

# 博士論文

ゼブラフィッシュ線条体の直接経路、  
間接経路投射神経細胞の同定  
及び行動選択パラダイムの確立

青木 亮

## 目次

略語表 .....	3
第 1 章 諸言 .....	5
1.1 脊椎動物における大脳基底核の役割と構造 .....	5
1.2 大脳基底核内の直接経路、間接経路とその機能モデル .....	5
1.3 直接経路、間接経路の投射神経細胞の発火パターンと運動選択の計算原理 .....	13
1.4 現行モデルの問題点 .....	14
1.5 神経研究のモデル動物としてのゼブラフィッシュの有用性と本研究の目的 .....	15
第 2 章 ゼブラフィッシュにおける大脳基底核相同領域の同定、及び特異的遺伝子組換え系統の樹立 .....	18
2.1 序論 .....	18
2.2 実験材料と手法 .....	26
2.3 結果 .....	33
2.4 考察 .....	54
第 3 章 ゼブラフィッシュにおける新規行動実験系の確立 .....	57
3.1 序論 .....	57
3.2 実験材料と手法 .....	59
3.3 結果 .....	63
3.4 考察 .....	69
第 4 章 総論 .....	71
参考文献 .....	78
謝辞 .....	95

## 略語表

abl	ablation (アブレーション)
BAC	bacterial artificial chromosome (バクテリア由来人工染色体)
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool (ベーシック・ローカルアライメント検索ツール)
cDNA	complementary deoxyribonucleic acid (相補的デオキシリボ核酸)
CDS	coding DNA sequence (コーディングデオキシリボ核酸配列)
CFF	critical flicker-fusion frequency (臨界点滅・融合周波数)
cRNA	complementary ribonucleic acid (相補的リボ核酸)
DIG	digoxigenin (ジゴキシゲニン)
EGFP	enhanced green fluorescent protein (強化型緑色蛍光タンパク)
FRET	föster resonance energy transfer (蛍光共鳴エネルギー移動)
GaASP	gallium arsenide phosphide (リン化ガリウムヒ素)
GABA	gamma-Aminobutyric acid (ガンマアミノ酪酸)
GECI	genetically-encoded calcium indicator (遺伝子にコードされたカルシウム指示蛍光タンパク質)
Hb	habenula (手綱核)
Km	kanamycin (カナマイシン)
LED	light-emitting diode (発光ダイオード)
LP	lateral telencephalic pallia (終脳外套外側)
LTM	long term memory (長期記憶)
mRNA	messenger ribonucleic acid (メッセンジャーリボ核酸)
NPY	neuropeptide Y (ニューロペプチドY)
penkl	penk-like (ペンク様)
PPp	parvocellular preoptic nucleus, posterior part (小細胞性視索前核後部)

ROI	region of interest (関心領域)
STM	short term memory (短期記憶)
TTL	transistor-transistor logic (トランジスタ-トランジスタ論理回路)
UAS	upstream activating sequence (上流活性化配列)
Vd	dorsal nucleus of area ventralis telencephali (終脳腹側部背側核)

## 第 1 章 諸言

### 1.1 脊椎動物における大脳基底核の役割と構造

ヒトを始めとする多くの動物は、状況に応じて適切な行動を選択し、また試行錯誤を通じてより優れた行動を学習していくことで、自らの選択を最適化していく。これらの能力は生存のための重要な機能であり、複雑かつ柔軟な行動を可能にする「知性」の根幹をなすものであると言える。哺乳類を主に対象とした薬理学的手法を用いた脳の特定の部位の破壊実験による一連の機能解析の結果から、これらの運動制御、及び適応的行動の学習には、終脳の大脳基底核と呼ばれる脳部位が重要な役割を担うことが示唆されてきた(Packard and McGaugh, 1996; Yin et al., 2004)。

大脳基底核とは線条体、淡蒼球、視床下核などを含む複数の神経核の総称であり、その入力核である線条体には、外部の環境や記憶の情報を有する大脳皮質や、海馬、扁桃体などの広い領域からの入力が集約される。大脳基底核はこれらの情報を視床へと送り、最終的に運動制御に重要な役割を持つ皮質運動野などの活動を制御する(図 1-1)。この皮質—大脳基底核—視床ループを介して外部の環境や記憶を受け、適切な行動を選び出す計算処理が大脳基底核の主な機能と考えられている(Hikosaka, 1991)。更に、タイプの異なる行動を担う複数のループが並列して存在していることが知られており、それらのループが関わる行動は眼球運動などの単純な運動調整から、プロ棋士が将棋を指す際の直観的行動選択(Wan et al., 2011)などの抽象的、認知的行動まで多岐に及ぶ。

### 1.2 大脳基底核内の直接経路、間接経路とその機能モデル

大脳基底核の入力核である線条体には皮質、海馬、扁桃体などからのすべての入

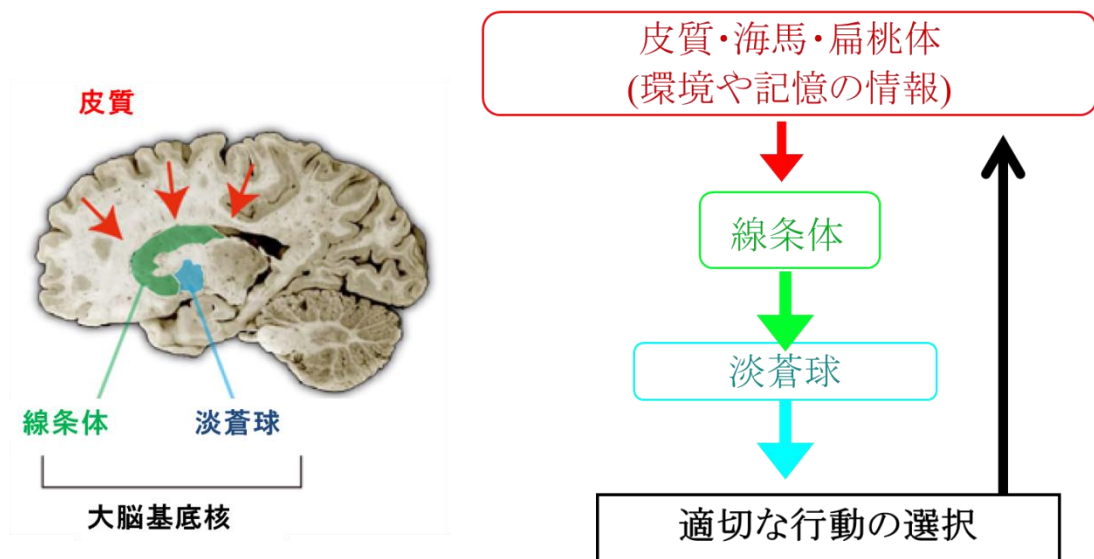


図 1-1. 大脳基底核の神経回路とその役割

(左): ヒト大脳における大脳基底核の位置。

(右): 線条体は大脳皮質、海馬、扁桃体などの領域から環境や記憶の情報を受け取り、淡蒼球を介して適切な行動の選択を行う。

力が一度集約し、同じく大脳基底核に属する淡蒼球に対して出力される。この淡蒼球への出力を担う投射神経細胞は線条体には 2 種類存在しており、これらの細胞群は、その投射先の違いから、それぞれ直接経路投射神経細胞、間接経路投射神経細胞と呼ばれている (Nambu, 2009)。直接経路の投射神経細胞は、ドーパミン D1 受容体、サブスタンス P を特異的に発現しており、淡蒼球内節部に投射している。間接経路の投射神経細胞は、ドーパミン D2 受容体、エンケファリンを特異的に発現しており、淡蒼球外節部に投射している。このように、両群の細胞は遺伝的プロファイル及び投射パターンにおいて異なった特性を持ち、またそれぞれの投射先の運動制御に対する作用から、皮質の興奮性神経細胞の活動をそれぞれ促進、及び抑制すると予想されてきた。これらの皮質に対する作用の違いから、直接経路が適切な行動を亢進し、間接経路が不適切な行動を抑制する、という機能モデルが現在までに提唱されている (図 1-2)。更に、大脳基底核に関係する領域の機能異常により起こるパーキンソン病のような病気では運動の開始が困難になり、一方ハンチントン病のような病気では運動の停止が困難になる (Ghiglieri et al., 2012) ことから、これらの運動に対する二律背反的モデルに対する理解は、病理的観点からも重要であることが示唆されている。

近年の遺伝的手法の発展に伴い、これらの細胞群特異的に目的遺伝子を発現させることが可能になったため、直接経路、および間接経路それぞれの細胞群の神経活動を操作した際、行動へどのような影響があるかが調べられ始めている。例えばジフテリア毒素受容体を間接経路の投射神経細胞を特異的に発現させ、ジフテリア毒素を注射することで間接経路の投射神経細胞を特異的に破壊した実験では、ケージ内の移動量の増加が観察された (Durieux et al., 2009)。また、光感受性チャネルであるチャネルロドプシンを用いて選択的にそれぞれの細胞群を脱分極させた実験からは、直接経路の活性化により移動量の亢進、間接経路の活性化によりすくみ反応の増加

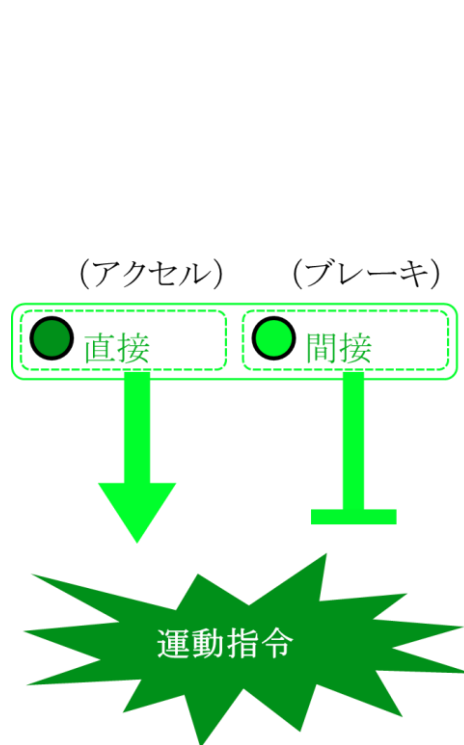


図 1-2. 線条体直接経路と間接経路の二律背反的機能モデル

線条体の直接経路、間接経路の投射神経細胞は、それぞれアクセルとブレーキのように、運動の実行を亢進、抑制すると考えられている。



及び運動開始頻度の低下がそれぞれ観察された (Kravitz et al., 2010)。これらの結果は、直接経路が運動を亢進し、間接経路が運動を抑制するという上記モデルから予測される結果と一致しており、上記モデルを裏付けるものであると言える (図 1-3)。

また、皮質—線条体間のシナプスにはドーパミンを介したシナプス可塑性が存在することが知られている (Calabresi et al., 2007)。中脳黒質に存在するドーパミン神経細胞は摂食や性行動などの報酬及びそれらの報酬を予期させるような刺激に反応することが知られているが (Arias-Carrión and Pöppel, 2007)、線条体は非常に強いドーパミンの修飾を受ける。これらの事実から、この報酬に対応する信号が線条体の投射神経細胞の可塑性を介して行動選択を変化させることで、よりその報酬を獲得する行動を強化すると考えられている (Schultz, 2013)。直接経路投射神経細胞と間接経路投射神経細胞は前述のように異なったドーパミン受容体を発現していることから、両者に対するドーパミンの作用も異なることが推測される (Surmeier et al., 2011)。

実際に、直接経路投射神経細胞が発現しているドーパミン D1 受容体は Gs 型 G タンパク共役型受容体であり、細胞に対して長期増強を引き起こすことが知られてきた (Reynolds et al., 2001; Calabresi et al., 2007)。一方、間接経路投射神経細胞が発現しているドーパミン D2 受容体は Gq 型 G タンパク共役型受容体であり、この受容体を介した作用によりドーパミンは長期減弱を引き起こすと考えられてきた (Gerdeman et al., 2002; Kreitzer and Malenka, 2007)。しかしながら、近年、より詳細に直接経路、間接経路それぞれに対するドーパミンの影響を調べた結果、実際にはより複雑な規則に従って可塑的な変化の方向性が決定されていることが明らかになってきた。BAC 遺伝子組換え技術を用いて直接経路、間接経路の投射神経細胞特異的に緑色蛍光タンパクを発現するマウスのスライス標本を用いることで、両者を区

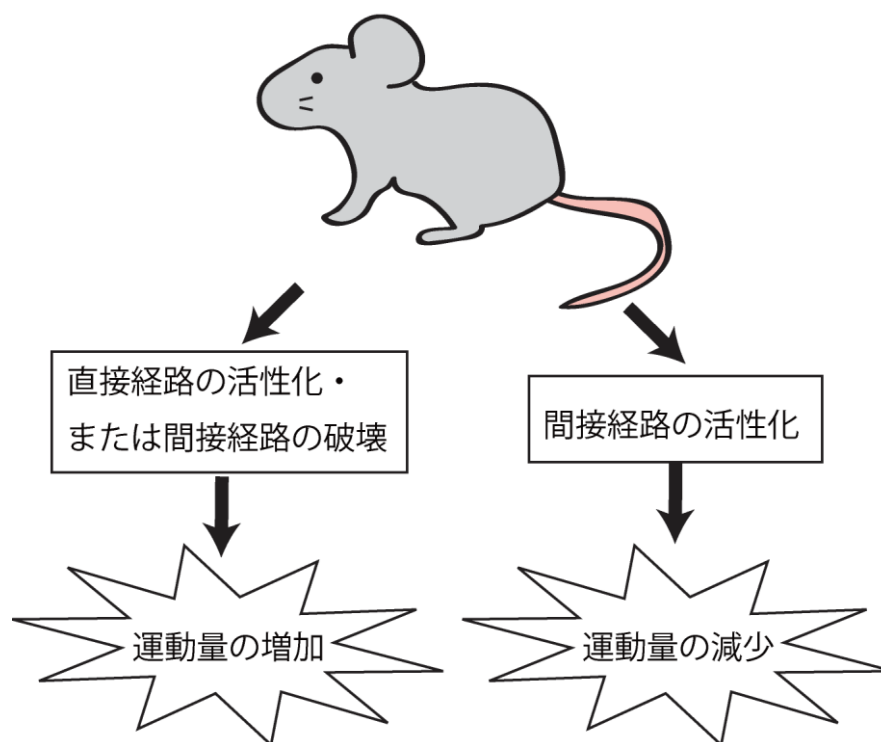


図 1-3. 線条体の直接経路、間接経路の活動の操作が運動量への相反する影響を与える

直接経路が運動に対して亢進的に、間接経路が抑制的に働くというモデルとよく一致して、直接経路の活性化もしくは間接経路の遺伝的破壊は運動量の増加を、間接経路の破壊は運動量の減少を引き起こすという結果が得られている。

別しながらシナプス強度を測定した電気生理的研究によると、皮質から直接経路の投射神経細胞へのシナプスはヘブ則に基づいた STDP (spike-timing-dependent plasticity) を引き起こすものの、長期増強にはドーパミン D1 受容体の活動が必要であり、一方でドーパミン D1 受容体のアンタゴニストを投与することで、スパイクのタイミングに関わらず長期減弱が導入されることが分かった。一方で、皮質から間接経路の投射神経細胞のシナプスでは、同様にヘブ則に基づいた STDP が引き起こされるものの、ドーパミン D2 受容体のアンタゴニストを投与すると長期減弱が観察されなくなり、一方でドーパミン D2 受容体のアゴニストを投与すると長期増強が長期減弱へと変化することが明らかになった (Shen et al., 2008)。これらの結果は、ドーパミンがグルタミン酸などの他の神経伝達物質と協調的に働くことで可塑性の方向性を制御していることを示しており、皮質から線条体への投射における個々のシナプス単位の伝達効率の変化により、適切な行動の学習が行われることを示唆している。従って、個々の細胞の応答性は極めて不均一であること、及びそれらは直接経路、間接経路でそれぞれ異なった規則性に従っていることが予想される (図 1-4)。

認知的学習において直接経路、間接経路の投射神経細胞がそれぞれどのような学習に関与しているのかに関しても研究が進んでいる。破傷風毒素を直接経路、間接経路の投射神経細胞特異的に発現させてシナプス小胞からの分泌を阻害した実験から、直接経路の投射神経細胞は報酬による学習に関わり、一方で間接経路の投射神経細胞は罰に対する忌避行動の学習に関与するという結果が得られており (Hikida et al., 2010, 2013)、認知的行動レベルでも直接経路、間接経路の投射神経細胞が異なった方法で学習に影響することが示唆されている。加えて、これら線条体の投射神経細胞のドーパミンに対する応答性はコカインやニコチンなどの各種薬物の作用機序とも深い関わりがあると考えられている (Grueter et al., 2012) が、直接経路の投射神

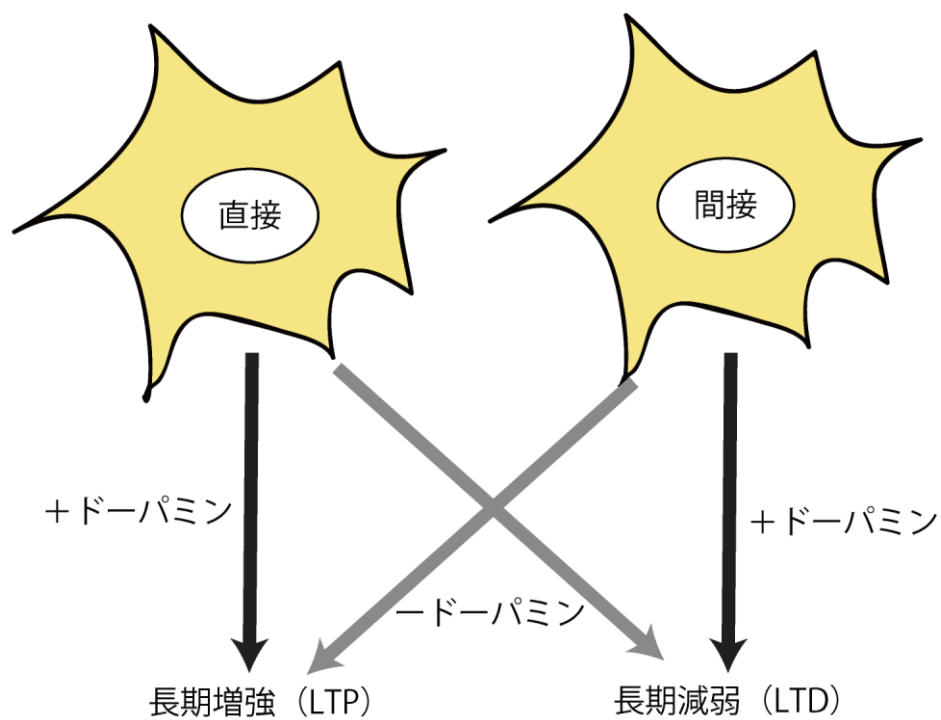


図 1-4. 直接経路、間接経路のドーパミンが引き起こす可塑性への影響は相異なる

直接経路の投射神経細胞はヘブ則に基づいた長期増強をドーパミン D1 受容体の活性化時に引き起こすが、非活性化時には長期減弱が起こる。一方で間接経路の投射神経細胞はドーパミン D2 受容体の活性化時には長期減弱を、非活性化時には長期増強を引き起こす。

経細胞はコカインに対する感作作用に関わるのに対し、間接経路の投射神経細胞は不活性化しても影響がないことが知られており(Hikida et al., 2010)、両者の異なった性質を明らかにすることは、薬物中毒治療の観点からも重要であると考えられる。

### 1.3 直接経路、間接経路の投射神経細胞の発火パターンと運動選択の計算原理

線条体の機能を明らかにする上で、線条体がどのような計算原理により適切な行動を選び出しているのかについても、盛んに研究が行われている。そのためには、第一に線条体の神経細胞の発火特性を知ることが重要であるが、とりわけ哺乳類を用いた運動課題中の線条体の神経細胞の活動を計測した研究はすでに非常に多く行われている。Schultz らの研究グループは、生きたマカクザルに空間的遅延応答課題を行わせ、その間に線条体前部の神経活動を単一電極記録により測定したところ、課題によって得られる報酬の予測量に正または負に相関して発火頻度の変化する神経細胞を発見した(Cromwell and Schultz, 2003)。また、Hikosaka らの研究グループはマカクザルを用いた研究から、線条体の神経細胞の発火は特定の方向への運動に対する相関性があるものの、予期される報酬量の影響を受けてそれらは変化していることを発見し、それらの神経細胞が報酬量の予測を含めた意思決定を担っていると提唱した(Kawagoe et al., 1998)。また Graybiel らの研究グループはラットを用いた実験から、条件付け T 迷路課題中に、報酬を受けるまでの一連の行動の開始時、終了時に相関して活動が変化すること(Jog et al., 1999)を明らかにした。さらに、学習の進行に応じて線条体の活動パターンがダイナミックに変化することも報告されている(Barnes et al., 2005)。この結果は、線条体の神経細胞の発火パターンが学習により可塑的に変化するとの仮説と一致しているものと考えられる。

