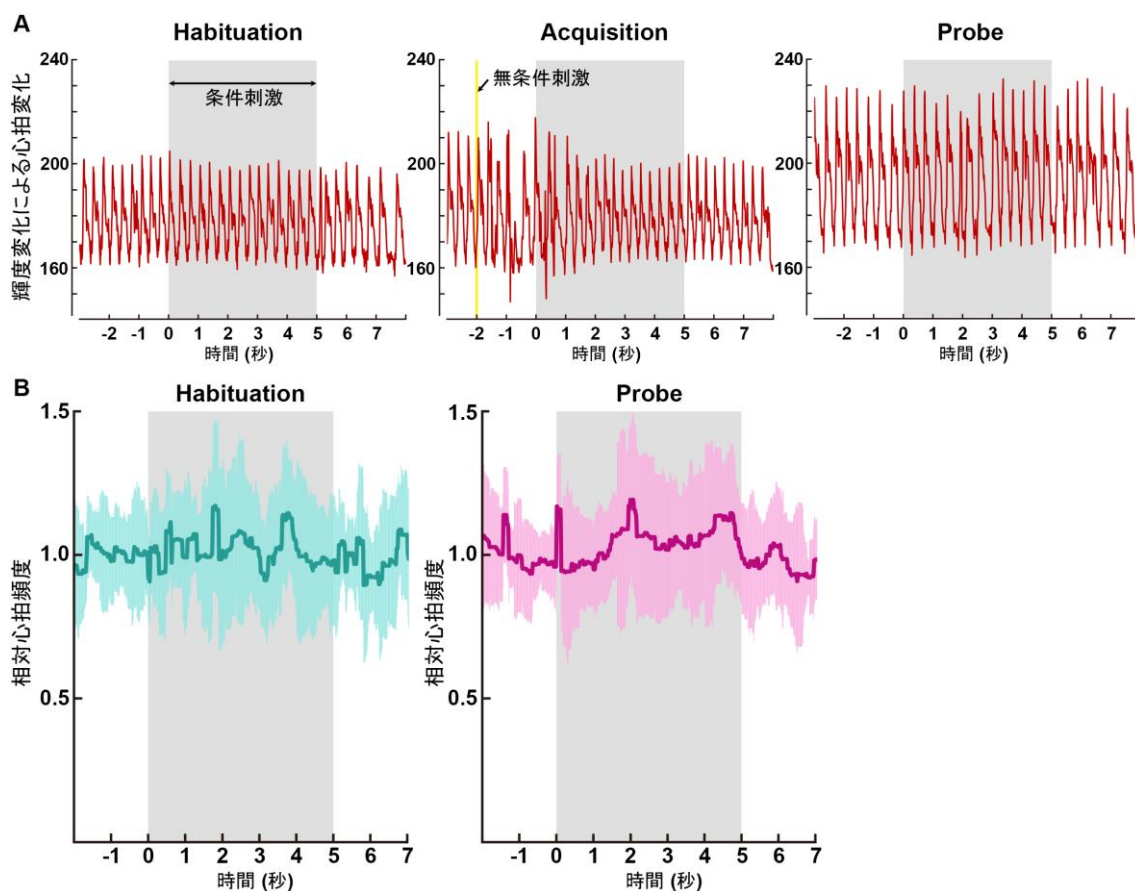


図 14. 逆行条件付けでは条件付け徐脈は獲得しない

(A) 逆行条件付けにおけるゼブラフィッシュ仔魚の心拍変化の典型例。単一の個体から得られた habituation session、acquisition session、probe session の心拍変化を示している。灰色の領域は条件刺激呈示を、黄線は無条件刺激を示している。x 軸は時間(秒)を、y 軸は赤外ビデオ撮影によって得られる心臓近傍の適切な領域内輝度変化で計測される心拍を示している。Probe session において、条件刺激呈示後の徐脈は起こらなかった。(B) Habituation 及び probe session における相対心拍頻度。各々10 試行分 (habituation:後半の 10 試行、probe:10 試行)の心拍頻度を平均し、条件刺激呈示前の 2 秒間の平均心拍頻度で割った値を相対心拍頻度(y 軸)とした。各々薄い色で示される領域は標準偏差(SD)であり、単一の個体から得られた代表的なデータを示している。

考察

本研究により、約 20 dpf の仔魚において約 40%の学習効率が得られた。早期の段階(6~7 dpf)でも、条件刺激(光)と無条件刺激(尾部への侵害刺激)により十分条件付け反応が獲得されるという報告があるが[42]、本研究においては早期の仔魚では学習効率は非常に低かった($n = 0/10$ for 5~9 dpf; $n = 3/12$ for 10~16 dpf)。一方、21 dpf 以降の仔魚であれば、恐怖条件付け学習が可能となるという報告もある[43]。これらは学習条件が異なるため、ゼブラフィッシュにおいて強固な恐怖条件付けがいつ起きるか判断することは難しい。例えば、成魚を用いた自由行動下の恐怖条件付け学習を行うことで、学習効率を上げることが可能になるかもしれない。しかしながら、成魚の場合は遊泳速度や筋肉の発達により、固定したまま学習中の脳内変化を継時的に観察することは非常に難しい。従って、本研究においては十分な学習効率を得られ、かつ実験的制約が最小で済む約 20 dpf の仔魚が最適であると結論した。

第4章. 恐怖条件付け学習における小脳の役割

第2章で、小脳ニューロン特異的に遺伝子操作が可能なトランスジェニックシステムの樹立を行った。第3章では、ゼブラフィッシュ仔魚における恐怖条件付け学習の確立を行った。本章では、樹立した Gal4 系統を用いて恐怖条件付け学習における小脳の役割について調べた。多くの Gal4 系統は、非特異的な遺伝子発現が見られ、個々の小脳ニューロンの機能を阻害する実験には注意が必要であった。その中で gSA2AzGFF152B は小脳弁/小脳体の顆粒細胞にのみ限局して目的遺伝子を誘導できることが分かったため、この系統を用いて機能阻害実験を行った。また、第3章で確立した方法ではゼブラフィッシュ仔魚はアガロース内で拘束しているため、リアルタイムでの脳内イメージングが可能である。そこで、全てのニューロンで発現を誘導できる *HuC(elav13)* プロモーター下で Gal4 を発現する系統と、UAS プロモーター下で Ca^{2+} インドikator-GCaMP7a を発現する系統を交配させて得られる系統を用いて、恐怖条件付け学習における小脳内ニューロンのリアルタイム Ca^{2+} イメージングを行った。

実験材料と方法

実験動物

小脳顆粒細胞の機能阻害には gSA2AzGFF152B; *Tg(UAS:BoTxBLC-GFP)^{icm21}*[114] を使用した。恐怖条件付け学習における脳内リアルタイム Ca^{2+} イメージングには *Tg(elav13:GAL4-VP16)^{nns6}*[75]、*Tg(UAS:GCaMP7a)^{d415}*[119] を使用し、遺伝的背景 *casper (mitfa^{w2}; roy^{a9})* を用いることで無傷でイメージングが可能となった。ゼブラフィッシュは名古屋大学生物機能開発利用研究センター内の小型魚類飼育装置(名東水園)を使用し、28.5°C、14 時間明期/10 時間暗期の条件で飼育した。古典的恐怖条件付け学習は全て明期の間に行った。

心拍記録方法

第3章に明記した方法により心拍解析を行った。野生型、顆粒細胞阻害仔魚、対照群、*Tg(elav13:GAL4-VP16); Tg(UAS:GCaMP7a)* の標準心拍頻度(habituation session における条件刺激呈示 2 秒前の平均心拍頻度)は各々 3.37 ± 0.54 Hz (mean \pm SD, $n = 15$)、 2.89 ± 0.61 Hz ($n = 16$)、 2.92 ± 0.56 Hz ($n = 20$)、 3.23 ± 1.12 Hz ($n = 5$) であり、群間の心拍頻度に有意な差は観察されなかった($P = 0.1194$, one-way ANOVA)。

遊泳行動解析

10 mL の飼育水が満たされた秤量皿(100 mm × 70 mm × 13 mm)に、約 20 dpf の仔魚を移した。光源として、秤量皿の下に白色 LED を配置した。10 分間馴化させた後、ゼブラフィッシュ仔魚の 1 分間の遊泳行動を、ビデオカメラ(15 fps)を用いて記録した。各々の仔魚の頭部の位置は、映像解析ソフトウェア Tracker (<http://physlets.org/tracker/>)を用いて追跡した。連続した 2 フレーム間の頭部の距離と向きは、Excel と R(3.2.3) (<https://www.r-project.org/>)を用いて計算した。連続した 2 つの動きの方向変化が 90 度を超えた場合、旋回として計数した。平均遊泳速度及び、平均旋回数 は Microsoft Excel と R を用いて計算した。

Ca²⁺イメージング

正立顕微鏡(Olympus BX51; Olympus, Japan)に取り付けた水浸対物レンズ(UMPlanFL 20 ×, NA 0.50, Olympus)により、4 %アガロースで拘束した *Tg(elav13:GAL4-VP16); Tg(UAS:GCaMP7a)* 仔魚の小脳の観察を行った。撮影には、冷却 CCD カメラ(ORCA-R2, Hamamatsu Photonics, Japan)を使用した。蛍光観察用照明には、高輝度 130W の光源装置(U-HGLGPS, Olympus, Japan)を使用した。実験装置に拘束した仔魚は、顕微鏡ステージ上で 1 時間以上馴化させ、**habituation session** 前に照射光に馴化させるため、開始 5 分前から青色照射を行った。StreamPix6 を用い、1344 × 1023 px の蛍光画像を単一焦点面で 4 fps (露光時間 250 ミリ秒)で取得した。取得した画像は、LabVIEW を用いて解析を行った。個々の仔魚において、約 5 つのニューロンで目視により判定が可能な蛍光強度変化が観察された。これらのニューロンに対して ROIs を設定し、LabVIEW を用いて ROIs 内の蛍光強度を数値データに変換した。条件付け学習中において、同一のニューロンの蛍光強度変化を継時的に計測するため、ImageJ (<http://imagej.nih.gov/ij/>)の TurboReg Plugin を用いて脳位置の修正を行った。蛍光強度変化 $\Delta F/F$ は、各々の時点での蛍光強度を条件刺激開始 2 秒前の平均蛍光変化で割ることで求めた。典型的な反応ニューロンにおいて、条件刺激誘発による $\Delta F/F$ は 20 %まで増加した。Probe session 前半試行(1st~5th)における条件刺激中の平均 $\Delta F/F$ が 3 %以上であったニューロンを、条件付け関連ニューロンと定義した。

免疫染色

BoTxBLC-GFP に対する 1 次抗体には anti-GFP (1/1000, ラットモノクローナル, Nacalai)、GCaMP7a に対する 1 次抗体には、anti-GFP (1/1000, ラビットポリクローナル, MBL)を用いた。顆粒細胞とプルキンエ細胞に対する抗体として、それぞれ anti-Neurod1 (1/500, マウス, 腹水)[36]、anti-parvalbumin 7 (1/1000, マウスモノクローナル, 腹水)[8]を用いた。仔魚におけるホールマウント及び脳切片免疫染色は、第 2 章で示した方法で行った。2 次抗体には、Alexa Fluor 488 goat anti-rat (H + L, Molecular Probes, Thermo Fisher Scientific, USA)、anti-rabbit (H + L, Biotium Inc., USA)、Alexa Fluor 568 goat anti-mouse IgG (H + L, Molecular Probes, Thermo Fisher Scientific, USA)を使用した。また、幾つかのホールマウント仔魚に対しては透明化試薬 SeeDB [62, 63]を用いて処理した。

統計解析

Fisher's exact test、one-way ANOVA、two-way repeated measures ANOVA with Bonferroni's post-hoc test は、R を用いて行った。

結果

小脳体顆粒細胞を阻害したトランスジェニック系統の作製

恐怖条件付け学習における小脳の役割を解明するため、顆粒細胞の機能阻害実験を行った。この目的のため、2章で樹立した顆粒細胞特異的 Gal4 系統である gSA2AzGFF152B と、蛍光タンパク質 GFP とボツリヌス毒素 type B の軽鎖の融合タンパク質を発現する *Tg(UAS:BoTxBLC-GFP)*[114]を交配させた。ボツリヌス毒素は神経毒素であり、シナプス小胞がシナプス前膜へ結合するために必要な SNARE 蛋白質を切断することで、神経伝達物質の放出を阻害する。本研究においては、Gal4 依存的に顆粒細胞からの神経伝達を阻害した(図 15A)。顆粒細胞で BoTxBLC-GFP を発現している仔魚(顆粒細胞阻害仔魚)を 5 dpf で選り分け、同数の顆粒細胞阻害仔魚と対照群を約 20 dpf まで同じ水槽で飼育した。約 20 dpf の仔魚において、BoTxBLC-GFP は小脳に限局した発現が観察された(図 15B-D, 図 16A-C)。顆粒細胞のマーカーである Neurod1 を用いて免疫染色を行った結果、顆粒細胞阻害仔魚において小脳体の顆粒細胞層で約半分(約 48%)の顆粒細胞が BoTxBLC-GFP を発現していた(図 15E-H, 表 3)。一方で、顆粒隆起/小脳尾葉においてはわずかな顆粒細胞(約 1.5 %)で BoTxBLC-GFP を発現していた(図 16D-K, 表 3)。

