

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 22 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25440104

研究課題名(和文)ゼブラフィッシュを用いた小脳神経の発生とその機能の解析

研究課題名(英文)The analysis of the development and the function of cerebellar neural circuitry by using zebrafish

研究代表者

清水 貴史 (Shimizu, Takashi)

名古屋大学・生物機能開発利用研究センター・准教授

研究者番号：50324760

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：小脳は、運動学習や恐怖などの情動に関する学習において重要な役割を果たしている。ゼブラフィッシュをモデル動物として小脳神経の発生と回路形成機構の研究を行った。小脳顆粒細胞の増殖と分化に異常をきたす変異体の解析から、細胞周期の進行とクロマチンリモデリングに関与する遺伝子が小脳神経の生成に関わっている明らかとした。さらに基底膜が神経軸索の正確な走行に重要な役割をしていることを見出した。また、ゼブラフィッシュ仔魚を用いた恐怖条件付け学習の実験系を構築した。小脳顆粒細胞は、学習過程において活性が変化した。顆粒細胞のコーディングの変化が、条件付けと条件反応からの回復を制御している可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The cerebellum plays an important role for motor learning and classical fear conditioning. To understand the genes that control the generation of cerebellar granule cells and their axogenesis, I investigated two zebrafish mutants. The cranio facial development protein 1 gene controlled granule cell differentiation by switching proliferation state to differentiation state in the precursors. The component of basement-membrane, type IV collagens, regulated the axogenesis. I established a method for the classical fear conditioning paradigm by using zebrafish larva. The 20 days zebrafish larvae acquired the conditioned fear responses. Inhibition of granule-cell transmission impaired the recovery from conditioned responses. I found conditioning-dependent changes in granule cell encoding. There were two types of conditioning-associated neurons in the cerebellum. These results indicate that granule cells control the recovery from conditioned fear responses in zebrafish.

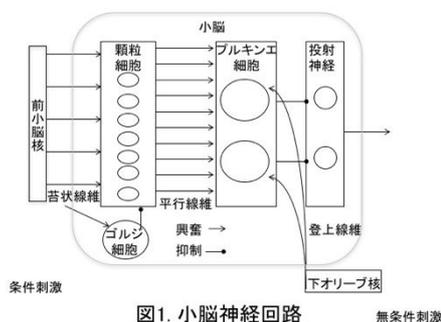
研究分野：発生生物学

キーワード：小脳 神経発生 ゼブラフィッシュ 恐怖条件付け学習 顆粒細胞

1. 研究開始当初の背景

小脳は、感覚情報と運動に連動した二つの入力情報を統合することにより、円滑な運動の制御と運動学習を行う。また、条件付け恐怖学習など情動による適応運動に中心的な役割をしていると考えられている。さらに近年は、運動から意識や思考といった高次脳機能に関与していることが示唆されている。小脳皮質は、分子層（顆粒細胞の平行線維とプルキンエ細胞の樹状突起からなる）、プルキンエ細胞層、顆粒細胞層の3層からなり、この構造は広く脊椎動物において保存されている。また、小脳の神経細胞は主に二つのグループに分けられる。グルタミン酸作動性の興奮性神経である顆粒細胞と深部小脳核神経細胞（真骨魚類においては eurydendroid 細胞）と GABA 作動性の抑制性神経であるプルキンエ細胞と介在神経（ゴルジ・星状細胞）である。小脳皮質のプルキンエ細胞は、小脳外からの登上線維と苔状線維の2種類の入力信号を受ける。苔状線維は、中枢神経の様々な領域にある小脳前核（中脳背側被蓋核、視蓋前域神経など）からの線維が顆粒細胞の樹状突起にシナプスを形成する。苔状線維からの入力は、顆粒細胞の軸索である平行線維に伝えられ、平行線維は最終的にプルキンエ細胞の樹状突起末端にシナプスを形成する。登上線維は、脳幹部に位置する下オリーブ核から起こり、プルキンエ細胞の細胞体近辺に終わる。プルキンエ細胞では登上線維と平行線維の信号が統合され、出力信号を興奮性投射神経である小脳核（魚類; eurydendroid 細胞）に送る(図1)。小脳パーセプトロン仮説では、苔状線維刺激が多数存在する顆粒細胞に分散表現される。多数の平行線維からプルキンエ細胞樹状突起へのシナプス荷重が、1本の登上線維の刺激を教師信号としてそれぞれの入力に応じて変化し、学習が行われると考えられた。登上線維と苔状線維からの同時刺激により、平行線維-プルキンエ細胞間シナプス長期抑制(LTD)が発見され、この仮説が支持された(Ito, M. Nat. Rev. Neurosci 9, 304, 2008)。

