

連載講座

ヒトを知るモデル動物としてのゼブラフィッシュ-6

ゼブラフィッシュを用いた 小脳の発生と機能解析

日比 正彦 清水 貴史

Key words: ゼブラフィッシュ, 小脳, 神経分化, 恐怖応答学習

これまで、ゼブラフィッシュを用いた神経科学の研究は、中枢神経後方の脊髄や脳幹部、前方の終脳・間脳・中脳に焦点を当てたものが多かった。これは、構造と機能が単純で、脊椎動物間で構造の類似性の高い脊髄や脳幹部と、より高度な情報処理のしくみを知るため終脳・間脳・中脳を研究するという側面があった。ヒトで最大のニューロン数を持ち(脳全体の70%以上)、複雑な機能を有する小脳に関しては、この十数年で研究が進んできた。本稿では、ゼブラフィッシュを用いた解析から得られた小脳の発生と機能に関する知見を概説する。

I ゼブラフィッシュの小脳の構造 —ヒト小脳との比較

1. 解剖

中枢神経の構造は大きく、前脳(終脳・間脳)、中脳、菱脳(後脳)、脊髄に分けられる。小脳は、菱脳前端の背側に位置する神経組織である。ヒトの小脳の構造は複雑である。小脳表面には横走る溝があり、これにより10個の小脳回に分けられる。前方9つを小脳体、最後尾は片葉小節葉と呼ばれる。また、小脳は、中央の虫部と左右の小脳半球にも分けられる。一方、ゼブラフィッシュ小脳は単純な構造をしている¹⁻⁴⁾(図1)。前後に大きく3つの区画に分けられる。前方は小脳弁と呼

ばれ、この部分は中脳背側の視蓋の下に潜り込んでいる。真ん中には最も大きな小脳体が存在するが、小脳回のような構造はない。小脳体の後方と側方には、それぞれ尾葉と顆粒隆起と呼ばれる区画がある。単純に比較することは難しいが、ゼブラフィッシュ小脳弁と小脳体を合わせた構造がヒトの小脳体に、ゼブラフィッシュの尾葉と顆粒隆起が、ヒトの片葉小節葉に相当すると考えられる。一方、虫部と小脳半球のような正中部と外側部の区別はない。哺乳類や鳥類では、遺伝子やタンパク質(Zebrin IIなど)の発現と相関する縦長の機能ドメインがあるとされているが⁵⁾、ゼブラフィッシュにはみられない。

2. 神経回路

ゼブラフィッシュの小脳弁と小脳体は、ヒトの小脳と同様に三層構造をとっている^{1-4,6)}(図1)。表層から分子層、プルキンエ細胞層、顆粒層である。尾葉と顆粒隆起では、顆粒層が大部分を占め表層に位置している。ヒトの小脳では最も内側に白質(小脳髄質)があるが、ゼブラフィッシュにはみられない。小脳に存在する細胞種はヒトとゼブラフィッシュでかなり保存されている^{1-4,6)}。グルタミン酸作動性興奮性ニューロンである顆粒細胞、GABA作動性抑制性ニューロンであるプルキンエ細胞、介在ニューロンであるゴルジ細胞や星状細胞は共通である。顆粒細胞とプルキンエ細胞

Developmental and functional studies of the cerebellum using zebrafish

Hibi Masahiko, Shimizu Takashi: 国立大学法人東海国立大学機構名古屋大学大学院理学研究科(〒464-8602 愛知県名古屋市中種区不老町)