次に、顆粒細胞を阻害することで、行動に影響を与える可能性を考慮し、1 分間の遊泳行動解析を行った。その結果、顆粒細胞阻害仔魚と対照群間で遊泳速度と回転数に差は見られなかった (図 17)。

小脳顆粒細胞は条件付け徐脈からの回復に関与している

古典的恐怖条件付け学習後、顆粒細胞阻害仔魚、対照群いずれも probe session において条件刺激誘発徐脈をした(図 15I, J)。野生型、顆粒細胞阻害仔魚、対照群間で学習効率に有意な差は見られなかった($P = 0.8615$, Fisher's exact test, 図 15I)。また、habituation session における条件刺激呈示中の平均相対心拍頻度においても、顆粒細胞阻害仔魚、対照群間で差は見られなかった(図 15J)。しかしながら、probe session における条件刺激誘発徐脈反応において、顆粒細胞阻害仔魚と対照群の 2 つの群間で有意な違いが見られた。対照群においては条件刺激誘発徐脈反応は迅速に回復し、条件刺激の間に正常値に近づく。一方で顆粒細胞阻害仔魚においては、条件刺激誘発徐脈反応はあまり回復せず、条件刺激の間中低い値を維持していた(two-way repeated

measures ANOVA: group effect $P = 0.0463$, group x time interaction $P = 0.00769$; 図 15J)。これらの結果は、小脳体の顆粒細胞の伝達抑制を行うと徐脈反応からの回復が阻害されることを示しており、顆粒細胞は徐脈反応からの回復に関与していることが示唆された。

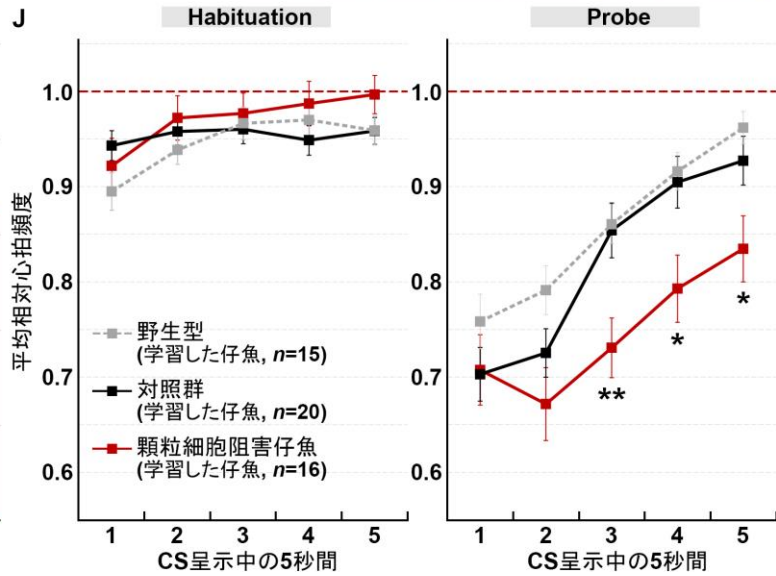
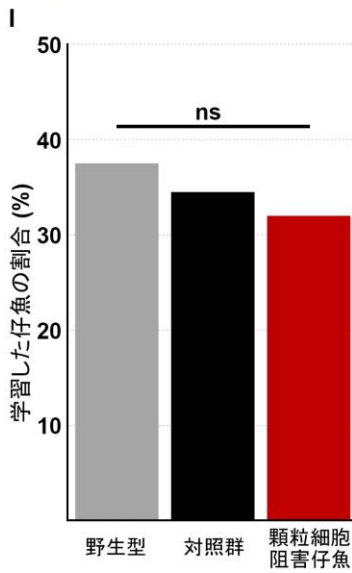
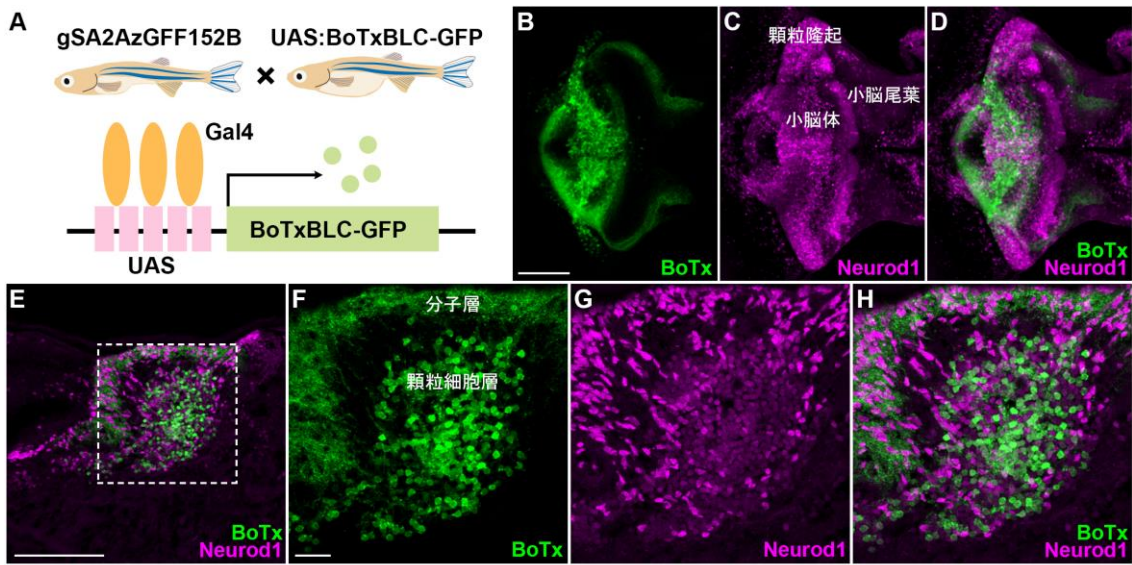


図 15. 顆粒細胞阻害によって起こる恐怖条件付け徐脈の延長

(A) 顆粒細胞阻害の模式図。顆粒細胞特異的 Gal4 系統である gSA2AzGFF152B と、蛍光タンパク質 GFP とボツリヌス毒素 type B の軽鎖の融合タンパク質を発現する *Tg(UAS:BoTxBLC-GFP)* を交配させて得られる仔魚は、Gal4 依存的に顆粒細胞の活動を阻害する(顆粒細胞阻害仔魚)。(B-H) 顆粒細胞阻害仔魚(20 dpf)における BoTxBLC-GFP の発現。全脳(B-D, 背側像(左:前方))及び矢状断切片(E-H)を用いて、抗 GFP 抗体と抗 Neurod1 抗体による二重免疫染色を行った。いずれも小脳領域を示している。(F-H) E の破線枠内拡大図。Neurod1 は顆粒細胞の核に発現する。顆粒細胞阻害仔魚において、小脳体内の約半数の成熟した顆粒細胞で BoTxBLC-GFP が発現していた。詳細な解析は図 16 及び表 4 に示す。(I) 条件付け依存的徐脈を示した仔魚(学習した仔魚)の割合。野生型は 40 匹中 15 匹、顆粒細胞阻害仔魚は 50 匹中 16 匹、対照群は 58 匹中 20 匹が学習した。これらのグループ間で、学習効率に有意な差は見られなかった ($P = 0.8615$, Fisher's exact test, ns: no significance)。(J) 野生型、顆粒細胞阻害仔魚、対照群における条件刺激により誘発される徐脈反応。5 秒間の条件刺激(CS)呈示中における 1 秒間毎の平均相対心拍頻度を示している。図は habituation 及び probe session の 10 試行の平均値±標準誤差(SEM)を示す。それぞれ灰色の点線は野生型($n = 15$)、赤色の実線は顆粒細胞阻害仔魚($n = 16$)、黒色の実線は対照群($n = 20$)を示している。Probe session における条件刺激誘発徐脈に、顆粒細胞阻害仔魚と対照群間で違いが見られた(** represents $P < 0.01$ and * represents $P < 0.05$, two-way repeated measures ANOVA with Bonferroni's post-hoc test)。顆粒細胞阻害仔魚と対照群はいずれも、probe session の間に条件刺激に対して徐脈反応を示したが、顆粒細胞阻害仔魚においては徐脈反応の延長が観察された。Scale bars: (B-D) 100 μm , (E) 100 μm , (F-H) 20 μm

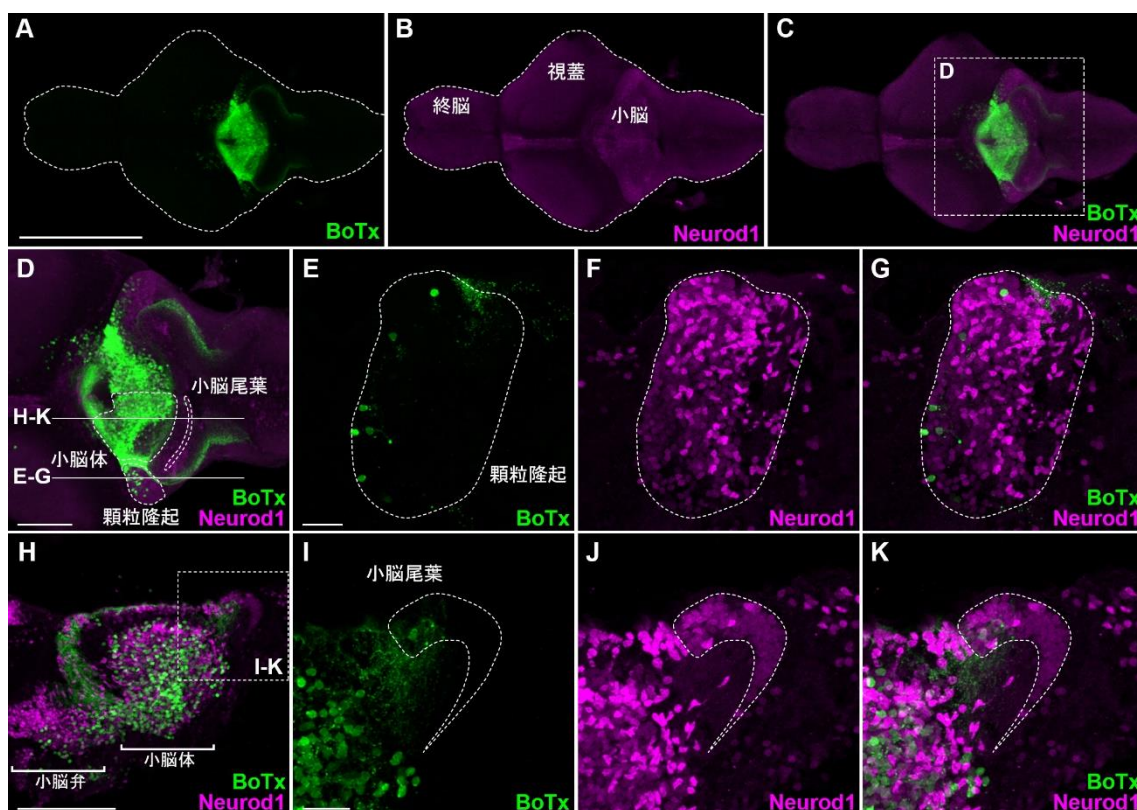


図 16. BoTxBLC-GFP は小脳顆粒細胞に限局して発現する

(A-C) 全脳(20 dpf, 背側像(左:前方))を用いた、抗 GFP 抗体と抗 Neurod1 抗体による二重免疫染色。小脳において、Neurod1 は顆粒細胞の核に発現する。BoTxBLC-GFP は小脳に限局して発現している。(D) C の破線枠内拡大図。(E-G) D の顆粒隆起領域における矢状断切片。顆粒隆起内において、わずかな Neurod1 陽性顆粒細胞でのみ BoTxBLC-GFP が発現している。(H) D の小脳体及び小脳尾葉領域における矢状断切片。(I-K) H の破線枠内拡大図。小脳尾葉において、わずかな Neurod1 陽性顆粒細胞でのみ BoTxBLC-GFP が発現している。Scale bars: (A-C) 400 μ m, (D) 100 μ m, (E-G) 20 μ m, (H) 100 μ m, (I-K) 20 μ m

表 3. BoTx-GFP の発現領域

	領域	BoTxBLC-GFP 陽性細胞	Neurod1 陽性細胞	比率 (%)
標本 1	小脳体	561	1112	50.45
	小脳尾葉	0	184	0
	顆粒隆起	10	446	2.24
標本 2	小脳体	327	768	42.58
	小脳尾葉	0	145	0
	顆粒隆起	4	316	1.27
標本 3	小脳体	671	1289	52.06
	小脳尾葉	3	206	1.46
	顆粒隆起	7	547	1.28

3 個体の *gSA2AzGFF152B; Tg(UAS:BoTxBLC-GFP)* 20 dpf 仔魚の脳矢状断切片(14 μm)を作製し、抗 GFP 抗体と抗 Neurod1 抗体による二重免疫染色を行った。各個体の脳において、顆粒隆起領域に相当する外側 2 切片、小脳体及び小脳尾葉領域に相当する内側 3 切片を解析に用いた(図 16 を参照)。小脳体・小脳尾葉・顆粒隆起における BoTxBLC-GFP 陽性細胞と Neurod1 陽性細胞の数を計測した(小脳体においては顆粒細胞層内の細胞を計測)。Neurod1 陽性細胞に対する、BoTxBLC-GFP 陽性細胞の比率を示している。