これらの小脳神経回路の構造とその機能については、マウスやニワトリの解剖学的知見や遺伝子改変動物の解析、電気生理学の実験によって解明されつつある(Review; Neuroscience 162, 723-731. 2009)。さらに



恐怖学習や運動学習における長期抑制とその分子基盤についても多数報告されている。しかしながら、小脳依存的な学習過程における神経細胞群としての機能の詳細は明らかではない。また、小脳神経回路の発達段階と学習能力の関係は定かではない。また、恐怖条件付け学習における小脳と他の脳領域、例えば扁桃体などとの関係も不明な点が多い。

2. 研究の目的

本研究においては、ゼブラフィッシュ小脳神経ネットワークの詳細な解析と小脳依存的な学習能力の測定とその過程における神経活動の可視化を行い、これまでの発生学的、解剖学的知見と合わせて小脳の構造と機能を統合的に理解していくことを目的とした。

小脳神経の形成不全をきたすゼブラフィッシュ変異体の解析から、顆粒細胞の生成と軸索形成の新しい分子機構を探る。また、小脳に蛍光タンパクなどを発現するトランスジェニックゼブラフィッシュの同定と性格付けによって神経回路網を明らかとするとともに小脳機能解析のためのツールを得る。これらのゼブラフィッシュを使って、小脳の機能解析と神経活動のモニタリングを行い、構造と機能の関係を明らかとすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 小脳変異体の解析

ゼブラフィッシュを用いて小脳神経細胞の発生と神経回路形成機構を明らかとするために変異体を解析した。

gazami 変異体

gazami 変異体では顆粒細胞が減少していた。gazami 変異体の原因遺伝子である *craniofacial development protein 1 (cfdp1)* と相互作用する遺伝子を Yeast two hybrid 法で検索した。細胞周期関連遺伝子の発現を調べた。

shionameki 変異体

shionameki 変異体では顆粒細胞の軸索走行が乱れていた。shionameki 変異体の原因遺伝子は IV 型コラーゲンである。IV 型コラーゲンは、基底膜構成因子の一つなので変異体における基底膜構造の詳細な解析を免疫染色法と電子顕微鏡を用いて行った。軸索伸張や再生過程を継時的に観察した。軸索走行に関与する因子である Robo-Slit 経路の関与について調べた。

(2) 小脳神経のコネクション解析

小脳神経回路形成に関わる神経細胞特異的に転写活性化因子 Gal4FF を発現するトランスジェニックゼブラフィッシュを複数種類同定して性格付けを行った。免疫染色法や in situ ハイブリダイゼーション法によってどのような小脳神経細胞に Gal4FF が発現しているかを調べた。小麦麦芽凝集素 (WGA) を顆粒細胞に発現させることによって小脳における神経回路網を解析した。蛍光タンパクを発現するトランスジェニックゼブラ

イッシュから、顆粒細胞とプルキンエ細胞を FACS によって取り出し、RNA sequencing 法によって発現する遺伝子を網羅的に調べた。

(3) 恐怖条件付け学習

仔魚を用いた恐怖条件付け学習系の樹立

アガロースに拘束したゼブラフィッシュ稚魚に対して、白色 LED あるいは赤色 LED の消灯を条件刺激として、体表への電気ショックを無条件刺激として、条件反応として心拍の低下（徐脈）を測定した(図2)。生後 20 日前後の仔魚を用いて、条件付け学習過程を解析した。それぞれのニューロン特異的にボツリヌス毒素を発現するトランスジェニックフィッシュで恐怖学習パラダイムを行い、小脳のどの領域のどのようなニューロンが関与しているかを解析した。

