

氏 名 Ailani, Deepak

学位(専攻分野) 博士(理学)

学位記番号 総研大甲第 1936 号

学位授与の日付 平成29年3月24日

学位授与の要件 生命科学研究科 遺伝学専攻  
学位規則第6条第1項該当

学位論文題目 Genetic Studies on Hypothalamus Functions in Zebrafish

論文審査委員 主 査 教授 岩里 琢治  
教授 北野 潤  
教授 平田 たつみ  
准教授 小出 剛  
教授 平田 普三 青山学院大学

論文の要旨

Summary (Abstract) of doctoral thesis contents

Locomotion is a rhythmic and alternating motor activity that allows an animal to move from one place to another, and is essential for survival of animals. In vertebrates, the hypothalamus has been shown to play an important role in regulation of locomotor activity. However, the functional circuits and cell populations mediating locomotor activity are still unclear. In this study, I aimed to investigate hypothalamic neuronal circuits and cell populations mediating locomotor activity using the model vertebrate zebrafish.

I performed a genetic screen using Tol2 transposon mediated gene trap and enhancer trap methods and generated transgenic fish that expressed Gal4 in specific brain regions in larval zebrafish. Then, I isolated a transgenic line named 116A that labeled a subpopulation of neurons in the caudal hypothalamus (cH), the intermediate hypothalamus (iH) and the paraventricular organ (PVO), and another line named 1121A that labeled a subpopulation of neurons in the cH, iH, PVO and the telencephalon. I performed calcium imaging using 116A-gal4;UAS:GCaMP6s and 1121A-gal4;UAS:GCaMP6s double transgenic fish, and found that the hypothalamic neurons labeled in these lines were activated when larval zebrafish performed spontaneous tail flips. I hypothesized that those neuronal populations may regulate locomotor activity.

First, to test this hypothesis, I analyzed the activity of the neurons labeled in 116A (hereafter referred to as 116A neurons) in freely swimming larvae after transfer to an imaging chamber. The locomotor activity of the larvae decreased gradually in the chamber, due to a process called habituation. I found that the activity of 116A neurons also decreased during the habituation. To further investigate their functions, I inhibited the neural activities by crossing 116A-gal4 fish with the UAS-effector fish carrying the botulinum neurotoxin gene. The double transgenic fish showed reduced locomotor activity, and specifically reduced swimming bout frequency. Then, I activated 116A neurons by crossing 116A-gal4 fish with the UAS-effector fish carrying the rat TRPV1 cDNA, encoding an ion channel that is open in the presence of capsaicin, and found that the double transgenic fish showed increased locomotor activity after application of capsaicin. These indicated that the genetically tagged cH, iH, and PVO cells in the hypothalamus play a crucial role in regulating locomotor activity in zebrafish larvae.

Next, to further explore the function of hypothalamic neurons in locomotion, I analyzed the activity of neurons at single-cell resolution by using the 1121A-gal4 line, since expression levels of GCaMP6s in the 116A-gal4;UAS:GCaMP6s larvae were not strong enough for single-cell imaging. I set up a system for optomotor response

(別紙様式 2)  
(Separate Form 2)

(OMR) in which swimming behaviors are evoked in head restrained larvae upon onset of visual stimuli, namely moving black-and-red gratings, under a spinning-disk confocal microscope. I found that the cH and iH neurons in the 1121A line were activated synchronously upon onset of the OMR stimuli. Interestingly, when the grating speed was changed, the activity of the cH and iH neurons changed according to the grating speeds. To our knowledge, this is the first demonstration of tuning of hypothalamic activity to the speed of a moving visual stimulus. Also, I found that the activities of telencephalon neurons labeled in the 1121A line were increased upon onset of the OMR stimuli. Some of these activities were correlated with those observed in the hypothalamus, suggesting connection of these two areas.

Previous studies that employed c-fos and pERK staining to detect neuronal activation reported that aversive stimuli activated the caudal hypothalamic area in larval zebrafish. To determine if the hypothalamic neurons labeled in the 116A and 1121A lines are involved in this activity, I applied aversive stimuli, such as mustard oil and heat, to the transgenic larvae, and analyzed them by calcium imaging. I found that the neurons labeled in 116A and 1121A lines were strongly activated by exposure to these aversive stimuli, suggesting that these neurons may be involved in aversive responses. Finally, I performed immunohistochemistry, and showed that the 116A neurons are mostly serotonergic. My present study provides a clue to understanding functions of a genetically identified neuronal population located in the caudal hypothalamus, the intermediate hypothalamus and the paraventricular organ in the larval zebrafish.