## 1.4 現行モデルの問題点

これらの知見は、線条体の細胞群が報酬に伴って放出されるドーパミンの修飾をうけており、かつ運動量の変化に正及び負に相関する細胞が存在する点で、上記の直接経路が適切な行動を亢進し間接経路が不適切な行動を抑制するという機能モデルから推定される活動パターンと矛盾しない。しかしながら、これらの研究では個々の計測された神経活動が直接経路の神経細胞によるものなのか、間接経路の神経細胞によるものなのかを区別していないため、直接経路及び間接経路内の神経細胞の活動パターンや学習による変化の違いについては知見がなく、実際に直接経路、および間接経路の投射神経細胞が何を表象しているのは全く分かっていない。その背景として、これらの直接経路及び間接経路の投射神経細胞が同じ領域内に混在しており、かつこれらの神経細胞の電気生理学的性質が非常に似通っているため、哺乳類を用いたこれまでの研究では、直接経路及び間接経路の神経細胞を位置情報やスパイクの波形などで区別しながら、*in vivo* で神経活動を計測することができないことが挙げられる。さらに、哺乳類における大脳基底核は脳深部に位置するため、2 光子カルシウムイメージングのような光学的手法を用いても、これらの細胞を区別したままそれぞれの神経活動を可視化することはできなかった。これらの理由により、直接経路、間接経路それぞれに属する投射神経を区別しながら、細胞単位での活動を計測することは非常に困難である。

近年になってようやく、ドーパミン D1 受容体陽性細胞、ドーパミン D2 受容体陽性細胞にそれぞれ特異的に Cre タンパクを発現するドーパミン D1 受容体-Cre 及びドーパミン D2 受容体-Cre マウスを用いて直接経路、間接経路特異的にカルシウム感受性蛍光タンパクを発現させ、光ファイバーを用いてフォトンカウンティングを行うことで直接経路、間接経路の細胞群の活動をそれぞれ区別して計測することが可能にな

った(Cui et al., 2013)。その結果、提唱された機能モデルと一致して、運動時には直接経路が、停止時には間接経路の投射神経細胞がそれぞれ活性化しているのではなく、両者はともに運動時に活性化し、さらに直接経路間接経路に関わらず、線条体の投射神経細胞群は反対側への方向転換時に発火頻度が上昇していることが明らかになった。しかしながら、このような手法では直接経路、間接経路の投射神経細胞の活動を同時に計測することができず、また一細胞レベルの神経細胞の活動プロファイルを捉えることはいまだ不可能である。一方で線条体の神経細胞は単純に報酬の予測量に正負に相関するのではなく、非常に不均一な応答特性を持つことが知られている。マカクザルを用いて報酬に基づく自由選択課題を遂行中の線条体の活動を調べたところ、線条体には単純に実際の行動の結果から予測される報酬量に相関して発火する細胞、行動間の相対的な報酬の差に相関して発火する細胞のほかに、特定の行動に対して予測される報酬の絶対量に相関して発火頻度が変化する細胞が多く存在していることが明らかになった(Samejima et al., 2005)。これらの結果から、線条体の個々の投射神経細胞は特定の行動の報酬の情報を表現しており、それらの比較によって適切な行動が選択されることが示唆されるため、複数の細胞の平均としての活動の解析は個々の細胞の表現を十分に反映していない可能性がある。これらの問題点を克服するためには、直接経路と間接経路内の神経細胞を区別しながら個々の神経細胞の活動を計測可能な解析系の確立が必要である。しかしながら、現在までにそのような解析系は、存在していなかった。

### 1.5 神経研究のモデル動物としてのゼブラフィッシュの有用性と本研究の目的

ゼブラフィッシュは小型の淡水魚であり、飼育が容易かつ多産であること、さらに遺伝的操作が容易であり、発生初期の胚が透明であることから、遺伝学研究、発生生物学研究において非常に広く使用されてきたモデル動物である。神経科学の分野でも、

遺伝子組換え系統の作成、操作、及び可視化に優れていることから、各種カルシウム感受性蛍光タンパクなどと組み合わせることで容易に 1 細胞レベルでの活動を解析することができ、近年非常に注目されている (Kawakami et al., 2004; Arrenberg et al., 2009; Yaksi et al., 2009)。さらに、哺乳類などのすでに確立したモデル動物で用いられている行動解析などの技術をゼブラフィッシュ成魚に適用することで、認知的機能解析の研究も成功を修めている (Koide et al., 2009; Agetsuma et al., 2010)。さらに、ゼブラフィッシュの脳はマウスなど、哺乳類のモデル生物のものと比べて非常に小さく、その終脳は高さ 1 mm 以下に収まるため、哺乳類の脳で行われる計算処理の原理が保存されたまま、よりコンパクトな形で実装されている可能性が高い。

本研究は、小さな終脳を持つゼブラフィッシュを線条体研究のモデル動物として確立すべく、そのための必要不可欠な要素である、(1)ゼブラフィッシュにおける線条体とその関連領域の同定、及び各領域特異的な遺伝子組換え系統の樹立、及び(2)状況に応じた適切な行動を伴うゼブラフィッシュ行動課題の確立を試みたものである。これらの研究基盤を整えることで、ゼブラフィッシュの小さな脳を各種遺伝子組換え系統作製技術と組み合わせることが可能になり、線条体の個々の神経細胞のサブタイプを同定した状態で、カルシウムイメージングによる活動パターンの解析が実現されると予想される。このような研究は、将来的に線条体の適切な運動選択のための計算原理の解明、パーキンソン病やハンチントン病などの病理の解明及びその治療法の確立のうえで、重要な示唆を与えられと考えられる(図 1-5)。



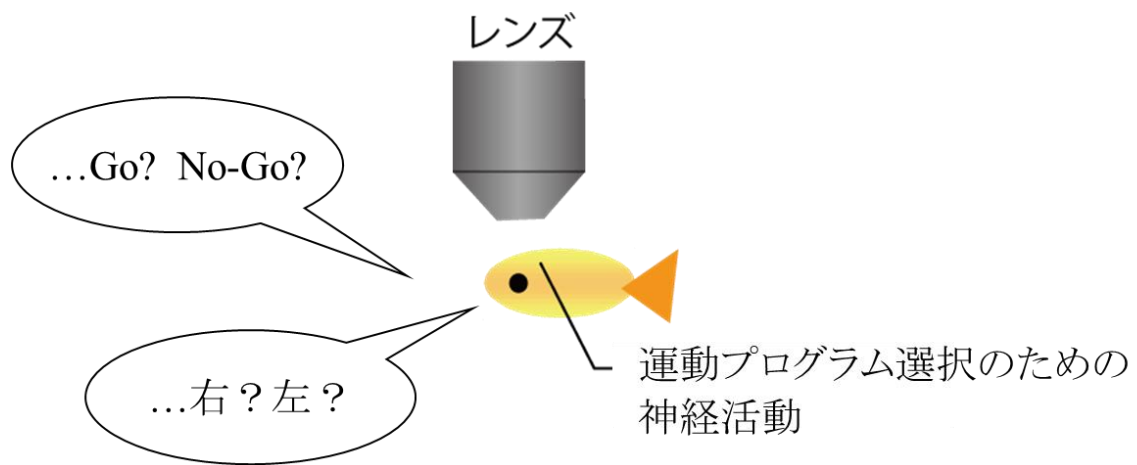


図 1-5. ゼブラフィッシュ線条体の、*in vivo* イメージングシステム

遺伝子組み換え技術により直接経路、間接経路の投射神経細胞を区別可能なように標識したゼブラフィッシュをカルシウムイメージング用の顕微鏡下に固定し行動選択課題を行わせる。これにより、状況に応じた運動プログラムを選択中のゼブラフィッシュの線条体の神経細胞の活動を記録することが可能になる。

## 第2章 ゼブラフィッシュにおける大脳基底核相同領域の同定、及び特異的遺伝子組換え系統の樹立

### 2.1 序論

ゼブラフィッシュを線条体研究のための有用なモデル動物として確立するうえで、ゼブラフィッシュにおける、哺乳類の線条体と相同な領域を同定することは必要不可欠である。いうまでもなく、モデル動物は普遍的な生命現象の解明を目的として、モデル動物で得られた知見を人を初めとする他の生物にも適用するために用いられる。そのための前提となるのが、相同性である。そもそも相同性 (homology) とは、単なる機能や形態の類似 (analogy) にとどまらず、その進化的起源を対象の領域と共有していることが必要である。相同性が示されて初めて、モデル動物で発見された知見がヒトなど、他の動物においてもあてはまる可能性が高いと推察され、それらの知見を他の動物に還元することが可能になる。

一般的に、相同性を議論するうえで重要となるのは、発生過程において由来となる組織、遺伝子の発現、及び領域間の投射関係などが同じであることがあげられる。このうち、ゼブラフィッシュ線条体の発生過程の由来に関しては、いくつかの報告がある。まず、近年の神経発生研究から、大脳基底核を含む終脳の各領域の起源は進化的に古く、これらの各領域の基本的な構造と機能は硬骨魚類から哺乳類まで共有されている可能性が高いことがわかってきた (Northcutt, 1981; Wullimann and Mueller, 2004)。硬骨魚類の神経発生研究により、神経管から終脳が発生する様式が哺乳類と硬骨魚類では大きく異なり、対応する各領域が全く異なった位置にある可能性が指摘されてきた (図 2-1) (Rodríguez et al., 2002)。そのような仮説についての実証的研究はいまだ数が限られる。しかしながら、金魚を用いた脳破壊実験により、哺乳類に

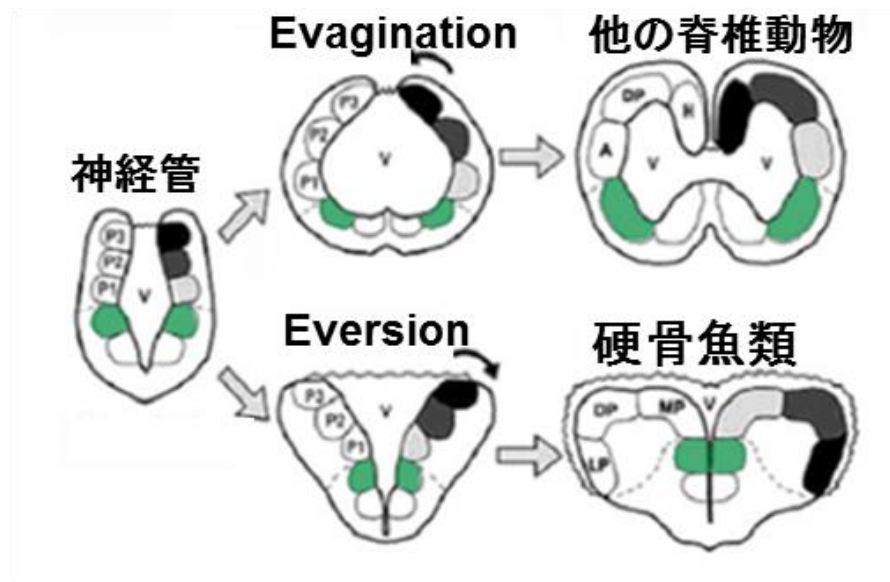


図 2-1. 哺乳類と硬骨魚類の発生様式の違い (Northcutt (1981) *Ann. Rev. Neurosci.*, vol.4, page316 の図 7 を改変)

発生様式の違いによって相同領域が哺乳類(上)と硬骨魚類(下)では全く異なる部位に位置する。

おける皮質に相当する部位である終脳外套内側(medial telencephalic pallia;MP、以下 MP)を破壊した魚は能動的忌避課題の学習が阻害されたのに対し、海馬に相当すると考えられている終脳外套外側(lateral telencephalic pallia;LP、以下 LP)を破壊した魚では能動的忌避課題の成績は正常であったが一時的な手がかりの記憶を必要とするトレース条件付け課題では成績が下がるなど、哺乳類における大脳皮質、海馬との機能的相同性を示唆する結果が得られている(Portavella et al., 2004)。また、鯉の長期的単一ユニット記録を用いた神経細胞の発火解析の結果から、哺乳類の海馬における場所細胞(O'Keefe and Dostrovsky, 1971)のように、特定の場所に魚がいる際に発火頻度が上がるような細胞が LP に存在することが確認された(Canfield and Mizumori, 2004)。このように、間接的ではあるがその機能的な領域区分が哺乳類と相同であることを示唆するいくつかの知見が得られている。

大脳基底核の進化的保存性については、哺乳類以外でも、鳥類、爬虫類、両生類などで、マーカー遺伝子の発現や接続関係において哺乳類における大脳基底核と相同の構造を持つ神経回路が保存されていることが分かっている(Smeets et al., 2000)。

ゼブラフィッシュでも、発生段階における各種マーカー遺伝子の発現を調べた研究から、稚魚の前脳の Sdd(dorsal subdivision of the dorsal subpallium)が転写因子 Dlx2a 陽性かつ Lhx6、Lhx7 陰性であり、哺乳類の線条体の原基である外側基底核隆起(lateral ganglionic eminence)と一致した発現パターンであることが明らかになっていることから、ゼブラフィッシュにおいても線条体の発生原基と考えられている(Mueller et al., 2008)。しかしながらその他の観点、とりわけ成魚においては、

相同性を議論するに十分にたる組織学的研究が未だなされておらず、遺伝的マーカーおよび投射関係に基づいた各領域の同定が必要である。

一方で、ゼブラフィッシュより進化的に早い段階で哺乳類と分岐した円口類に属するヤツメウナギを用いた研究から、哺乳類におけるマーカー遺伝子が発現していること、電気生理学的な性質が哺乳類の投射神経細胞と似通っていること、及び淡蒼球への投射が観察されることを基準に、哺乳類の線条体と相同な神経回路の存在が報告されており、大脳基底核の起源が進化的に古く、ゼブラフィッシュにも保存されている可能性が高いことが示唆される(Stephenson-Jones et al., 2011)。

また、ドーパミン系に作用する薬物乱用によって、線条体の神経細胞に可塑的な変化が起こることが知られており、これらの線条体の神経細胞の特性が薬物に対する行動変化の原因だと考えられている(Lüscher and Malenka, 2011)が、ゼブラフィッシュにおいてもコカイン(Darland and Dowling, 2001)及びニコチン(Kedikian et al., 2013)をもちいた条件付け場所嗜好課題によって、行動の変化を起こすことが知られている。これらの事実は、間接的にはあるが、ドーパミンを介した線条体の可塑的な変化を起こすメカニズムが、ゼブラフィッシュにも進化的に保存されていることを示唆している。

同様に、認知的行動の面でも、罰を予期させるような条件付けされた刺激に対し忌避行動をとることを学習させる能動的忌避課題のような適応的行動は哺乳類においては脳基底核依存であることが知られているが(Salamone, 1994)、同様の行動課題はゼブラフィッシュにも学習可能であり(Pradel et al., 1999)、ゼブラフィッシュが同様

の計算原理に基づく神経回路により、これらの適応的行動を実現していることが示唆される。

古典的に、各遺伝子が脳の機能に及ぼす影響を調べるために、その遺伝子のノックアウト動物を作製して行動の変化を調べる、という手法がとられてきた (Guan et al., 2010)。これらの手法はハエや線虫などを用いた大規模スクリーニングと相性がよく、記憶、感覚、運動など、様々な機能に重要な働きを持つ遺伝子が同定されてきた。しかし単一の認知的機能が単一の遺伝子に依存している例は少なく、むしろ複数の遺伝子産物の組み合わせによることが多いため、近年、とりわけ認知科学の分野では、脳の機能を遺伝子単位ではなく、神経回路単位で解明すべく、脳の領域特異的 (Tsien et al., 1996)、あるいは細胞のサブタイプ特異的 (Taniguchi, 2014) に、目的の遺伝子を導入可能な遺伝子組換え系統を作製する、という手法がとられてきている。このような遺伝子組換え系統を用いることで、それら特定の細胞群に蛍光タンパクを発現させることで投射関係を明らかにすることや、チャネルロドプシンなどの光感受性チャネルタンパクを発現させて電気生理学的解析を行う (Cohen et al., 2012) ことが可能である。また、GCaMP などのカルシウム感受性蛍光タンパク (Akerboom et al., 2012) を発現させることでカルシウムイメージングなどの光学的解析が可能になり、チャネルロドプシン刺激を生きた動物に行うことで神経活動の操作に伴う行動の変化を解析 (Deisseroth and Schnitzer, 2013) することが可能になる (図 2-2)。このような領域特異的な遺伝子組換え系統を用いるため、数千塩基のプロモーター配列を用いた遺伝子組換え系統の作成が行われてきたが、転写制御にかかわる領域が CDS から離れていることもあり (Lettice et al., 2003)、数千塩基では、内在性の遺伝子の発現を再現するのに十分でない可能性も高かった。これらの問題を改善すべく、マウスなどのモデル動物では相同組換えを利用したノックインマウスの作成が広く行われ

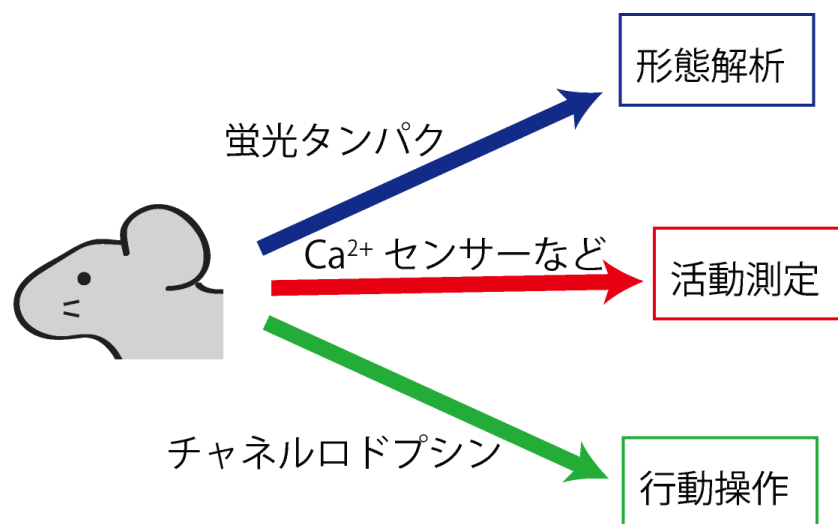


図 2-2. 各種遺伝子導入により様々な細胞種特異的な解析が可能になる

遺伝子組み換え技術を用いて蛍光タンパクを特定の領域、特定の細胞種に発現させることで、投射関係などの形態を解析することが可能になる。またチャネルロドプシンなどの光感受性チャネルタンパクと電気生理学的解析を組み合わせる、もしくはカルシウム感受性蛍光タンパクを発現させることで細胞の活動を測定することができる。更に、光感受性チャネルタンパクを発現させて行動変化を誘発させることで、それらの細胞の生理的機能を解析することが可能になる。

てきた。これにより、内在性の遺伝子の発現を非常に忠実に再現した組換え遺伝子の発現が可能になるが、同時にこの手法は、得られる組換え系統の多様性がないという欠点も持っている。一方、ゼブラフィッシュにおいては、それらの手法は実用化されておらず、近年になってようやく Zinc-finger nuclease や TALENs (transcription activator-like effector nucleases) (Huang et al., 2012) など、狙った染色体上の部位に変異を導入する手法などが実用化されつつあるが、一般に普及するには至っていない。一方で、大腸菌内で BAC (bacterial artificial chromosome) の相同組換えを用いた BAC コンストラクトを作製し、一細胞期の卵にインジェクションすることで生殖系列細胞のゲノムに取り込ませることで確立する BAC 遺伝子組換え系統は、ゼブラフィッシュでも広く用いられてきた (Lee et al., 2001)。これらの手法を用いた遺伝子組換え系統の樹立により、ゼブラフィッシュでも、神経伝達の阻害による機能解析などが可能になっており (Koide et al., 2009; Agetsuma et al., 2010)、神経回路単位での機能解明のためのモデル動物として、有用性が高まってきている。これにより、行動解析や生理的機能解析を含めた、認知科学的研究のためのモデル動物としての基盤が整いつつある。

今章ではゼブラフィッシュを線条体モデル生物として確立するうえで必要不可欠である、ゼブラフィッシュにおける線条体を含む大脳基底核神経回路の同定、及びそれらに特異的な遺伝子組換え系統の作出について述べる (図 2-3)。



ゼブラフィッシュにおける、

- ・ 大脳基底核神経回路の同定
- ・ 特異的な遺伝子組換え系統の作出

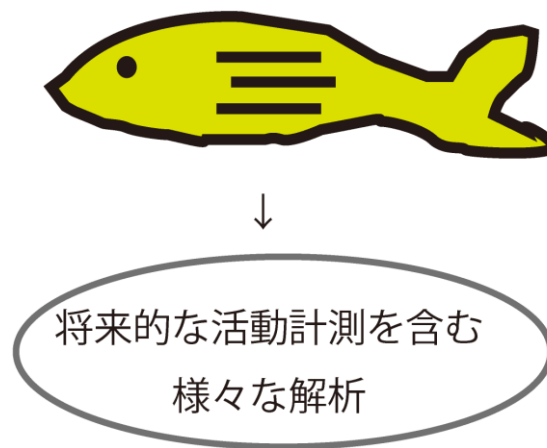


図 2-3. ゼブラフィッシュ大脳基底核の同定と遺伝子組換え系統の作出、及びその目的

ゼブラフィッシュを線条体研究のモデル動物として確立するために、ゼブラフィッシュにおける大脳基底核神経回路の同定、及び各細胞種特異的な遺伝子組み換え系統の作出が必要不可欠である。これにより、線条体の *in vivo* 活動計測など、ゼブラフィッシュの利点を生かした様々な研究を行うことが可能になる。

## 2.2 実験材料と手法

### ゼブラフィッシュ系統

ゼブラフィッシュは標準的な環境で飼育及び交配した (Westerfield, 2007)。1~2 ヶ月齢及び成魚はそれぞれ 1 リットル及び 7 リットル水槽で飼育された。飼育水は常に交換され、14 時間の明期と 10 時間の暗期の周期のもと、水温を 28.5℃に保たれた。蛍光観察の際の色素の形成を防ぐため、必要に応じて、稚魚の飼育水には 0.002 % のフェニルチオウレアが加えられた。本研究で作製された遺伝子組換え系統は *tac1* 陽性細胞の可視化を目的とした Tg(*tac1*:GAL4VP16)、*npv* 陽性細胞の可視化を目的とした Tg(*npv*:GAL4VP16)であり、その他に GAL4VP16 により GFP の発現を誘導するため Tg(UAS:GFP)が使用された。