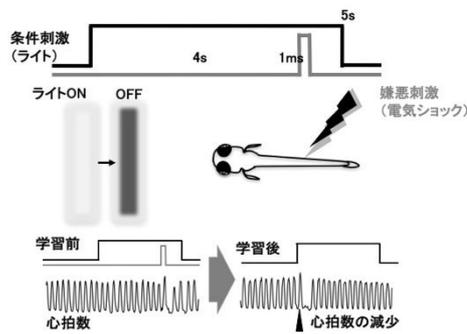


図2. 心拍の変化を用いた遅延条件付け恐怖学習

学習時における神経活動変化のモニタリング

汎神経マーカーである *elav3* 遺伝子エンハンサーによって GCaMP7a を発現するトランスジェニックフィッシュを用いて、学習前、学習中、学習後における小脳神経の活動の変化を記録した。生後 20 日前後のゼブラフィッシュ仔魚について神経活動の変化と心拍数の変化を観察した。

(4) 回避学習

遅延条件付け回避学習（非痕跡）

狭い通路を通じて往来できる 2 つのコンパートメントに分割された水槽に魚を入れる。魚のいる方のコンパートメントに緑色ライト（条件刺激）を点灯し、ライトが点灯している間に他のコンパートメントに移動しなければ無条件刺激（電気ショック）を与える試行を繰り返す。このような試行を繰り返すと魚は条件刺激に反応して反対側のコンパートメントの回避行動をとることが知られている。このような非痕跡条件付け回避学習における小脳神経回路の役割を調べた。

4. 研究成果

(1) 小脳神経形成に異常のある変異体の解析

gazami 変異体では、成熟した顆粒細胞が減少しているが、前駆細胞の細胞増殖は亢進していた。*gazami* の原因遺伝子である *cfdp1* は、細胞増殖に関わる遺伝子 c-Myc と結合した。さらにこの変異体では、G2/M サイクリン

である *cycb1* の発現が上昇し、G1/S サイクリン依存性キナーゼである *cdk4* の発現は逆に減少していた。以上の結果は、*Cfdp1* が Myc と協調して細胞周期関連遺伝子の発現制御を通して、細胞周期の進行を制御している可能性が示唆された。

IV 型コラーゲンの変異によって小脳顆粒細胞の軸索走行に異常が見られた。IV 型コラーゲンの変異により、基底膜構造が乱れることによって軸索の走行が異常になることを明らかにした (PLoS Genet. (2015))。

(2) 小脳神経のコネクション：小脳神経回路形成に関わる神経細胞特異的に転写活性化因子 Gal4FF を発現するトランスジェニックゼブラフィッシュを解析した。顆粒細胞に小麦芽凝集素 (WGA) を顆粒細胞に発現させることによって小脳における神経回路網を解析した。WGA の輸送を解析したところ、顆粒細胞 > 平行線維 > プルキンエ細胞 > eurydendroid 細胞（投射神経）あるいは、顆粒細胞 > 平行線維 > プルキンエ細胞 < 登上線維 < 下オリブ核といった小脳の神経回路網をトレースすることが出来た (Dev. Biol. (2014))。

顆粒細胞とプルキンエ細胞に発現する遺伝子を網羅的に解析して in situ ハイブリダイゼーションによって発現部位を同定した (J Comp Neurol. (2017))。

(3) 恐怖条件付け学習

古典的恐怖学習付け学習：生後 20 日前後のゼブラフィッシュを用いて条件刺激として LED ライトの消灯、無条件刺激として電気ショックを行い、条件反応として心拍数の変化を測定する恐怖条件付け学習の実験系を樹立した。小脳顆粒細胞の一部をボツリヌス毒素で阻害したところ、学習が行われないと予想していたが、学習頻度には影響はなかった。しかし、阻害魚では条件反応である徐脈が延長した。また、条件反応の獲得に従って反応する小脳内ニューロンを GCaMP を用いたカルシウムイメージングで同定した(図 3)。これらのニューロンは、小脳体にある顆粒細胞である可能性が高く、条件反応と相関が示唆された。また、ニューロンの活性化の時間経過より徐脈からの回復過程を制御している可能性が示唆された。これまでは平行線維からプルキンエ細胞への神経伝達における LTD が学習に関与していると考えられていた

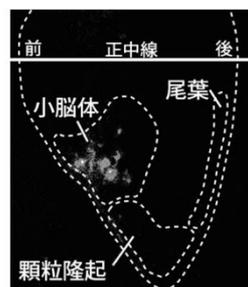


図3. 条件付け恐怖学習に関連して活動する小脳ニューロン

が、顆粒細胞におけるコーディングが学習過程で変化することも重要であることが示唆された。

(4) 回避学習

ゼブラフィッシュ成魚を用いた回避学習システムを構築した。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 5 件)

