

論文の内容の要旨

論文題目: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

氏名 青木亮

[背景と目的]

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。これらの適応的行動の学習には終脳の大脳基底核が重要な役割を担うことが知られている。大脳基底核の入力核である線条体には2種類の投射神経細胞が知られており、それぞれ直接経路、間接経路投射神経細胞と呼ばれているが、それらの細胞群が実際の行動選択、及び適応的行動の学習においてどのように働くのかについては全く分かっていない。その理由として、齧歯類や霊長類を用いた研究では両細胞群を区別した状態で細胞の活動を計測することが困難であることが挙げられる。

今研究では、遺伝的操作が容易かつイメージングに適したゼブラフィッシュを新たに大脳基底核研究のモデル動物として確立すべく、ゼブラフィッシュにおける大脳基底核神経回路の同定を行い、また破壊実験により適応的行動に及ぼす影響を検証し、さらに従来に比べ短時間かつ容易に学習可能な、新規適応的行動課題の作製を試みた。

[結果]

1. 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作製

先行研究から、適応的行動課題の一つである能動的忌避課題の学習に伴い、ゼブラフィッシュ終脳表面部に活動の上昇する領域が同定された。哺乳類において同様の適応的行動課題は大脳皮質から大脳基底核の入力核である線条体への投射によって担われていることが知られていたため、まずこの領域を電氣的に破壊する手法を開発し、機能を阻害して学習された行動への影響を調べたところ、対照群に比べて課題の成績が低下することが判明した。さらに、これらの学習された記憶への作用は学習成立後に破壊手術を行った個体でも観察されたため、学習の記録ではなく、維持または想起に関わっていることが示唆された。

これらの脳表面の領域は哺乳類の大脳皮質に相同な領域であると考えられており、また終脳腹側部背側核 (dorsal nucleus of area ventralis telencephali; 以下 Vd) に対する投射が確認されていた。さらに硬骨魚類の神経発生研究より、哺乳類の線条体に対応する領域が Vd であると提唱されていた。硬骨魚類の Vd が哺乳類の線条体の相同領域であることを遺伝的プロファイル、及び投射関係の観点から詳細に検証するため、哺乳類における線条体の直接経路、間接経路投射神経細胞の遺伝的マーカーである *tac1*、*penk* 及び *penk-like* の発現を *in situ hybridization* で確認したところ、Vd 内に発現が確認され、さらにそれらはお互いに異なる細胞で発現していた。さらに哺乳類において両細胞群が共に発現する *ctip2* は、両者を包括する領域に発現していた。このことから、これらの *tac1*、*penk* 及び *penk-like* 陽性細胞が、それぞれゼブラフィッシュ線条体の直接経路、間接経路の投射神経細胞であることが示唆された。

次に Vd の細胞群の投射を調べるため、*tac1* の遺伝子を含むバクテリア由来人工染色体を用いた遺伝子組換え系統を作製した (*Tg(tac1:GAL4)*)。 *Tg(tac1:GAL4; UAS:GFP)* 系統の発現パターンを成魚で確認したところ、内在性の *tac1* の発現と一致した発現パターンが確認され、さらに繊維状の投射がニューロペプチド Y 陽性の脚内核へ伸びていることが確認された。これにより Vd から脚内核への投射が、哺乳類における線条体から、同じ大脳基底核内の淡蒼球への投射に対応することが示唆された。

哺乳類における淡蒼球の遺伝的マーカーである *nkx2.1*、及び *er81* のゼブラフィッ

シユ相同遺伝子の発現を確認したところ、脚内核に強い特異的発現が観察された。これにより、遺伝的発現、及び投射関係の両観点から、ゼブラフィッシュの脚内核が哺乳類の淡蒼球の相同領域であることが強く示唆された。さらに脚内核からの投射を調べるために Tg(npy:gal4;uas:gfp)を作成し、脚内核からの投射先を調べたところ、小細胞性視索前核後部 (posterior part of parvocellular preoptic nucleus、以下 Pp) への投射が確認された。Pp はその機能的分類について未だ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外側腹側核/前腹側核の硬骨魚類における相同領域である可能性は高い。

2. ゼブラフィッシュにおける新規行動実験系の確立

ゼブラフィッシュを大脳基底核研究のモデル動物として確立するうえで、ゼブラフィッシュ成魚を用いた適応的行動及び学習を定量する行動学習パラダイムが必要である。従来の適応的行動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という欠点があった。こ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 Y 迷路弁別課題を新たに確立した。この課題は電気刺激を非条件付け刺激として用いて、コンピュータ制御された視覚刺激を Y 字状の水槽の底部に提示することにより、ゼブラフィッシュに赤色刺激を忌避し、灰色で提示された目的領域へと到達させることを学習させる課題である。実験の結果、ゼブラフィッシュは非常に短時間かつ高い正解率でこの課題を学習可能なことが明らかになった。さらに獲得された記憶は24時間後も保持されていることが確かめられた。

[考察と今後の展望]

本研究では、遺伝的マーカーの発現、及び遺伝子組換えシステムを用いた蛍光タンパク質の発現の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が示された。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が示された。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事が可能になった。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。

今後は本研究で得られた知見を、遺伝的カルシウムインジケータを発現する遺伝子組換え系統の作製、行動実験を模した視覚刺激呈示システムの構築、及び固定下での運動出力計測系の確立と組み合わせることで、実際に顕微鏡下で適応的行動課題を実行中のゼブラフィッシュ線条体から神経活動を記録することが可能になり、大脳基底核の神経回路における行動選択のための計算原理の解明につながると期待される。