

論文題目

ゼブラフィッシュ幼魚における微細な姿勢制御の
力学的・神経回路メカニズムの解明

**Biomechanics and neural circuit mechanisms
of a fine postural control in larval zebrafish**

総合研究大学院大学

生命科学研究科 基礎生物学専攻

梶岡 拓己

目次

1. 要旨	2
2. 全体的な序論	5
3. 微細な姿勢制御の力学的・神経回路の研究	8
3.1. 序論	8
3.2. 結果	10
3.2.1. 自由行動実験	10
3.2.2. VBR を司る神経回路の探求	14
3.2.3. VBR を担う細胞の破壊時の自由行動実験	25
3.2.4. その他のニューロンの可能性	27
3.3. 考察	28
3.3.1. 姿勢制御の行動について	28
3.3.2. 神経回路について	32
4. ダイナミックな姿勢制御の神経回路の研究	37
4.1. 序論	37
4.2. 結果	39
4.3. 考察	43
5. 全体的な考察	44
6. 材料と方法	45
7. 図・表	55
8. 参考文献	104
9. 謝辞	110
10. 投稿論文	

1. 要旨

Postural control is important for survival in many animal species, regardless of whether they live on the land or in the water. Land-walking vertebrates maintain a desirable posture by a fine, static control, while they also recover from a severely disturbed posture by a vigorous, dynamic body movement. Although biomechanics of these postural control is well understood, neural mechanisms of the behaviors are not fully elucidated. When severely disturbed, fish recover their posture by vigorously performing swimming. Most fish also maintain their dorsal-up posture when they are still, which strongly suggests that fish finely control posture. However, the biomechanics and neural circuits of the fine postural control is unknown.

To examine fine control mechanisms in fish, I first observed larval zebrafish behavior from frontal and dorsal sides during roll-tilt stimuli in a dark condition. As previously reported, fish occasionally swam and recovered the upright posture. However, fish also recovered from the roll-tilted posture without swimming. The postural correction behavior remained in fish with pectoral fins removed. Upon close examinations, I found that fish slightly bent the body near the swim bladder to the ear-up side when they corrected their posture. The body bend reflex was more clearly observed when fish were placed in highly viscous water or head-embedded in agarose. These results revealed that the fine postural correction is associated with a body bend behavior, which is referred to as vestibular-induced bend reflex (VBR).

How does the VBR recover the upright posture? In a simplified model, when a fish is upright, gravity, which acts at the center of mass (COM), and buoyancy, which acts at the center of volume (COV), are on the midline. In contrast, when a fish performs the VBR upon the roll tilt, the head and caudal body move toward the ear-up side, while in reaction, the body around the swim bladder moves toward the ear-down side. As the fish body bends, the COM position becomes more lateral than the COV position, because the density of the swim bladder is extremely smaller than that of the rest of the body. This results in a misalignment between

gravity and buoyancy, generating a moment of force that counter-rotates the tilted body to the upright. If this model is correct, swim bladder-deflated fish would not be able to recover from the roll tilt when they perform the VBR, because the body density becomes nearly uniform, and therefore the misalignment between gravity and buoyancy is not produced. As expected, fish with deflated swim bladder were unable to recover. This result strongly supported the model. Thus, these results demonstrated that fish recover the upright posture by the fine postural control, which is the VBR.

Next, I focused on the neural circuits for the VBR. Based on the previous reports, I hypothesized that the VBR is driven by the following neural circuits: tangential nucleus (TAN; a vestibular nucleus) through neurons in the nucleus of the medial longitudinal fasciculus (nMLF; a class of RS neurons) to the spinal cord, and finally to the posterior hypaxial muscles (PHMs) near the swim bladder. To test this hypothesis, I performed two experiments for each cell population in the pathway: 1) Ca^{2+} imaging using a custom-built tiltable objective microscope and 2) behavioral analyses in head-embedded fish after cell ablation. During the roll tilt, TAN neurons in the ear-down side, a subset of nMLF neurons in the ear-up side, and slow-type PHMs in the ear-up side, especially those located in close proximity to the swim bladder, but not fast-type PHMs, were activated. As expected from the lateralized neural activity during the roll tilt, ablation of each cell population in the activated side impaired the VBR. These results revealed that the VBR is driven through the TAN-nMLF-PHM pathway. Taken together, the present study revealed biomechanics and neural circuits of a fine postural control in larval zebrafish.