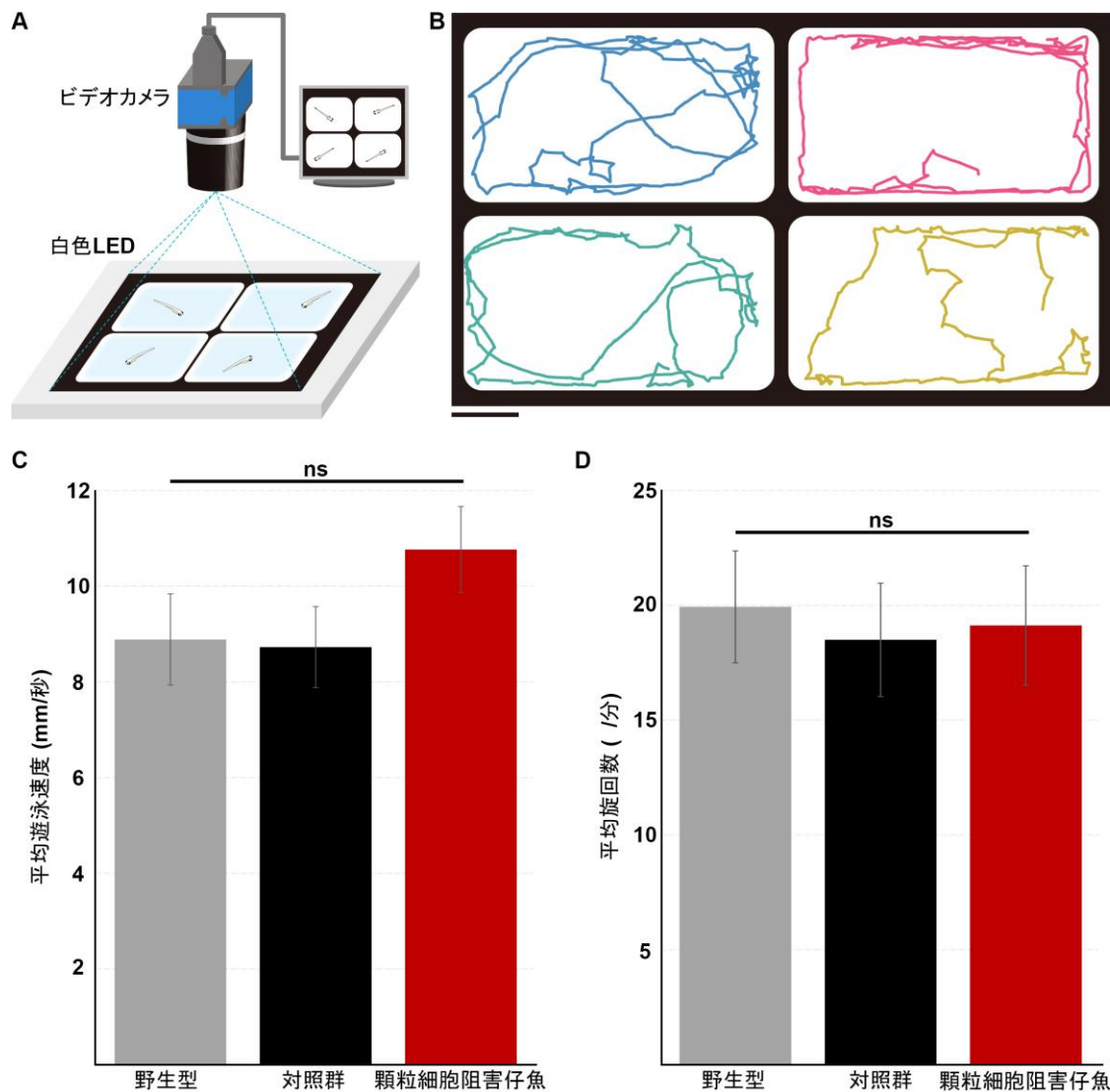


図 17. 顆粒細胞阻害仔魚において遊泳行動に影響はない

(A) 約 20 dpf のゼブラフィッシュ仔魚における遊泳行動解析実験の模式図。各仔魚の頭部位置をビデオカメラ(15 fps)で記録し、その軌道を分析した。(B) 1 分間の自由遊泳中における野生型仔魚 4 匹の軌道。野生型、顆粒細胞阻害仔魚、対照群について各々 16 匹ずつ解析を行った。連続する 2 つのフレーム間の、頭部位置の距離及び方向を計算した。(C) 平均遊泳速度(mm/秒)±SEM。グループ間で有意な差は見られなかった($P = 0.2162$, one-way ANOVA, ns: no significance)。(D) 1 分間の平均旋回数±SEM。90 度以上の方向転換を示した場合、旋回として回数を数えた。グループ間で有意な差は見られなかった($P = 0.9207$, one-way ANOVA, ns: no significance)。Scale bars: (B) 20 mm

古典的恐怖条件付け学習中のゼブラフィッシュ小脳 Ca^{2+} イメージング

ゼブラフィッシュ小脳の神経活動を記録するため、全てのニューロンで Gal4 を発現する *Tg(elavl3:GAL4-VP16)* [75]と *Tg(UAS:GCaMP7a)* [119]を交配した。受精後 5 日目に、脳で蛍光が観察される仔魚を選び分け、約 20 dpf まで飼育した。GCaMP7a の蛍光を観察するには、実験の間仔魚の脳に青色励起光を照射し続ける必要がある。しかし、この方法では、条件刺激として用いていた白色 LED のスペクトルと重なってしまい、学習付けが困難であった。そこで、青色照射光と重ならない赤色 LED の消灯を、恐怖条件付け学習における条件刺激として利用した。赤色 LED の消灯と電気刺激を組み合わせた条件付けでも、条件刺激誘発の徐脈反応が起こる ($n=3/10$) ため、赤色 LED を用いて恐怖条件付け学習における Ca^{2+} イメージングを行った。

神経活動を評価するため、GCaMP7a 蛍光強度変化 ($\Delta F/F$) を計算した (図 18)。Habituation session において自発的な活動は観察されるが、条件刺激に対する蛍光強度の増加はほとんど検出されなかった (図 18E, 左)。一方、probe session において幾つかの小脳ニューロンで条件刺激に誘発された蛍光強度の増加が観察された (図 18E, 右)。Probe session 前半の 5 試行における条件刺激呈示中の平均 $\Delta F/F$ が 3 % 以上であったニューロンを、条件付け関連ニューロンと定義した。小脳内において 4 つ以上の条件付け関連ニューロンが観察されたのは、36 % ($n=9/25$) の仔魚であった。条件付け関連ニューロンの例を図 18D, E (細胞 1-7) に示した。これらのニューロンは小脳体に位置しており、顆粒隆起や小脳尾葉においては条件付け依存的に活動するニューロンは観察されなかった (図 18C-E, 細胞 8, 9)。また、コントロール実験 (逆行条件付け) では条件付け関連ニューロンは観察されなかった。

条件付け関連ニューロンの経時変化

次に、これらの条件付け関連ニューロンが恐怖条件付けの間にどのような蛍光強度変化を示すか、解析を行った (図 19)。 Ca^{2+} イメージング後に、probe session において条件刺激誘発の活動 ($\Delta F/F$) が観察されたものを条件付け関連ニューロンと特定した。これらのニューロンを遡及的に同定し、acquisition session の間の活動を調べた。3 つの条件付け関連ニューロンの $\Delta F/F$ を、図 19A, B に示した。Acquisition session の 2 試行目においては、無条件刺激が蛍光強度の増加を誘発したものの、条件刺激に対してはほとんど増加が見られなかった。8 試行目では、2 つの条件付け関連ニューロンで条件刺激により誘発されたわずかな蛍光強度の増加が観察された。18 試行目には、全

での条件付け関連ニューロンにおいて蛍光強度が顕著に増加した。その他の条件付け関連ニューロンにおいても同様の变化を示すかどうか調べるため、学習後に条件付け関連ニューロンを有した 5 匹の仔魚において各々 5 つの条件付け関連ニューロンから平均 $\Delta F/F$ を算出し、解析を行った。無条件刺激により全ての小脳ニューロンで蛍光強度の増加が検出されるため(図 19A, B)、条件刺激誘発の活動解析には無条件刺激前の条件刺激 4 秒間における $\Delta F/F_{CS0-4}$ の値を用いた。その結果、条件付け関連ニューロンにおける条件刺激誘発蛍光強度の上昇は、5 匹とも acquisition session の間に徐々に増加していくことが分かった(図 19C)。さらに、probe session 10 試行中の $\Delta F/F$ 解析を行ったところ、probe session の間に条件付け関連ニューロンの条件刺激誘発 $\Delta F/F$ は徐々に減少することが分かった(図 19D, E)。これらのデータにより、記憶(条件付け関連活動)は 2 種類の刺激の組み合わせ(連合)の間に漸進的に形成され、条件刺激呈示のみを繰り返すことで徐々に消えていくことが示唆された。

また、 $\Delta F/F$ と心拍数の同時計測により、4 つ以上の条件付け関連ニューロンを有する 9 匹のうち 4 匹の仔魚において、probe session の複数の試行で徐脈反応を示した。これらの仔魚において、acquisition 及び probe session で条件付け関連ニューロンの活動が観察される時期に、徐脈反応が見られるようになった(典型的な例を図 20, 図 21, 図 22 で示した)。条件付け関連ニューロンが観察されなかった仔魚では、条件付け徐脈反応も見られなかった。

2 種類の条件付け関連ニューロン

条件付け関連ニューロンには、活動時期の違いで 2 種類存在することが分かった。Type I ニューロンは条件刺激呈示に伴い即座に活動し、type II ニューロンは遅れて活動した(図 23A)。Type I ニューロンの活動($\Delta F/F$)は条件刺激呈示時に増加し始め、条件刺激後期に至る間に最大となり、条件刺激終了後直ちに減少した。Type II ニューロンの活動は条件刺激呈示に対しわずかに上昇したが、条件刺激終了後に強く活動を起こした。また、type I と type II のニューロンは小脳体内で各々近接して位置していた(図 23B)。

次に、*Tg(elavl3:GAL4-VP16); Tg(UAS:GCaMP7a)*における GCaMP7a の発現と、顆粒細胞あるいはプルキンエ細胞のマーカー(各々 *Neurod1*, *Pvalb7*)を比較することで、これらの条件付け関連ニューロンの種類の特定を試みた(図 23C-J)。ほとんどの GCaMP7a 陽性の細胞体は *Neurod1* を共発現していたが(図 23F)、*Pvalb7* は共発現し

ていなかった(図 23J)。この結果と小脳体内の条件付け関連ニューロンの位置を考慮すると、*Tg(elavl3:GAL4-VP16); Tg(UAS:GCaMP7a)*で観察された条件付け関連ニューロンは顆粒細胞であることが示唆された。これは、真骨魚類において *HuC* としても知られる *elavl3* プロモーターは未成熟あるいは新生ニューロンで活性があり[120]、成熟したプルキンエ細胞では発現していない可能性が高いこと、顆粒細胞は仔魚において連続的に発生するという報告[36, 121]からも考えられる。従って、恐怖条件付け学習には活動時期の異なる 2 種類の条件付け関連顆粒細胞が存在することが示唆された。