0370-9531/08/¥500/論文/JCOPY

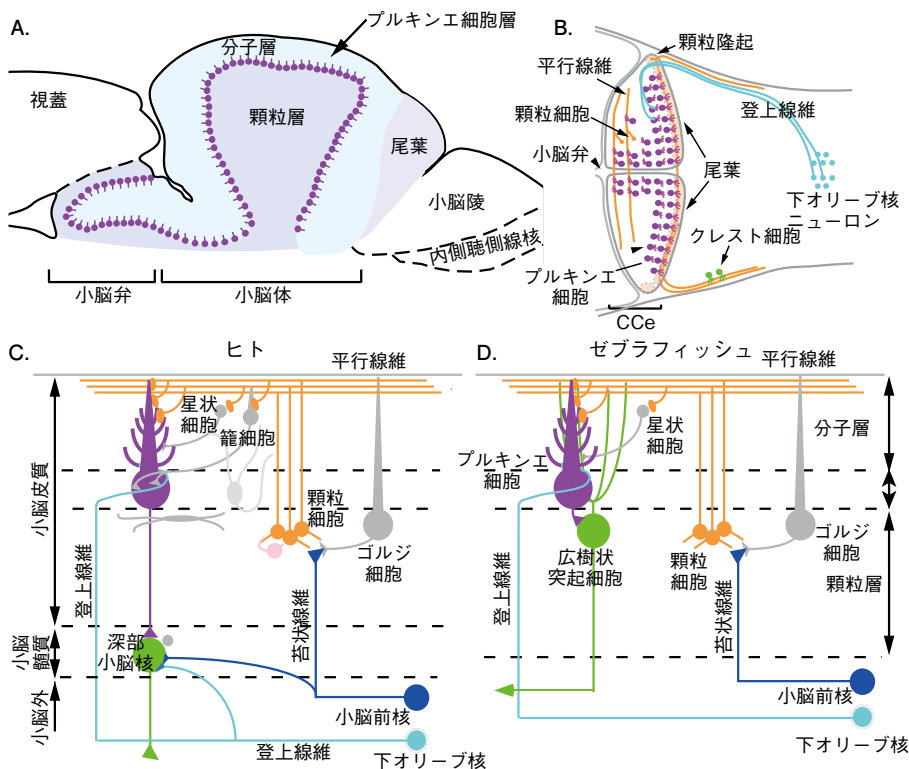


図 1 ゼブラフィッシュの小脳

A. ゼブラフィッシュ成魚の小脳 (矢状断). B. ゼブラフィッシュ仔魚の小脳 (背面図). C, D. ヒトとゼブラフィッシュの小脳神経回路の模式図 (文献 2, 3 より改変して引用)

胞の細胞体は、それぞれ顆粒層とプルキンエ細胞層に位置する。これらの細胞は、小脳外から入力を受ける。顆粒細胞は、脳のいろいろな場所にある小脳前核からの軸索(苔状線維)を受け、その情報は分子層に存在する顆粒細胞軸索(平行線維)を介して、プルキンエ細胞樹状突起に伝えられる。一方、プルキンエ細胞は、脳幹部腹側に位置する下オリーブ核からの軸索(登上線維)を受ける。プルキンエ細胞は、苔状線維-平行線維からの情報と、登上線維の情報を統合して処理し、その情報を、投射ニューロンを介して小脳外へ出力する。ヒトを含む多くの脊椎動物では、投射ニューロンはプルキンエ細胞から離れて、正中部分に位置し深部小脳核を構成するが、ゼブラフィッシュの投射ニューロンはプルキンエ細胞の近傍に位置し、長い樹状突起を持ち広樹状突起細胞と呼ばれ、平行線維からの信号も受ける。この部分は、ヒトとゼブラフィッシュの小脳神経回路の大きな違いの一つである。後方のプルキンエ細胞

は、ヒトと同様に前庭神経核(下行聴核)にも直接軸索を伸長する。また、後方(尾葉と顆粒隆起)の顆粒細胞はプルキンエ細胞に軸索を送るが、この軸索は、更に小脳から後方に伸長し、内側聴側線核に細胞体を持つクレスト細胞の樹状突起に出力する。この部分も、ヒトを含む哺乳類にはみられない神経回路である。小脳の後方の神経回路は、ヒトの片葉小節葉と似た機能、すなわち前庭神経や蝸牛神経(聴側線系)情報の処理に関わっていると考えられる。

介在ニューロンである星状細胞は分子層に、ゴルジ細胞は顆粒層に存在し、小脳神経回路機能の調整に関与する。一方、ヒトにみられる籠細胞などの幾つかの介在ニューロンは、ゼブラフィッシュで認められない。小脳の放射状グリアであるバグマングリア細胞は、ゼブラフィッシュでも認められる。このように、ヒトとゼブラフィッシュで違いがあるものの、基本的な神経回路構造は保存されている。

