

氏 名 MILLER ANDREW STEVEN

学位(専攻分野) 博士(理学)

学位記番号 総研大甲第 2003 号

学位授与の日付 平成 30 年 3 月 23 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 Spontaneous and Evoked Periodic Activity in the Larval
Zebrafish Telencephalon

論文審査委員 主 査 教授 平田 たつみ
教授 岩里 琢治
教授 木村 暁
准教授 鈴木 えみ子
助教 小林 亮太 複合科学研究科 情報学
専攻

論文の要旨

Summary (Abstract) of doctoral thesis contents

The vertebrate telencephalon, a center for higher-order processing, is vital to the integration of learning, memory, emotion, and sensory inputs. However, the neurological basis of these functions are still not fully understood, particularly in the case of teleosts. In order to understand how the neural circuits essential for these behaviors form, and how these circuits may ultimately produce sophisticated behaviors, larval zebrafish can be used as a model to visualize the activities of neurons in the process of establishing functional circuits, as well as during stimulus processing and behavioral tasks. Since the transparency of zebrafish larvae allow light to pass through the entirety of their brains, living specimens may be used for optogenetic studies without the need for invasive tissue dissection. Furthermore, in the initial stages of brain development, the telencephalon exhibits activities generated by internal processes, rather than by external stimuli. These spontaneous activities are believed to be indicative of the types of activity observed in later, mature neural circuits, and therefore formed the basis of my analysis. Using Genetically Encoded Calcium Indicators (GECIs) such as GCaMP expressed in genetically defined portions of the forebrains of 5 day old zebrafish through the Gal4/UAS system, I recorded activities of neural populations of agarose-fixed larvae under a confocal microscope. I then proceeded to use dimensionality reduction and signal analysis techniques to find consistent patterns among them, identifying a population of cells with slow, periodic oscillations alternating at a rate of approximately 0.1 Hz between the left and right hemispheres of the dorsal surface of the forebrain. Using a custom analysis pipeline to register confocal imaging data from multiple optical layers and fish, I was able to expand this analysis to the more ventral optical sections of the dorsal telencephalon, finding a gradient of frequencies across the anteroposterior axis of the pallium consisting of cells with progressively slower periodic activities towards the posterior end. In order to elucidate the mechanics of these oscillating cells, and their possible behavioral functionality, I attempted to manipulate the frequency and phase of the oscillator through pharmacological and visual stimulus-based interventions. Treatments of baclofen, a GABABR agonist, resulted in a reduction in the 0.1 Hz activities of the oscillating telencephalic cells, fitting with an oscillating circuit model that would require inhibitory inputs to both hemispheres to maintain a separation in terms of phase. Moreover, with a visual stimulus protocol consisting of periodic dark flashes displayed in an alternating fashion to the left and right eyes of the larvae, I was able to identify populations of neurons in both the telencephalon and optic tectum with initially periodic, spontaneous alternating activities that were also responsive to the phase of visual stimuli. In the case of the visually responsive telencephalic cells, a difference in sensitivity to left or right-sided stimuli was also found, based on the initial phase of their ongoing spontaneous activities. Additionally, the telencephalic pallium contained a smaller population of cells that were responsive to visual stimuli from both the left and right eyes. Since both of these populations were capable of entrainment after the end of visual stimuli, this suggests that these cells may be part of a circuit able to integrate visual information over short

(別紙様式 2)
(Separate Form 2)

time-scales, similar to functionalities proposed for another recently identified oscillator in the larval zebrafish located in the hindbrain, and implicated in long term biases in swim directions. The shared frequencies and similar responses to visual input suggest that these two oscillators may in fact be part of a much larger functional circuit. Finally, in order to further investigate the link between telencephalic oscillatory activity and behavior, I developed a system for performing virtual reality behavioral assays on agarose-fixed larvae, using a camera-based method to track tail movements in order to reconstruct intended paths during fictive swim bouts, with the intent to combine it with a calcium imaging platform for future experiments.

博士論文審査結果の要旨
Summary of the results of the doctoral thesis screening

発達期の動物の脳内には、外界からの刺激が無くても自発的に興奮する神経細胞が存在する。Miller, Andrew Stevenさんは、神経細胞の自発性神経活動を解析することで、細胞集団としての規則性や内在する機能的結合性を明らかにできるのではないかと考え、幼生 zebrafish を材料に用いて、脊椎動物の重要な中枢である終脳に着目した研究を行なった。Millerさんは、蛍光カルシウムプローブGCaMPを神経細胞全般に発現させたトランスジェニック zebrafish 系統を用いて、頭部を固定し無麻酔の状態、終脳の自発性神経活動のリアルタイムイメージングを行った。次いで、細胞集団の挙動を探るために、得られたイメージングデータにPCA-ICA法を適用して多数の神経細胞の活動を自動的に抽出した。さらに、神経活動データに主成分分析を適用して細胞集団としての特徴抽出を試みた。これらの結果、従来知られていなかった左右半球の間で交互におこる振動性の活動成分を明らかにすることに成功した。これは約0.1Hzという長い周期をもつ活動であり、左右終脳半球の前背側部に存在する細胞集団がその主な振動源であった。さらに、より広範囲の脳領域から神経活動を同時計測する方法を開発し、複数のzebrafishから得られたデータを解析した。その結果、自発活動周期は細胞固有であるものの細胞間でばらつきがあり、高周波から低周波の振動を示す細胞が終脳外套の前後軸に沿って連続的に分布していることが明らかとなった。次に、外部から刺激を与えることで、自発性神経活動に影響を与えることができるかどうかを検討した。右眼と左眼にそれぞれ0.1Hzの暗刺激を交互に繰り返し与えたところ、視中枢である視蓋では、予想通り、片眼性の左右交互の誘発反応が確認された。また、終脳の神経細胞の活動データから位相を抽出して解析したところ、視覚刺激に対して弱いながらも両眼性の反応が認められ、自発性活動振動の位相が視覚刺激のタイミングに引き込まれる効果が認められた。一連の研究は、zebrafish終脳における新規の自発性神経活動の特徴づけたものとして評価できる。

上記の結果に加えて、博士論文ではzebrafishバーチャルリアリティ行動解析系の構築についても報告された。これは、頭部を固定したzebrafishの尾の動きから進行方向と速度を計算予測し、予測された動きに合わせてスクリーン上に投影した背景情報を移動させることで、バーチャルリアリティ空間を構築するものである。自由遊泳中の脳活動の記録を可能にするシステムとして、当該分野に大きく貢献することが期待される。

以上のように、Millerさんの研究は、多くの新しい技術や工夫を含んでおり、今後の神経科学研究の方向性に新たな示唆を与えるものである。よって、博士号授与の要件を満たすと全会一致で判断した。