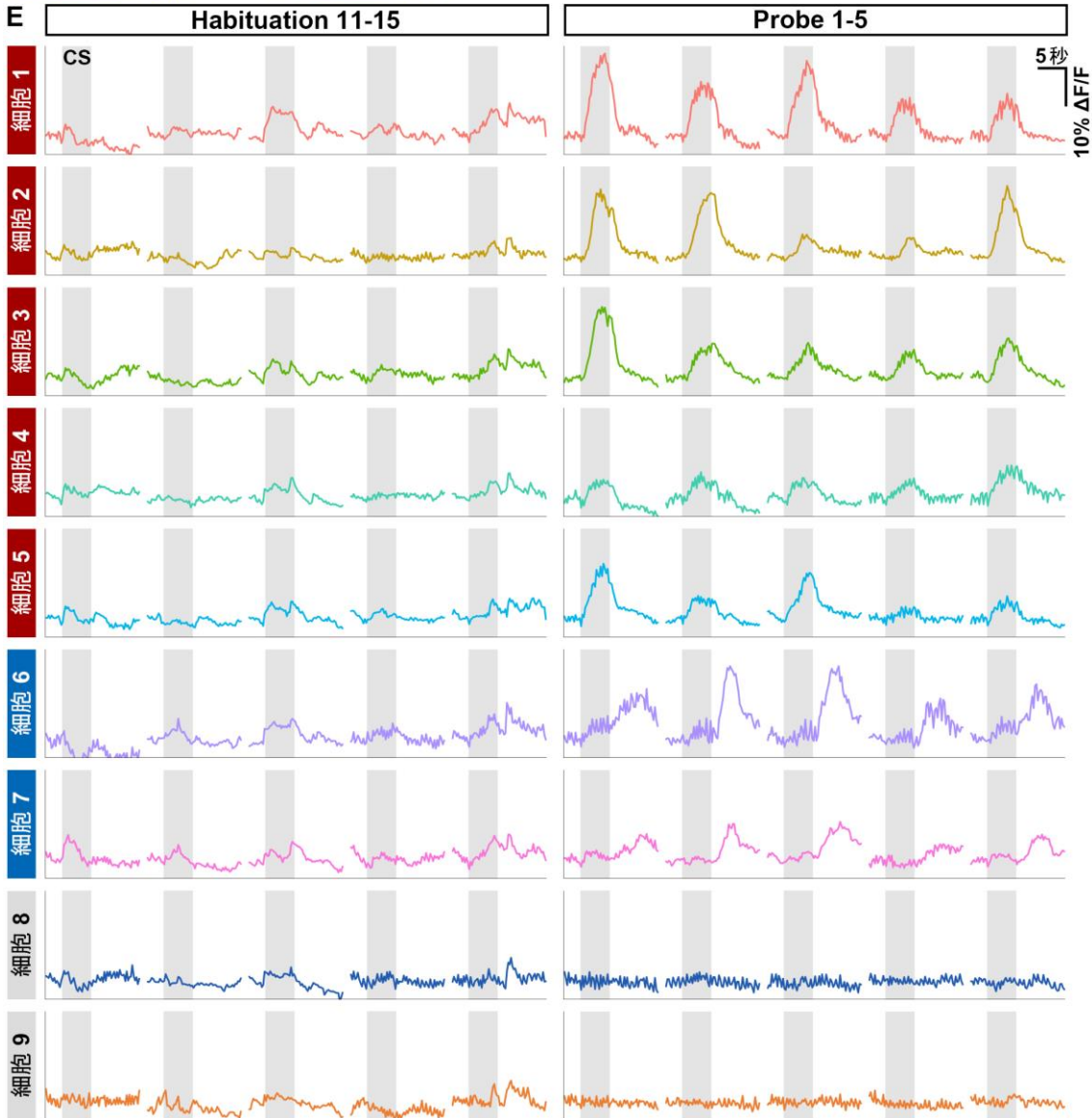
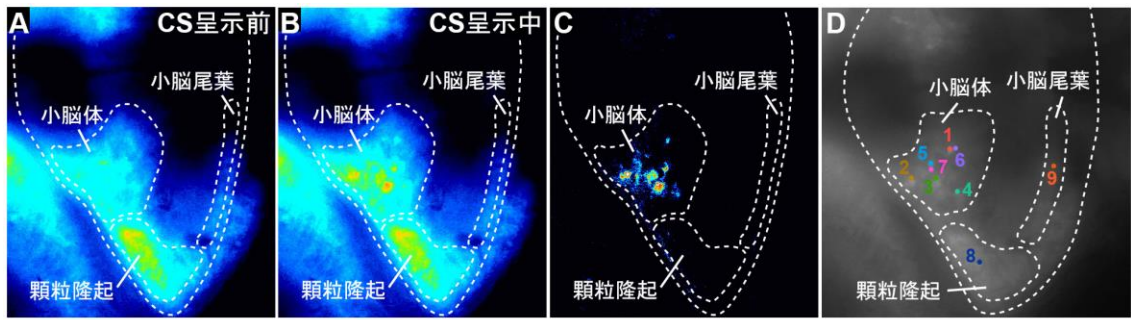


図 18. 古典的恐怖条件付け学習中に小脳ニューロンは活動する

(A,B) Probe session の 9 試行目における Ca^{2+} イメージング。条件刺激(CS)呈示前(A)及び条件刺激呈示中(B)の、*Tg(elavl3:GAL4-VP16); Tg(UAS:GCaMP7a)* 仔魚における GCaMP7a の蛍光強度を示している。画像は条件刺激開始の 2 秒前と、2.5 秒後に撮影されたものを示している。(C) 条件刺激呈中から条件刺激呈示前の画像を減算して得られた図を示している。条件刺激により誘発された蛍光強度の増加は、小脳体に限局して観察された。(D,E) 小脳神経活動の時間経過。単一の仔魚における 9 つの小脳ニューロンについて、habituation(11~15 試行目)及び probe(1~5 試行目)中の蛍光強度変化を示している。E で示される $\Delta F/F$ は、各々の時点での蛍光強度を条件刺激呈示前 2 秒間の平均蛍光強度で除算した。灰色の領域は条件刺激呈示を示している。各々のニューロンの位置は D に示している。Probe session 中、小脳体内の 7 つのニューロン(細胞 1-7)で条件刺激により誘発された蛍光強度の増加が見られた。一方、顆粒隆起(細胞 8)及び小脳尾葉(細胞 9)のニューロンにおいては、habituation と probe session 間で蛍光強度変化は見られなかった。

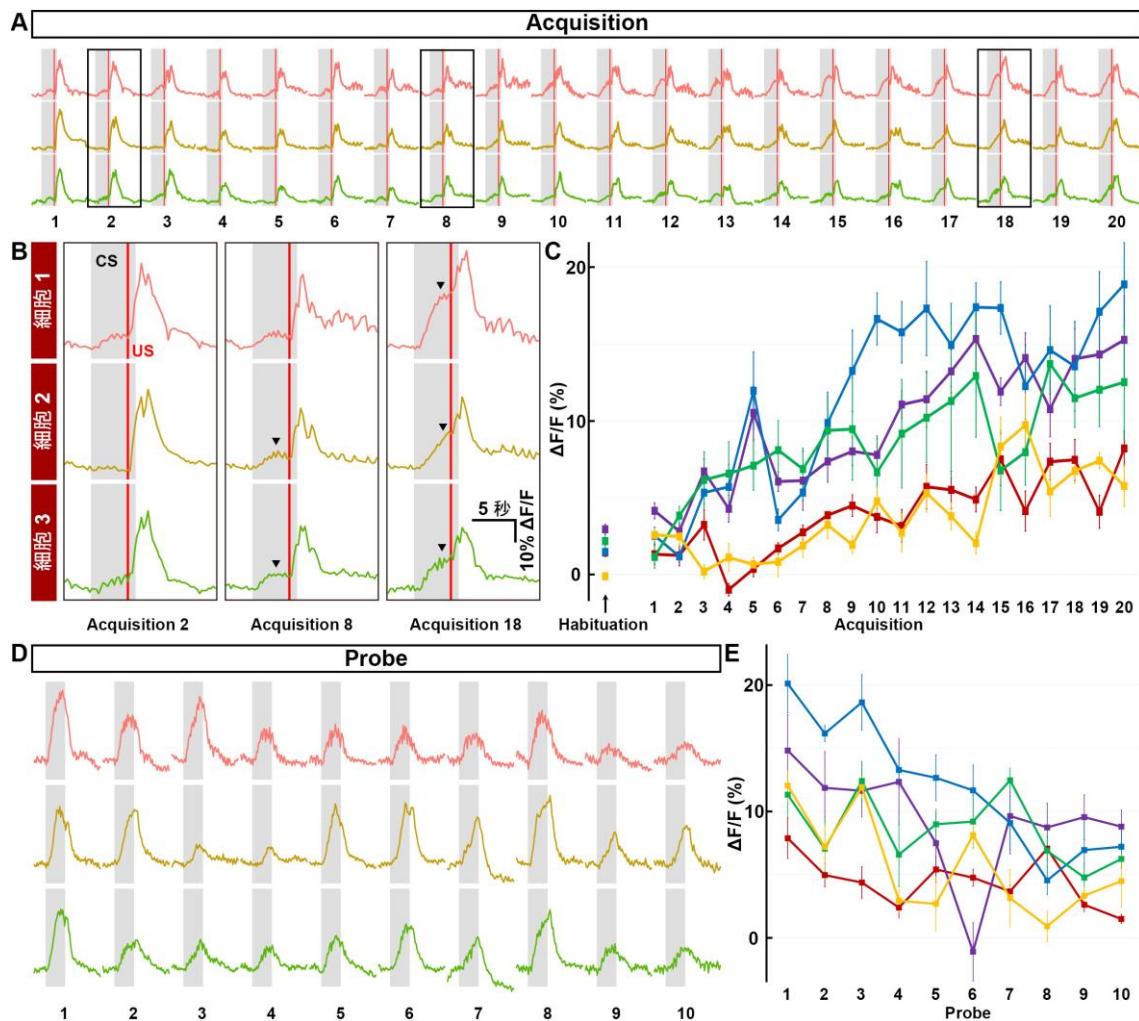


図 19. 学習中における条件付け関連ニューロンの経時変化

(A) 単一の仔魚から得られた 3 つの条件付け関連ニューロンの、acquisition session 中の神経活動($\Delta F/F$)。灰色の領域及び赤色の実線は各々、条件刺激と無条件刺激を示している。(B) A の枠内拡大図。Acquisition session の 2 試行目、8 試行目、18 試行目を示している。条件刺激(CS)により誘発される神経活動(矢印)は、acquisition session の間に徐々に増加していくことが分かった。また、蛍光強度は無条件刺激(US)により強く上昇する。(C) 図は acquisition session における 5 匹の仔魚について、各々 5 つの条件付け関連ニューロンの平均蛍光強度変化 \pm SEM を示している。条件刺激後 4 秒間の $\Delta F/F_{CS0-4}$ の値を用いた。(D) 単一の仔魚から得られた 3 つの条件付け関連ニューロンの、probe session 中の神経活動($\Delta F/F$)。(E) Probe session の間に、条件付け関連ニューロンの活動は減少する。図は probe session における 5 匹の仔魚について、各々 5 つの条件付け関連ニューロンの平均蛍光強度変化 \pm SEM を示している。

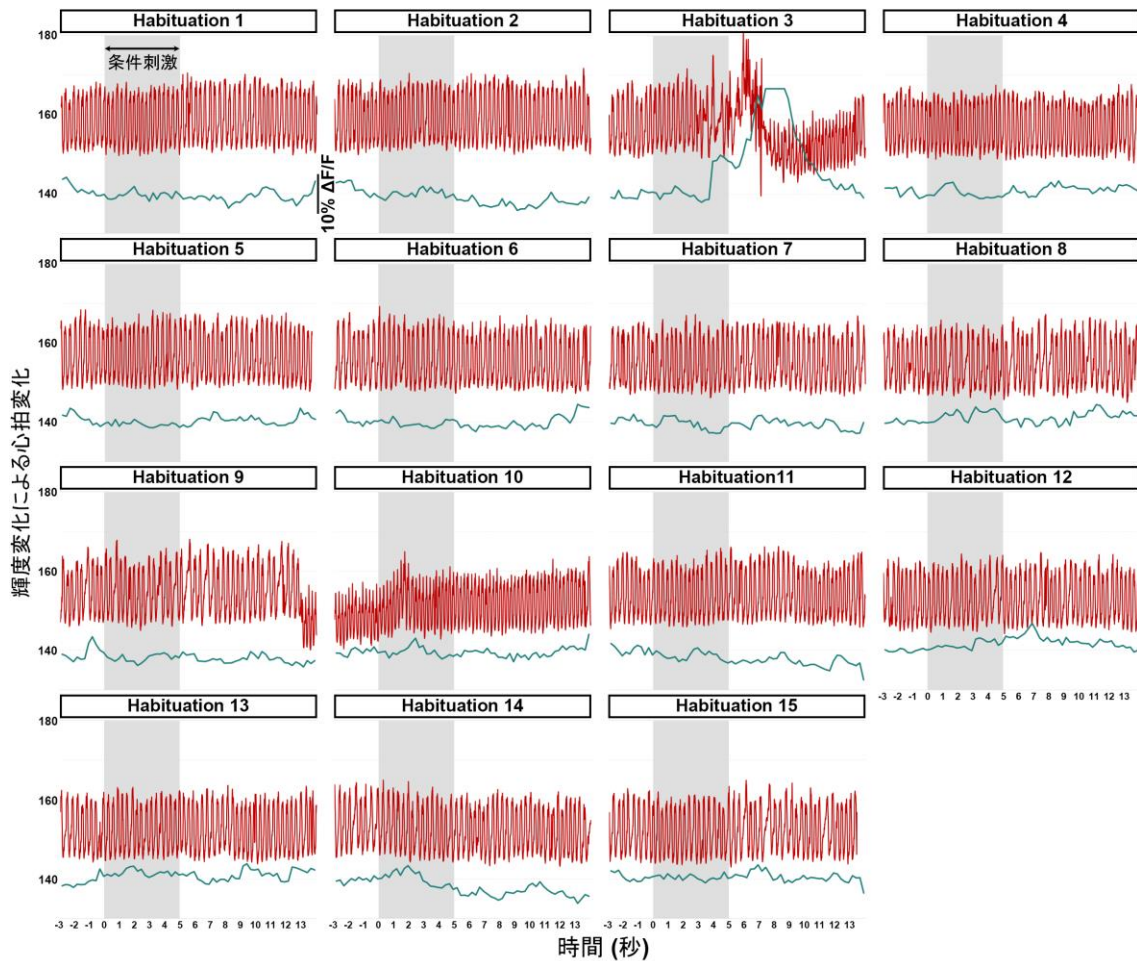


図 20. Habituation session における学習仔魚の心拍と神経活動同時計測

Tg(elavl3:GAL4-VP16); Tg(UAS:GCaMP7a) 仔魚 25 匹について、心拍と GCaMP7a 蛍光強度変化を同時に計測した。そのうち 1 匹が学習個体であると同定された。図は、habituation session における学習仔魚の心拍(赤線)と条件付け関連ニューロンの蛍光強度変化($\Delta F/F$, 緑線)を示している。これらの acquisition 及び probe session については各々図 21、図 22 で示している。x 軸は時間(秒)を、y 軸は輝度変化で計測される心拍と $\Delta F/F$ を示している。灰色の領域は条件刺激を示している。