### Bacterial artificial chromosome (BAC) 組換え

Tg(*tac1*:GAL4VP16)の作成については、BAC終端情報を提供するEnsemble ([http://uswest.ensembl.org/Danio\\_rerio/Info/Index](http://uswest.ensembl.org/Danio_rerio/Info/Index)) のゼブラフィッシュゲノムシーケンスに対して*tac1* のcDNA配列を用いてBLAST検索をかけることで、*tac1* のCDSを含むBACクローンであるzc135B21 が同定された。GAL4VP16 のCDSを含むpGAL4VP16-Km<sup>r</sup> (Agetsuma et al., 2010)をPCRテンプレートとして用いることで、相同組換えのためのtargeting DNA fragmentの増幅を行った(5' 側腕部-GAL4VP16-poly(A)-Km<sup>r</sup>-3' 側腕部)。Tac1 targeting 5'配列はTTATACTTTAAAGTGCTTTAAAGGAAAAAGGGAAAGTTACTGGGAGCAACであり、*tac1* 遺伝子の翻訳開始サイトの 50 塩基上流を標的としたものである。3' 配列はGATTGTTGCCTGTCCAGTAATCAAGGTCTTCTTTTGGACCCAATTCCTCTであり、*tac1* 遺伝子の翻訳開始サイトの 50 塩基下流を標的としたものである。GAL4VP16 配列をふく

むBACプラスミド(tac1:GAL4VP16-Km<sup>r</sup>)はzc135B21 株の相同組換えによって、すでに発表されているプロトコルと同様の方法で作製された(Kimura et al., 2006)。精製されたtac1:GAL4VP16 プラスミドは 1-2 細胞期のゼブラフィッシュの卵にインジェクションされた。インジェクションされたゼブラフィッシュは成魚に成長するまで育てられ、Tg(UAS:EGFP) 系統と掛け合わせ、稚魚の終脳におけるGFPの発現を指標にスクリーニングが行われた。

Tg(npy:GAL4VP16)についても、npyのCDSを含むBACクローンのzC72N5 が同定され, targeting 5' 配列としてAACAATAAATTGCGCATCAGCACAAACACGTTTGCTTTGTTTAATTGCAGが、3' 配列としてAGAAACGCGCACGCTGCCCAGCTCATCCACATCTTCATGTTTGGATTTCATがそれぞれ用いられ、Tg(tac1:GAL4VP16)と同様の方法で作成された。

## クローニング

ゼブラフィッシュ野生型(RIKEN Wako)成魚脳から RNeasy Protect Mini Kit (QIAGEN, Venlo, Netherlands)を用いて RNA を抽出した。その後、SuperScript III First-Strand Synthesis System for RT-PCR(Invitrogen, Massachusetts, USA) を用いて cDNA ライブラリーを作製した。この cDNA ライブラリーを鋳型し、表 2-1 に記載したプライマーを元に、Prime STAR HS DNA polymerase (TaKaRa, Shiga, Japan) を用いて PCR 反応を行い、大脳基底核における発現を *in situ* hybridization で確認するための tac1、penk、penkl、ctip2、nkx2.1b、er81 の遺伝子の増幅をおこなった。得られた PCR 産物は、Zero Blunt TOPO PCR Cloning Kit (Invitrogen)を用いて、pCR-Blunt II-TOPO プラスミド(Invitrogen)にクローニングした。

表 2-1 クローニング用プライマー

遺伝子名	3'末端側プライマー配列	3'末端側プライマー配列
tac1	GGAGACGCGCATCGTAC- GCGC	CAAGC- TACAATCACACAGAGA
penk	GAATGTGTGTTGGAG- TGTGAG	AGTTTCAAGCAG- TTTATTTAA
penkl	AGTGCAAACCATGTTCTCGC	GCGGACTAA- TAATGTGATGAG
ctip2	CTAGCCGACTATTCCTTGTG	CTCTTTCGAAGGCACTGGG
nkx2.1b	CAGAACAATGTCGATGAGCC	TGTACACATAATCTG- CATCCAC
er81	TCATTA ACTCTGACCTGGCG	TGGGTGTGGGTTACAG- TATC

### *in situ* hybridization

*in situ* hybridization はゼブラフィッシュの稚魚、及び成魚切片に対して、すでに発表されているプロトコルに沿って行われた (Westerfield, 2007)。成魚の脳は 4% PFA で一晩固定した後、80  $\mu$ m の厚さにビブラトームで切片作成を行った。DIG (Roche, Basel, Switzerland) 標識された tac1、penk、ctip2、er81、nkx2.1b の cRNA プローブがハイブリダイゼーション反応のために用いられ、anti-DIG-AP (alkali phosphatase; Roche) で 1~4 時間インキュベートした後、NBT-BCIP (Roche) で発色反応を行った。

二重 *in situ* hybridization では、TSA Plus DNP (AP) system (PerkinElmer, Massachusetts, USA)、anti-DNP-Alexa488 (Invitrogen) を用いた DIG プロー

ブの染色後に、FastRed (Roche) による fluorescein プローブ染色、及び DAPI (Invitrogen) による対比染色を行った。

## 免疫染色

トリカインによって麻酔した成魚を、改変した Bouin 溶液 (Castro et al., 2006) による灌流固定した後ビブラトームで 50  $\mu$ m 切片を作製した。一次抗体として抗 NPY 抗体 (1:1,000 希釈, Sigma Aldrich, Missouri, USA) 及び抗 GFP 抗体 (1:3,000 希釈, Aves Labs, Oregon, USA) を、二次抗体として anti-rabbit IgG-Alexa546 (1:500 希釈, Invitrogen)、anti-chicken IgY-Alexa488 (1:500 希釈, Invitrogen) を用いた。

## 共焦点顕微鏡

二重 *in situ* hybridization 及び蛍光抗体染色の試料は、共焦点レーザー顕微鏡 (LSM510META, Zeiss, Oberkochen, Germany) によって撮影を行った。

## 能動的忌避課題

野生型の雄の 6~12 か月齢の成魚が能動的忌避課題の学習のために使用された。学習に先立って、個々のゼブラフィッシュは一晩 1 リットルタンクに隔離された。本研究で用いられた能動的忌避課題は、先行研究 (Pradel et al., 1999) と同様の条件で行われ、また、実験は防音室内に配置された防音箱 (Muromachi kikai Co., Tokyo, Japan) で行った。ゼブラフィッシュ学習用水槽は白色半透明のアクリル製シャトルボックス (WxDxH: 100 mm x 200 mm x 100 mm、水位: 55 mm) で、ゼブラフィッシュが移動できるよう中央にくぼみを持つ仕切り板で 2 等分された。水槽底部は白色 LED (550 lux) により常時照らされており、ゼブラフィッシュの位置は毎秒 30 フレームで、

カスタムメイドトラッキングシステム(Presence Plus, Banner Engineering Japan, Tokyo, Japan)により同定された。同定された位置情報はオンラインでメインプログラムを制御する PC (MED-PC version IV and SmartCtrl DIG-716P2, Med Associates Inc, Vermont, USA) に送られた。条件付け刺激として、赤色 LED (6V, 19mA) が用いられ、水槽の短辺部に設けられた円形の透明の窓を通じて提示された。非条件付け刺激として低刺激電気ショック (2.5 V AC, ENV-410B, Med Associates Inc) が水槽長辺部に設置されたステンレス製の板を介して与えられた。メインプログラムは SKED 言語 (Neuroscience Co., Tokyo, Japan, 青木田鶴博士により一部改変) によって書かれた。

この学習課題では、ゼブラフィッシュは非条件付け刺激から逃れるために、条件付け刺激が提示されたのち仕切りを超えて反対側のコンパートメントに逃げることを学習する。20 分の適応時間の後、ゼブラフィッシュがいる側のコンパートメントの条件付け刺激が提示される。もし 15 秒以内にゼブラフィッシュが仕切りを超え、反対側のコンパートメントに逃げるができなければ、非条件付け刺激が最大 15 秒間与えられる。ゼブラフィッシュの行動は 3 種類に分類された。ゼブラフィッシュが条件付け刺激の提示後 15 秒以内に反対側のコンパートメントに逃げたものは“Avoidance”行動、条件付け刺激の提示後 15 秒以内には逃げられなかったものの、その後非条件付け刺激が与えられた後 15 秒以内に反対側のコンパートメントに逃げたものは“Escape”行動、最後まで反対側のコンパートメントに逃げなかったものは“Failure”行動に分類された。ゼブラフィッシュが仕切りを超えた瞬間、条件付け刺激、非条件付け刺激はともに止められた。“Failure”行動時には、15 秒間の非条件付け刺激が与えられた後に、条件付け刺激、非条件付け刺激はともに止められた。各試行の終了後、疑似ランダムな試行間間隔 (inter-trial interval) が与えられた ( $15 \pm 5.2$  秒、平均 $\pm$ 標準誤差)。もしゼブ

ラフィッシュが連続する 10 試行の内 8 試行で“Avoidance”行動を示し、また少なくとも 3 回非条件付け刺激を経験していれば、そのセッションは学習済み個体としての基準を満たしていると判断され、学習は終了された。1つのセッションは最大 60 試行からなり、60 試行で学習基準を満たさなかったものに関しては1度そのセッションは終了され、20 分のインターバルの後別のセッションが開始された（ただし、“Failure”行動を 58 回以上示した個体を除く）。2 度目のセッションでも学習基準を満たさなかった個体は使用されなかった。

### 電気的方法による組織のアブレーション

実験に使用したゼブラフィッシュは 0.02 %トリカインで麻酔した後、飼育水を含むデイスシュの上に移し、湿らせたキムワイプを巻いた手製のホルダーにより固定された。手術中、ゼブラフィッシュの生存及び麻酔を保つため、0.02%トリカインを含む飼育水が常に経口で灌流された。学習前にアブレーションを行う実験では、能動的忌避行動課題を学習済みの個体の頭蓋の、神経活動中心あるいはシャム手術部位上に、マイクロドリル (omniDrill35, World Precision Instruments, Florida, USA) を用いて小さな穴があげられた。学習後にアブレーションを行う実験では、終脳上の頭蓋にマイクロブレード (37-5920, ROBOZ, Maryland, USA) を用いて小さな穴があげられた。両実験ではともに、絶縁されたタングステン微小電極 (先端径 1~2  $\mu\text{m}$ , TM33B01, World Precision Instruments) が脳定位固定装置 (SR6-M, Narishige, Tokyo, Japan) 上の電極用ホルダーに固定され、対象位置の脳表面から 50  $\mu\text{m}$  の深さに位置を合わせられた。対象位置は、InversePericam のイメージング (図 2-4) から得られた活動中心の位置に相当する、手綱核の位置から  $0.0102 \times [\text{体長}]$  側部方向に、 $0.0224 \times [\text{体長}]$  前部方向に進んだ位置であった。電極はアイソレーター (ISO-Flex, A.M.P.I., Jerusalem, Israel) の陰極へ接続され、陽極はワニロクリップを介して湿

ったキムワイプで覆われたディッシュ壁部へ接続された。この電極を介して、両側に 30  $\mu$ A の電流を 8 秒間与えることでアブレーションを行った。また、学習前にアブレーションを行った実験では、アブレーション後に開口部をイオンビーム照射済み手術用テフロンシート (Takahashi et al., 2007a, 2007b) で被い、手術用接着剤 (アロンアルファ A, Daiichi Sankyo, Tokyo, Japan) により密閉した。学習後にアブレーションを行った実験では、開口部は 0.05% フェノールレッドで着色した 2% low-melting agar (NuSieve GTG Agarose, CAMBREX, New Jersey, USA) で塞がれ、その上にイオンビーム照射済み手術用テフロンシートが手術用接着剤によって貼られた。対照実験のためのシャム手術は、アブレーションの対象位置が終脳背側の最前部であるという点を除き、すべて同じように行われた。手術後のゼブラフィッシュは抗生物質 (Antibiotic-Antimycotic, Invitrogen) を加えた魚用リンゲル液中で一晩維持された。手術されたゼブラフィッシュで、麻酔から回復後に異常な行動を示す個体はいなかった。行動テスト後の個体の脳はすべて取り出され、4% PFA / 0.1 M PBS 中で 4°C で 16 時間固定され、ビブラトームで 80  $\mu$ m の切片を作製した後ニッスル染色を行い、アブレーション箇所の同定を行った (アブレーション位置については後述)。



## 2.3 結果

線条体は前述のように試行錯誤によって適切な行動を習得していく強化学習に重要な役割を果たす領域であることが知られているが、ゼブラフィッシュにおいてすでに確立された強化学習の行動パラダイムに、能動的忌避課題がある(図 2-4A)。能動的忌避課題は、ゼブラフィッシュを 2 つのコンパートメントに分かれた水槽に入れ、魚がいる側での赤色 LED の点灯から 15 秒間同じコンパートメントに留まった際に電気ショックを与えることで、赤色 LED を手掛かりとして反対側のコンパートメントに忌避することを学習させる学習課題である。能動的忌避課題の学習は、強化学習の一種であり、ゼブラフィッシュは苦痛からの解放を正の強化因子として用いて試行錯誤により忌避行動を改善していくことが要求される。共同研究者である青木田鶴博士は、カルシウム感受性蛍光タンパクであり、カルシウム濃度の上昇に応じて蛍光強度が減少する InversePericam を HuC プロモーターの制御下で神経細胞に発現させた遺伝子組換えゼブラフィッシュである HuC:IP 系統(Li et al., 2005)の成魚に能動的忌避課題を学習させた。24 時間後、それらのゼブラフィッシュにニコチン性アセチルコリン受容体の拮抗性阻害剤であり、筋弛緩剤として働く d-ツボクラリンを皮下注入し、頭蓋を手術により取り除いて脳を露出させたのち落射顕微鏡下で脳表面の蛍光イメージングを行ったところ、終脳の一部の領域で、赤色 LED に対する反応が蛍光強度の低下として観察された(図 2-4B、Learner 24 h)。これらの蛍光強度変化は能動的忌避課題学習後に特異的であり、赤色 LED の提示のみ(Cue-alone)や、電気ショックのみ(Shock-alone)を与えられた魚、あるいは学習後 30 分(Learner 30 min)の魚では観察されなかった。また、赤色 LED と電気ショックをランダムに与えられた魚でも、同様の活動は観察されなかった(Cue-Shock unpaired)。このことから、観察された神経活動は能動的忌避課題の学習に特異的なことが示唆された。この実験では、自由に泳いでいる状態と筋弛緩剤を投与されて固定された状態という違いはあるものの、

能動的忌避課題中の、状況に応じた適切な行動の選択に伴う神経活動が、終脳に存在することを示唆している。また、これらの神経活動が行動学習の 24 時間後には観察されたが、30 分後には観察されなかったことから、これらの活動は、長期的に保存された行動プログラムの想起に関わっていることが示唆された。しかしながら、これらの学習に 관련된 神経活動の変化が実際に行動に対して因果関係を持つかどうかはこの実験からはわからず、それを確認するためには実際に活動が観察された領域の神経細胞の活動を変化させ、行動への影響を調べる必要があった。

著者は、これらの領域と、状況に応じた適切な行動の選択との因果関係を調べるため、電気的アブレーション (ablation) による局所的破壊実験の手技を開発し、学習された行動へ及ぼす影響を調べた。電気的アブレーションとは、電極を介して流れる電流により熱が発生することで細胞にネクロシスを起こし、機能を阻害する手法である。トリカインによる麻酔をかけたゼブラフィッシュを手術用ホルダーに固定し、マイクロブレードを用いて頭蓋に穴をあけた後、極細の絶縁タングステン電極をゼブラフィッシュ脳表面より 50  $\mu\text{m}$  挿入し、陰極側に設定して 30  $\mu\text{A}$  の電流を 8 秒間流すことでアブレーションを行った。アブレーション処置後、頭蓋の穴はイオンビーム照射済みテフロンシートで覆われ、手術用アロンアルファで塞がれた。麻酔から回復させたのち、ゼブラフィッシュは抗生物質を含むリンガー溶液中に戻された。アブレーション位置は、前述の共同研究者による InversePericam イメージング (図 2-4B) の蛍光強度変化の値を加重平均することにより決定された。実験終了後に 4%PFA で固定した脳からビブラトームにより切片を作製し、ニッスル染色を行った。ニッスル染色は細胞体が染色され、その細胞体の大きさが大きいものが神経細胞、小さいものがグリア細胞として区別可能である。電気的アブレーションに伴い、熱による損傷のための神経細胞の脱落、及びその回復のためのグリア細胞の増加が

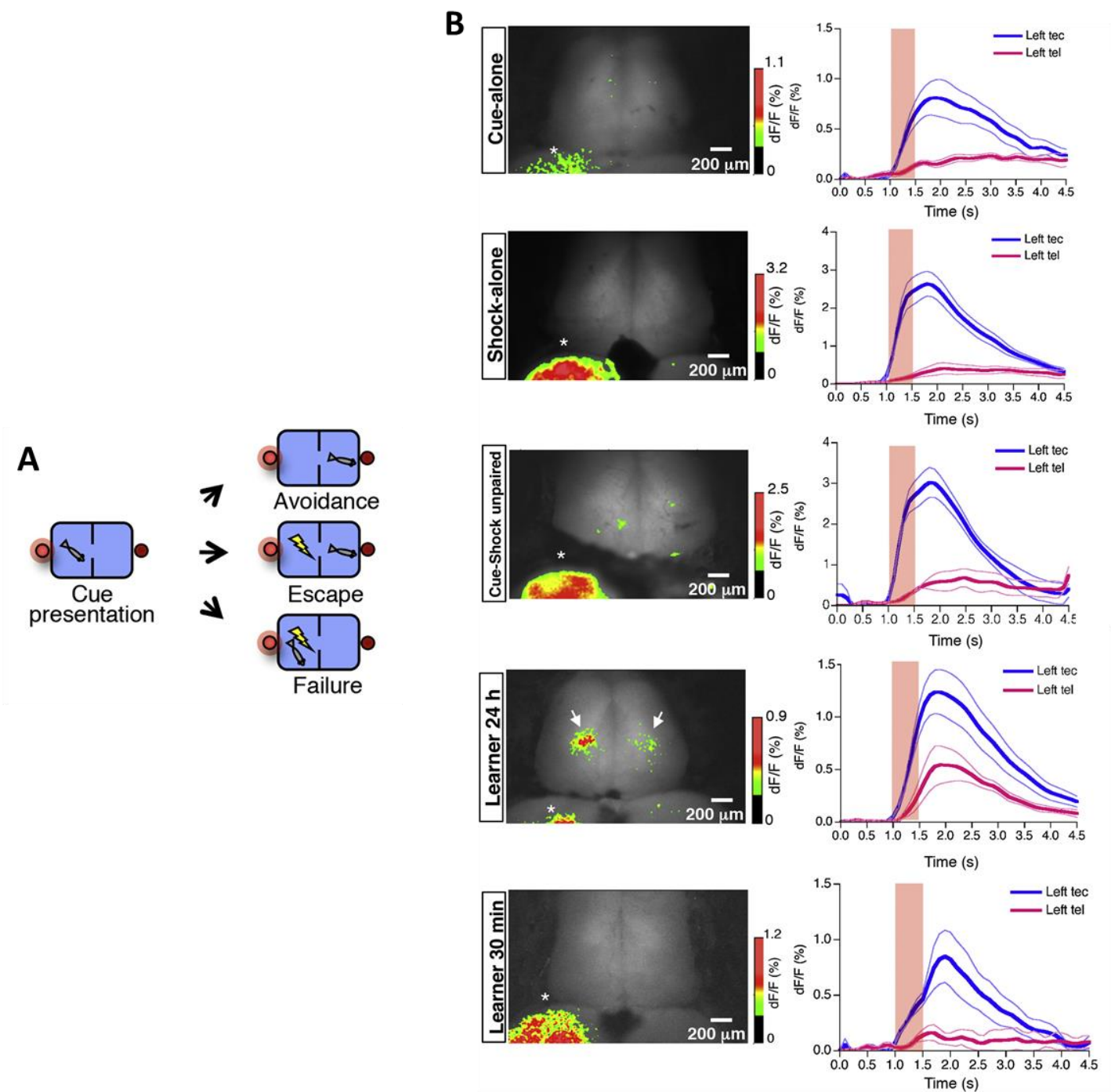


図 2-4. ゼブラフィッシュ終脳における記憶の想起に伴うカルシウム信号の可視化実験(共同研究者の青木田鶴博士のデータより、Aoki *et al*, (2013) *Neuron*, volume 78, page882 の図 1 及び page884 の図 2 を改変)  
(次ページへ続く)

(図 2-4 続き)

(A) ゼブラフィッシュ能動的忌避課題では、赤色 LED が条件付け刺激としてゼブラフィッシュがいる側のコンパートメントで、最大 30 秒間提示された。3 種類の反応は 3 種類に分類された。ゼブラフィッシュが条件付け刺激の提示 (Cue presentation) 後 15 秒以内に反対側のコンパートメントに逃げたものを“Avoidance”行動、条件付け刺激の提示後 15 秒以内には逃げられなかったものの、その後非条件付け刺激 (電気ショック) が与えられた後 15 秒以内に反対側のコンパートメントに逃げたものは“Escape”行動、最後まで反対側のコンパートメントに逃げなかったものは“Failure”行動に分類された。