- Hibi, M., Matsuda, K., Takeuchi, M., Shimizu, T., and Murakami, Y. Evolutionary mechanisms that generate morphology and neural-circuit diversity of the cerebellum. *Dev Growth Differ.* doi: 10.1111/dgd.12349 (2017)
- Takeuchi, M., Yamaguchi, S., Sakakibara, Y., Hatyashi, T., Matsuda, K., Hara, Y., Tanegashima, C., Shimizu, T., Kuraku, S., and Hibi, M. Gene expression profiling of granule cells and Purkinje cells in the zebrafish cerebellum. 査読有、*J Comp Neurol.* 525 1558-1585 (2017)
- Scalise, K., Shimizu, T., Hibi, M., and Sawtell, N.B. Responses of cerebellar Purkinje cells during fictive optomotor behavior in larval zebrafish. 査読有、*J Neurophysiol.* 116 2067-2080 (2016)
- Takeuchi, M., Matsuda, K., Yamaguchi, S., Asakawa, K., Miyasaka, N., Lal, P., Yoshihara, Y., Koga, A., Kawakami, K., Shimizu, T., and Hibi, M. Establishment of Gal4 transgenic zebrafish lines for analysis of development of cerebellar neural circuitry. 査読有、*Dev Biol.* 397 1-17 (2015)
- Takeuchi, M., Yamaguchi, S., Yonemura, S., Kakiguchi, K., Sato, Y., Higashiyama, T., Shimizu, T., and Hibi, M. Type IV collagen controls the axogenesis of cerebellar granule cells by regulating basement membrane integrity in zebrafish. 査読有、*PLoS Genet.* 11 e1005587 (2015)

[学会発表](計 24 件)

- 清水貴史 ゼブラフィッシュ恐怖条件付け学習における小脳の役割 日本発生生物学学会 秋季シンポジウム、2016.10. (静岡・三島)
- Takeuchi, M., Yamaguchi, S., Sakakibara, Y., Hayashi, T., Matsuda, K., Hara, Y., Hayashi, T., Kuraku, S., Shimizu, T., and Hibi, M. Gene expression profiling of granule cells

and Purkinje cells in zebrafish cerebellum. 第 22 回小型魚類研究会、2016.8. (愛知・岡崎)

Matsuda, K., Yoshida, M., Kawakami, K., Hibi, M., and Shimizu, T. Zebrafish cerebellar neural circuitry is involved in the classical fear conditioning. 第 39 回日本神経科学大会、2016.7. (神奈川・横浜)

Matsuda, K., Yoshida, M., Asakawa, K., Nakai, J., Kawakami, K., Hibi, M., and Shimizu, T. Zebrafish cerebellum is involved in the classical fear conditioning. 第 21 回小型魚類研究会、2015.9. (大阪・吹田)

Takeuchi, M., Yamaguchi, S., Hayashi, T., Sakakibara, Y., Matsuda, K., Hara, Y., Hayashi, T., Kuraku, S., Shimizu, T., and Hibi, M. Basement membrane stability is important for the axogenesis of cerebellar granule cells in zebrafish. 第 21 回小型魚類研究会、2015.9. (大阪・吹田)

Hibi, M., Takeuchi, M., Yamaguchi, S., Matsuda, K., Hayashi, T., Hara, Y., Sakakibara, Y., Yoshida, M., Kuraku, S., and Shimizu, T. Evolution and development of cerebellar neural circuitry in teleosts. 第 48 回日本発生生物学学会大会、2015.6. (茨城・つくば)

Shimizu, T., Kani, S., Bae, Y.K., Sun, X., and Hibi, M. A nuclear protein Cfdp1 regulates differentiation of granule cells in zebrafish cerebellum. 第 48 回日本発生生物学学会大会、2015.6. (茨城・つくば)

Takeuchi, M., Yamaguchi, S., Hayashi, T., Yonemura, S., Hara, Y., Hayashi, T., Kuraku, S., Shimizu, T., and Hibi, M. Integrity of basement membrane is important for axogenesis of cerebellar granule cells. 第 48 回日本発生生物学学会大会、2015.6. (茨城・つくば)