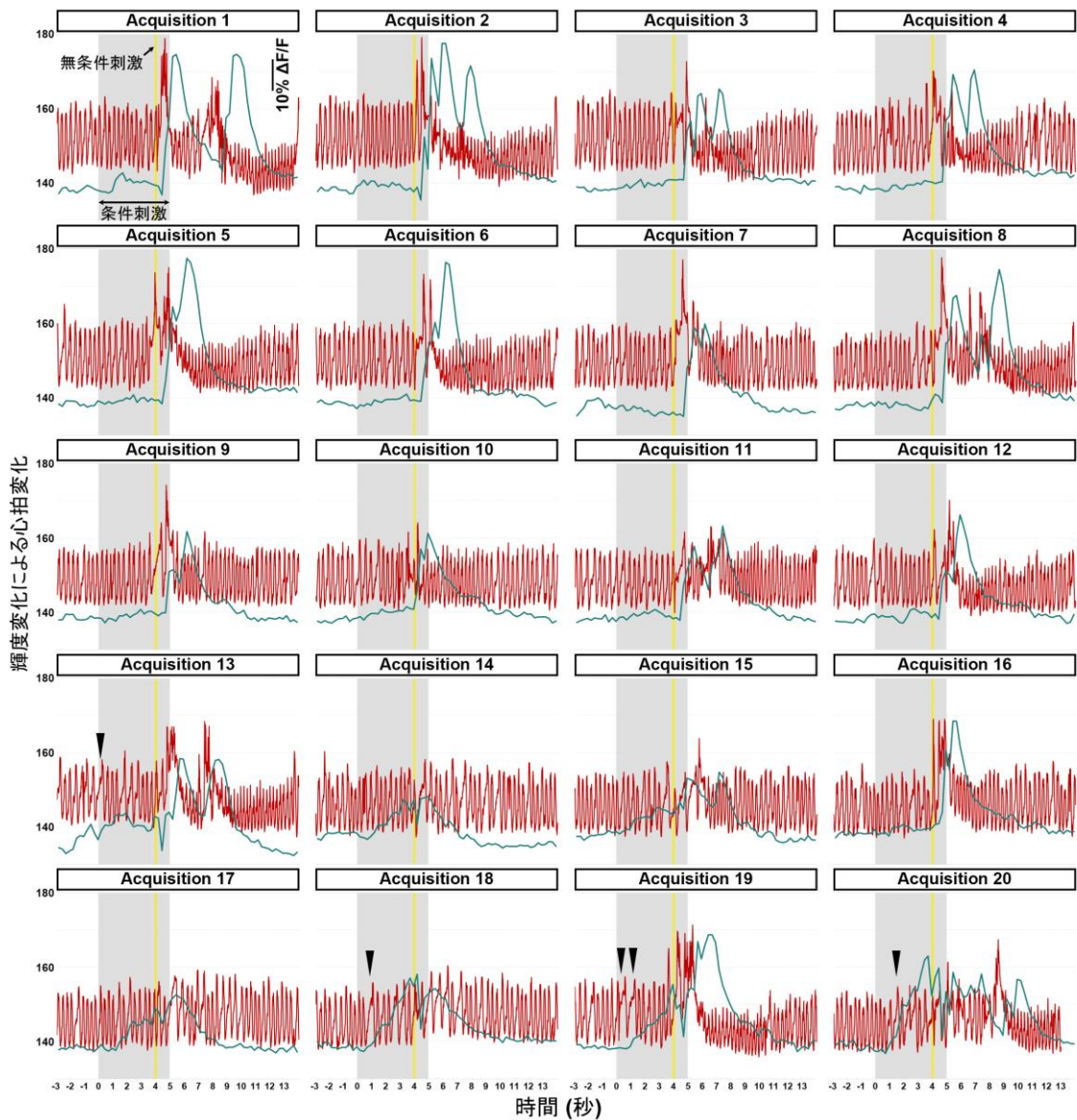


図 21. Acquisition session における学習仔魚の心拍と神経活動同時計測

図は、acquisition session における学習仔魚の心拍(赤線)と条件付け関連ニューロンの蛍光強度変化($\Delta F/F$, 緑線)を示している。x 軸は時間(秒)を、y 軸は輝度変化で計測される心拍と $\Delta F/F$ を示している。灰色の領域は条件刺激を示している。x 軸は時間(秒)を、y 軸は輝度変化で計測される心拍と $\Delta F/F$ を示している。灰色の領域及び黄線は各々、条件刺激と無条件刺激を示している。矢印は条件付け徐脈を示している。条件刺激に対する $\Delta F/F$ の増加が明らかに観察され始める 13 試行目において、条件付け徐脈も観察される。

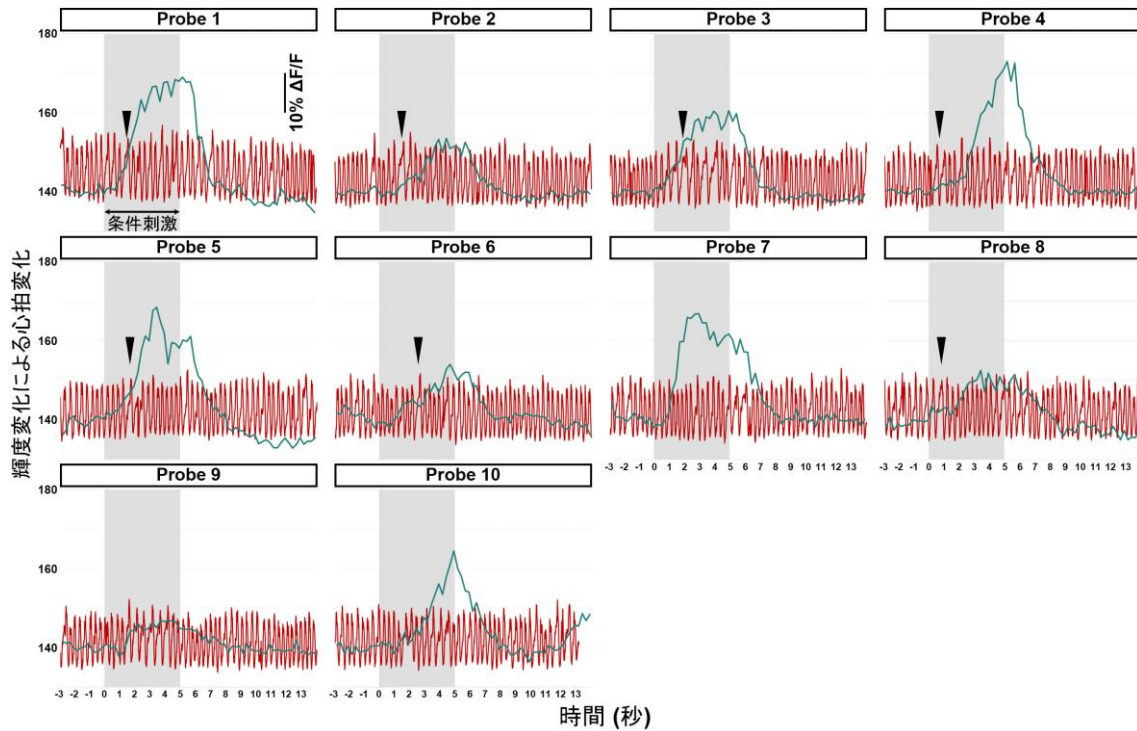


図 22. Probe session における学習仔魚の心拍と神経活動同時計測

図は、probe session における学習仔魚の心拍(赤線)と条件付け関連ニューロンの蛍光強度変化($\Delta F/F$, 緑線)を示している。x 軸は時間(秒)を、y 軸は輝度変化で計測される心拍と $\Delta F/F$ を示している。灰色の領域は条件刺激を示している。x 軸は時間(秒)を、y 軸は輝度変化で計測される心拍と $\Delta F/F$ を示している。灰色の領域は条件刺激を示しており、矢印は条件付け徐脈を示している。

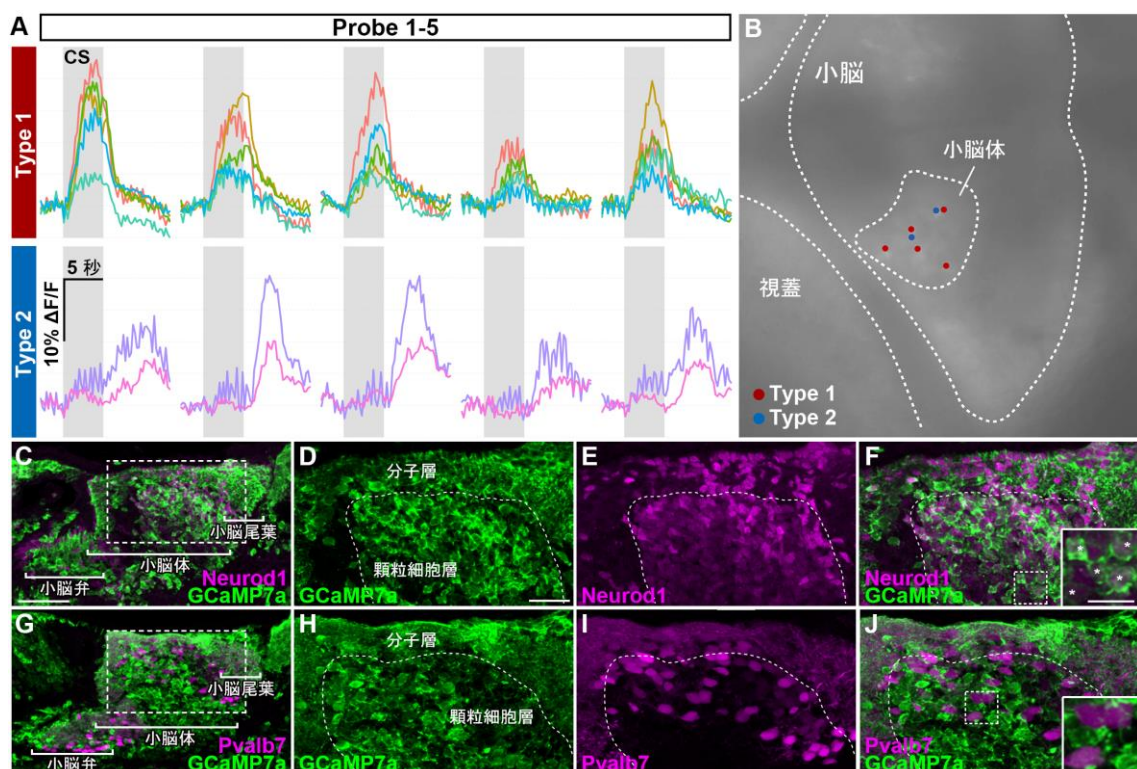


図 23. 2 種類の条件付け関連ニューロン

条件刺激により活動する条件付け関連ニューロンには、2 種類存在することが分かった。Type 1 ニューロンは条件刺激に対して迅速に活動し、type 2 ニューロンは遅れて活動する。(A) Probe session(1~5 試行目)中の、*Tg(elavl3:GAL4-VP16); Tg(UAS:GCaMP7a)*仔魚における type 1 及び type 2 ニューロンの神経活動($\Delta F/F$)。5 つの type 1 ニューロンと、2 つの type 2 ニューロンを示している。灰色の領域は条件刺激を示している。(B) Type 1 ニューロン(赤点)と type 2 ニューロン(青点)の小脳内の位置。これらのニューロンは小脳体内で互いに近接して存在している。(C) *Tg(elavl3:GAL4-VP16); Tg(UAS:GCaMP7a)*の約 20 dpf における脳切片を用いて、抗 GFP 抗体と抗 Neurod1 抗体による二重免疫染色を行った。(D-F) C の破線枠内拡大図。F 内の挿入図は、F の破線枠内拡大図。Neurod1 は顆粒細胞の核に発現する。GCaMP7a は、小脳弁・小脳体・小脳尾葉の大部分の顆粒細胞で発現している(F 内挿入図の星印)。(G) *Tg(elavl3:GAL4-VP16); Tg(UAS:GCaMP7a)*の約 20 dpf における脳切片を用いて、抗 GFP 抗体と抗 Pvalb7 抗体による二重免疫染色を行った。(H-J) G の破線枠内拡大図。J 内の挿入図は、J の破線枠内拡大図。Pvalb7 はプルキンエ細胞の神経突起(軸索と樹状突起)、細胞体のいずれも標識する。GCaMP7a はプルキンエ細胞では発現していない(F 内挿入図)。Scale bars: (C, G) 50 μm , (D-F, H-J) 20 μm , (F, J の挿入図) 10 μm

表 4. 小脳内ニューロンにおける GCaMP7a の発現

	GCaMP7a 陽性細胞	GCaMP7a・Neurod1 陽性細胞	比率 (%)
標本 1	305	281	92.13
標本 2	311	276	88.75
標本 3	293	269	91.81