(B) 能動的忌避課題学習後個体の、InversePericam によるカルシウムイメージング

(左): 各実験条件における蛍光強度の変化率 ( $dF/F$ ) の例。画像は視覚刺激呈示から 1 秒後に取得されたもの。星印は視蓋における活動を示す。矢印は学習から 24 時間経過後のゼブラフィッシュ終脳に特異的な活動スポットを示す。(Cue-alone: 学習の際に条件付け刺激 (赤色 LED) のみを提示した群; Shock-alone: 学習の際に非条件付け刺激 (電気ショック) のみを提示した群; Cue-Shock unpaired: 学習の際に条件付け刺激と非条件付け刺激がランダムに提示された群; Learner 24 h: 能動的忌避課題の学習成立から 24 時間後にイメージングを行った群; Learner 30 min: 能動的忌避課題の学習成立から 30 分後にイメージングを行った群。)

(右): 各実験条件での左視蓋 (Left tec: 青) 及び左終脳 (Left tel: ピンク) における蛍光強度の経時的変化を平均化したもの。平均  $\pm$  標準誤差がプロットされている。赤い影は刺激の呈示期間 (1 - 1.5 秒) を示す。統計処理に使用された個体数は、Cue-alone が 6 個体、Shock-alone が 4 個体、Cue-shock unpaired が 5 個体、Learner 24hr が 7 個体、Learner 30 min が 4 個体。

起こるといわれている、それらの知見と一致して、およそアブレーションの中心から半径およそ 150  $\mu\text{m}$  の範囲で、神経細胞の欠落、及びグリオースと呼ばれる、グリア細胞の局所的な増加が観察された(図 2-5B、Ablated、Posterior)。このことから、局所的に神経細胞を破壊することができたと判断された。この手法をもちいて、能動的忌避課題学習前及び後のゼブラフィッシュの活動中心に対応する脳表面領域をアブレーションした(図 2-5A)。また、対照実験として、今回学習に伴う活動の増加が観察されなかった終脳の最前部をアブレーションするシャム(sham)手術を行った(図 2-5E)。シャム手術による破壊が活動中心から離れた位置にのみ起こっていることも、同様にニッスル染色により確認された(図 2-5B)。

著者らは確立されたアブレーション手法を用いて手術を施し、翌日に能動的忌避課題の訓練を行ったうえで、学習が成立した個体に対し、学習の短期(30 分)後と長期(24 時間)後に記憶の想起を比較した(図 2-5A1)。成績は、基準(連続する 10 試行のうち、8 試行以上で 15 秒以内に忌避行動をとる)に達するまでに要した試行数を調べることで定量的に評価された。結果、活動中心におけるアブレーションを行ったゼブラフィッシュ(abl)が基準に達するまでに要した試行数は、シャム手術を行ったゼブラフィッシュ(sham)と比較して、学習中は第 1 セッション(S1)、第 3 セッション(S3)共に有意な差は見られなかった(図 2-5C、sham S1 と abl S1 の比較で p 値は 0.2642、対応の無い t 検定; sham S3 と abl S3 の比較で p 値は 0.3659、対応の無い t 検定)。更に、短期記憶(short term memory:以下 STM とする)を調べるために学習成立後 30 分経過した魚で同様の能動的忌避課題について電気刺激を与えない条件で行い、課題の成績をテストしたところ、やはり活動中心でアブレーションを行ったゼブラフィッシュとシャム手術を行ったゼブラフィッシュの間で基準に達するまでの試行数に有意差は観察されなかった(図 2-5C、sham STM と abl STM の比較で p 値は

0.2604、対応の無い t 検定)。しかしながら、長期記憶(long term memory:以下 LTM とする)を調べるために学習成立後 24 時間経過したゼブラフィッシュで同様のテストを行い基準に達するまでの試行数を確認したところ、活動中心でアブレーションを行ったゼブラフィッシュでは、シャム手術を行ったゼブラフィッシュと比較して、基準に達するまでに要した試行数が有意に増加、すなわち記憶の低下が観察された(sham LTM と abl LTM の比較で p 値は 0.0266、対応の無い t 検定)。これらの結果から、活動中心にアブレーションを行ったゼブラフィッシュでは、長期的な記憶のみが損なわれており、短期的な記憶は保持されたままであることが明らかになった。また、手術後のゼブラフィッシュが効率よく課題の学習を遂行できたことから、手術処置に伴う視覚系の損傷や痛覚認識は最小限であったと推測された。加えて、手術前後のゼブラフィッシュの行動量を、学習装置内での仕切りを超える回数、及び移動距離を比較することで検討したところ、有意な差は見られなかった(図 2-6A、B)。これらの事実から、活動中心のアブレーションは視覚系の損傷や痛覚認識によるものではなく、また単純に行動量の低下によるものでもなく、能動的忌避課題の長期的記憶を特異的に低下させていることが示唆された。

更に、活動中心が訓練によって学習された忌避行動記憶の記銘(encoding)に関わっているのか、維持または想起に関わっているのかを調べるため、学習後の個体にアブレーションを行った。学習が成立した個体に対し、訓練終了後 5 時間経過した後にアブレーションを行い、24 時間後に記憶の想起を再検証する(図 2-5A2)実験を行ったところ、アブレーションを行ったゼブラフィッシュでは、手術後(after)に、手術前(before)と比べて有意に基準に達するまでに要した試行数が増えていた(図 2-5D、before(セッション 3 の平均)では 9.6 回に対し、after(テストセッションの平均)では

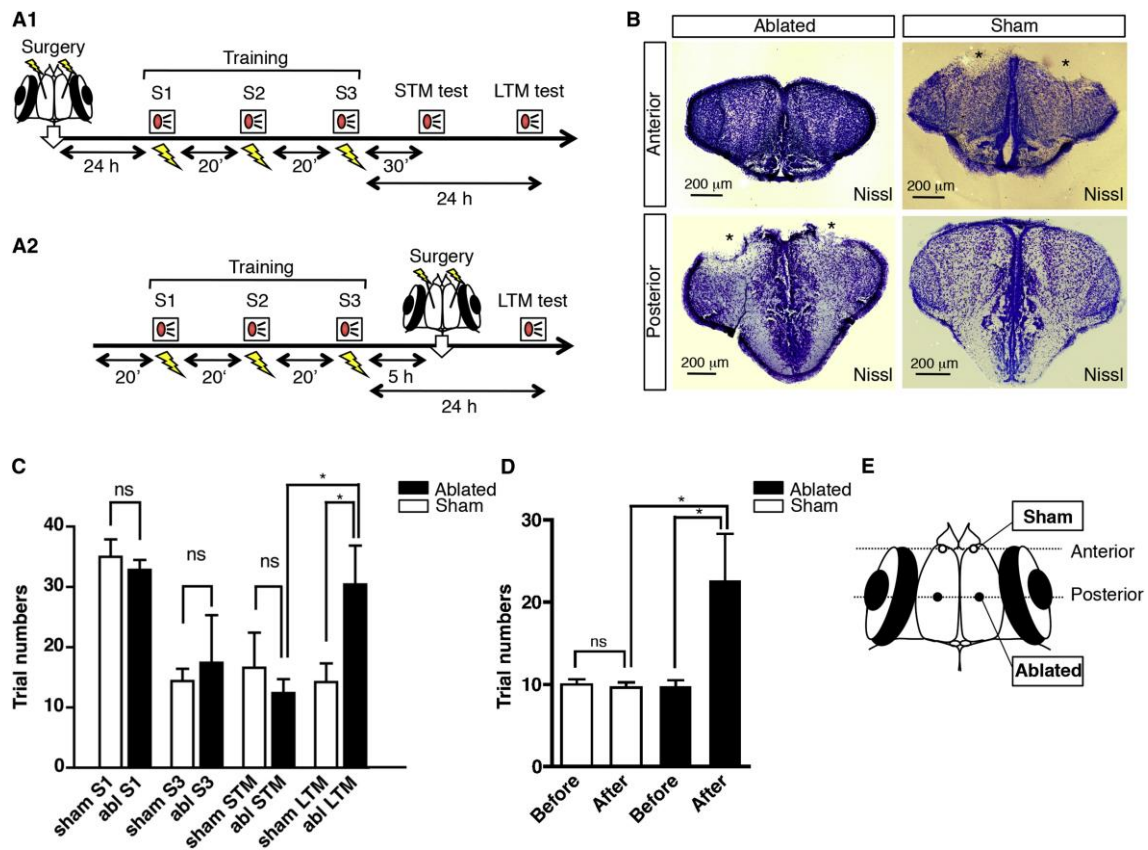


図 2-5. 活動領域の損傷により長期的に保存された忌避行動の想起が損なわれる

(A1) 学習前にアブレーションを行った際の実験手順。第 1 日目にゼブラフィッシュは手術を受け、一晚回復させたのちに能動的忌避課題の訓練を行った。短期記憶 (short-term memory: STM) は学習の最終セッション終了後 30 分経過してから、長期記憶 (long-term memory: LTM) は 24 時間経過後にそれぞれテストされた。S1 はセッション 1 を、S2 はセッション 2、S3 はセッション 3 をそれぞれ示す。

(A2) 学習後にアブレーションを行った際の実験手順。ゼブラフィッシュはまず能動的忌避課題を学習したのち、5 時間後に手術を受けた。記憶保持のテストは学習の最終セッションから 24 時間後に行われた (LTM test)。S1 はセッション 1 を、S2 はセッション 2、S3 はセッション 3 をそれぞれ示す。

(次ページへ続く)

(図 2-5 続き)

(B)活動中心をアブレーションした個体、及びシャム手術を受けた個体の例。切片の位置は(E)に示す。前方部(シャム手術の位置)及び後方部(活動中心の位置)の coronal (coronal)切片のニッスル染色像。星印はアブレーション部位を示す。

(C)学習前のアブレーションは長期記憶の獲得には影響するが短期記憶には影響しない。各条件における平均±標準誤差を示す。S1 はセッション 1 を、S2 はセッション 2、S3 はセッション 3 を、STM は短期記憶(30 分後)を、LTM は長期記憶(24 時間後)をそれぞれ示す。シャム手術を受けた個体(sham)は 5 個体、アブレーション手術を受けた個体(abl)は 5 個体が統計処理に使用された。基準に達するまでに要した試行数の平均は sham S1 と abl S1 でそれぞれ 35 回、32.8 回、sham S3 と abl S3 で 14.4 回と 17.4 回、sham STM と abl STM で 16.6 回と 12.4 回、sham LTM と abl LTM で 14.2 回と 30.4 回であった。sham S1 と abl S1 の比較で p 値は 0.2642、sham S3 と abl S3 の比較で p 値は 0.3659、sham STM と abl STM の比較で p 値は 0.2604、sham LTM と abl LTM の比較で p 値は 0.05 未満、abl STM と abl LTM の比較で p 値は 0.05 未満、sham STM と sham LTM の比較で p 値は 0.3641 であった(検定はいずれも対応の無い t 検定)。

(D)学習成立から 24 時間後にアブレーションした個体の忌避行動の想起 各条件における平均±標準誤差を示す。シャム手術を受けた個体(sham)は 8 個体、アブレーション手術を受けた個体(abl)は 14 個体が統計処理に使用された。基準に達するまでに要した試行数の平均はシャム手術の前(sham before)と後(sham after)でそれぞれ 10 回と 9.6 回、活動中心のアブレーション実験の前(abl before)と後(abl after)で 9.6 回と 23.6 回であった。sham before と sham after の比較は p 値が 0.35(対応のある t 検定)。ablated before と ablated after の比較は p 値が 0.05 未満(対応のある t 検定)。sham after と ablated after の比較は p 値が 0.05 未満(対応の無い t 検定)。

(E)アブレーション部位を示した図。黒点が活動中心のアブレーション部位を、白点がシャム手術におけるアブレーション部位を示す。



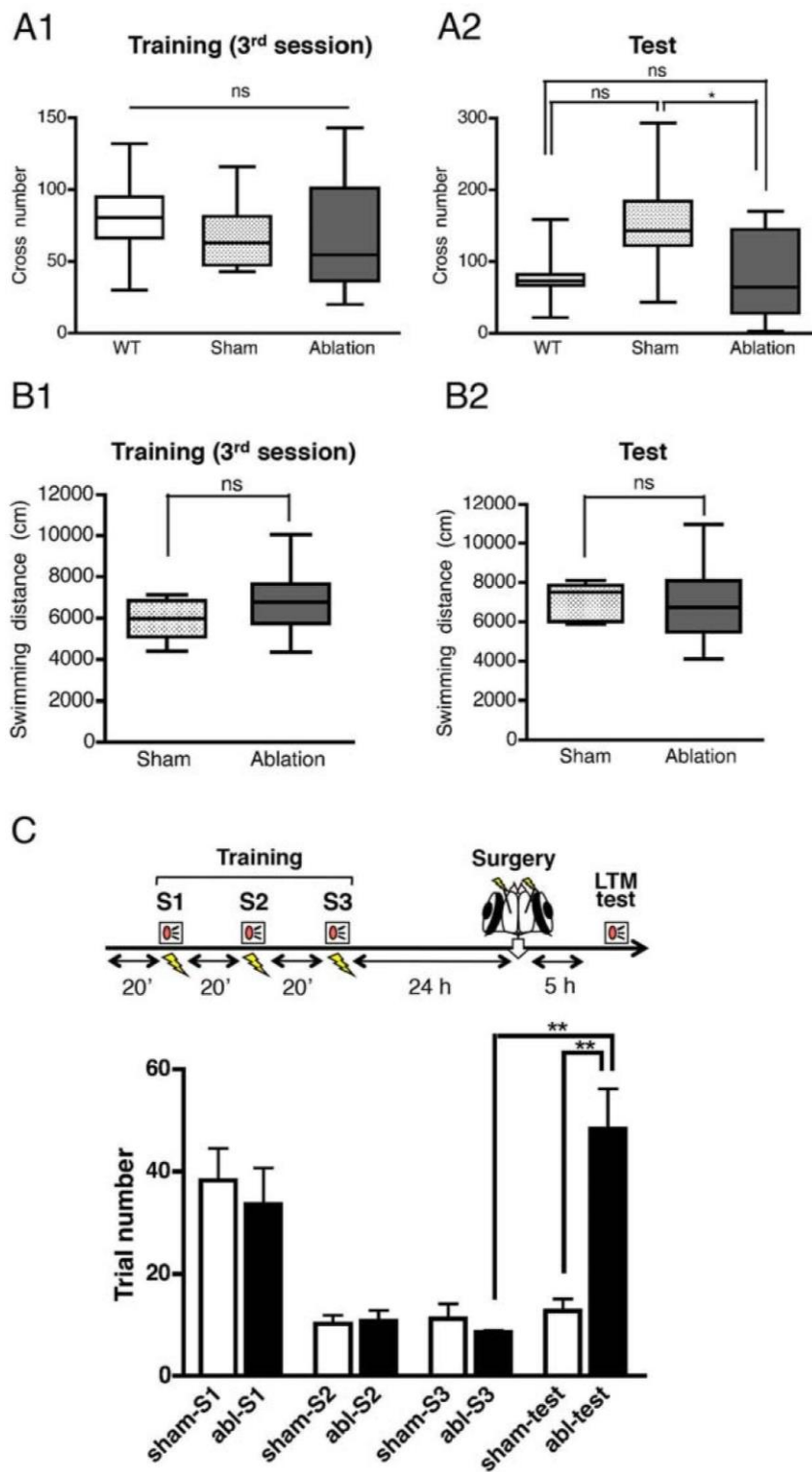


図 2-6. 手術による行動の変化と長期記憶に及ぼす影響  
(次ページへ続く)

(図 2-6 続き)

(A1) 第 3 セッションでゼブラフィッシュが中央の仕切りを超える回数 (cross number) は野生型 (WT)、シャム手術を受けた個体 (sham)、活動中心をアブレーションした個体 (abl) で、有意差はなかった。(p 値は 0.5086、one-way ANOVA による検定。シャム手術を受けた個体は 8 個体、アブレーション手術を受けた個体は 14 個体、野生型は 7 個体が統計処理に使用された)

(A2) テストセッションでゼブラフィッシュが中央の仕切りを超える回数は野生型とシャム手術を受けた個体で有意差はなかったが、シャム手術を受けた個体と活動中心をアブレーションした個体では有意差が見られた。(p 値は 0.05 未満、one-way ANOVA と Bonferroni's multiple comparison test による検定。シャム手術を受けた個体は 8 個体、アブレーション手術を受けた個体は 14 個体、野生型は 7 個体が統計処理に使用された。しかしながら、重要なことに、野生型とアブレーション、及び野生型とシャム手術を受けた個体の間には有意差は見られなかった。(p 値は 0.05 未満、one-way ANOVA と Bonferroni's multiple comparison test による検定)

(B1) 第 3 セッションでゼブラフィッシュが泳いだ距離 (Swimming distance) はシャム手術を受けた個体、活動中心をアブレーションした個体で、有意差はなかった。(p 値は 0.15、対応の無い t 検定による検定。シャム手術を受けた個体は 8 個体、アブレーション手術を受けた個体は 14 個体が統計処理に使用された。)

(B2) テストセッションでゼブラフィッシュが泳いだ距離はシャム手術を受けた個体、活動中心をアブレーションした個体で、有意差はなかった。(p 値は 0.994、対応の無い t 検定による検定。シャム手術を受けた個体は 8 個体、アブレーション手術を受けた個体は 14 個体が統計処理に使用された。)

(C) 上: 実験手順。ゼブラフィッシュは 3 セッションの能動的忌避課題の訓練を行った。24 時間後に手術が行われ、手術から 5 時間後、長期記憶を確認するためのテストが行われた。sham はシャム手術を受けた群を、abl はアブレーション手術を受けた群を、S1 はセッション 1 を、S2 はセッション 2 を、S3 はセッション 3 をそれぞれ示す。下: 各条件における平均±標準誤差を示す。活動中心をアブレーションされた個体は記憶の想起が損なわれた。(abl-S3 と abl-test の比較では、p 値は 0.01 未満 (対応のある t 検定)、sham-test と abl-test の比較では、p 値は 0.01 未満 (対応の無い t 検定)。シャム手術を受けた個体は 4 個体、アブレーション手術を受けた個体は 5 個体が統計処理に使用された。

23.6 回、p 値は 0.025 (対応のある t 検定))。対照的に、シャム手術を行った個体では有意な差は見られなかった (before (セッション 3 の平均) では 10 回に対し、after (テストセッションの平均) では 9.6 回、p 値は 0.35 (対応のある t 検定))。また、アブレーションを学習成立後 24 時間経過してから行った個体でも、同様に記憶の低下が観察された (図 2-6C)。これらの実験結果から、活動中心は長期的な記憶の保持もしくは想起に必要であることが示された。

今回活動中心として同定された領域は Dc (central zone of the dorsal telencephalic area) と呼ばれる領域の一部であり、外套の構造を哺乳類と比較した結果から、哺乳類における皮質に相同な領域だと考えられている (Mueller and Wullimann, 2009)。これらの仮説に基づいて、この活動領域が線条体に対して投射しており、哺乳類における皮質から線条体への投射に対応していることが予想される。

共同研究者である青木田鶴博士、及び木下雅恵博士により、上記活動中心領域の神経細胞の投射先が調べられた。この実験では能動的忌避課題の学習成立後のゼブラフィッシュ終脳からパッチクランプ法により電気生理的に神経活動を記録した後、記録用のガラスピペットを用いて神経細胞染色用トレーサーである neurobiotin を注入して染色を行い、細胞の形態、及びその細胞がどの領域に対して投射するかが調べられた。その結果、学習成立後に視覚刺激に対して応答するグルタミン酸作動性神経細胞の、終脳の外套下部 (subpallium) に位置する終脳腹側部背側核 (dorsal nucleus of area ventralis telencephali; 以下 Vd とする) に対する投射が確認された。Vd は哺乳類における線条体の相同機関であると提唱されている (Rink and Wullimann, 2001; Mueller et al., 2008) ものの、成魚におけるマーカー遺伝子の発現や神経細胞の形態などを含めた詳細な解析は未だなされていなかった。そこで、

著者はゼブラフィッシュにおける Vd が哺乳類における線条体の相同領域であることをより詳細に確認するため、まず各遺伝的マーカーの発現を確認した。

哺乳類の線条体において、線条体の細胞はガンマアミノ酪酸 (gamma-Aminobutyric acid; 以下 GABA とする) 作動性であることが知られている。また、直接経路、間接経路の投射神経細胞はそれぞれペプチドのサブスタンス P、エンケファリンを特異的に発現することが知られている (Gerfen et al., 1990)。また、両者は転写因子の *ctip2* を発現知られていることが知られている (Arlotta et al., 2008)。そこでサブスタンス P、エンケファリンそれぞれの前駆体であるマウスのタキキニン (tachykinin) 1 及びマウスのプロエンケファリン (proenkephaline) の相同遺伝子を Ensemble (<http://www.ensembl.org/index.html>) のゲノムデータベース上から、アノテーションとマウス由来配列を用いた BLAST 検索により探索した。その結果、マウスのタキキニン 1 に関してはゼブラフィッシュ *tac1* が、マウスのプロエンケファリンに関してはゼブラフィッシュ *penk* とゼブラフィッシュ *penkl* (*penk-like*) の2つが相同遺伝子であることを見出した。これらの遺伝子の成魚脳における発現パターンを調べるため *in situ* hybridization を行ったところ、前述した Vd に発現が確認された (図 2-7 A - D)。

