Osaka University Knowledge Archive

Title	In Vivo Imaging of Synaptic Inhibition on the Mauthner Cell of Larval Zebrafish
Author(s)	高橋, 正治
Citation	大阪大学, 2002, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/44354
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

Osaka University

【1】

氏　　名	髙　橋　正　治（たか はし まさ はる）
博士の専攻分野の名称	博　士（理　学）
学　位　記　番　号	第　17234　号
学位授与年月日	平成14年6月24日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 基礎工学研究科システム人間系専攻
学　位　論　文　名	In Vivo Imaging of Synaptic Inhibition on the Mauthner Cell of Larval Zebrafish （in vivo イメージングによるゼブラフィッシュ稚魚マウスナー細胞への抑制性シナプス入力の計測）
論　文　審　査　委　員	（主査） 教　授　村上富士夫 （副査） 教　授　藤田　一郎　　教　授　大澤　五住　　助教授　小田　洋一

論　文　内　容　の　要　旨

脳は外界からの感覚情報の処理や、行動の制御などを司る主な器官である。脳のはたらきは、特定の出力を担うニューロン（群）からなる、機能単位‘モジュール’で構成される。個々のモジュールの出力特性は、内部の抑制性のネットワークにより強力に制御・決定されている。これまでに、神経ネットワーク活動を完全に維持した、ありのままの（*in vivo*）神経活動を研究するためのアプローチとして、光学計測法の開発が進められてきたが、抑制性シナプス入力の *in vivo* 計測は実現していなかった。

今回、機能モジュールのモデル系として、脊推動物の脳で形態的・機能的に同定可能な数少ないニューロンの1つである、ゼブラフィッシュの後脳マウスナー（M）細胞を用い、抑制性シナプス入力の *in vivo* イメージングシステムを開発した。コイ科の熱帯魚であるゼブラフィッシュは、稚魚（受精後1ケ月以内）の頭が透明であるため、ニューロン活動の光学計測に有効な実験系である。また、M細胞は、それが担う機能が明確であり、脳の多くの部位で見られるフィードフォワード・フィードバック型の抑制性シナプス回路により、その出力特性が制御されることが電気生理学的に明らかなため、光学計測データと電気生理学の知見との対応が可能である。M細胞は、侵害刺激と反対方向に素早く屈曲して逃げ去る運動‘C-スタート’をトリガーする。この神経活動は、聴神経からのフィードフォワード抑制および自身の軸索側枝からの2種類のフィードバック抑制（反回性・相反性）によって、発火閾値や連続活動が強力に制御されている。M細胞では、逆行性活動電位の振幅が抑制性シナプス入力によって減少することに着目し、3種類のシナプス抑制の可視化を試み、以下の結果を得た。まず、蛍光 Ca 指示薬と共焦点レーザー顕微鏡を用い、高い光学シグナルを測定加算なしに得られるシステムを構築した。1）受精後4日目以降のゼブラフィッシュの脊髄から逆行性にM細胞へ特異的に Ca 指示薬をロードし、脊髄電気刺激によるM細胞の逆行性活動電位に伴う Ca 応答を同定した。2）反回性シナプス抑制により、この光学応答の振幅が強力に減衰することを見出した。また、M細胞の全細胞記録により、反回性抑制電流を記録し、光学計測の結果を確認した。4）ゼブラフィッシュの耳胞（耳の原器）に同側M細胞の閾値以下の強度で電気刺激を与え、聴神経由来のフィードフォワード抑制を賦活すると、反対側のM細胞で光学応答の抑制が見られた。この抑制効果は、過去の電気生理学的研究の結果と対応した。5）強い耳胞刺激で片側のM細胞を活動させると、それに起因する、反対側M細胞への強力な相反性抑制が可視化された。6）キ

ンギョ成魚M細胞で、長期増強を誘導した高頻度電気刺激を、ゼブラフィッシュ稚魚の耳胞に与えた結果、長時間持続するフィードフォワード抑制の促進効果が誘導・計測された。