	GCaMP7a 陽性細胞	GCaMP7a・Pvalb7 陽性細胞	比率 (%)
標本 1	295	0	0
標本 2	288	0	0
標本 3	306	0	0

3 個体の *Tg(elavl3:GAL4-VP16); Tg(UAS:GCaMP7a)* 20 dpf 仔魚の脳矢状断切片(14 μ m)を作製し、抗 GFP 抗体(GCaMP7a 用)と抗 Neurod1 抗体(上の表、図 23C-F)あるいは抗 Pvalb7 抗体(下の表、図 23G-J)による二重免疫染色を行った。各個体の脳において、5 切片を解析に用いた。GCaMP7a 陽性細胞、GCaMP7a・Neurod1 陽性細胞、GCaMP7a・Pvalb7 陽性細胞の数を計測した。GCaMP7a 陽性細胞に対する GCaMP7a・Neurod1 陽性細胞の比率及び、GCaMP7a 陽性細胞に対する GCaMP7a・Pvalb7 陽性細胞の比率を示している。約 90%の GCaMP7a 陽性細胞において顆粒細胞のマーカーである Neurod1 が共発現しており、一方でプルキンエ細胞のマーカーである Pvalb7 とは共発現していなかった。

考察

ゼブラフィッシュにおける古典的恐怖条件付け学習

哺乳類や金魚において小脳神経回路に依存する条件付け徐脈が観察されることから、条件付け徐脈は脊椎動物間で保存された小脳を介した恐怖反応であることが示唆される。ゼブラフィッシュにおいては 5 dpf までに単純な小脳神経回路は形成され [8]、プルキンエ細胞は顆粒細胞からの単純スパイク及び登上線維からの複雑スパイクを示すことが報告されている [37-39]。これらの知見は、小脳神経回路が初期の段階で機能的であることを示しているが、早期の仔魚がなぜ効率的に学習しないのかという疑問が生じる(第 3 章)。これに関して、早期の仔魚における登上線維は視覚や運動といった単純な情報は符号化するが、網膜像の動き調節のような運動適応は符号化していないことが分かっている [38]。従って、小脳神経回路が恐怖条件付けのような複雑な行動を制御するためには、十分な成熟時間が必要であると考えられる。

小脳は恐怖条件付け学習に関与している

小脳体における顆粒細胞の機能阻害を行った結果、恐怖条件付けは抑制されなかったが、条件刺激誘発の徐脈反応を延長させた(図 15)。また、probe session の間条件刺激によって活性化される条件付け関連ニューロンを小脳体内に特定し、これらのニューロンが顆粒細胞である可能性が高いことを示した(図 18, 23, 表 4)。顆粒細胞阻害仔魚では、小脳体内の約半数の成熟した顆粒細胞でボツリヌス毒素が発現していた(図 15F-H, 図 16, 表 3)。本研究の結果から、小脳体内の少なくとも一部の顆粒細胞は条件付け反応からの回復を制御していることを示している。顆粒細胞阻害仔魚において条件刺激誘発徐脈の初期は比較的正常であるが、徐脈からの回復が遅れており(図 15J)、顆粒細胞が回復の段階で関与していることを示唆している。

これまでの研究により、金魚 [34, 35] や哺乳類 [30-32] において小脳活動を阻害すると条件付け徐脈反応が消失することが知られている。また、哺乳類において下オリーブ核 [29] や中位核(深部小脳核) [32] を阻害すると恐怖条件付けが消失することも報告されている。本研究による発見は、恐怖条件付け反応に小脳神経回路が積極的な役割を果たしているというこれらの報告とは対照的である。これは、阻害した細胞集団の違いから起こったと考えられる。これまでの阻害実験においては小脳機能を非特異的に破壊しているが、小脳神経回路は抑制性プルキンエ細胞、興奮性顆粒細胞、それに伴う

様々なシナプス可塑性で複雑に構成されており、恐怖条件付け学習における小脳の役割について詳細な解析は困難であった。本研究では、顆粒細胞を介したシナプス伝達を選択的に阻害することで(図 15)、以前までの報告では観察できなかった条件付け徐脈反応からの回復を制御しているという顆粒細胞の役割を明らかにした。発生初期段階から長期にわたり顆粒細胞の神経伝達阻害を行うと、小脳神経回路の再配線により表現型が軽減する可能性があった。それにもかかわらず、本研究の成果から、たとえ小脳神経回路の再配線が起きても、顆粒細胞は条件付け反応の回復に関与していることが示唆された。

ゼブラフィッシュ小脳における機能領域

哺乳類の小脳虫部を阻害したこれまでの報告[30-32]により、小脳虫部は古典的恐怖条件付けにおける自律神経系の反応に関与していることが示唆されている。本研究により、ゼブラフィッシュにおいては小脳体の顆粒細胞が条件付け徐脈反応に関与していることを発見した(図 15)。小脳体に位置する顆粒細胞は吻側内側(小脳弁/小脳体)のプルキンエ細胞樹状突起へと軸索を伸ばしており、尾部側方(小脳尾葉/顆粒隆起)の顆粒細胞は小脳体内の尾部側のプルキンエ細胞樹状突起と後脳背側のクレスト細胞樹状突起に投射[14, 15]、尾部側のプルキンエ細胞は前庭系へと軸索を伸ばしている[8, 41, 122]。これらのことから、小脳神経回路は吻側内側と尾部側方で異なることが考えられる。また、尾部側のプルキンエ細胞は視運動性反応を制御し、吻側内側のプルキンエ細胞は遊泳行動を制御していると報告されており[41]、ゼブラフィッシュ小脳内にも機能領域が存在することが考えられる。本研究の結果、真骨魚類小脳における吻側内側小脳神経回路が、機能的に哺乳類の小脳虫部に相当しており、条件付け自律神経系の反応を制御していることが示唆された。

小脳ニューロンの学習機構

Acquisition session の開始時において、無条件刺激によって小脳体・顆粒隆起・小脳尾葉の小脳ニューロンを活性化する一方、条件刺激では活性化しなかった(図 18, 19)。この結果は、条件刺激のみに対して反応する小脳ニューロンはほとんどないことを意味しているが、条件刺激に誘発された低活動を見落としている可能性も考えられる。小脳神経回路における学習過程は、様々なシナプスの可塑的変化で起こる。平行線維-プルキンエ細胞間のシナプスにおける長期抑圧(long-term depression: LTD)及び

長期増強(long-term potentiation: LTP)、苔状線維-中位核(深部小脳核)間のシナプスで起こる LTP、苔状線維-顆粒細胞間のシナプスにおける LTP が小脳学習に重要な役割を果たしていると考えられている[18, 24, 123-126]。本研究により、顆粒細胞あるいは顆粒細胞への入力で、条件刺激と無条件刺激からの情報を統合する学習過程が起こることを示唆している。このメカニズムと他のシナプスにおける LTD/LTP が協調して起こることで、恐怖条件付け反応を制御している可能性がある。Probe session において条件刺激のみ繰り返し呈示すると、条件付け関連ニューロンの活動は減少した(図 19E)。顆粒細胞の活性もまた、学習中に生じる条件刺激-無条件刺激間の統合と同じシナプスレベルで減少していると考えられる。

条件付け関連ニューロンは acquisition session の間に徐々に条件刺激誘発の活動を獲得していったが(図 19)、仔魚は acquisition session の途中で徐脈反応を示した(図 12)。神経活動と心拍数の同時計測により、条件付け関連ニューロンが活動する際に徐脈反応が観察された(図 21, 22)。これは、小脳顆粒細胞(条件付け関連ニューロン)を活性化するための閾値が存在していることを意味している。学習顆粒細胞の活動がこの閾値を超えたとき、ゼブラフィッシュ仔魚は条件付け徐脈反応を示し始める。そして、学習顆粒細胞の活性が閾値以下に達するまで条件付け反応を継続すると考えられる(図 13, 少なくとも probe session の 10 試行では起こらなかった)。

顆粒細胞による条件付け徐脈反応の制御

哺乳類において、恐怖条件付け反応獲得後に平行線維-プルキンエ細胞間に LTP が生じることが報告されている[125, 127]。一方、瞬目反射条件づけの間にプルキンエ細胞の単純スパイクが抑制されることも報告されている[128, 129]。また、金魚における恐怖条件付けにおいて、いくつかのプルキンエ細胞で単純スパイクの増加が観察されるが、多くのプルキンエ細胞では単純スパイクの減少を示す[130]ことから、真骨魚類では恐怖条件付けの間にプルキンエ細胞の活動はほとんど抑制されていると考えられる。プルキンエ細胞の活動が抑制されることで、投射ニューロンの活動が上昇し、これが恐怖条件付け反応の発現の要因を担っている可能性がある。本研究の結果、顆粒細胞は条件付け徐脈反応からの回復に関与していることが示唆された。この結果は、条件付け関連ニューロン(顆粒細胞)の活動が増加することでプルキンエ細胞を活性化し、それに伴い eurydendroid 細胞と条件付け反応を抑制するという興味深い可能性を

示した。これについては、恐怖条件付けの間にプルキンエ細胞及び **eurydendroid** 細胞のイメージングや活性操作実験により、明らかにすることができると考えられる。

本研究ではさらに、恐怖条件付けに関与している 2 種類の条件付け関連ニューロンを発見した(図 23)。これらのニューロンが条件付け徐脈からの回復に関与していることを考えると、**type I** と **type II** ニューロンはそれぞれ回復の初期段階及び後期段階で役割を果たしていると考えられる。**Type I** ニューロンは徐脈を誘発するプログラムと協調的に開始される回復プログラムに関与しており、**type II** ニューロンは感覚情報あるいは徐脈の命令が、2 次的に回復プログラムを活性化するフィードバック機構において役割を果たしている可能性がある。他の可能性としては、これらのニューロンは互いに近接して存在しているため(図 23)、同じ苔状線維の入力を共有していることが考えられる。苔状線維入力に対する **type I** と **type II** ニューロンの感受性の違いが、活動時期の違いの要因担っている可能性がある。**Type I** と **type II** ニューロンを選択的に刺激あるいは抑制可能になれば、恐怖条件付けにおけるこれらのニューロンの詳細な役割が明らかになるであろう。

本研究の結果、ゼブラフィッシュは古典的恐怖条件付け学習における小脳神経回路の役割を研究するための良いモデルであることが示された。今後、小脳神経回路の各構成要素の機能を解明するために、光遺伝学やゲノム編集技術、変異体を用いることで、小脳の情動における役割の詳細な理解に繋がると考えられる。

第5章. 総括

本研究では、これまで明らかにされていなかった古典的恐怖条件付け学習における小脳神経回路の役割について、ゼブラフィッシュを用いて解析を行った。

第2章では、ゼブラフィッシュ小脳神経回路を自由に操作可能な **Gal4** トランスジェニックゼブラフィッシュ系統の樹立を行った。これにより、小脳神経回路素子の各々の可視化や活動操作、**Ca²⁺**イメージングが可能となった。

第3章では、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方法の確立を行った。**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。

第4章では、小脳神経回路の入力に関わる顆粒細胞特異的にボツリヌス毒素を発現させ機能阻害した上で、恐怖条件付け学習を行った。その結果、学習後の徐脈反応は起きるが、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 **Ca²⁺**インジケーター**GCaMP7a** を発現させ、恐怖条件付け学習中の小脳ニューロンの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。さらに、これらの活動のタイミングには **2**種類のパターンが存在し、これらのニューロンは顆粒細胞であることが免疫染色により考察された。

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。今後は、ゲノム編集により得られる変異体、個々の小脳ニューロンにおける **Ca²⁺**イメージングや光遺伝学的操作を用いることで、恐怖条件付けにおける小脳の役割のさらなる解明が可能であると考えられる。

参考文献

1. Ito, M., *Cerebellar long-term depression: characterization, signal transduction, and functional roles*. *Physiol Rev*, 2001. **81**(3): p. 1143-95.
2. Ito, M., *Bases and implications of learning in the cerebellum--adaptive control and internal model mechanism*. *Prog Brain Res*, 2005. **148**: p. 95-109.
3. Ito, M., *Cerebellar circuitry as a neuronal machine*. *Prog Neurobiol*, 2006. **78**(3-5): p. 272-303.
4. Ito, M., *Control of mental activities by internal models in the cerebellum*. *Nat Rev Neurosci*, 2008. **9**(4): p. 304-13.
5. Tsai, P.T., et al., *Autistic-like behaviour and cerebellar dysfunction in Purkinje cell Tsc1 mutant mice*. *Nature*, 2012. **488**(7413): p. 647-51.
6. Wang, S.S., A.D. Kloth, and A. Badura, *The cerebellum, sensitive periods, and autism*. *Neuron*, 2014. **83**(3): p. 518-32.
7. Hibi, M., et al., *Evolutionary mechanisms that generate morphology and neural-circuit diversity of the cerebellum*. *Dev Growth Differ*, 2017. **59**(4): p. 228-243.
8. Bae, Y.K., et al., *Anatomy of zebrafish cerebellum and screen for mutations affecting its development*. *Dev Biol*, 2009. **330**(2): p. 406-26.
9. Hashimoto, M. and M. Hibi, *Development and evolution of cerebellar neural circuits*. *Dev Growth Differ*, 2012. **54**(3): p. 373-89.
10. Hibi, M. and T. Shimizu, *Development of the cerebellum and cerebellar neural circuits*. *Dev Neurobiol*, 2012. **72**(3): p. 282-301.
11. Ikenaga, T., M. Yoshida, and K. Uematsu, *Morphology and immunohistochemistry of efferent neurons of the goldfish corpus cerebelli*. *J Comp Neurol*, 2005. **487**(3): p. 300-11.
12. Ikenaga, T., M. Yoshida, and K. Uematsu, *Cerebellar efferent neurons in teleost fish*. *Cerebellum*, 2006. **5**(4): p. 268-74.
13. Buffo, A. and F. Rossi, *Origin, lineage and function of cerebellar glia*. *Prog Neurobiol*, 2013. **109**: p. 42-63.
14. Takeuchi, M., et al., *Type IV Collagen Controls the Axogenesis of Cerebellar Granule Cells by Regulating Basement Membrane Integrity in Zebrafish*. *PLoS Genet*, 2015. **11**(10): p. e1005587.
15. Volkman, K., et al., *The zebrafish cerebellar rhombic lip is spatially patterned in producing granule cell populations of different functional compartments*. *Dev Biol*, 2008. **313**(1): p. 167-80.
16. Mikami, Y., et al., *Expression of zebrafish glutamate receptor delta2 in neurons*