さらに、二重 *in situ* hybridization によりこれらの遺伝子の共局在を調べたところ、Vd 内の *tac1*、*penk*、*penkl* それぞれのシグナルは重ならず、これらの遺伝子を発現している細胞はそれぞれ異なる細胞であることも明らかになった (図 2-7E-G)。同様の方法で哺乳類の *ctip2* 遺伝子の相同遺伝子であるゼブラフィッシュ *ctip2* もクロ-

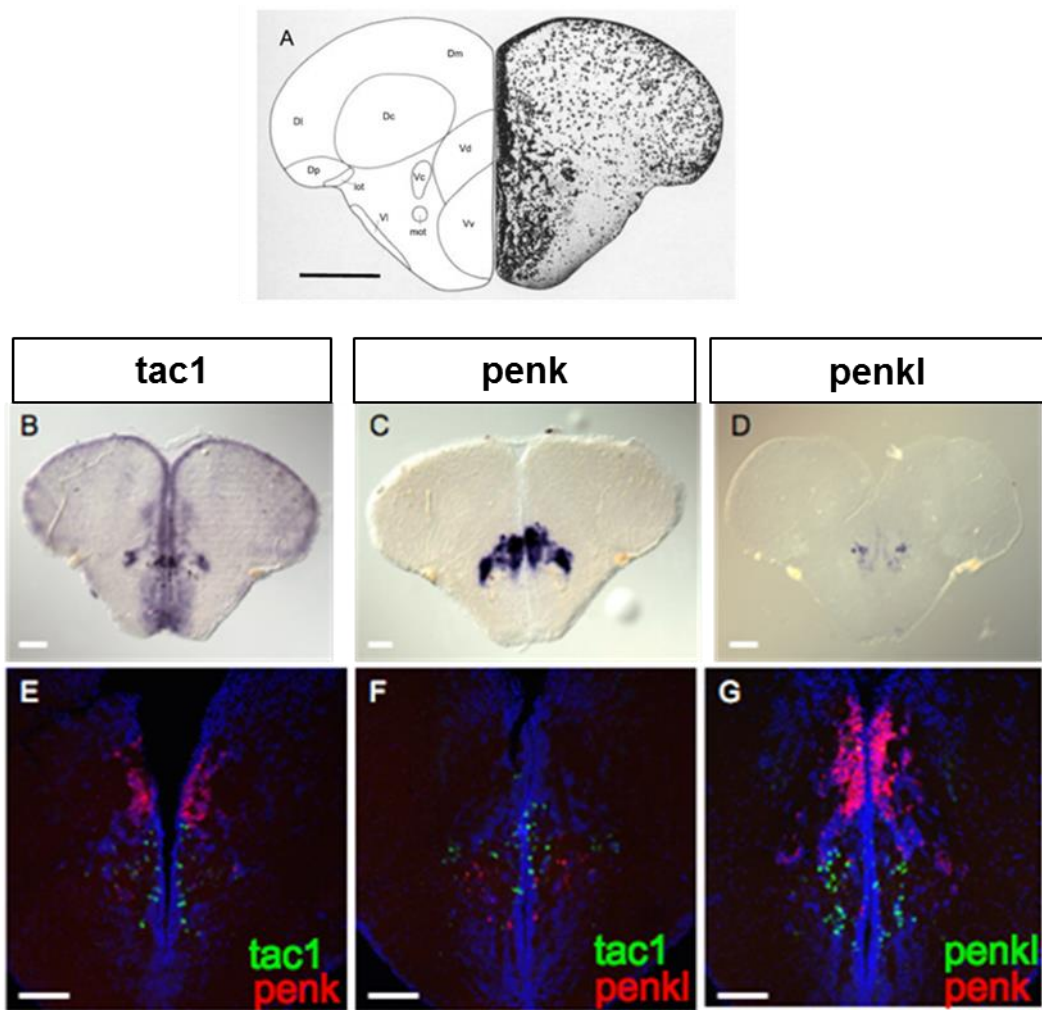


図 2-7. **tac1**、**penk**、**penkl** の終脳における発現

(A) ゼブラフィッシュ終脳の各領域 (Zebrafish Brain Atlas より) (校正棒 = 300  $\mu\text{m}$ )

(B - D) **tac1** (B), **penk** (C), **penkl** (D) *in situ* hybridization 像 (校正棒 = 100  $\mu\text{m}$ )

(E - G) 二重 *in situ* hybridization 像 (校正棒 = 100  $\mu\text{m}$ )

ニングを行い、*in situ* hybridization を行ったところ、これらの遺伝子を発現している領域を包括する領域に発現が確認された(図 2-8)。

また、これらの特性に関わる遺伝子の、ゼブラフィッシュにおける相同遺伝子の発現を確認すべく、GABA 作動性神経細胞のマーカーである *gad65*、*gad67* (Mueller and Guo, 2009) の発現を *in situ* hybridization により確認したところ、Vd 内の発現が確認された。一方グルタミン酸作動性神経細胞のマーカーである *vglut1*、*vglut2.1*、*vglut2.2* (Higashijima et al., 2004) の発現は、Vd 内には確認されなかった(図 2-9)。

これらの発現結果により、Vd に存在する *tac1* 陽性細胞がゼブラフィッシュにおける線条体の直接経路の投射神経細胞、*penk*、及び *penkl* 陽性細胞がゼブラフィッシュにおける、線条体の間接経路の投射神経細胞であることが示唆された。

この推論をさらに領域間の投射関係の保存性の観点から検証すべく、GAL4-UAS システムを利用した、*tac1* 陽性細胞特異的な遺伝子組換え系統の作成を試みた。まず著者はゲノムデータベース (Ensemble; <http://www.ensembl.org/index.html>) から、*tac1* のコード領域を含む BAC clone を検索し、そのうちの一つである *zC135B21* を同定した。次に、*zC135B21* 内に存在する *tac1* コード領域の翻訳開始部位に *gal4vp16/poly(A)* 配列を相同組換えにより導入した。作製した BAC コンストラクトを、一細胞期の細胞質にインジェクションし、得られた F0 世代個体を Tg (*UAS:EGFP*) 系統と掛け合わせ、生まれた F1 世代の稚魚から終脳腹側部の蛍光を指標にスクリーニングを行った。その結果、遺伝子組換え系統を得ることに成功した。

Tg (*tac1:gal4*; *UAS:EGFP*) の成魚脳における EGFP 発現パターンを調べたところ



図 2-8. **ctip2** の終脳における発現

**ctip2** は Vd の **tac1**、**penk** 陽性領域を包括する領域に発現している。(校正棒 = 100  $\mu$ m)

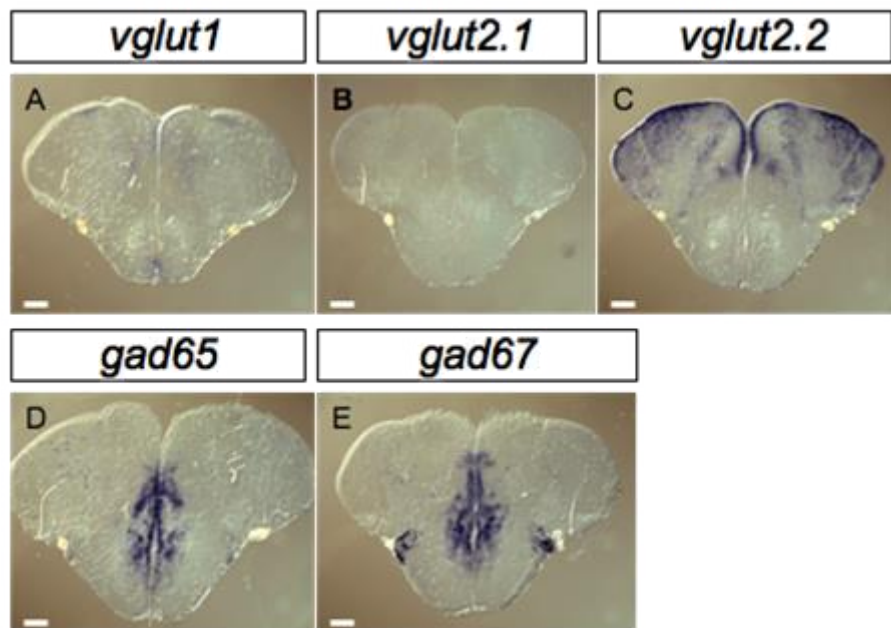


図 2-9. 神経伝達物質のマーカ遺伝子の発現

(A - C) グルタミン酸作動性神経細胞のマーカ遺伝子である、*vglut1* (A)、*vglut2.1* (B)、*vglut2.2* (C) の *in situ* hybridization 像

(D, E) GABA 作動性神経細胞のマーカ遺伝子である、*gad65* (D) と *gad67* (E) の *in situ* hybridization 像 (校正棒 = 100  $\mu$ m)



ろ、内在性の *tac1* とよく似た発現パターンが観察された(図 2-10A)。さらにこれらの細胞群は、腹側外側に線維をのばしており、NPY 陽性領域として知られる脚内核(entopeduncular nucleus)に対する投射が観察された(Castro et al., 2006)。この観察結果から、ゼブラフィッシュにおける Vd から脚内核への投射に相当するのが、哺乳類における線条体から淡蒼球への投射であるのではないかと推測された(図 2-10B)。

脚内核は GABA 作動性神経細胞特異的なマーカー遺伝子である *gad67* の発現より、哺乳類の淡蒼球に相同である可能性が示唆されてきた(Mueller and Guo, 2009)が、より特異的な遺伝的マーカー、及び投射関係に基づく実証はされていなかった。上記の仮説を遺伝子の発現パターンの進化的保存性の観点から検討すべく、哺乳類における淡蒼球の遺伝的マーカーである *er81*、*nkx2.1* (Nóbrega-Pereira et al., 2010) のゼブラフィッシュ相同遺伝子のクローニングを行い、*in situ* hybridization で発現を確認した。その結果、*er81*、*nkx2.1* は共に脚間核特異的に発現していることが確認された(図 2-11)。これにより、投射関係、及び遺伝的マーカーの両観点から、ゼブラフィッシュにおける Vd から脚間核への投射が、哺乳類における線条体から淡蒼球への投射に対応していることが示唆された。

さらに NPY 陽性細胞の投射関係をより詳細に観察するために、NPY の CDS を含む BAC を用いた BAC 遺伝子組換え系統である、*Tg(npy:GAL4VP16)* 系統を作製した。この系統を *Tg(UAS: GFP)* 系統と掛け合わせた結果、内在性の NPY と一致して、EGFP の発現が観察された(図 2-12)。この系統における EGFP 陽性ファイバーの投射先を解析したところ、小細胞性視索前核後部(*posterior part of parvocellular preoptic nucleus*、以下 PPp と表記)に対する投射が観察された。PPp

はその機能的分類についてあまり良く分かっていないが、間脳に属すると考えられており、哺乳類の淡蒼球の投射先である視床 VL/VA の硬骨魚類における相同領域である可能性は高い。また、これらの GFP 陽性繊維は手綱核へは投射をしていなかった。

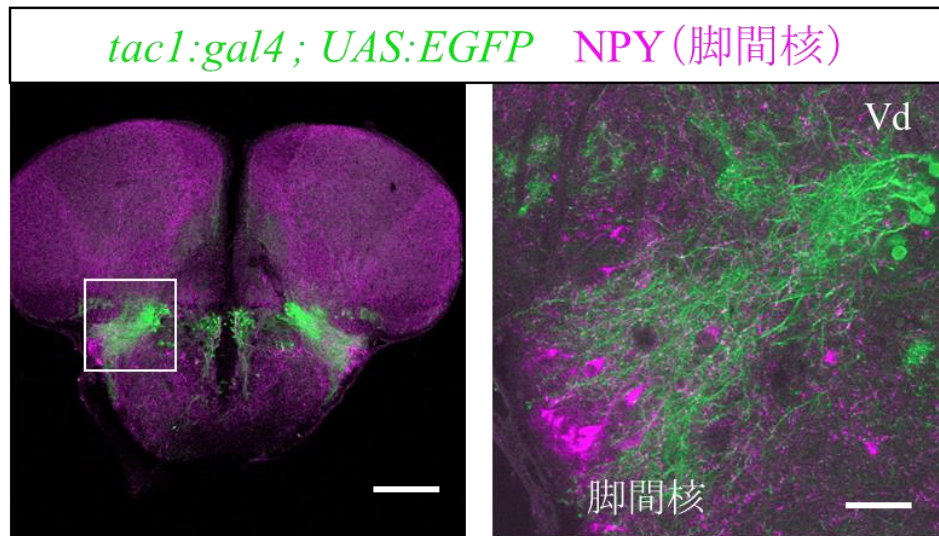
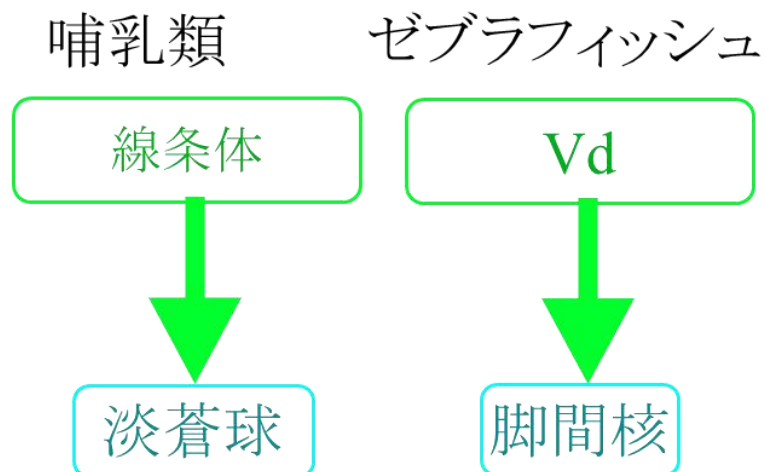
**A****B**

図 2-10. **Tg(tac1:GAL4VP16; UAS:GFP)** の発現パターン

(A 左) : *tac1:gal4; UAS:EGFP* 系統の抗 NPY 染色像 (校正棒 = 200  $\mu\text{m}$ )。

(A 右) : 左の四角で囲まれた部分の拡大像。Gal4 陽性細胞 (緑) から NPY 陽性の脚間核 (マゼンタ) への繊維状構造の投射 (校正棒 = 50  $\mu\text{m}$ )

(B) 哺乳類とゼブラフィッシュの脳基底核の相同領域間の投射関係

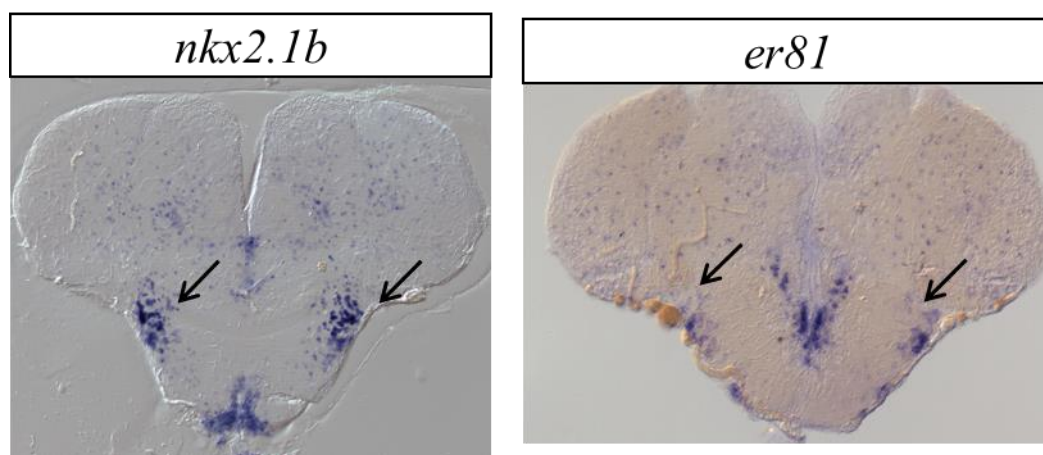


図 2-11. 淡蒼球のマーカー遺伝子の *in situ* hybridization

(左): *nkx2.1b* のゼブラフィッシュ終脳における発現パターン。外套部にまばらに存在するほか、脚内核(矢印)に特に強い発現が見られる。

(右): *er81* の発現パターン。外套部にまばらに存在するほか、脚内核(矢印)に特に強い発現が見られる。

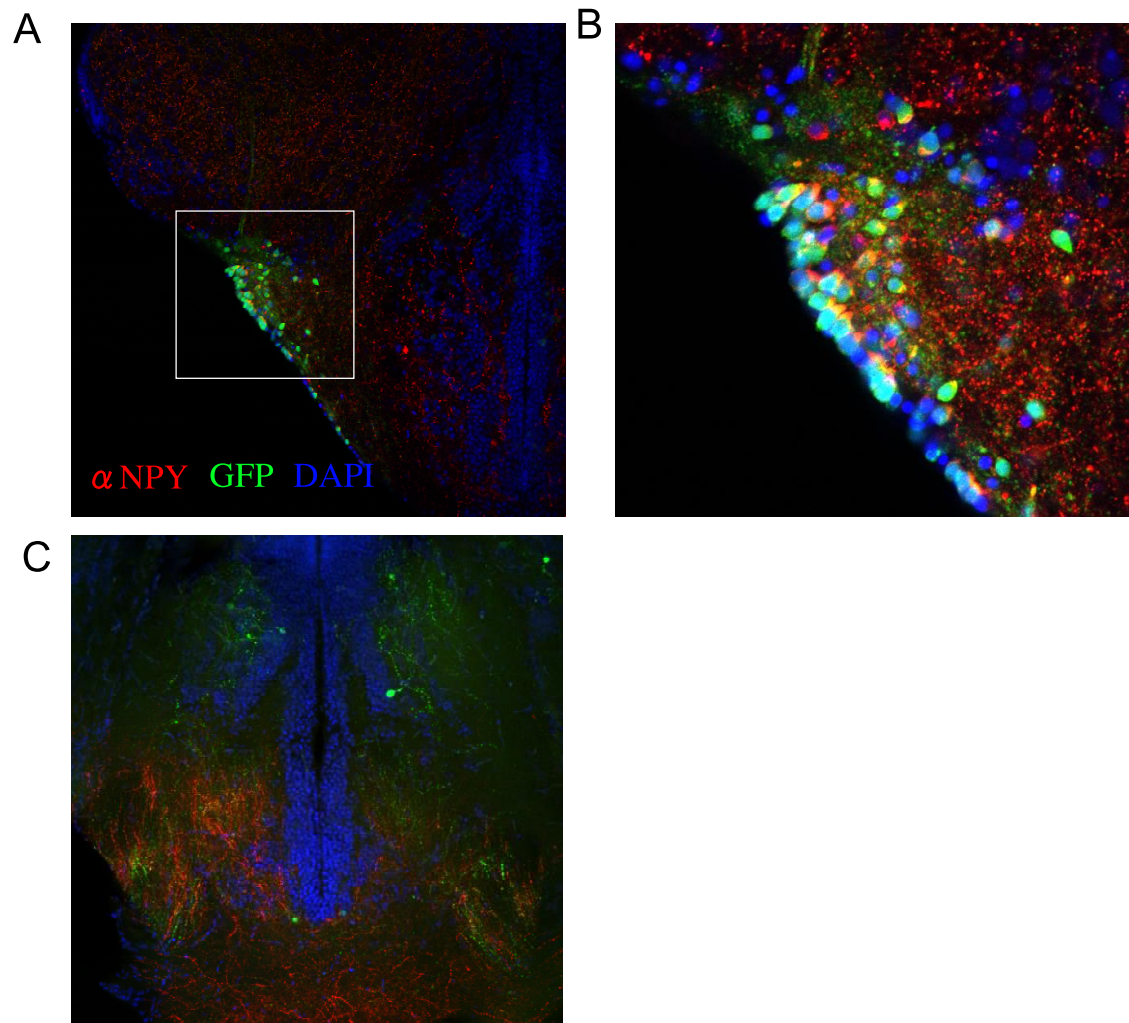


図 2-12. **Tg(npv:GAL4VP16; UAS:GFP)** の発現

(A) 脚内核に共局在する内在性 NPY と GFP シグナル。

(B) (A) の四角で示された領域の拡大図。

(C) Pp 周辺への GFP 陽性ファイバーの投射。

## 2.4 考察

近年、硬骨魚類にも哺乳類の終脳の高次機能を担う領域と相同な領域が存在すると提唱されてきた (Wullimann and Mueller, 2004)。今回の結果は、線条体及び淡蒼球のゼブラフィッシュにおける相同領域の存在を強く支持し、それにより今まで提唱はされていたものの詳細な解析のなされていなかったゼブラフィッシュの脳基底核について、その基本的な構成要素が硬骨魚類から哺乳類まで、進化的に保存されていることが示唆された。

とりわけ進化的相同性を論じるうえで重要な点である、遺伝子の発現、及び各領域間の投射関係の両面で相同性を支持する結果が得られたことは、非常に意義が大きいと言える。加えて、破壊実験の結果が示したように、機能的な面でもこれらの外套から Vd への投射が哺乳類の皮質から脳基底核への投射と同じ役割を担っていることが示唆された。これらの事実は、哺乳類においてよく知られている皮質—脳基底核ループの神経回路の起源が系統遺伝学的に古いグループに属する硬骨魚類から進化的に保存され、行動選択を担ってきたことを示唆している。