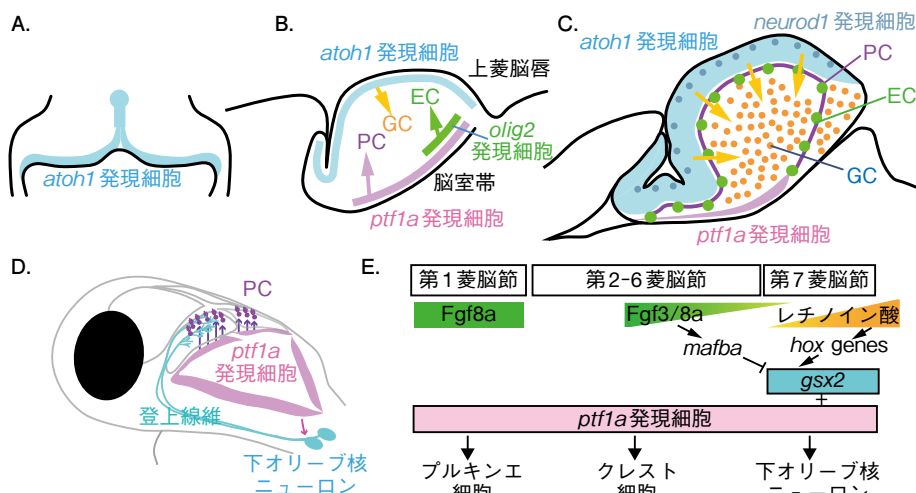


図2 ゼブラフィッシュにおける小脳ニューロンと下オリーブ核ニューロンの発生

A. ゼブラフィッシュ仔魚小脳領域の *atoh1* 発現神経前駆細胞。B, C. 仔魚および成魚での小脳ニューロン発生。D. プルキンエ細胞と下オリーブ核ニューロン分化。E. 下オリーブ核ニューロン細胞運命決定のメカニズム。GC: 顆粒細胞, PC: プルキンエ細胞, EC: 広樹状突起細胞。(文献2-4, 12より改変して引用)

II 小脳発生

小脳領域は、発生初期に神経前後軸形成プログラムによって形成される²⁻⁴⁾。その小脳領域には2つの神経前駆細胞ドメイン、すなわち小脳原基背側に位置する上菱脳唇と腹側に位置する脳室帯が形成される(図2)。上菱脳唇にはbHLH型転写因子をコードするプロニューラル遺伝子 *atoh1* (ゼブラフィッシュでは *atoh1a/b/c*) が発現する神経前駆細胞が存在し、顆粒細胞を含むグルタミン酸作動性神経を産生する^{7,8)}。ヒトを含む羊膜類では、*atoh1* を発現する平面状に広がり神経前駆細胞の層(外顆粒層)をつくるが、ゼブラフィッシュでは正中中部と後端部に限局する^{7,8)}。正中中部の *atoh1* 発現前駆細胞の一部は、bHLH型転写因子をコードする *neurod1* を発現し、顆粒細胞へ分化する。これらの顆粒細胞は、軸索を伸長しながら腹側に移動し、小脳弁や小脳体の顆粒層を形成する。後端部の *atoh1* 発現神経前駆細胞は顆粒細胞を産生するが、腹側に移動せず、尾葉と顆粒隆起の顆粒層を形成する⁸⁾。 *atoh1a*, *b*, *c* の3つの遺伝子は冗長的に機能していると考えられるが、*atoh1c* が顆粒細胞を産生するうえで、最も寄与が大きいことが示されている⁹⁾。