- with cerebellum-like wiring*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004. **322**(1): p. 168-76.
17. Ekerot, C.F. and M. Kano, *Long-term depression of parallel fibre synapses following stimulation of climbing fibres*. *Brain Res*, 1985. **342**(2): p. 357-60.
 18. Ito, M. and M. Kano, *Long-lasting depression of parallel fiber-Purkinje cell transmission induced by conjunctive stimulation of parallel fibers and climbing fibers in the cerebellar cortex*. *Neurosci Lett*, 1982. **33**(3): p. 253-8.
 19. Thompson, R.F. and J.E. Steinmetz, *The role of the cerebellum in classical conditioning of discrete behavioral responses*. *Neuroscience*, 2009. **162**(3): p. 732-55.
 20. Krupa, D.J. and R.F. Thompson, *Reversible inactivation of the cerebellar interpositus nucleus completely prevents acquisition of the classically conditioned eye-blink response*. *Learn Mem*, 1997. **3**(6): p. 545-56.
 21. Yeo, C.H. and G. Hesslow, *Cerebellum and conditioned reflexes*. *Trends Cogn Sci*, 1998. **2**(9): p. 322-30.
 22. Aiba, A., et al., *Deficient cerebellar long-term depression and impaired motor learning in mGluR1 mutant mice*. *Cell*, 1994. **79**(2): p. 377-88.
 23. Kishimoto, Y., et al., *Classical eyeblink conditioning in glutamate receptor subunit delta 2 mutant mice is impaired in the delay paradigm but not in the trace paradigm*. *Eur J Neurosci*, 2001. **13**(6): p. 1249-53.
 24. Wada, N., et al., *Conditioned eyeblink learning is formed and stored without cerebellar granule cell transmission*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007. **104**(42): p. 16690-5.
 25. Duvarci, S. and D. Pare, *Amygdala microcircuits controlling learned fear*. *Neuron*, 2014. **82**(5): p. 966-80.
 26. Herry, C. and J.P. Johansen, *Encoding of fear learning and memory in distributed neuronal circuits*. *Nat Neurosci*, 2014. **17**(12): p. 1644-54.
 27. Agetsuma, M., et al., *The habenula is crucial for experience-dependent modification of fear responses in zebrafish*. *Nat Neurosci*, 2010. **13**(11): p. 1354-6.
 28. Amo, R., et al., *The habenulo-raphé serotonergic circuit encodes an aversive expectation value essential for adaptive active avoidance of danger*. *Neuron*, 2014. **84**(5): p. 1034-48.
 29. Kotajima, H., et al., *Effects of inferior olive lesion on fear-conditioned bradycardia*. *Neuroreport*, 2014. **25**(8): p. 556-61.
 30. Supple, W.F., Jr. and B.S. Kapp, *The anterior cerebellar vermis: essential*

- involvement in classically conditioned bradycardia in the rabbit.* J Neurosci, 1993. **13**(9): p. 3705-11.
31. Supple, W.F., Jr. and R.N. Leaton, *Cerebellar vermis: essential for classically conditioned bradycardia in the rat.* Brain Res, 1990. **509**(1): p. 17-23.
 32. Sacchetti, B., et al., *Cerebellar role in fear-conditioning consolidation.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(12): p. 8406-11.
 33. Damasio, A.R., et al., *Subcortical and cortical brain activity during the feeling of self-generated emotions.* Nat Neurosci, 2000. **3**(10): p. 1049-56.
 34. Yoshida, M. and R. Hirano, *Effects of local anesthesia of the cerebellum on classical fear conditioning in goldfish.* Behav Brain Funct, 2010. **6**: p. 20.
 35. Yoshida, M., I. Okamura, and K. Uematsu, *Involvement of the cerebellum in classical fear conditioning in goldfish.* Behav Brain Res, 2004. **153**(1): p. 143-8.
 36. Kani, S., et al., *Proneural gene-linked neurogenesis in zebrafish cerebellum.* Dev Biol, 2010. **343**(1-2): p. 1-17.
 37. Hsieh, J.Y., et al., *Rapid development of Purkinje cell excitability, functional cerebellar circuit, and afferent sensory input to cerebellum in zebrafish.* Front Neural Circuits, 2014. **8**: p. 147.
 38. Scalise, K., et al., *Responses of cerebellar Purkinje cells during fictive optomotor behavior in larval zebrafish.* J Neurophysiol, 2016. **116**(5): p. 2067-2080.
 39. Sengupta, M. and V. Thirumalai, *AMPA receptor mediated synaptic excitation drives state-dependent bursting in Purkinje neurons of zebrafish larvae.* Elife, 2015. **4**.
 40. Ahrens, M.B., et al., *Brain-wide neuronal dynamics during motor adaptation in zebrafish.* Nature, 2012. **485**(7399): p. 471-7.
 41. Matsui, H., et al., *Functional regionalization of the teleost cerebellum analyzed in vivo.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2014. **111**(32): p. 11846-51.
 42. Aizenberg, M. and E.M. Schuman, *Cerebellar-dependent learning in larval zebrafish.* J Neurosci, 2011. **31**(24): p. 8708-12.
 43. Valente, A., et al., *Ontogeny of classical and operant learning behaviors in zebrafish.* Learn Mem, 2012. **19**(4): p. 170-7.
 44. Aigaki, T., et al., *The gene search system: its application to functional genomics in Drosophila melanogaster.* J Neurogenet, 2001. **15**(3-4): p. 169-78.
 45. Halpern, M.E., et al., *Gal4/UAS transgenic tools and their application to zebrafish.* Zebrafish, 2008. **5**(2): p. 97-110.
 46. Hirsch, N., L.B. Zimmerman, and R.M. Grainger, *Xenopus, the next generation:*

- X. tropicalis* genetics and genomics. Dev Dyn, 2002. **225**(4): p. 422-33.
47. Kokoza, V.A. and A.S. Raikhel, *Targeted gene expression in the transgenic Aedes aegypti using the binary Gal4-UAS system*. Insect Biochem Mol Biol, 2011. **41**(8): p. 637-44.
 48. Perrimon, N., *Creating mosaics in Drosophila*. Int J Dev Biol, 1998. **42**(3): p. 243-7.
 49. Scott, E.K., *The Gal4/UAS toolbox in zebrafish: new approaches for defining behavioral circuits*. J Neurochem, 2009. **110**(2): p. 441-56.
 50. Asakawa, K., et al., *Genetic dissection of neural circuits by Tol2 transposon-mediated Gal4 gene and enhancer trapping in zebrafish*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(4): p. 1255-60.
 51. Ogura, E., et al., *Adaptation of GAL4 activators for GAL4 enhancer trapping in zebrafish*. Dev Dyn, 2009. **238**(3): p. 641-55.
 52. Scott, E.K., et al., *Targeting neural circuitry in zebrafish using GAL4 enhancer trapping*. Nat Methods, 2007. **4**(4): p. 323-6.
 53. Asakawa, K. and K. Kawakami, *The Tol2-mediated Gal4-UAS method for gene and enhancer trapping in zebrafish*. Methods, 2009. **49**(3): p. 275-81.
 54. Hatta, K., H. Tsujii, and T. Omura, *Cell tracking using a photoconvertible fluorescent protein*. Nat Protoc, 2006. **1**(2): p. 960-7.
 55. Yoshihara, Y., *Visualizing selective neural pathways with WGA transgene: combination of neuroanatomy with gene technology*. Neurosci Res, 2002. **44**(2): p. 133-40.
 56. Yoshihara, Y., et al., *A genetic approach to visualization of multisynaptic neural pathways using plant lectin transgene*. Neuron, 1999. **22**(1): p. 33-41.
 57. White, R.M., et al., *Transparent adult zebrafish as a tool for in vivo transplantation analysis*. Cell Stem Cell, 2008. **2**(2): p. 183-9.
 58. Kawakami, K., et al., *A transposon-mediated gene trap approach identifies developmentally regulated genes in zebrafish*. Dev Cell, 2004. **7**(1): p. 133-44.
 59. Tanabe, K., et al., *Atypical protein kinase C regulates primary dendrite specification of cerebellar Purkinje cells by localizing Golgi apparatus*. J Neurosci, 2010. **30**(50): p. 16983-92.
 60. Ohashi, Y., et al., *A bicistronic lentiviral vector-based method for differential transsynaptic tracing of neural circuits*. Mol Cell Neurosci, 2011. **46**(1): p. 136-47.
 61. Shin, J., et al., *Neural cell fate analysis in zebrafish using olig2 BAC transgenics*. Methods Cell Sci, 2003. **25**(1-2): p. 7-14.

62. Ke, M.T., S. Fujimoto, and T. Imai, *SeeDB: a simple and morphology-preserving optical clearing agent for neuronal circuit reconstruction*. Nat Neurosci, 2013. **16**(8): p. 1154-61.
63. Ke, M.T. and T. Imai, *Optical clearing of fixed brain samples using SeeDB*. Curr Protoc Neurosci, 2014. **66**: p. Unit 2.22.
64. Higashijima, S., G. Mandel, and J.R. Fetcho, *Distribution of prospective glutamatergic, glycinergic, and GABAergic neurons in embryonic and larval zebrafish*. J Comp Neurol, 2004. **480**(1): p. 1-18.
65. Higashijima, S., M. Schaefer, and J.R. Fetcho, *Neurotransmitter properties of spinal interneurons in embryonic and larval zebrafish*. J Comp Neurol, 2004. **480**(1): p. 19-37.
66. Kawakami, K., et al., *zTrap: zebrafish gene trap and enhancer trap database*. BMC Dev Biol, 2010. **10**: p. 105.
67. Mueller, T. and M.F. Wullimann, *BrdU-, neuroD (nrd)- and Hu-studies reveal unusual non-ventricular neurogenesis in the postembryonic zebrafish forebrain*. Mech Dev, 2002. **117**(1-2): p. 123-35.
68. Mueller, T. and M.F. Wullimann, *Anatomy of neurogenesis in the early zebrafish brain*. Brain Res Dev Brain Res, 2003. **140**(1): p. 137-55.
69. Wullimann, M.F., et al., *The long adventurous journey of rhombic lip cells in jawed vertebrates: a comparative developmental analysis*. Front Neuroanat, 2011. **5**: p. 27.
70. Ahn, A.H., et al., *The cloning of zebrin II reveals its identity with aldolase C*. Development, 1994. **120**(8): p. 2081-90.
71. Murakami, T. and Y. Morita, *Morphology and distribution of the projection neurons in the cerebellum in a teleost, Sebastiscus marmoratus*. J Comp Neurol, 1987. **256**(4): p. 607-23.
72. McFarland, K.A., et al., *Hh and Wnt signaling regulate formation of olig2+ neurons in the zebrafish cerebellum*. Dev Biol, 2008. **318**(1): p. 162-71.
73. Hisano, S., et al., *Expression of inorganic phosphate/vesicular glutamate transporters (BNPI/VGLUT1 and DNPI/VGLUT2) in the cerebellum and precerebellar nuclei of the rat*. Brain Res Mol Brain Res, 2002. **107**(1): p. 23-31.
74. Miyazaki, T., et al., *Subtype switching of vesicular glutamate transporters at parallel fibre-Purkinje cell synapses in developing mouse cerebellum*. Eur J Neurosci, 2003. **17**(12): p. 2563-72.
75. Kimura, Y., et al., *Hindbrain V2a neurons in the excitation of spinal locomotor circuits during zebrafish swimming*. Curr Biol, 2013. **23**(10): p. 843-9.