本研究では、抑制性シナプス入力の *in vivo* 計測を初めて成功させただけでなく、発生生物学・遺伝学上の有用なモデル動物でありながら、神経ネットワークの生理学的知見がほとんどないゼブラフィッシュで、基本的な運動の1つである逃避運動を制御する抑制回路が早期から機能することが明らかにされ、さらに、可塑的変化も誘導されることが見出された。本研究で開発した *in vivo* 計測システムは、発達に伴う神経ネットワークの形成や、シナプス可塑性と運動適応のリンクの解析などに展開でき、分子生物学的方法とを組み合わせ、脳のモジュール機能の設計原理を解明する上で有用であると考えられる。

論文審査の結果の要旨

脳は外界からの感覚情報の処理や、行動の制御などを司る主な器官である。脳のはたらきは、特定の出力を担うニューロン（群）からなる、機能単位‘モジュール’で構成される。

個々のモジュールの出力特性は、内部の抑制性のネットワークにより強力に制御・決定されている。これまでに、神経ネットワーク活動を完全に維持した、ありのままの（*in vivo*）神経活動を研究するためのアプローチとして、光学計測法の開発が進められてきたが、抑制性シナプス入力の *in vivo* 計測は実現していなかった。

今回、機能モジュールのモデル系として、脊椎動物の脳で形態的・機能的に同定可能な数少ないニューロンの1つである、ゼブラフィッシュの後脳マウスナー（M）細胞を用い、抑制性シナプス入力の *in vivo* イメージングシステムを開発した。コイ科の熱帯魚であるゼブラフィッシュは、稚魚（受精後1ケ月以内）の頭が透明であるため、ニューロン活動の光学計測に有効な実験系である。また、M細胞は、それが担う機能が明確であり、脳の多くの部位で見られるフィードフォワード・フィードバック型の抑制性シナプス回路により、その出力特性が制御されることが電気生理学的に明らかなため、光学計測データと電気生理学の知見との対応が可能である。M細胞は、侵害刺激と反対方向に素早く屈曲して逃げ去る運動‘C-スタート’をトリガーする。この神経活動は、聴神経からのフィードフォワード抑制および自身の軸索側枝からの2種類のフィードバック抑制（反回性・相反性）によって、発火閾値や連続活動が強力に制御されている。M細胞では、逆行性活動電位の振幅が抑制性シナプス入力によって減少することに着目し、3種類のシナプス抑制の可視化を試み、以下の結果を得た。まず、蛍光 Ca 指示薬と共焦点レーザー顕微鏡を用い、高い光学シグナルを測定加算なしに得られるシステムを構築した。1）受精後4日目以降のゼブラフィッシュの脊髄から逆行性にM細胞へ特異的に Ca 指示薬をロードし、脊髄電気刺激によるM細胞の逆行性活動電位に伴う Ca 応答を同定した。2）反回性シナプス抑制により、この光学応答の振幅が強力に減衰することを見出した。また、M細胞の全細胞記録により、反回性抑制電流を記録し、光学計測の結果を確認した。4）ゼブラフィッシュの耳胞（耳の原器）に同側M細胞の閾値以下の強度で電気刺激を与え、聴神経由来のフィードフォワード抑制を賦活すると、反対側のM細胞で光学応答の抑制が見られた。この抑制効果は、過去の電気生理学的研究の結果と対応した。5）強い耳胞刺激で片側のM細胞を活動させると、それに起因する、反対側M細胞への強力な相反性抑制が可視化された。6）キンギョ成魚M細胞で、長期増強を誘導した高頻度電気刺激を、ゼブラフィッシュ稚魚の耳胞に与えた結果、長時間持続するフィードフォワード抑制の促進効果が誘導・計測された。

本研究では、抑制性シナプス入力の *in vivo* 計測を初めて成功させただけでなく、発生生物学・遺伝学上の有用なモデル動物でありながら、神経ネットワークの生理学的知見がほとんどないゼブラフィッシュで、基本的な運動の1つである逃避運動を制御する抑制回路が早期から機能することが明らかにされ、さらに、可塑的変化も誘導されることが見出された。本研究で開発した *in vivo* 計測システムは、発達に伴う神経ネットワークの形成や、シナプス可塑性と運動適応のリンクの解析などに展開でき、分子生物学的方法とを組み合わせ、脳のモジュール機能の設計原理を解明する上で有用であると考えられる。

以上のように、本研究は脳のモジュール横能の設計原理を解明する上で有用な知見であると考えられ、博士（理学）の学位論文として価値があるものと認める。