一方、脳室帯にはプロニューラル遺伝子 *ptf1a*

が発現する神経前駆細胞が存在し、哺乳類同様、プルキンエ細胞、星状細胞、ゴルジ細胞などのGABA作動性神経を産生する⁸⁾。これらの細胞は分化しながら脳室帯から背側に移動し、それぞれプルキンエ細胞層、分子層、顆粒層に定着する。哺乳類の投射ニューロンである小脳深部核ニューロンは、*atoh1* 発現前駆細胞から産生されることがわかっているが、ゼブラフィッシュの投射ニューロン(広樹状突起細胞)の起源はまだよくわかっていない。少なくとも、広樹状突起細胞の一部は、脳室帯に存在するbHLH型転写因子をコードする *olig2* を発現する神経前駆細胞に由来すると考えられている^{8,10)}。プルキンエ細胞と同様に、脳室帯から背側に移動し、プルキンエ細胞近傍に移動するのではないだろうか。これまで、顆粒細胞で発現する分泌タンパク質 Reelin がプルキンエ細胞の移動に重要であると報告されてきたが、ゼブラフィッシュを用いた解析から、顆粒細胞で産生された Reelin タンパク質が軸索で分子層に運ばれ、Reelin の濃度勾配が形成され、それによって脳室で産生されるプルキンエ細胞や広樹状突起細胞の移動が制御されることが示唆されている¹¹⁾。

atoh1 や *ptf1a* 発現細胞は、小脳領域だけでなく、菱脳全体の背側脳室帯に存在する。これらの一部は、小脳の入力あるいは出力細胞を産生す

る。例えば、菱脳後方の *ptf1a* 発現神経前駆細胞から、登上線維を伸ばす下オリブ核ニューロンが産生される⁸⁾。*ptf1a* 発現細胞のうち、前方菱脳(第1菱脳節)から小脳プルキンエ細胞・介在ニューロンが、最後方の菱脳(第7菱脳節)から下オリブ核ニューロンが、中間的な位置(第2-6菱脳節)から小脳の出力先の一つであるクレスト細胞が産生される¹²⁾。*ptf1a* 発現細胞から小脳神経回路を構成する複数のニューロンができる現象は、細胞の多様性獲得のメカニズムを理解するうえで重要である。これまでの研究から、菱脳の前後軸を形成に関わる線維芽細胞増殖因子(Fgf)とレチノイン酸シグナルが¹³⁾、ホメオボックス遺伝子 *gsx2* の第7菱脳節での発現を調節していること、*gsx2* が下オリブ核ニューロンの運命決定に必要であることが明らかになっている¹²⁾(図2)。

小脳神経回路のニューロンの分化や基本的な回路形成は、受精後の最初の1週間に観察される¹⁾。しかし、ニューロン産生は持続して行われる。プルキンエ細胞は受精後1か月間、顆粒細胞は一生産生され続けられる^{8,14,15)}。ゼブラフィッシュ成体小脳においても、*atoh1*、*ptf1a* を発現する細胞は存在しており、ゼブラフィッシュでは神経前駆細胞を維持し続けるメカニズムがあると考えられる。哺乳類では、プルキンエ細胞で産生される Shh が顆粒細胞の前駆細胞の増殖に関わっているが、ゼブラフィッシュにおける神経前駆細胞の維持機構はいまだ不明である。

Ⅲ 小脳機能

1. 運動学習

小脳に関連した運動学習の解析には、前庭動眼反射(VOR)や視機性眼球反応(OKR)が実験系としてよく用いられてきた。VORは、頭が動いたときの網膜上のブレをなくすように、眼の動きによって補正する反射である。OKRは、視野が動くとき網膜上の像のぶれをなくすように、眼が動く反応である。これらの眼球運動自体は、小脳の機能は必要ないと考えられているが、動物はこの行動を繰り返すことにより、より効率的に眼を動かすようになる運動学習に小脳が関わっている。ゼブラフィッシュでは、VORやOKRは早期の仔

魚から認められるが、運動学習は成長と共にみられるようになる^{16,17)}。ゼブラフィッシュ仔魚の小脳が、OKRの適応調節に関わる実験結果も報告されており¹⁸⁾、仔魚の発達過程で機能的な小脳神経回路が形成され、運動学習に携わるものと考えられる。

魚は遊泳の際、視覚情報をもとに運動制御を調節する。例えばまわりの景色が動くと、川の流れで身体が流されたと認識し、それに対抗するように泳ぐ。その動きにより景色が変わり、その視覚情報をもとに運動制御を調整する(運動適応)。この運動適応において、小脳神経回路が活性化されること^{19,20)}、登上線維を破壊すると影響が出ることから¹⁹⁾、小脳は運動適応にも関与することが示されている。