哺乳類の直接経路、及び間接経路の神経細胞は同じ領域に混在している (Kreitzer and Berke, 2011) が、本研究で同定された直接経路、間接経路の細胞群は離れた領域に存在していた。これらの不一致は、進化の過程で発生過程の細胞種特異的な細胞移動に変化が起こったことを示唆している。この仮説に一致して、硬骨魚類より早く哺乳類と別れて進化した円口類に属するヤツメウナギでも、直接経路の神経細胞と間接経路の神経細胞が離れて存在することが明らかになっている (Stephenson-Jones et al., 2011)。また一方で、哺乳類における淡蒼球には視床に投射する抑制性神経細胞が存在するほか、興奮性の投射が手綱核に対して存在する

ことが明らかになっている(Hong and Hikosaka, 2008)が、これらの興奮性、抑制性細胞は共に淡蒼球内に存在している。一方で、ゼブラフィッシュでも脚内核腹側部(ventral entopeduncular nucleus: vEP)と呼ばれる領域にはグルタミン作動性の神経細胞が存在し、手綱核へと投射していることが知られている(Amo et al., 2014)。これらの興奮性細胞は今回観察された抑制性細胞である npy 遺伝子を発現している細胞群より腹側後部に位置し、両者は混在していない。この結果と一致して、ランプレイの線条体からの投射を受ける細胞群における手綱核に投射するグルタミン酸作動性神経細胞と視床に対して投射する神経細胞群はそれぞれ別の核を形成することが知られている(Stephenson-Jones et al., 2013)。これらの哺乳類において混在している細胞群が硬骨魚類では異なった核を形成しているという事実は、発生過程の細胞移動のダイナミクスを解明するモデルとして有用であるのみならず、両細胞群が距離的に離れているという利点を生かし、より効率のよい局所的な領域破壊実験、電気生理的な細胞活動記録を可能にすると期待される。

大脳基底核の神経回路は種々の疾患とも関係が深い。パーキンソン病は振戦、筋剛健、無動、姿勢保持反射障害などの運動症状を持つ進行性疾患であり、ドーパミン神経細胞の減少により線条体内のドーパミンのバランスが崩れることにより起こると考えられている(Arias-Carrión and Pöppel, 2007)。また、ハンチントン病では逆に不随意運動などの症状が現れるが、原因となる細胞毒性は線条体で特に顕著であることが知られており(Ghiglieri et al., 2012)、それらの病態は、直接経路と間接経路のバランスが崩れることがその一因であると示唆されている。更に、近年になって Sapap3 という scaffolding タンパクを欠損させたマウスでは皮質—線条体のシナプス伝達効率が低下するとともに、強迫性神経障害(obsessive-compulsive disorder)に似た、過剰な毛づくろい反応が観察される(Welch et al., 2007)。また、自閉症の原因遺伝子

の一つである *neuroligin 1* の変異がやはり皮質—線条体のシナプスの機能不全に関わり、線条体の中棘状神経(*medium spiny neuron*)の発現している *SHANK3* の変異が自閉症に関連付けられた *22q13-deletion* シンドロームの原因となるなど、線条体の機能不全が様々な精神疾患にも関与することが知られており、ゼブラフィッシュにおける線条体を含む大脳基底核神経回路の同定は、ゼブラフィッシュの上記疾患のモデル動物としての有用性を示す重要な知見である。とりわけ、ゼブラフィッシュは薬剤や遺伝的スクリーニングに極めて適したモデル動物であり、近年では行動実験と組み合わせることで睡眠障害のような認知的機能不全に対するアプローチもなされている(Rihel et al., 2010)。今回の結果はゼブラフィッシュの、上記疾患のモデル動物としての有用性を示唆するものであり、そのメカニズムの解明、薬物スクリーニングによる治療方法の確立などへの一助となると期待される。

今回の研究ではゼブラフィッシュ直接経路投射神経細胞特異的な遺伝子組換え系統の樹立に成功した。この系統を用いることで、光遺伝学的手法を用いた直接経路特異的な神経活動の操作、及びそれに伴う行動の変化の解析、また、カルシウム感受性蛍光タンパクの発現を誘導した状態で2光子イメージングを用いることによる神経細胞活動の記録、光遺伝学的手法をラベリングに用いて時間分解能の優れた電気生理的活動記録などが可能になると予想される。また、間接経路の投射神経細胞に特異的な遺伝子組換え系統についても現在作成中である。これらを組み合わせることで、線条体の二種類の投射神経細胞の計算処理のメカニズムを包括的に理解することが可能になると予想される。



## 第3章 ゼブラフィッシュにおける新規行動実験系の確立

### 3.1 序論

本研究では、ゼブラフィッシュの線条体を遺伝子組換え技術及び2光子顕微鏡による *in vivo* イメージング技術を用いて可視化し、顕微鏡下で行動課題を行うゼブラフィッシュの線条体の神経細胞の活動パターンを明らかにすることを目的としている。そのため、ゼブラフィッシュに、特定の状況下で適切な行動を選択させるような行動パラダイムを構築する必要がある。

ゼブラフィッシュ成魚を用いた適応的な行動および学習を定量する実験パラダイムとして、いくつかのパラダイムが発表されている。例えば能動的忌避課題 (Pradel et al., 1999) は2つに分かれたコンパートメントのうち、現在ゼブラフィッシュがいる側のコンパートメントに条件付け刺激 (赤色光刺激) が与えられ、一定時間内に反対側のコンパートメントに忌避できなければ電気刺激を受けるというものである。また、T迷路課題 (Darland and Dowling, 2001) ではゼブラフィッシュはT型の迷路のうち、片方の腕部に到達した際にのみ報酬を受け取ることができるというパラダイムで、長期的な空間記憶の能力を定量的に評価することが可能である。また、delayed spatial alternation 課題 (Levin and Chen, 2004) は、3つのコンパートメントのうち中央部にゼブラフィッシュを泳がせ、交互に変化する正解側のコンパートメントに逃げ込めなければ罰を与えるパラダイムであり、作業記憶を定量的に評価するための学習課題である。さらに、conditioned place preference 課題 (Darland and Dowling, 2001; Lau et al., 2006) や、十字迷路課題 (Al-Imari and Gerlai, 2008; Sison and Gerlai, 2010) のように、水槽内でゼブラフィッシュが報酬となる刺激の存在する領域の近傍に留まる時間が多くなることを利用した学習課題などが開発、及び用いられてきた。このように、ゼブラフィッシュは様々な認知的学習課題を習得することが可能である。加え

て近年では、餌を報酬として用いることで視覚刺激弁別課題を学習させるパラダイムも報告されている (Mueller and Neuhauss, 2012)。しかしながらこれらの学習パラダイムはその殆どが観察者として学習過程に参加する必要があり、非常に実験者の時間を消費する。加えて、各実験者がそれぞれの興味の対象である現象に注目するうえで実験のプロトコルを変更する必要が生じてきた際、それらの変更を適用して新たに学習パラダイムを構築しなおすのは非常に労力を要する。

これらの問題点を解決すべく、より短時間で学習可能かつ仕様の変更も容易である学習課題を実現するため、Y迷路弁別課題を確立した。この課題は短時間で学習可能かつ完全に自動化されたものであり、ゼブラフィッシュの連合学習の能力を信頼性における精度で測定でき、かつ生産性を劇的に向上させることが可能になる。加えて、このパラダイムは安価で構築可能かつ各研究者が容易に実行プログラムを改変可能なものであるため、それぞれの目的の機能に焦点が当たるよう各研究者が検証することが可能になった。

## 3.2 実験材料と手法

### 訓練装置

使用した訓練装置は防音室中に設置された 24.1 インチの LCD スクリーン (MultiSync LCD-P232W, NEC, Tokyo, Japan) 上に配された 3 つの腕部と半透明の底面を持つ行動実験用の Y 字型水槽 (高さ 10 cm、各腕部は長さ 15 cm、幅 7 cm) から構成され、水深 8 cm の飼育水で満たされた (図 3-1A)。魚の行動を撮影するためのビデオカメラは水槽の約 60 cm 上方に固定され、スクリーン上に表示する視覚刺激、スピーカーからの音刺激、及び刺激装置 (master-8, A.M.P.I., Jerusalem, Israel) とバスアンプリファイヤー (SEG-3104, Nihon Kodensho, Tokyo, Japan) を制御する PC に接続された。電気刺激 (5 V, 50-ms duration, 10 Hz) は各腕部の両側面に配置された鋼鉄製の網を介して与えられた。箱内には加えて、水温を 28 ~ 30°C に保つための小型のファンが配置された。

### ソフトウェアアルゴリズム

行動実験用のプログラムはすべて MATLAB を使用して実行された。行動実験開始時、魚を水槽に入れる前に水槽内の 10 カ所の関心領域 (region of interest、以下 ROI)、及び水槽外の 3 カ所の ROI (全 13 カ所; 1~3: 最端部; 4~6: 中間部; 7~9: 近縁部; 10: 中央の三角部; 11: 現在実行中のプログラムを示す円形マーカー; 12: 電気刺激の有無を示す円形マーカー; 13: 未使用) に分割し、それぞれの ROI を行動記録用のビデオカメラのフレームに割り当てた。魚の位置を同定するためには、まず記録された各フレームをグレースケールの画像へと変換し、参照用画像から引いて差分イメージを取得した (図 3-2)。魚は背景より暗く映るため、差分イメージからノイズ処理をすることで、魚の位置を同定することが可能になる。参照用イメージは底面に表示

する視覚刺激が変わるたびに更新される。著者は目視による観察と比較することで、  
上記アルゴリズムによる魚の位置の同定が完全に正しいことを確認している。

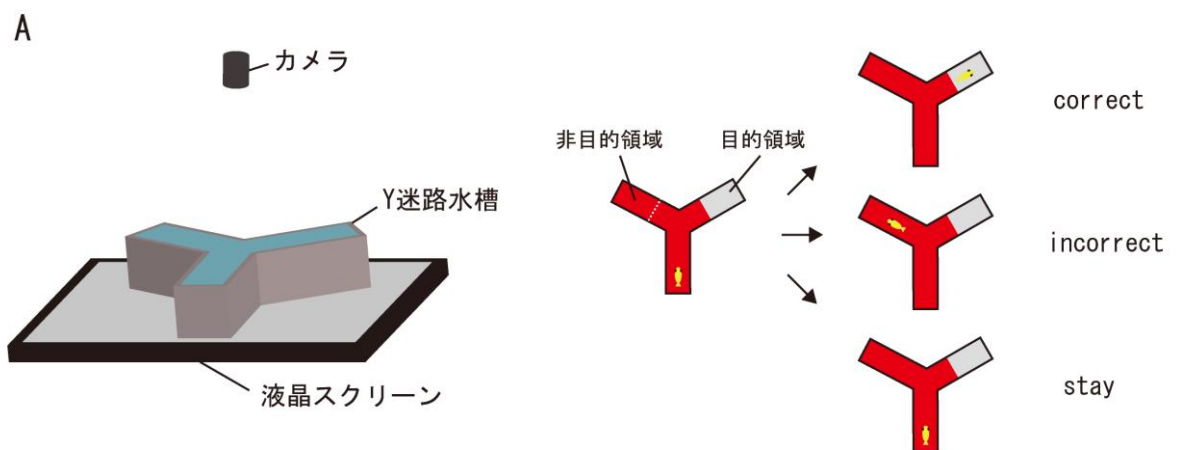


図 3-1. ゼブラフィッシュY迷路弁別課題

(A) 実験装置の模式図

(B) 行動課題のルール。ゼブラフィッシュの行動は、3 種類に分類された。**correct**: ゼブラフィッシュは正しく目標領域に到達できた。**incorrect**: ゼブラフィッシュは非目標領域に先に到達した。**stay**: ゼブラフィッシュはその試行を通して、目標領域にも非目標領域にも到達しなかった。

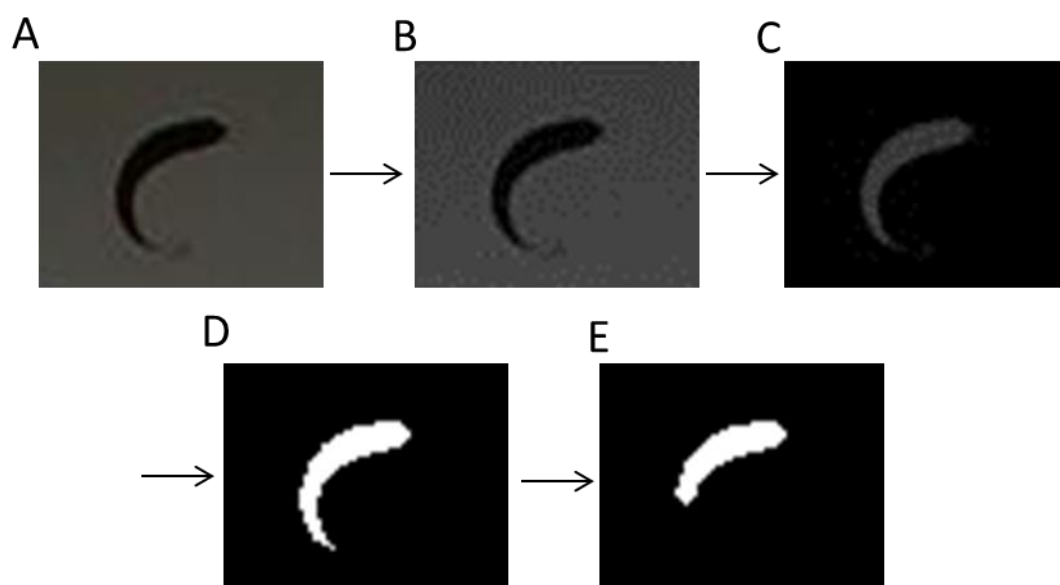


図 3-2. ゼブラフィッシュの位置判定アルゴリズム

- (A) 元の画像
- (B) 元画像を白黒化
- (C) 背景画像から差分を検出
- (D) 閾値を設定して二値化
- (E) morphological opening によるノイズの除去

### 3.3 結果

実験には 6～12 ヶ月齢のオスの成魚が用いられた。学習課題を開始する 1 日前に、ゼブラフィッシュは 1 リットル水槽に 1 匹ずつ分けられた。翌日、魚は Y 迷路水槽に入れられ、飛び出し防止のための透明の蓋が水槽にかぶせられた。10 分間の慣らし時間の後、実験は開始された。学習開始時、タンク全体の底面部は灰色になるよう、ディスプレイで制御された。学習の工程は 20 回の無刺激試行と続く 100 回の刺激試行から構成された。各試行の開始時には、聴覚刺激 (700 Hz, 0.5 sec) が与えられて、魚が現在いるもしくは最後にいた腕部でない腕部のうち一つが無作為に選ばれ、その腕部の先端部 (端から 10 cm 以内の領域) が目標領域として定められ、目標領域以外の全領域で、水槽下に配置された LCD ディスプレイにより赤色刺激が提示された (図 3-1B)。この提示は魚が目的領域に到達するか、30 秒が経過するまで続けられ、魚が目的領域に到達した際は高音の聴覚刺激 (1400Hz, 0.5 sec) が与えられた。また刺激試行では、魚が 15 秒以内に目的領域に到達しなかった場合は目的領域の存在する腕部以外の腕部に電気刺激が与えられ、それは試行終了時まで続けられた。各試行のうち、目的領域に先に到達したものを **correct**、非目的領域に先に到達した者を **incorrect**、どちらにも最後まで到達しなかったものを **stay** と呼んだ。

学習の 1 例を図 3-3 に示す。ゼブラフィッシュは一般的に非常に多動であり、この例では各試行中に 1 つの腕部にとどまることはなかった。また、すべての無刺激試行において、すなわち電気刺激が与えられていないにもかかわらず、魚は 15 秒以内に目的領域に到達していた。しかしながら、目標領域と非目標領域に先に到達する傾向に差はなかった。このことから、学習前の魚には、灰色の腕部と赤色の腕部の間に、明白な優先傾向は存在しないことが示唆された。

しかしながら、刺激試行が開始されると魚の正解率(過去 10 試行のうち、非目的領域より先に目的領域に到達した割合;図 3-3 中段)は急激に増加し、41 ~ 43 回目の試行では 100%に到達した。特筆すべきことに、その時点では魚は 3 回しか電気刺激を経験していない。その後成績は一旦下降し、魚は連続して電気刺激を受けた(44 ~ 61 回目の試行)。この期間、魚は試行開始後電気刺激開始時まで動きを止め、電気刺激を受け始めると同時に目的領域に激しく泳ぐといった行動が観察された。そのうち成績は回復し、そのまま安定した(62 ~ 120 回目の試行)。

また複数個体(6 個体)の成績を解析した結果、無刺激試行時(1 ~ 20 回目の試行)の平均正解率は  $49.4 \pm 9.4 \%$  であり、無作為に選んだ場合と有意差はなかったが、最初の 20 回の刺激試行(21 ~ 40 回目の試行)では  $77.5 \pm 10.3 \%$  に増加し、61 ~ 80 回目の試行では  $93.3 \pm 7.5 \%$  に達した(図 3-4A)。また、試行開始時から目標領域に到達するまでの平均時間は無刺激試行時(1 ~ 20 回目の試行)では  $12.85 \pm 7.18$  秒であるのに対し、刺激試行時(21 ~ 120 回目の試行)では  $6.46 \pm 3.83$  秒に短縮されている(図 3-4B)。これらの結果から、視覚刺激と連合された目的領域への忌避学習が成立していることが示された。

さらに、学習成立後のゼブラフィッシュにおける記憶が、長期的に保持されているかを学習後 24 時間経過してから再度行動のテストを行うことで検証した。同様の手法を用いて訓練したゼブラフィッシュ(5 個体)の正しい腕部を選ぶ確率は 1-20 試行では  $51.9 \pm 7.3 \%$  だったのに対し、100-120 試行では  $85.0 \pm 6.3 \%$  まで上昇した。その後、ゼブラフィッシュを 1 リットル水槽にて個飼いで置いておき、24 時間後に電気ショックを与えない条件で同様の課題を行わせ、記憶の検証を行った。24 時間後に再テストした際、1-20 試行での正しい腕部を選ぶ確率は  $79.8\% \pm 2.8 \%$  であり、最初の 1-20



試行と比べて有意に高いままであった(図 3-4C)。このことから、この学習課題によって成立した記憶は 24 時間後も保持されることが明らかになった。

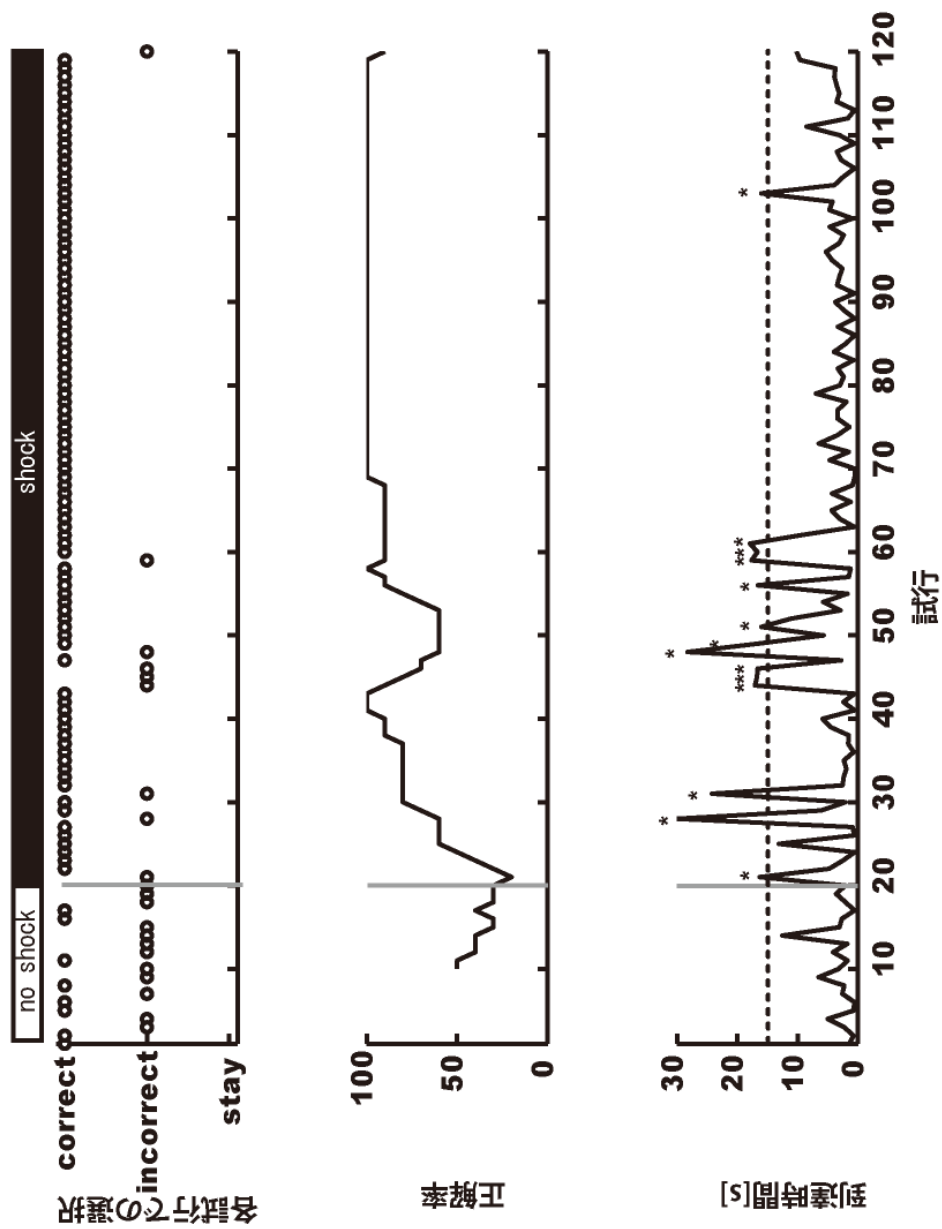


図 3-3. Y 迷路弁別課題の成績 (一例)