Summary of the results of the doctoral thesis screening

視床下部は自律機能の調節だけでなく動物の行動の制御にも重要な役割を担うことが知られているが、その神経基盤はよくわかっていない。出願者は、遺伝学的解析と *in vivo* イメージングに適したモデル脊椎動物であるゼブラフィッシュの幼魚を用いてこの課題に取り組んだ。

所属研究室では独自の *Tol2* トランスポゾン法を用いて多様な *Gal4* トランスジェニックフィッシュ系統が開発されてきたが、出願者はそれらの中から視床下部で発現が検出される 54 系統を同定した。そのうちの *gSAIzGFFM116A* (116A) 系統では視床下部の尾部 (*cH*)、中間部 (*iH*)、および室傍器官 (*PVO*) に特異的に発現が見られた。*gSAIzGFFM1121A* (1121A) 系統では視床下部の *cH*、*iH*、*PVO* とともに終脳に強い発現がみられた。これらの *Gal4* 系統を用いて蛍光カルシウム指示タンパク質である *GCaMP6s* を発現するゼブラフィッシュを作製し、神経活動の観察を行った。ロコモーション (泳ぎ) 制御に特に着目して解析を行い、116A 系統と 1121A 系統では尾の動きと同調して視床下部 (*cH*、*iH*、*PVO*) の神経活動が上昇することを見出した。これらの実験は頭部を固定したゼブラフィッシュで行われた。

次いで出願者は、より自然の状態に近い自由遊泳中のイメージングを行った。顕微鏡下に設置したイメージングチャンバーに 116A 系統のゼブラフィッシュを入れ、視床下部の神経活動を観察した。ゼブラフィッシュはイメージングチャンバーに移した直後は激しく泳ぎ、その後時間経過とともに泳ぎの程度を低下させたが、視床下部の活動も同様に、最初に大きくその後次第に減少する特徴を示した。一方、*Gal4* 依存的にボツリヌス毒素 (*BoTX*) を発現する *UAS-BoTx* 系統と 116A 系統を交配することにより視床下部の活動を抑制したところ、尾の動きの頻度が低下することによって遊泳距離も低下した。また逆に、*TPRV1* を発現させカプサイシン投与によって視床下部の神経活動を上昇させたところ、尾の動きの頻度が上昇しそれに伴い遊泳距離が上昇することを示唆する結果が得られた。これらの結果から、視床下部の遺伝学的に同定された特定の細胞群が遊泳行動に重要な役割を担うことが示された。また、ゼブラフィッシュに化学物質などの嫌悪刺激を与えると忌避行動を示すが、その行動にも視床下部の同じ細胞群が関与することが示された。

出願者はさらに単一細胞レベルでの神経活動の観察を行った。116A 系統は単一細胞観察に十分な蛍光強度が得られなかったため、これらの解析は専ら 1121A 系統を用いて行われた。頭部固定したゼブラフィッシュを顕微鏡下に置いて縞模様などの背景を一定速度で動かせると、ゼブラフィッシュは背景との相対位置を一定に保つために泳ぐ反応 (視運動反応) を示すが、出願者は 1121A 系統を用いてその時の視床下部の単一細胞の活動を観察した。その結果、縞模様の動きの速度と、尾の動きの頻度および視床下部細胞の活動レベルが比例することを見出した。1121A 系統では終脳でも *GCaMP6s* が発現するが、その特徴を生かして終脳と視床下部の同時イメージングを行った。その結果、終脳の細胞の中に視運動反応中に視床下部細胞と同期した活動がみられるものが見つかり、視運動反応における終脳と視床下部の連携が示唆された。

(別紙様式 3)  
(Separate Form 3)

以上のように、出願者は、ゼブラフィッシュの特長を活かした研究を展開し、動物の行動における視床下部の神経回路機構の理解の進展に貢献した。以上の理由から、出願者の博士論文は博士号授与の要件を満たすと審査員全員一致で判断した。