Because fish are inherently unstable in the water, maintaining the dorsal-up posture requires neuro-muscular activity. Since most fish are upright almost all the time, fish likely maintain the dorsal-up posture by frequently performing the VBR.

Vestibulospinal neurons, which convey vestibular signals from the vestibular nucleus directly to the spinal cord, are thought to mainly mediate vestibular-induced postural responses. In addition to this pathway, it is presumed that pathways from the vestibular nuclei through reticulospinal neurons to the spinal cord are also involved in the postural control. Here the results

clearly demonstrated that the reticulospinal neurons play an important role in the postural control in larval zebrafish. The present study suggests the importance of the reticulospinal pathways in other vertebrates and sheds light on the evolutionally conserved neural circuits involved in the postural control.

2. 全体的な序論

姿勢制御は、多くの生物で重要である。これは環境（陸上、水中、空中）問わず、幅広い生物で必須な行動である。ある望ましい姿勢、または安定姿勢から傾斜すると、元の姿勢に戻るような運動が引き起こされる。陸上脊椎動物において、姿勢が乱れると複数の姿勢立て直し戦略をとる。1つ目に、微細な運動での立て直しで、姿勢の偏位が小さい時、抗重力筋の活動を変えることで姿勢を立て直す方法である（図 1A; Ankle strategy; Le Mouel and Brette, 2007）。この運動の立て直しを繰り返すことで、姿勢を適切な状態を維持することが可能となる（Morrasso et al., 2005）。2つ目に中位の運動での立て直しである。これは地面と接する部分が少ないヒトを含む二足歩行動物で見られる方法であるが、姿勢の偏位が中程度の時、偏位速度より速い速度で胴体を尻周りで屈曲することで（また同時に腕を動かすことで）倒れるのを防ぐ方法である（図 1B; Hip strategy; Horak, 2006）。この立て直しは、接地点が限られている（平均台など、足の移動先が限られた場所しか存在しない）状況によく使われる方法である。3つ目に、大きな運動での立て直しで、姿勢偏位が大きい時、ステップや歩行を介して、または物を手で掴むことでも倒れるのを防ぐ方法である（図 1C, D; Step/Grasp strategy; Maki et al., 2003）。この方法はよく歩行中見られる方法である。

これらの姿勢制御の違いは生体力学的によく理解されている（Maki and McIlroy, 1997）。重心と支持基底面（地面と接する部位（四肢等）で囲まれた領域）の関係性で説明される。上記で示したいずれの場合にも、重心が支持基底面の内側に居留させる姿勢制御方法である。支持基底面が変化するかどうかという観点から、上記の1つ目と2つ目は変化しない運動（fixed-support strategy; 図 1A, B）に対し、3つ目は変化する運動（change-in-support strategy; 図 1C, D）と対比される（Maki and McIlroy, 1997）。また、姿勢の安定性の観点から、1つ目の姿勢制御は、非常に小さい動きで特定の姿勢を維持する運動で、静的な制御（static control、以下微細な運動とする; 図 1A）と呼ばれるのに対し、2つ目と3つ目の方法は、重心の大きな変化に対応し、倒れるのを防ぐ運動で、動的な制御（dynamic control、以下ダイナミックな運動とする; 図 1B-D）と呼ばれる（Dunsky et al., 2017）。

哺乳類で、視覚、前庭感覚、体性感覚、自己受容の情報を統合して姿勢を制御すると考えられている。その中で、前庭情報は姿勢に重要な役割を果たしている

(Culluen, 2012; Forbes et al., 2015)。重力方向に対する頭部の傾斜は内耳の耳石器官によって受容される。前庭情報はその後、脳幹の前庭神経核に伝達され、最終的に運動出力の情報が脊髄に伝達される。多くの研究で、姿勢制御に関わる神経回路の特定がなされてきた。ヒトや哺乳類等の陸上脊椎動物は、回路姿勢制御の神経回路の研究は非常に難しい。これは、関節が多いことや神経細胞の数が多く、回路が複雑であること、さらにはインタクトな状態での細胞の活動を計測することが非常に難しいことかも要因と考えられる。