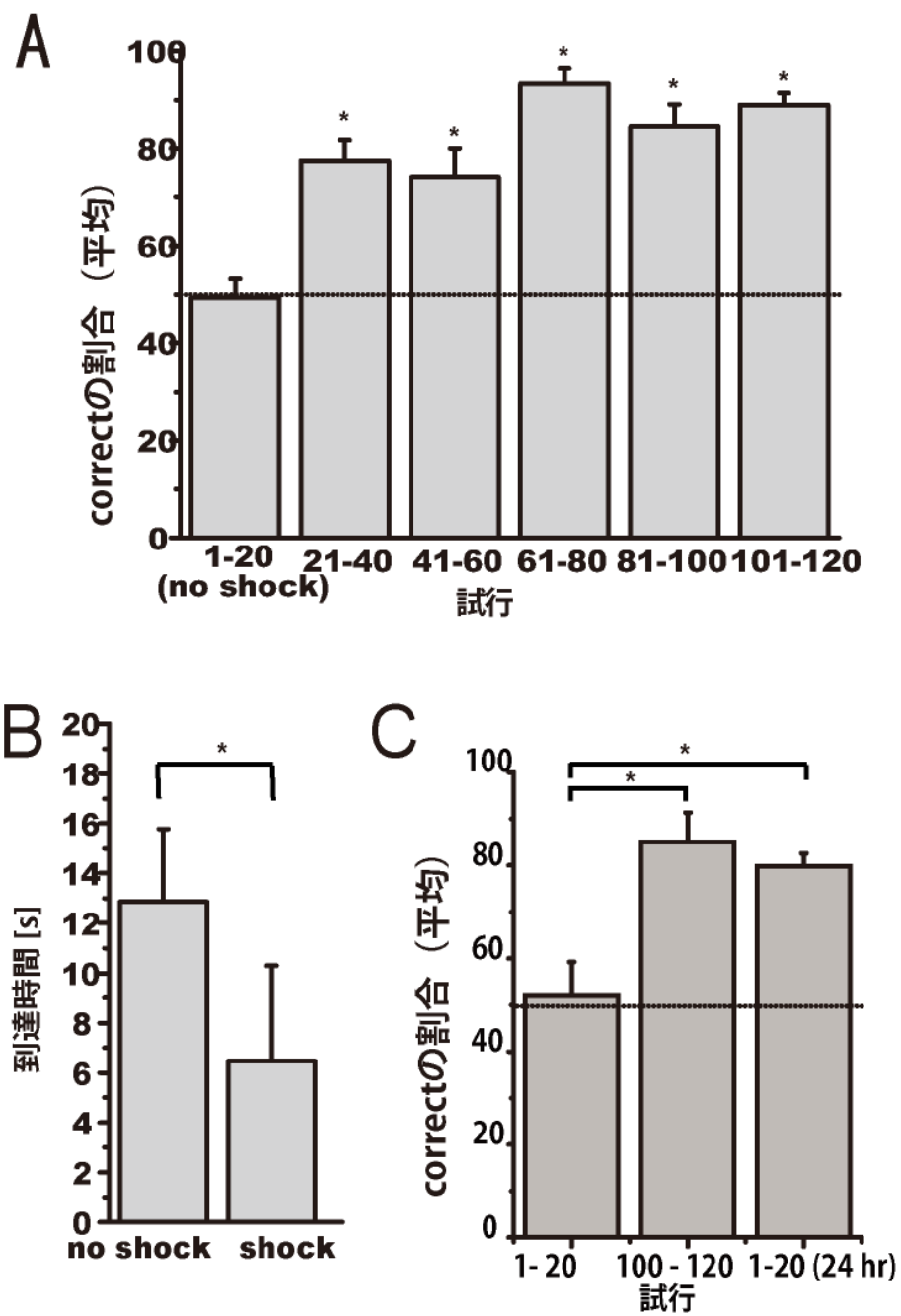


図 3-4. Y 迷路弁別課題の成績  
(次ページへ続く)

(図 3-4 続き)

(A) 実験を行った全ゼブラフィッシュの正解率の平均の変化(6 個体)。stay を示した試行は計算に含まれていないため、チャンスレベル(点線で表示)は 50 %である。p 値は 0.001 未満、対応のある t 検定。エラーバーは標準誤差を示す。

(B) 実験を行った全ゼブラフィッシュの目標領域に達するまでに要した時間(6 個体)。p 値は 0.05 未満、対応のある t 検定。エラーバーは標準誤差を示す。

(C) 長期記憶のテスト。全ゼブラフィッシュの正解率の平均を 1-20 試行、100-120 試行、翌日(24 時間後)の 1-20 試行で比較した。点線はチャンスレベルを示す(50 %)。p 値は 0.05 未満、対応のある t 検定。エラーバーは標準誤差を示す。

### 3.4 考察

今回作製した課題では、魚は 20 試行の内に有意に成績が向上し、全学習行程は 2 時間以内に終了した。これは従来のゼブラフィッシュを用いた連合課題の学習 (Pradel et al., 1999; Darland and Dowling, 2001; Mueller and Neuhaus, 2012) と比べて、驚くべき速さである。その原因として考えられるのは、視覚刺激が底面全体に及ぶため、魚の位置や向きに関わらず視認することが可能であることが考えられる。それに加えて、従来のゼブラフィッシュの行動学習課題ではあまり用いられていなかった聴覚刺激を、各試行開始時及び目的領域到達時にそれぞれ異なる音程で与えたことで、それらを手掛かりとして課題の構造を掴みやすく、学習が容易になったことが推測される。この推測と一致して、ゼブラフィッシュを用いて、異なる音程の聴覚刺激の弁別課題が学習可能なことが知られている (Cervi et al., 2012)。学習そのものが速いことに加え、この課題は完全自動化されているため、一人の実験者が複数の実験を同時に行うことも可能であり、結果として実験者の生産性を著しく向上させ、薬物スクリーニングやミュータントスクリーニングなど、大量の個体を必要とする実験に役立つと期待される。

能動的忌避課題は魚の認知的能力を調べるために広く使用されている課題であり、この課題では、魚は電気刺激を避けるために、試行開始の合図である信号が提示されたら 2 つに区切られた部屋のうち、他方の部屋に移動する必要がある。しかしながら、能動的忌避課題においては、ゼブラフィッシュが生来多動な動物であるため、未学習の個体も偶然他方の部屋に移動してしまうことが多くあり、定量的に学習の度合いを測定することが難しかった。今回作製したパラダイムでは、未学習の個体では正解率が 50% 近くになるため、学習の度合いをより定量的に評価することが可能になっている。

今回開発した魚の位置判定、及び視覚刺激呈示用の **MATLAB** のソースコードは極めて単純かつカスタマイズが容易である。これにより、実験者はこのシステムを様々な学習則（報酬課題、長期学習など）や様々な種類の視覚刺激（色、パターン、特定の形など）、及び様々な形の水槽と組み合わせて、各々の注目したい機能を調べることができる。ゼブラフィッシュを用いた認知機能解析は、このシステムを利用した大規模スクリーニングと組み合わせることで、ヒトの認知に関わる病気の治療法の開発などに役立つと期待される。

## 第 4 章 総論

本研究はゼブラフィッシュが状況に応じた適切な行動を選択している線条体の直接経路、間接経路の投射神経細胞の個別可視化解析のため、適切な行動の選択時における両細胞群の発火パターンを *in vivo* イメージングにより解析することを目的としたものである。

本研究では、まず遺伝的マーカーの発現の確認、及び遺伝子組換え系統を用いた蛍光タンパク質の発現導入を組み合わせることで、分子生物学的、組織学的手法によりゼブラフィッシュにも、哺乳類における線条体、及び直接経路、間接経路投射神経細胞に相同な領域、及び遺伝子が進化的に保存されていることを示した。さらに、破壊実験により、これらの領域が実際に状況に応じた適切な行動の選択に関わっていることを示した(第 2 章)。

また、実際にゼブラフィッシュに状況に応じた適切な行動を学習させるため、新規行動課題である Y 迷路弁別課題の確立を行った。この実験系により、ゼブラフィッシュの行動、記憶などを極めて短時間かつ効率的に調べることが可能になった(第 3 章)。

今後は、本研究により得られた知見をさらに発展すべく、成魚におけるカルシウムイメージング系を確立することが必要である。そもそも生きている個体に視覚刺激を与えてその反応として神経活動の変化を計測するというアプローチは Hubel と Wiesel による麻酔下ネコの一次視覚野からの電気生理的活動記録の研究(Hubel and Wiesel, 1959)など古典的に行われているが、近年では単純に視覚処理に関わる神経細胞の応答を計測するのみならず、視覚刺激を手掛かりとして様々な認知的課題を動物に行わせ、より高次の脳機能に対応する神経細胞の活動を解析する研究が広く行われ

ている。さらに近年では 2 光子顕微鏡の普及により、脳深部の神経細胞の活動を数か月乃至長期間に渡って記録することで、学習の過程そのものに関わる神経活動の変化を記録することが可能になっている (Peters et al., 2014)。また、長期イメージングは神経活動パターンの変化のみならず、スパイン形態などの subcellular な変化が学習に伴って起こることも解析することが可能になる (Fu et al., 2012; Lai et al., 2012)。一方で、神経活動イメージングのための蛍光物質も、近年急速に発達している。従来は、Fura2 や OregonGreen-BAPTA などの化学的なカルシウム感受性化合物を用いることで神経細胞を非特異的に染色し、その蛍光強度の変化として神経活動を計測することが一般的であったが、FRET 型プローブである Cameleon (Miyawaki et al., 1999) や単純に蛍光強度が変化するタイプの GCaMP シリーズ (Akerboom et al., 2012) など、カルモジュリンのカルシウム結合部位を組み込むことで構造変化を起こし、カルシウム濃度依存的に蛍光強度や FRET 効率の変化するような genetically-encoded calcium indicator (GECI) が近年では広く用いられてきている。これにより、従来の化学的カルシウムインジケータでは困難であった、細胞種特異的な神経活動の計測が、遺伝子組換え技術と組み合わせることで可能になってきている。さらにこれらの GECI はよりダイナミックレンジの広く、より解離定数の小さなものが開発されてきており (Horikawa et al., 2010)、以前のものと比べて小さなカルシウム濃度の変化でも可視化が容易になってきている。

近年はとりわけ GECI が広く用いられる傾向にあるが、その背景として、遺伝的カルシウムインジケータの開発が飛躍的に進み、より変化率の大きいもの (Akerboom et al., 2012)、より解離定数が低く、小さなレンジでのカルシウム濃度の変化に対応したもの (Horikawa et al., 2010) が開発されている。また、蛍光色も緑周辺のみならず、赤い物も開発されており (Zhao et al., 2011)、他の蛍光タンパクと同時に観察するこ



とも可能になっている。加えて、以前は新規タンパクの導入から遺伝子組換え系統の作出、掛け合わせを行い実験に使用できる年齢まで成長させるのに時間がかかっていたが、近年のウイルスを用いた遺伝子の導入により、それらの作製にかかる時間が劇的に短縮されたことも、その要因の一つである。加えてウイルスを局所的にインジェクションすることで、特定の領域に投射する細胞群のみに発現を誘導するなど、プロモーター以外の特性を利用して細胞種を分けることもその利点の一つである。さらに近年では狂犬病ウイルスを用いたシナプス間導入の可能な遺伝子発現の導入が可能になっており(Wickersham et al., 2007)、これらを組み合わせることにより、神経細胞の他の領域との相互作用をより詳細に解析することができる。ゼブラフィッシュにおいても、Sindbis ウイルスや herpes simplex ウイルスなどによる発現誘導が可能なことが知られている(Zhu et al., 2009; Zou et al., 2014)。

また、近年では miniature microscope(Ghosh et al., 2011)や light-sheet scanning microscope(Vladimirov et al., 2014)など、新たな光学的手法の開発が行われており、今後その重要性はさらに増すと予想される。一方でイメージング技術は各種遺伝的プローブの発展により、細胞内のカルシウム濃度のみならず、膜電位(Akemann et al., 2012)、細胞内セカンドメッセンジャー(Castro et al., 2014)、CaMKIIなどの可塑性に関わる因子の活性(Lee et al., 2009)、細胞骨格やそれに関連する因子の動態(Okamoto and Hayashi, 2006; Murakoshi et al., 2011)などを可視化することが可能である。また、個々の分子のみならず、スパインの形態変化(Matsuzaki et al., 2004; Fu et al., 2012; Lai et al., 2012)、脳脊髄液内の代謝物の除去速度(Xie et al., 2013)など、様々な状態を、生きた個体内で計測することが可能である。ゼブラフィッシュはその遺伝的操作の容易さと、比較的小型の脳を持

ち可視化に適していることから、これらのイメージング技術を生きた個体に適用するうえで極めて有用なモデル動物であると言える。

また、今後取り組むべき新たな課題として、頭部固定下のゼブラフィッシュに仮想現実として視覚刺激を提示し、実際に行動課題中だと認識させる系の開発が必要である。そのためには、筋電位記録からゼブラフィッシュの移動情報を抽出し、それらを仮想現実内の距離情報としてオンラインでフィードバックさせて視覚刺激を変化させる仕組みが必要である。すでにこのようなアプローチはマウスの研究で用いられている (Harvey et al., 2009, 2012; Dombeck et al., 2010)。一方で、近年では microendoscope (Ghosh et al., 2011) の開発、普及が進んでおり、そもそも頭部を固定しなくても行動中の動物の神経活動を計測することが可能になりつつある。これらの手法に比べて仮想現実を用いる利点は、現実では体験することのできない視覚刺激を与えることが可能になることである。例えばマウスを用いた海馬の研究では、視覚刺激を LED により瞬間的に制御することで、あたかもマウスが瞬間的に移動したかのように錯覚させ、神経活動の遷移を観察している (Jezek et al., 2011)。このような特性はゼブラフィッシュを用いた研究にも適用可能である。近年ではゼブラフィッシュ稚魚に流れていく縞状の視覚刺激を提示することで流れと同方向への運動を誘発させ (optomotor response)、移動距離を運動神経の活動から推定し、縞の流れる速度へとフィードバックさせる、という仮想現実を用いた研究がなされている。その状態で、仮想的な移動距離の値を操作し、ゼブラフィッシュの運動調節に関わる神経領域を同定した。これらの研究はいずれも、現実的な制約にとらわれることなく、動物の知覚を操作できるという仮想現実の利点を生かしたものである。

最近では、2光子顕微鏡による多細胞同時記録や、シリコンプローブ (Bragin et al., 2000) などによる多ユニット記録などの手法の発展に伴い、複数の細胞の挙動を同時に観察することが可能になってきている。これらの手法により得られる細胞集団の活動パターンは、単純に効率的にデータを集積できるのみならず、そもそも一細胞の活動記録とは質的に違う情報を含みうる。その理由として、細胞単位の活動と、特定の感覚入力や認知的概念との相関を解析するというアプローチの限界が挙げられる。例えば前頭前野の神経細胞は複雑な認知的行動課題の遂行中に、課題の複数の要素に対して非線形的に発火頻度が変化することが知られており、これらの非線形性は集合的に神経活動を捉えた時に、情報量が多く、特徴量の解読がより正確に可能であるという利点を備えている (Rigotti et al., 2013)。これらの事実は、単一細胞記録からはこれらの神経回路の計算処理の仕組みを明らかにするのは不可能であり、それらの理解のためには、集合的な活動状態の解析と、その挙動を説明するためのモデルの構築が必要であるということを示唆している。例えば近年では、文脈依存的な視覚刺激弁別課題の遂行中に同様に前頭前野の神経細胞の活動状態の遷移を細胞集団単位で解析した結果、刺激に対する初期の反応は文脈に関わらず状態空間内の一定の方向への変化であることが明らかになった。さらにそれらの集合的な挙動を人工ニューラルネットワークに学習させたところ、それらの実際の神経ネットワークの挙動を再現することの可能なモデルの構築に成功している (Mante et al., 2013)。さらにこのモデルを詳細に解析したところ、これらの集合的な挙動は線状アトラクターを持ち、異なる文脈は状態がこのアトラクターからずれた後、戻る際に異なる方向にバイアスをかけていることが明らかになった。このように、脳内の計算処理を単なる状態の記述ではなく、その原理原則を踏まえた集合的な神経活動のダイナミクスとして理解するためには、現実世界では再現不可能な操作や非現実的なほど網羅的な挙動の記述が必要であり、そのために理論的なアプローチは極めて有用である。

一方でゼブラフィッシュを用いた研究においても、神経回路内における計算処理を個々の細胞の応答特性ではなく、細胞集合のダイナミクスとして捉えようという研究が始められてきている。例えば Friedrich らのグループは比率の異なる 2 種類の匂い分子の混合刺激に対する嗅球の神経細胞の集団の反応を、化学的インジケータを用いたカルシウムイメージングで調べたところ、その細胞集合の応答は非連続かつ分離された複数の安定状態に収束することを発見した (Niessing and Friedrich, 2010)。これらのアトラクターライクな複数の安定点の存在は脳皮質では興奮性の再帰的なネットワークによって実現されていると考えられてきた (Wang, 2008) が、嗅球のような抑制性の相互作用が支配的な領域にも存在するということは極めて予想外な結果に思われる。しかしながら、嗅球において分離され、ノイズの影響が取り除かれた情報が嗅皮質へと送られ、そこでパターンの補完や他の記憶との連合学習などの高次な情報処理が行われると考えれば、理にかなった仕組みであると考えられる。一方で運動制御についても、前述のように、ゼブラフィッシュの幼魚に運動神経の活動とバーチャルリアリティー内で再現された遊泳速度の関係を変化させたときに、神経細胞ネットワークの状態もそれに応じて急激に変化することが明らかになった (Ahrens et al., 2012)。このことから、神経細胞ネットワークのダイナミクスの解析はその出力、すなわち行動との関係を明らかにするためにも有益であると言える。

ここで重要なのは、このような神経活動の活動空間内での安定点やそれらの時間的遷移などのダイナミクスの解析は、個々の細胞の応答特性を調べても明らかにではなく、多細胞記録による集合的活動を解析する必要があるということである。このように、従来比較的単純と思われていた感覚刺激と一次感覚細胞の関係の間にも、複雑な神経細胞ネットワークの領域内相互作用が存在しており、一細胞のみの応答ではその感

覚処理の全貌を明らかにすることは難しいと考えられる。これは、線条体のような、より高次の、より中枢の情報処理機構においては殊更顕著であると考えられ、本研究の目標とする *in vivo* 多細胞記録のアプローチが特に有用であると予想される。

本研究は、ゼブラフィッシュを線条体研究のモデル動物として確立するための、基礎的な神経基盤の解明、及び実験的手法の解析に成功した。これらの知見は線条体研究のみならず、広く認知的な行動課題を伴う神経現象の解明のために、ゼブラフィッシュが有用であることを示す先駆的研究であると言える。

## 参考文献

- Agetsuma, M., Aizawa, H., Aoki, T., Nakayama, R., Takahoko, M., Goto, M., Sassa, T., Amo, R., Shiraki, T., Kawakami, K., Hosoya, T., Higashijima, S., Okamoto, H., (2010). The habenula is crucial for experience-dependent modification of fear responses in zebrafish. *Nature neuroscience* **13**, 1354–6.
- Ahrens, M.B., Li, J.M., Orger, M.B., Robson, D.N., Schier, A.F., Engert, F., Portugues, R., (2012). Brain-wide neuronal dynamics during motor adaptation in zebrafish. *Nature* **485**, 471–7.
- Akemann, W., Mutoh, H., Perron, A., Park, Y.K., Iwamoto, Y., Knöpfel, T., (2012). Imaging neural circuit dynamics with a voltage-sensitive fluorescent protein. *Journal of neurophysiology* **108**, 2323–37.
- Akerboom, J., Chen, T.-W., Wardill, T.J., Tian, L., Marvin, J.S., Mutlu, S., Calderón, N.C., Esposti, F., Borghuis, B.G., Sun, X.R., Gordus, A., Orger, M.B., Portugues, R., Engert, F., Macklin, J.J., Filosa, A., Aggarwal, A., Kerr, R.A., Takagi, R., Kracun, S., Shigetomi, E., Khakh, B.S., Baier, H., Lagnado, L., Wang, S.S.-H., Bargmann, C.I., Kimmel, B.E., Jayaraman, V., Svoboda, K., Kim, D.S., Schreiter, E.R., Looger, L.L., (2012). Optimization of a GCaMP calcium indicator for neural activity imaging. *The Journal of neuroscience* **32**, 13819–40.

- Al-Imari, L., Gerlai, R., (2008). Sight of conspecifics as reward in associative learning in zebrafish (*Danio rerio*). *Behavioural brain research* **189**, 216–9.
- Amo, R., Fredes, F., Kinoshita, M., Aoki, R., Aizawa, H., Agetsuma, M., Aoki, T., Shiraki, T., Kakinuma, H., Matsuda, M., Yamazaki, M., Takahoko, M., Tsuboi, T., Higashijima, S., Miyasaka, N., Koide, T., Yabuki, Y., Yoshihara, Y., Fukai, T., Okamoto, H., (2014). The Habenulo-Raphe Serotonergic Circuit Encodes an Aversive Expectation Value Essential for Adaptive Active Avoidance of Danger. *Neuron* **84**, 1034–48.
- Arias-Carrión, O., Pöppel, E., (2007). Dopamine, learning, and reward-seeking behavior. *Acta neurobiologiae experimentalis* **67**, 481–8.
- Arlotta, P., Molyneaux, B.J., Jabaudon, D., Yoshida, Y., Macklis, J.D., (2008). Ctip2 controls the differentiation of medium spiny neurons and the establishment of the cellular architecture of the striatum. *The Journal of neuroscience* **28**, 622–32.
- Arrenberg, A.B., Del Bene, F., Baier, H., (2009). Optical control of zebrafish behavior with halorhodopsin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**, 17968–73.
- Barnes, T.D., Kubota, Y., Hu, D., Jin, D.Z., Graybiel, A.M., (2005). Activity of striatal neurons reflects dynamic encoding and recoding of procedural memories. *Nature* **437**, 1158–61.