2. 恐怖応答学習

小脳が古典的条件づけに関与することは古くから知られていた。動物は、非侵襲刺激を条件刺激(CS)、嫌悪的な刺激を無条件刺激(US)としてペアで繰り返し与えると、その関係性を連合学習し、条件刺激だけでフリージング(すくみ)反応や回避反応を起こす。例えば、音や光刺激を短時間条件刺激として与え、角膜や眼瞼への刺激を無条件刺激として与える実験を繰り返すと、条件刺激でまばたきを誘導できる(瞬目反射条件づけ)。瞬目反射条件づけには、小脳神経回路が関与していると考えられてきた。

ゼブラフィッシュの受精後20日前後の仔魚を顕微鏡上に固定し、消灯をCS(5秒)とし、CS開始4秒後にUSとして電気ショックを与える学習実験を行うと、約40%の魚がCSに反応して心拍が遅くなる(徐脈)、古典的恐怖応答学習の実験を確立した。神経伝達物質の放出を抑制するボツリヌス毒素を顆粒細胞に特異的に発現させた魚では、学習効率は影響を受けないものの、徐脈反応が遅延した²¹⁾。また、その学習後に、CSにより活性化される顆粒細胞と考えられるニューロンが、小脳体に存在することが明らかになった²¹⁾。少なくとも、心臓の自律神経系制御に関わる古典的恐怖応答学習において、小脳神経回路は関与しており、条件反応のタイミング調節に関わっていると考えられた。

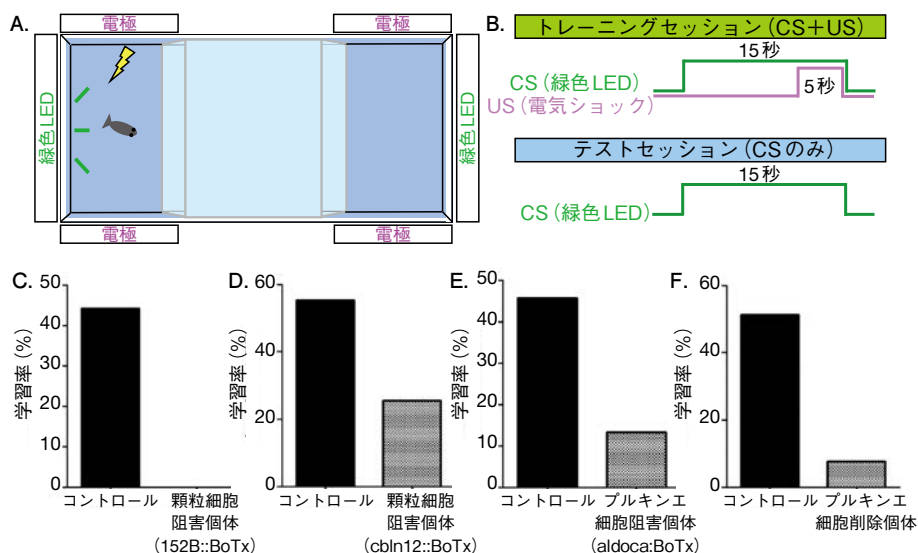


図3 ゼブラフィッシュを用いた能動的回避学習

A. 能動的回避学習に用いた水槽。B. 能動的回避学習の学習パラダイム。C-F. ボツリヌス毒素で顆粒細胞 (C, D), プルキンエ細胞 (E) を阻害した魚, ニトロレダクターゼを用いてプルキンエ細胞 (F) を破壊した魚を用いた学習実験。魚を A の水槽で順化後, 緑色 LED を条件刺激, 電気ショックを無条件刺激としてトレーニングセッションを行い, テストセッションでは条件刺激のみを与えた。条件刺激により, 一定以上の確立で反対側の水槽に逃避した場合は学習成功とした。顆粒細胞阻害個体には, 小脳体の顆粒細胞を阻害した 152B::BoTx と顆粒細胞全体を阻害した cbln12::BoTx を用いた。(文献 22 より改変して引用)