Matsuda, K., Yoshida, M., Takeuchi, M., Asakawa, K., Ohkura, M., Nakai, J., Kawakami, K., Hibi, M., and Shimizu, T. Roles of zebrafish cerebellar neural circuitry in the classical fear conditioning. 第 38 回日本神経科学大会、2015.7. (兵庫・神戸)

Shimizu, T., Kani, S., Bae, Y.K., Sun, X., and Hibi, M. A nuclear protein Cfdp1 regulates differentiation of granule cells in zebrafish cerebellum. 第 38 回日本神経科学大会、2015.7. (兵庫・神戸)

Takeuchi, M., Yamaguchi, S., Hayashi, T., Sakakibara, Y., Matsuda, K., Hara, Y., Hayashi, T., Kuraku, S., Shimizu, T., and Hibi, M. Transcriptome analysis of

granule cells and Purkinje cells in zebrafish cerebellum. 第38回日本神経科学大会、2015.7. (兵庫・神戸)
 Matsuda,K., Yoshida,M., Takeuchi,M., Asakawa,K., Ohkura,M., Miyasaka,N., Yoshihara,Y., Nakai,J., Kawakami,K., Hibi,M., and Shimizu,T. Roles of zebrafish cerebellar neural circuitry in the classical fear conditioning. 第20回小型魚類研究会、2014.9. (東京)
 Takeuchi,M., Yamaguchi,S., Yonemura,S., Asakawa,K., Kawakami,K., Takada,S., Shimizu,T., and Hibi,M. Precise assembly of the basement membrane is important for the axogenesis of cerebellar granule cells. 第20回小型魚類研究会、2014.9. (東京)
 Takeuchi,M., Yamaguchi,S., Yonemura,S., Asakawa,K., Kawakami,K., Takada,S., Shimizu,T., and Hibi,M. Basement membrane structures is important for the axogenesis of cerebellar granule cells. 第37回日本神経科学大会、2014.9. (横浜)
 Takeuchi,M., Yonemura,S., Asakawa,K., Kawakami,K., Takada,S., Kuraku,S., Hayashi,T., Yamaguchi,S., Shimizu,T., and Hibi,M. Contral of axon guidance of cerebellar granule cells by the basement membrane. 11th International Conference on Zebrafish Development and Genetics、2014.6. (Madison, USA)
 Takeuchi,M., Yonemura,S., Asakawa,K., Kawakami,K., Takada,S., Shimizu,T., and Hibi,M. Precise axogenesis of the cerebellar granule cells requires interaction between their axons and the basement membrane. 第47回日本発生物学会大会、2014.5. (名古屋)
 Matsuda,K., Takeuchi,M., Asakawa,K., Ohkura,M., Miyasaka,N., Yoshihara,Y., Hayashi,T., Kuraku,S., Kawakami,K., Shimizu,T., and Hibi,M. Dissection of cerebellar neural circuitry with zebrafish Gal4gene/enhancer trap lines. 第47回日本発生物学会大会、2014.5. (名古屋)
 Matsuda,K., Takeuchi,M., Asakawa,K., Yoshida,M., Ohkura,M., Miyasaka,N., Yoshihara,Y., Nakai,J., Kawakami,K., Hibi, M., and Shimizu,T. Functional analysis of zebrafish cerebellar neural circuitry in classical conditioning. 第19回小型魚類研究会、2013.9. (仙台)
 Takeuchi,M., Yonemura,S., Asakawa,K., Kawakami,K., Takada,S., Shimizu,T., and Hibi,M. Basement membrane-dependent contral of axogenesis of cerebellar granule cells.

第19回小型魚類研究会、2013.9. (仙台)
 Takeuchi,M., Yonemura,S., Asakawa,K., Kawakami,K., Takada,S., Shimizu,T., and Hibi,M. Basement membrane integrity is required for axogenesis of cerebellar granule cells. 第46回日本発生物学会大会、2013.5. (松江)

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

名称：
 発明者：
 権利者：
 種類：
 番号：
 出願年月日：
 国内外の別：

取得状況(計 0件)

名称：
 発明者：
 権利者：
 種類：
 番号：
 取得年月日：
 国内外の別：

〔その他〕
 ホームページ等
<http://bbc.agr.nagoya-u.ac.jp/~junkei/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

清水 貴史 (SHIMIZU Takashi)
 名古屋大学・
 生物機能開発利用研究センター・准教授
 研究者番号：50324760

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()