76. Koster, R.W. and S.E. Fraser, *FGF signaling mediates regeneration of the differentiating cerebellum through repatterning of the anterior hindbrain and reinitiation of neuronal migration*. J Neurosci, 2006. **26**(27): p. 7293-304.
77. Volkman, K., et al., *The zebrafish cerebellar upper rhombic lip generates tegmental hindbrain nuclei by long-distance migration in an evolutionary conserved manner*. J Comp Neurol, 2010. **518**(14): p. 2794-817.
78. Obholzer, N., et al., *Vesicular glutamate transporter 3 is required for synaptic transmission in zebrafish hair cells*. J Neurosci, 2008. **28**(9): p. 2110-8.
79. De Zeeuw, C.I. and A.S. Berrebi, *Postsynaptic targets of Purkinje cell terminals in the cerebellar and vestibular nuclei of the rat*. Eur J Neurosci, 1995. **7**(11): p. 2322-33.
80. Han, V.Z. and C.C. Bell, *Physiology of cells in the central lobes of the mormyrid cerebellum*. J Neurosci, 2003. **23**(35): p. 11147-57.
81. Meek, J., *Comparative aspects of cerebellar organization. From mormyrids to mammals*. Eur J Morphol, 1992. **30**(1): p. 37-51.
82. Brochu, G., L. Maler, and R. Hawkes, *Zebrin II: a polypeptide antigen expressed selectively by Purkinje cells reveals compartments in rat and fish cerebellum*. J Comp Neurol, 1990. **291**(4): p. 538-52.
83. Fujita, H., et al., *Detailed expression pattern of aldolase C (Aldoc) in the cerebellum, retina and other areas of the CNS studied in Aldoc-Venus knock-in mice*. PLoS One, 2014. **9**(1): p. e86679.
84. Lannoo, M.J., et al., *Zebrin II immunoreactivity in the rat and in the weakly electric teleost Eigenmannia (gymnotiformes) reveals three modes of Purkinje cell development*. J Comp Neurol, 1991. **310**(2): p. 215-33.
85. Lannoo, M.J., et al., *Development of the cerebellum and its extracerebellar Purkinje cell projection in teleost fishes as determined by zebrin II immunocytochemistry*. Prog Neurobiol, 1991. **37**(4): p. 329-63.
86. Goll, M.G., et al., *Transcriptional silencing and reactivation in transgenic zebrafish*. Genetics, 2009. **182**(3): p. 747-55.
87. Ito, H. and M. Yoshimoto, *Cytoarchitecture and fiber connections of the nucleus lateralis valvulae in the carp (Cyprinus carpio)*. J Comp Neurol, 1990. **298**(4): p. 385-99.
88. Pouwels, E., *On the development of the cerebellum of the trout, Salmo gairdneri. IV. Development of the pattern of connectivity*. Anat Embryol (Berl), 1978. **153**(1): p. 55-65.
89. Finger, T.E., *Efferent neurons of the teleost cerebellum*. Brain Res, 1978.

- 153**(3): p. 608-14.
90. Folgueira, M., R. Anadon, and J. Yanez, *Afferent and efferent connections of the cerebellum of a salmonid, the rainbow trout (Oncorhynchus mykiss): a tract-tracing study*. J Comp Neurol, 2006. **497**(4): p. 542-65.
 91. Ikenaga, T., M. Yoshida, and K. Uematsu, *Efferent connections of the cerebellum of the goldfish, Carassius auratus*. Brain Behav Evol, 2002. **60**(1): p. 36-51.
 92. Meek, J., R. Nieuwenhuys, and D. Elsevier, *Afferent and efferent connections of cerebellar lobe C1 of the mormyrid fish Gnathonemus petersi: an HRP study*. J Comp Neurol, 1986. **245**(3): p. 319-41.
 93. Meek, J., R. Nieuwenhuys, and D. Elsevier, *Afferent and efferent connections of cerebellar lobe C3 of the mormyrid fish Gnathonemus petersi: an HRP study*. J Comp Neurol, 1986. **245**(3): p. 342-58.
 94. Wullimann, M.F. and R.G. Northcutt, *Connections of the corpus cerebelli in the green sunfish and the common goldfish: a comparison of perciform and cypriniform teleosts*. Brain Behav Evol, 1988. **32**(5): p. 293-316.
 95. Torres, B., et al., *Afferents to the oculomotor nucleus in the goldfish (Carassius auratus) as revealed by retrograde labeling with horseradish peroxidase*. J Comp Neurol, 1992. **324**(3): p. 449-61.
 96. Yang, C.Y., et al., *Fiber connections of the lateral valvular nucleus in a percomorph teleost, tilapia (Oreochromis niloticus)*. J Comp Neurol, 2004. **474**(2): p. 209-26.
 97. Heap, L.A., et al., *Cerebellar output in zebrafish: an analysis of spatial patterns and topography in eurydendroid cell projections*. Front Neural Circuits, 2013. **7**: p. 53.
 98. Wullimann, M.F. and R.G. Northcutt, *Afferent connections of the valvula cerebelli in two teleosts, the common goldfish and the green sunfish*. J Comp Neurol, 1989. **289**(4): p. 554-67.
 99. Apps, R. and R. Hawkes, *Cerebellar cortical organization: a one-map hypothesis*. Nat Rev Neurosci, 2009. **10**(9): p. 670-81.
 100. Sasamura, K., H. Ohki-Hamazaki, and I. Sugihara, *Morphology of the olivocerebellar projection of the chick: an axonal reconstruction study*. J Comp Neurol, 2013. **521**(14): p. 3321-39.
 101. Sugihara, I., *Organization and remodeling of the olivocerebellar climbing fiber projection*. Cerebellum, 2006. **5**(1): p. 15-22.
 102. Sugihara, I., S.P. Marshall, and E.J. Lang, *Relationship of complex spike*

- synchrony bands and climbing fiber projection determined by reference to aldolase C compartments in crus Ila of the rat cerebellar cortex.* J Comp Neurol, 2007. **501**(1): p. 13-29.
103. Sugihara, I. and P.N. Quay, *Identification of aldolase C compartments in the mouse cerebellar cortex by olivocerebellar labeling.* J Comp Neurol, 2007. **500**(6): p. 1076-92.
 104. Sugihara, I. and Y. Shinoda, *Molecular, topographic, and functional organization of the cerebellar cortex: a study with combined aldolase C and olivocerebellar labeling.* J Neurosci, 2004. **24**(40): p. 8771-85.
 105. Livet, J., et al., *Transgenic strategies for combinatorial expression of fluorescent proteins in the nervous system.* Nature, 2007. **450**(7166): p. 56-62.
 106. Pan, Y.A., et al., *Zebrabow: multispectral cell labeling for cell tracing and lineage analysis in zebrafish.* Development, 2013. **140**(13): p. 2835-46.
 107. Asakawa, K., G. Abe, and K. Kawakami, *Cellular dissection of the spinal cord motor column by BAC transgenesis and gene trapping in zebrafish.* Front Neural Circuits, 2013. **7**: p. 100.
 108. Miyasaka, N., et al., *Olfactory projectome in the zebrafish forebrain revealed by genetic single-neuron labelling.* Nat Commun, 2014. **5**: p. 3639.
 109. Miyasaka, N., et al., *From the olfactory bulb to higher brain centers: genetic visualization of secondary olfactory pathways in zebrafish.* J Neurosci, 2009. **29**(15): p. 4756-67.
 110. Braz, J.M., B. Rico, and A.I. Basbaum, *Transneuronal tracing of diverse CNS circuits by Cre-mediated induction of wheat germ agglutinin in transgenic mice.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(23): p. 15148-53.
 111. Muto, A. and K. Kawakami, *Prey capture in zebrafish larvae serves as a model to study cognitive functions.* Front Neural Circuits, 2013. **7**: p. 110.
 112. Muto, A., et al., *Genetic visualization with an improved GCaMP calcium indicator reveals spatiotemporal activation of the spinal motor neurons in zebrafish.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. **108**(13): p. 5425-30.
 113. Koide, T., et al., *Olfactory neural circuitry for attraction to amino acids revealed by transposon-mediated gene trap approach in zebrafish.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(24): p. 9884-9.
 114. Sternberg, J.R., et al., *Optimization of a Neurotoxin to Investigate the Contribution of Excitatory Interneurons to Speed Modulation In Vivo.* Curr Biol, 2016. **26**(17): p. 2319-28.
 115. Arrenberg, A.B., F. Del Bene, and H. Baier, *Optical control of zebrafish behavior*

- with halorhodopsin*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(42): p. 17968-73.
116. Douglass, A.D., et al., *Escape behavior elicited by single, channelrhodopsin-2-evoked spikes in zebrafish somatosensory neurons*. Curr Biol, 2008. **18**(15): p. 1133-7.
117. Umeda, K., et al., *Targeted expression of a chimeric channelrhodopsin in zebrafish under regulation of Gal4-UAS system*. Neurosci Res, 2013. **75**(1): p. 69-75.
118. Yoshida, M., R. Hirano, and T. Shima, *Photocardiography: a novel method for monitoring cardiac activity in fish*. Zoolog Sci, 2009. **26**(5): p. 356-61.
119. Muto, A., et al., *Real-time visualization of neuronal activity during perception*. Curr Biol, 2013. **23**(4): p. 307-11.
120. Okuyama, T., et al., *Controlled Cre/loxP site-specific recombination in the developing brain in medaka fish, Oryzias latipes*. PLoS One, 2013. **8**(6): p. e66597.
121. Zupanc, G.K., K. Hinsch, and F.H. Gage, *Proliferation, migration, neuronal differentiation, and long-term survival of new cells in the adult zebrafish brain*. J Comp Neurol, 2005. **488**(3): p. 290-319.
122. Biechl, D., et al., *Eppur Si Muove: Evidence for an External Granular Layer and Possibly Transit Amplification in the Teleostean Cerebellum*. Front Neuroanat, 2016. **10**: p. 49.
123. D'Angelo, E., et al., *Evidence for NMDA and mGlu receptor-dependent long-term potentiation of mossy fiber-granule cell transmission in rat cerebellum*. J Neurophysiol, 1999. **81**(1): p. 277-87.
124. Lev-Ram, V., et al., *A new form of cerebellar long-term potentiation is postsynaptic and depends on nitric oxide but not cAMP*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(12): p. 8389-93.
125. Sacchetti, B., et al., *Long-term synaptic changes induced in the cerebellar cortex by fear conditioning*. Neuron, 2004. **42**(6): p. 973-82.
126. Salin, P.A., R.C. Malenka, and R.A. Nicoll, *Cyclic AMP mediates a presynaptic form of LTP at cerebellar parallel fiber synapses*. Neuron, 1996. **16**(4): p. 797-803.
127. Zhu, L., et al., *Membrane excitability and fear conditioning in cerebellar Purkinje cell*. Neuroscience, 2006. **140**(3): p. 801-10.
128. Jirenhed, D.A., F. Bengtsson, and G. Hesslow, *Acquisition, extinction, and reacquisition of a cerebellar cortical memory trace*. J Neurosci, 2007. **27**(10): p. 2493-502.

129. Kotani, S., S. Kawahara, and Y. Kirino, *Purkinje cell activity during classical eyeblink conditioning in decerebrate guinea pigs*. Brain Res, 2006. **1068**(1): p. 70-81.
130. Yoshida, M. and H. Kondo, *Fear conditioning-related changes in cerebellar Purkinje cell activities in goldfish*. Behav Brain Funct, 2012. **8**: p. 52.

謝辞

本研究の遂行ならびに学位論文の執筆にあたり、多大なるご指導・ご支援を賜りました日比正彦教授、清水貴史准教授に厚く御礼申し上げます。日比正彦教授には、本研究の実験計画・研究指導・論文の執筆に至るまで丁寧なご指導を頂きました。厚く御礼申し上げます。**Gal4** トランスジェニックゼブラフィッシュ系統の樹立に関する論文をまとめるにあたり、竹内未紀研究員には実験・解析のご協力を頂きました。また、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に関する実験については、広島大学大学院・生物圏科学研究科の吉田将之准教授に何度も相談に乗って頂きました。時には名古屋大学まで足を運んで頂き共に実験を行うなど、多くのご協力を頂きました。心より感謝致します。

本研究で用いたジーン/エンハンサートラップ系統のスクリーニングには、国立遺伝学研究所・初期発生研究部門の川上浩一教授、浅川和秀助教に多くのご協力頂きました。恐怖条件付け学習における小脳 Ca^{2+} イメージングに用いた *Tg(ela^vl3:GAL4-VP16)* は岡崎統合バイオサイエンスセンター・基礎生物学研究所・神経行動学研究部門の東島眞一教授に分与して頂きました。ジーン/エンハンサートラップ系統の解析に用いた *Tg(olig2:EGFP)* は Vanderbilt University の Bruce H. Appel 教授から、*Tg(UAS:Kaede)* は兵庫県立大学大学院・生命理学研究科の八田公平教授から、*Tg(UAS:AcGFP-P2A-WGA)* は理化学研究所脳科学総合研究センターの吉原良浩教授から分与して頂きました。この場を借りて深く感謝致します。

小田洋一教授、上川内あづさ教授、小橋常彦特任講師、石川由希講師を始めとする名古屋大学大学院理学研究科生命理学専攻の皆様には温かいご指導と激励を賜り、非常に充実した研究生活を過ごすことができました。また、名古屋大学博士課程教育リーディングプログラム・グリーン自然科学国際教育研究プログラムや生物機能開発利用研究センターからは、RA 雇用による経済支援を頂きました。この場を借りて厚く御礼申し上げます。

本研究の立ち上げから論文執筆に至る長期間、動物器官機能学グループの皆様には数々の助言を頂きました。ゼブラフィッシュの飼育は、技術職員の近藤久仁代さん、塚崎幸子さんにご協力を頂きました。心からお礼申し上げます。

最後に、ここまで温かく見守り応援し続けてくれた、両親を始めとする家族や友人に心から感謝致します。皆様、本当に有難うございました。