ゼブラフィッシュ成魚が自由に遊泳できる状況下で, 光刺激を CS, 電気ショックを US として連合学習させると, 約 50% の魚で CS に依存して能動的に回避行動をとる (図 3)。ボツリヌス毒素で顆粒細胞やプルキンエ細胞を阻害した魚, 成魚になってからプルキンエ細胞を破壊した魚では, US に対する反応性は影響されないものの (電気ショックで回避行動をとる), 連合学習の効率が下がることが明らかになった。能動的回避学習は, CS と US の関係性を学習する古典的条件づけの成立と, それに基づいて意思決定し回避行動を行う, 2 つの要素に分けることができる。ボツリヌス毒素で顆粒細胞やプルキンエ細胞を阻害した魚では, 古典的条件づけが阻害されていた²²⁾。このことから, 小脳神経回路が能動的回避学習に関わることを, 少なくとも連合学習の過程で機能していることが明らかになった。

おわりに:

ゼブラフィッシュ 小脳研究の今後

ゼブラフィッシュを用いた小脳研究の歴史は浅

い。多くの未解決問題が残っている。神経前駆細胞から顆粒細胞やプルキンエ細胞に分化する過程で, どのような遺伝子が発現し, 特徴的な構造や機能を持つようになるかわかっていない。ゼブラフィッシュ仔魚から, 分化中の顆粒細胞やプルキンエ細胞を分取し, トランスクリプトーム解析が行われた²³⁾。これらの遺伝子のなかには, 機能が未知の遺伝子も多い。CRISPR/Cas9 法を用いたリバーズジェネティクス (変異体) 解析から, これら遺伝子の機能が明らかにされるであろう。一方, フォワードジェネティクスで得られた変異体の解析からも, 小脳発生に関する知見を得られる。これまで, 基底膜を構成する IV 型コラーゲンが顆粒細胞軸索走行に関与すること²⁴⁾, クロマチン再構成に関わる Cfdp1 が顆粒細胞の細胞周期や細胞分化に関わることが明らかになった²⁵⁾。今後もリバーズとフォワードの両方向の遺伝学を組み合わせることで, より詳細な小脳発生のメカニズムの解明が進むと思われる。

小脳機能に関しては近年, 小脳神経回路の異常と自閉症スペクトラムなどの精神疾患の関係が注

目を集めている。ゼブラフィッシュを用いた社会性行動の実験や^{26, 27)}、自閉症関連遺伝子のゼブラフィッシュでの解析も行われており²⁸⁾、社会性行動における小脳神経回路の役割もゼブラフィッシュ研究から手がかりが得られる可能性がある。

技術的には近年、Ca²⁺ イメージングに加え、高感度で時間分解能の高い蛍光膜電位センサー^{29, 30)}が開発されており、小脳に関連した行動や学習において、活性化あるいは抑制されるニューロンが同定されるものと考えられる。平行線維とプルキンエ細胞の間の長期抑制 (LTD) や長期促進 (LTP) といったシナプス可塑性が、小脳の学習機能に重要であると考えられている。神経活動イメージング技術は、学習における小脳シナプスの可塑性の役割の解明につながるであろう。また、シナプス可塑性には、様々な細胞内シグナル伝達が関与している。近年、細胞内シグナル伝達を制御する光遺伝学ツールが開発されており^{31, 32)}、これらを利用することにより、小脳神経回路の機能が詳細に理解されるものと思われる。

これまで、小脳神経回路の動作原理を説明する数理モデルが提唱されてきた³³⁾。その多くは、学習の過程で、小脳神経回路内に効率のよい行動制御のための内部モデルがコードされるというモデルである。学習後は、内部モデルとの誤差 (予測誤差) が最小になるよう行動が実行されるとする仮説である。このモデルは、運動学習だけでなく、恐怖応答学習や社会性行動にも適応できると考えられている。ゼブラフィッシュを用いた実験データに基づく正確な数理モデルの確立と、それに基づいた神経回路動作原理の理解につながることを期待したい。