- Bragin, A., Hetke, J., Wilson, C.L., Anderson, D.J., Engel, J., Buzsáki, G., (2000). Multiple site silicon-based probes for chronic recordings in freely moving rats: implantation, recording and histological verification. *Journal of neuroscience methods* **98**, 77–82.
- Calabresi, P., Picconi, B., Tozzi, A., Di Filippo, M., (2007). Dopamine-mediated regulation of corticostriatal synaptic plasticity. *Trends in neurosciences* **30**, 211–9.
- Canfield, J.G., Mizumori, S.J.Y., (2004). Methods for chronic neural recording in the telencephalon of freely behaving fish. *Journal of neuroscience methods* **133**, 127–34.
- Castro, A., Bécerra, M., Manso, M.J., Anadón, R., (2006). Calretinin immunoreactivity in the brain of the zebrafish, *Danio rerio*: distribution and comparison with some neuropeptides and neurotransmitter-synthesizing enzymes. I. Olfactory organ and forebrain. *The Journal of comparative neurology* **494**, 435–59.
- Castro, L.R. V, Guiot, E., Polito, M., Paupardin-Tritsch, D., Vincent, P., (2014). Decoding spatial and temporal features of neuronal cAMP/PKA signaling with FRET biosensors. *Biotechnology journal* **9**, 192–202.
- Cervi, A.L., Poling, K.R., Higgs, D.M., (2012). Behavioral measure of frequency detection and discrimination in the zebrafish, *Danio rerio*. *Zebrafish* **9**, 1–7.



- Cohen, J.Y., Haesler, S., Vong, L., Lowell, B.B., Uchida, N., (2012). Neuron-type-specific signals for reward and punishment in the ventral tegmental area. *Nature* **482**, 85–8.
- Cromwell, H.C., Schultz, W., (2003). Effects of expectations for different reward magnitudes on neuronal activity in primate striatum. *Journal of neurophysiology* **89**, 2823–38.
- Cui, G., Jun, S.B., Jin, X., Pham, M.D., Vogel, S.S., Lovinger, D.M., Costa, R.M., (2013). Concurrent activation of striatal direct and indirect pathways during action initiation. *Nature* **494**, 238–42.
- Darland, T., Dowling, J.E., (2001). Behavioral screening for cocaine sensitivity in mutagenized zebrafish. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**, 11691–6.
- Deisseroth, K., Schnitzer, M.J., (2013). Engineering approaches to illuminating brain structure and dynamics. *Neuron* **80**, 568–77.
- Dombeck, D.A., Harvey, C.D., Tian, L., Looger, L.L., Tank, D.W., (2010). Functional imaging of hippocampal place cells at cellular resolution during virtual navigation. *Nature neuroscience* **13**, 1433–40.
- Fu, M., Yu, X., Lu, J., Zuo, Y., (2012). Repetitive motor learning induces coordinated formation of clustered dendritic spines in vivo. *Nature* **483**, 92–5.

- Gerdeman, G.L., Ronesi, J., Lovinger, D.M., (2002). Postsynaptic endocannabinoid release is critical to long-term depression in the striatum. *Nature neuroscience* **5**, 446–51.
- Gerfen, C.R., Engber, T.M., Mahan, L.C., Susel, Z., Chase, T.N., Monsma, F.J., Sibley, D.R., (1990). D1 and D2 dopamine receptor-regulated gene expression of striatonigral and striatopallidal neurons. *Science* **250**, 1429–32.
- Ghiglieri, V., Bagetta, V., Calabresi, P., Picconi, B., (2012). Functional interactions within striatal microcircuit in animal models of Huntington’s disease. *Neuroscience* **211**, 165–84.
- Ghosh, K.K., Burns, L.D., Cocker, E.D., Nimmerjahn, A., Ziv, Y., Gamal, A. El, Schnitzer, M.J., (2011). Miniaturized integration of a fluorescence microscope. *Nature methods* **8**, 871–8.
- Grueter, B.A., Rothwell, P.E., Malenka, R.C., (2012). Integrating synaptic plasticity and striatal circuit function in addiction. *Current opinion in neurobiology* **22**, 545–51.
- Guan, C., Ye, C., Yang, X., Gao, J., (2010). A review of current large-scale mouse knockout efforts. *Genesis* **48**, 73–85.
- Harvey, C.D., Coen, P., Tank, D.W., (2012). Choice-specific sequences in parietal cortex during a virtual-navigation decision task. *Nature* **484**, 62–8.

- Harvey, C.D., Collman, F., Dombeck, D.A., Tank, D.W., (2009). Intracellular dynamics of hippocampal place cells during virtual navigation. *Nature* **461**, 941–6.
- Higashijima, S.-I., Schaefer, M., Fetcho, J.R., (2004). Neurotransmitter properties of spinal interneurons in embryonic and larval zebrafish. *The Journal of comparative neurology* **480**, 19–37.
- Hikida, T., Kimura, K., Wada, N., Funabiki, K., Nakanishi, S., (2010). Distinct roles of synaptic transmission in direct and indirect striatal pathways to reward and aversive behavior. *Neuron* **66**, 896–907.
- Hikida, T., Yawata, S., Yamaguchi, T., Danjo, T., Sasaoka, T., Wang, Y., Nakanishi, S., (2013). Pathway-specific modulation of nucleus accumbens in reward and aversive behavior via selective transmitter receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **110**, 342–7.
- Hikosaka, O., (1991). Basal ganglia--possible role in motor coordination and learning. *Current opinion in neurobiology* **1**, 638–43.
- Hong, S., Hikosaka, O., (2008). The globus pallidus sends reward-related signals to the lateral habenula. *Neuron* **60**, 720–9.
- Horikawa, K., Yamada, Y., Matsuda, T., Kobayashi, K., Hashimoto, M., Matsu-ura, T., Miyawaki, A., Michikawa, T., Mikoshiba, K., Nagai, T.,

- (2010). Spontaneous network activity visualized by ultrasensitive Ca(2+) indicators, yellow Cameleon-Nano. *Nature methods* **7**, 729–32.
- Hubel, D.H., Wiesel, T.N., (1959). Receptive fields of single neurones in the cat's striate cortex. *The Journal of physiology* **148**, 574–91.
- Jezek, K., Henriksen, E.J., Treves, A., Moser, E.I., Moser, M.-B., (2011). Theta-paced flickering between place-cell maps in the hippocampus. *Nature* **478**, 246–9.
- Jog, M.S., Kubota, Y., Connolly, C.I., Hillegaart, V., Graybiel, A.M., (1999). Building neural representations of habits. *Science* **286**, 1745–9.
- Kawagoe, R., Takikawa, Y., Hikosaka, O., (1998). Expectation of reward modulates cognitive signals in the basal ganglia. *Nature neuroscience* **1**, 411–6.
- Kawakami, K., Takeda, H., Kawakami, N., Kobayashi, M., Matsuda, N., Mishina, M., (2004). A transposon-mediated gene trap approach identifies developmentally regulated genes in zebrafish. *Developmental cell* **7**, 133–44.
- Kedikian, X., Faillace, M.P., Bernabeu, R., (2013). Behavioral and molecular analysis of nicotine-conditioned place preference in zebrafish. *PloS one* **8**, e69453.

- Kimura, Y., Okamura, Y., Higashijima, S., (2006). alx, a zebrafish homolog of Chx10, marks ipsilateral descending excitatory interneurons that participate in the regulation of spinal locomotor circuits. *The Journal of neuroscience* **26**, 5684–97.
- Koide, T., Miyasaka, N., Morimoto, K., Asakawa, K., Urasaki, A., Kawakami, K., Yoshihara, Y., (2009). Olfactory neural circuitry for attraction to amino acids revealed by transposon-mediated gene trap approach in zebrafish. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**, 9884–9.
- Kreitzer, A.C., Berke, J.D., (2011). Investigating striatal function through cell-type-specific manipulations. *Neuroscience* **198**, 19–26.
- Kreitzer, A.C., Malenka, R.C., (2007). Endocannabinoid-mediated rescue of striatal LTD and motor deficits in Parkinson’s disease models. *Nature* **445**, 643–7.
- Lai, C.S.W., Franke, T.F., Gan, W.-B., (2012). Opposite effects of fear conditioning and extinction on dendritic spine remodelling. *Nature* **483**, 87–91.
- Lau, B., Bretaud, S., Huang, Y., Lin, E., Guo, S., (2006). Dissociation of food and opiate preference by a genetic mutation in zebrafish. *Genes, brain, and behavior* **5**, 497–505.

- Lee, E.C., Yu, D., Martinez de Velasco, J., Tessarollo, L., Swing, D.A., Court, D.L., Jenkins, N.A., Copeland, N.G., (2001). A highly efficient *Escherichia coli*-based chromosome engineering system adapted for recombinogenic targeting and subcloning of BAC DNA. *Genomics* **73**, 56–65.
- Lee, S.-J.R., Escobedo-Lozoya, Y., Szatmari, E.M., Yasuda, R., (2009). Activation of CaMKII in single dendritic spines during long-term potentiation. *Nature* **458**, 299–304.
- Levin, E.D., Chen, E., (2004). Nicotinic involvement in memory function in zebrafish. *Neurotoxicology and teratology* **26**, 731–5.
- Li, J., Mack, J.A., Souren, M., Yaksi, E., Higashijima, S., Mione, M., Fetcho, J.R., Friedrich, R.W., (2005). Early development of functional spatial maps in the zebrafish olfactory bulb. *The Journal of neuroscience* **25**, 5784–95.
- Lüscher, C., Malenka, R.C., (2011). Drug-evoked synaptic plasticity in addiction: from molecular changes to circuit remodeling. *Neuron* **69**, 650–63.
- Mante, V., Sussillo, D., Shenoy, K. V, Newsome, W.T., (2013). Context-dependent computation by recurrent dynamics in prefrontal cortex. *Nature* **503**, 78–84.

- Matsuzaki, M., Honkura, N., Ellis-Davies, G.C.R., Kasai, H., (2004).  
Structural basis of long-term potentiation in single dendritic spines.  
*Nature* **429**, 761–6.
- Miyawaki, A., Griesbeck, O., Heim, R., Tsien, R.Y., (1999). Dynamic and  
quantitative Ca<sup>2+</sup> measurements using improved cameleons.  
*Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of  
America* **96**, 2135–40.
- Mueller, K.P., Neuhauss, S.C.F., (2012). Automated visual choice  
discrimination learning in zebrafish (*Danio rerio*). *Journal of  
integrative neuroscience* **11**, 73–85.
- Mueller, T., Guo, S., (2009). The distribution of GAD67-mRNA in the adult  
zebrafish (teleost) forebrain reveals a prosomeric pattern and suggests  
previously unidentified homologies to tetrapods. *The Journal of  
comparative neurology* **516**, 553–68.
- Mueller, T., Wullimann, M.F., (2009). An evolutionary interpretation of  
teleostean forebrain anatomy. *Brain, behavior and evolution* **74**, 30–42.
- Mueller, T., Wullimann, M.F., Guo, S., (2008). Early teleostean basal  
ganglia development visualized by zebrafish *Dlx2a*, *Lhx6*, *Lhx7*, *Tbr2*  
(*eomesa*), and GAD67 gene expression. *The Journal of comparative  
neurology* **507**, 1245–57.

Murakoshi, H., Wang, H., Yasuda, R., (2011). Local, persistent activation of Rho GTPases during plasticity of single dendritic spines. *Nature* **472**, 100–4.

Nambu, A., (2009). Functions of direct, indirect and hyperdirect pathways. *Brain and nerve ; Shinkei kenkyū no shinpo* **61**, 360–72.

Niessing, J., Friedrich, R.W., (2010). Olfactory pattern classification by discrete neuronal network states. *Nature* **465**, 47–52.

Nóbrega-Pereira, S., Gelman, D., Bartolini, G., Pla, R., Pierani, A., Marín, O., (2010). Origin and molecular specification of globus pallidus neurons. *The Journal of neuroscience* **30**, 2824–34.

Northcutt, R.G., (1981). Evolution of the telencephalon in nonmammals. *Annual review of neuroscience* **4**, 301–50.

O'Keefe, J., Dostrovsky, J., (1971). The hippocampus as a spatial map. Preliminary evidence from unit activity in the freely-moving rat. *Brain research* **34**, 171–5.

Okamoto, K., Hayashi, Y., (2006). Visualization of F-actin and G-actin equilibrium using fluorescence resonance energy transfer (FRET) in cultured cells and neurons in slices. *Nature protocols* **1**, 911–9.



- Packard, M.G., McGaugh, J.L., (1996). Inactivation of hippocampus or caudate nucleus with lidocaine differentially affects expression of place and response learning. *Neurobiology of learning and memory* **65**, 65–72.
- Peters, A.J., Chen, S.X., Komiyama, T., (2014). Emergence of reproducible spatiotemporal activity during motor learning. *Nature* **510**, 263–7.
- Portavella, M., Torres, B., Salas, C., (2004). Avoidance response in goldfish: emotional and temporal involvement of medial and lateral telencephalic pallium. *The Journal of neuroscience* **24**, 2335–42.
- Pradel, G., Schachner, M., Schmidt, R., (1999). Inhibition of memory consolidation by antibodies against cell adhesion molecules after active avoidance conditioning in zebrafish. *Journal of neurobiology* **39**, 197–206.
- Reynolds, J.N., Hyland, B.I., Wickens, J.R., (2001). A cellular mechanism of reward-related learning. *Nature* **413**, 67–70.
- Rigotti, M., Barak, O., Warden, M.R., Wang, X.-J., Daw, N.D., Miller, E.K., Fusi, S., (2013). The importance of mixed selectivity in complex cognitive tasks. *Nature* **497**, 585–90.
- Rihel, J., Prober, D.A., Arvanites, A., Lam, K., Zimmerman, S., Jang, S., Haggarty, S.J., Kokel, D., Rubin, L.L., Peterson, R.T., Schier, A.F., (2010). Zebrafish behavioral profiling links drugs to biological targets and rest/wake regulation. *Science* **327**, 348–51.

- Rink, E., Wullimann, M.F., (2001). The teleostean (zebrafish) dopaminergic system ascending to the subpallium (striatum) is located in the basal diencephalon (posterior tuberculum). *Brain research* **889**, 316–30.
- Rodríguez, F., López, J.C., Vargas, J.P., Gómez, Y., Broglio, C., Salas, C., (2002). Conservation of spatial memory function in the pallial forebrain of reptiles and ray-finned fishes. *The Journal of neuroscience* **22**, 2894–903.
- Salamone, J.D., (1994). The involvement of nucleus accumbens dopamine in appetitive and aversive motivation. *Behavioural brain research* **61**, 117–33.
- Samejima, K., Ueda, Y., Doya, K., Kimura, M., (2005). Representation of action-specific reward values in the striatum. *Science* **310**, 1337–40.
- Schultz, W., (2013). Updating dopamine reward signals. *Current opinion in neurobiology* **23**, 229–38.
- Shen, W., Flajolet, M., Greengard, P., Surmeier, D.J., (2008). Dichotomous dopaminergic control of striatal synaptic plasticity. *Science* **321**, 848–51.
- Sison, M., Gerlai, R., (2010). Associative learning in zebrafish (*Danio rerio*) in the plus maze. *Behavioural brain research* **207**, 99–104.

- Smeets, W.J., Marín, O., González, A., (2000). Evolution of the basal ganglia: new perspectives through a comparative approach. *Journal of anatomy* **196**, Pt 4, 501–17.
- Stephenson-Jones, M., Kardamakis, A.A., Robertson, B., Grillner, S., (2013). Independent circuits in the basal ganglia for the evaluation and selection of actions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **110**, E3670–9.
- Stephenson-Jones, M., Samuelsson, E., Ericsson, J., Robertson, B., Grillner, S., (2011). Evolutionary conservation of the basal ganglia as a common vertebrate mechanism for action selection. *Current biology* **21**, 1081–91.
- Surmeier, D.J., Carrillo-Reid, L., Vargas, J., (2011). Dopaminergic modulation of striatal neurons, circuits, and assemblies. *Neuroscience* **198**, 3–18.
- Takahashi, N., Suzuki, Y., Ujiie, H., Hori, T., Iwaki, M., Yamada, T., (2007a). Application of ion beam irradiated ePTFE to repair small vessel injuries. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms* **257**, 114–117.
- Takahashi, N., Suzuki, Y., Ujiie, H., Iwaki, M., Hori, T., Yamada, T., (2007b). Ion-beam irradiated ePTFE as an aneurysm wrapping material. *Surface and Coatings Technology* **201**, 8150–8154.

- Taniguchi, H., (2014). Genetic dissection of GABAergic neural circuits in mouse neocortex. *Frontiers in cellular neuroscience* **8**, 8.
- Tsien, J.Z., Chen, D.F., Gerber, D., Tom, C., Mercer, E.H., Anderson, D.J., Mayford, M., Kandel, E.R., Tonegawa, S., (1996). Subregion- and cell type-restricted gene knockout in mouse brain. *Cell* **87**, 1317–26.
- Vladimirov, N., Mu, Y., Kawashima, T., Bennett, D. V, Yang, C.-T., Looger, L.L., Keller, P.J., Freeman, J., Ahrens, M.B., (2014). Light-sheet functional imaging in fictively behaving zebrafish. *Nature Methods* **11**, 883–4.
- Wan, X., Nakatani, H., Ueno, K., Asamizuya, T., Cheng, K., Tanaka, K., (2011). The neural basis of intuitive best next-move generation in board game experts. *Science* **331**, 341–6.
- Wang, X.-J., (2008). Decision making in recurrent neuronal circuits. *Neuron* **60**, 215–34.
- Welch, J.M., Lu, J., Rodriguiz, R.M., Trotta, N.C., Peca, J., Ding, J.-D., Feliciano, C., Chen, M., Adams, J.P., Luo, J., Dudek, S.M., Weinberg, R.J., Calakos, N., Wetsel, W.C., Feng, G., (2007). Cortico-striatal synaptic defects and OCD-like behaviours in Sapap3-mutant mice. *Nature* **448**, 894–900.
- Westerfield, M., (2007). The Zebrafish Book. A guide for the laboratory use of zebrafish (*Danio rerio*), 5th ed. Univ. of Oregon Press, Eugene.

- Wickersham, I.R., Lyon, D.C., Barnard, R.J.O., Mori, T., Finke, S., Conzelmann, K.-K., Young, J.A.T., Callaway, E.M., (2007). Monosynaptic restriction of transsynaptic tracing from single, genetically targeted neurons. *Neuron* **53**, 639–47.
- Wullimann, M.F., Mueller, T., (2004). Teleostean and mammalian forebrains contrasted: Evidence from genes to behavior. *The Journal of comparative neurology* **475**, 143–62.
- Xie, L., Kang, H., Xu, Q., Chen, M.J., Liao, Y., Thiyagarajan, M., O'Donnell, J., Christensen, D.J., Nicholson, C., Iliff, J.J., Takano, T., Deane, R., Nedergaard, M., (2013). Sleep drives metabolite clearance from the adult brain. *Science* **342**, 373–7.
- Yaksi, E., von Saint Paul, F., Niessing, J., Bundschuh, S.T., Friedrich, R.W., (2009). Transformation of odor representations in target areas of the olfactory bulb. *Nature neuroscience* **12**, 474–82.
- Yin, H.H., Knowlton, B.J., Balleine, B.W., (2004). Lesions of dorsolateral striatum preserve outcome expectancy but disrupt habit formation in instrumental learning. *The European journal of neuroscience* **19**, 181–9.
- Zhao, Y., Araki, S., Wu, J., Teramoto, T., Chang, Y.-F., Nakano, M., Abdelfattah, A.S., Fujiwara, M., Ishihara, T., Nagai, T., Campbell, R.E., (2011). An expanded palette of genetically encoded Ca<sup>2+</sup> indicators. *Science* **333**, 1888–91.

- Zhu, P., Narita, Y., Bundschuh, S.T., Fajardo, O., Schärer, Y.-P.Z., Chattopadhyaya, B., Boulldoires, E.A., Stepien, A.E., Deisseroth, K., Arber, S., Sprengel, R., Rijli, F.M., Friedrich, R.W., (2009). Optogenetic Dissection of Neuronal Circuits in Zebrafish using Viral Gene Transfer and the Tet System. *Frontiers in neural circuits* **3**, 21.
- Zou, M., De Koninck, P., Neve, R.L., Friedrich, R.W., (2014). Fast gene transfer into the adult zebrafish brain by herpes simplex virus 1 (HSV-1) and electroporation: methods and optogenetic applications. *Frontiers in neural circuits* **8**, 41.

## 謝辞

本博士論文を作成するにあたり、ご指導いただきました坪井貴司准教授に心から感謝申し上げます。

また、本研究は全て理化学研究所脳科学総合研究センター岡本仁シニアチームリーダーのご指導の元、行われました。本研究を進める上で、貴重なご助言、ご指導を賜りました岡本仁シニアチームリーダーに深く感謝いたします。

博士課程を通してご支援していただきました、坪井研究室、岡本研究室の皆様により御礼申し上げます。