●文 献

- 1) Bae YK, Kani S, Shimizu T et al : *Dev Biol.* **330** : 406-426, 2009
- 2) Hashimoto M, Hibi M : *Dev Growth Differ.* **54** : 373-389, 2012
- 3) Hibi M, Shimizu T : *Dev Neurobiol.* **72** : 282-301, 2012
- 4) Hibi M, Matsuda K, Takeuchi M et al : *Dev Growth Differ.* **59** : 228-243, 2017
- 5) Apps R, Hawkes R : *Nat Rev Neurosci.* **10** : 670-681, 2009
- 6) Wullimann MF, Rupp B, Reichert H : *Neuroanatomy of the Zebrafish Brain : A Topological Atlas*, Birkhäuser Verlag, Basel, 1996
- 7) Chaplin N, Tendeng C, Wingate RJ : *J Neurosci.* **30** : 3048-3057, 2010
- 8) Kani S, Bae YK, Shimizu T et al : *Dev Biol.* **343** : 1-17, 2010
- 9) Kidwell CU, Su CY, Hibi M, Moens CB : *Dev Biol.* **438** : 44-56, 2018
- 10) McFarland KA, Topczewska JM, Weidinger G et al : *Dev Biol.* **318** : 162-171, 2008
- 11) Nimura T, Itoh T, Hagio H et al : *Dev Biol.* **455** : 393-408, 2019
- 12) Itoh T, Takeuchi M, Sakagami M et al : *Development.* **147** : dev190603, 2020
- 13) Shimizu T, Bae YK, Hibi M : *Development.* **133** : 4709-4719, 2006
- 14) Kaslin J, Ganz J, Geffarth M et al : *J Neurosci.* **29** : 6142-6153, 2009
- 15) Kaslin J, Kroehne V, Benato F et al : *Neural Dev.* **8** : 9, 2013
- 16) Beck JC, Gilland E, Tank DW, Baker R : *J Neurophysiol.* **92** : 3546-3561, 2004
- 17) Portugues R, Engert F : *Curr Opin Neurobiol.* **19** : 644-647, 2009
- 18) Matsui H, Namikawa K, Babaryka A, Köster RW : *Proc Natl Acad Sci U S A.* **111** : 11846-11851, 2014
- 19) Ahrens MB, Li JM, Orger MB et al : *Nature.* **485** : 471-477, 2012
- 20) Scalise K, Shimizu T, Hibi M, Sawtell NB : *J Neurophysiol.* **116** : 2067-2080, 2016
- 21) Matsuda K, Yoshida M, Kawakami K et al : *Sci Rep.* **7** : 11865, 2017
- 22) Koyama W, Hosomi R, Matsuda K et al : *eNeuro.* **8** : ENEURO.0507-20.2021, 2021
- 23) Takeuchi M, Yamaguchi S, Sakakibara Y et al : *J Comp Neurol.* **525** : 1558-1585, 2017
- 24) Takeuchi M, Yamaguchi S, Yonemura S et al : *PLoS Genet.* **11** : e1005587, 2015
- 25) Itoh T, Inoue S, Sun X et al : *Dev Dyn.* **250** : 1618-1633, 2021
- 26) Stednitz SJ, McDermott EM, Ncube D et al : *Curr Biol.* **28** : 2445-2451.e3, 2018
- 27) Carreño Gutiérrez H, Colanesi S, Cooper B et al : *Sci Rep.* **9** : 3040, 2019
- 28) Ruzzo EK, Pérez-Cano L, Jung JY et al : *Cell.* **178** : 850-866.e26, 2019
- 29) Abdelfattah AS, Kawashima T, Singh A et al : *Science.* **365** : 699-704, 2019
- 30) Abdelfattah AS, Valenti R, Zheng J et al : *Nat Commun.* **11** : 3444, 2020
- 31) Kandori H : *Adv Exp Med Biol.* **1293** : 3-19, 2021
- 32) Koyanagi M, Saito T, Wada S et al : *Adv Exp Med Biol.* **1293** : 141-151, 2021
- 33) Kawato M, Ohmae S, Hoang H, Sanger T : *Neuroscience.* **462** : 151-174, 2021