小さな水棲脊椎動物は前庭に関わる行動を研究する上で非常に使いやすい。ここでは、生物種が多い魚の姿勢制御を考える。ゼブラフィッシュやヤツメウナギでは、ピッチやロール方向の姿勢偏位から泳いで立て直すことが知られている (Ulluen et al., 1994; Zelenin et al., 2003a; Bagnall and McLean, 2014; Ehrlich and Schoppik, 2017)。この姿勢制御は陸上脊椎動物でのダイナミックな運動に対応すると考えられる。このダイナミックな姿勢制御はバイオメカニカルな観点からはある程度理解されている。左右背腹の筋肉の収縮を変化させることで、姿勢立て直しの方向に力のモーメントを生み出すことが知られている。神経回路に関しては、運動ニューロン、前運動ニューロン性介在ニューロンのレベルでは理解されており、さらに左右背腹のバイアスのかかった運動ニューロンの活動を作り出すのに、脳幹に存在する脊髄投射ニューロン（前庭脊髄路ニューロンや網様体脊髄路ニューロン）が関わることもわかっている

(Zelenin et al., 2003b; Zelenin et al., 2007; Bagnall and McLean, 2014)。しかしながら前運動ニューロン性介在ニューロンの性質や脊髄投射ニューロンの接続については不明である。

ダイナミックな姿勢制御に対し、微細な姿勢制御については、魚での存在が明らかではないが、推測されている。ではバイオメカニカルな観点からどのように姿勢を立て直すのであるか不明である。また、神経回路の観点から、どのように達成されているかも全くわかっていない。

ゼブラフィッシュは前庭情報をもとにした姿勢制御機構を研究する上で非常に有用なモデル生物である。前庭システムは脊椎動物で保存されている (Diaz and Glover, 2002; Nicolson, 2005; Straka and Baker, 2013)。受精後5日目までには、背が上の状態を維持するようになる (Riley and Moorman, 2000) ことから、この段階までに姿勢制御の神経回路は形成されていると考えられる。また、頭部が透明なため、前庭刺激を与え

た時のイメージングが可能のため (Favre-Bulle et al., 2018; Migault et al., 2018; Tanimoto et al., 2022)、非侵襲的に神経回路が可能である。

今回の研究では、ゼブラフィッシュにおいて、2つの姿勢制御メカニズムの機構を研究した。1つ目は微細な姿勢制御機構について、バイオメカニカル、神経回路の両方の観点から解明することを目的に研究した。2つ目はダイナミックな姿勢制御機構について、前運動ニューロン性介在ニューロン同定を軸に神経回路の解明を目的に研究を行った。

3. 微細な姿勢制御の力学的・神経回路の研究

3.1. 序論

陸上脊椎動物では、わずかな姿勢の偏位から微細な制御を行うことで姿勢を立て直すことが知られており、この微細な姿勢制御を繰り返すことで、姿勢を維持することができることが知られている (Le Mouel and Brette, 2007; Morrasso et al., 2005)。

魚において、微細な姿勢制御機構の存在は推測されている。体の構造の観点から、ゼブラフィッシュを含め多くの魚の体は不安定である (Webb, 2005; Ehrlich and Schoppik, 2017, Stewart and McHenry, 2011)。これは、麻酔をかけた魚は、背が上の状態を保つことができず、腹や左右が上の状態になってしまうということからも明らかである。不安定状態にもかかわらず、背が上の状態を維持することから、魚にも微細な姿勢制御機構が存在することが推測される。しかし生体力学的にどのように達成されているかは全くわかっていない。Favre-Bulle ら (2017)は、ゼブラフィッシュにおいて人工的な耳石の移動によって遊泳を伴わない胴体の屈曲反射が引き起こされることを示していた。この胴体の屈曲が姿勢制御機構に関わると推定されているが、もし微細な姿勢制御に関わるなら、生体力学的にどのようにして姿勢を立て直すかは不明のままである。

動物の姿勢制御は、前庭神経核から直接脊髄に直接投射する前庭脊髄路神経が、前庭情報を基にした姿勢反射において非常に重要な役割を果たしていることが古くから知られている (Uchino and Kushiro, 2011; McCall et al., 2017; Witts and Murray, 2019)。前庭脊髄路ニューロンは、軸索が通る経路の違いから2種類に分けられる。外側を通る LVST (lateral vestibulospinal tract) ニューロンと、内側を通る MVST

(medial vestibulospinal tract) ニューロンである。LVST ニューロンは脊髄全域に渡り軸索を伸ばし、主に体幹や四肢の筋肉を制御する。一方、MVST ニューロンは脊髄の頸椎または胸椎の前側までしか軸索を投射しておらず、体の前側の筋肉、特に首の筋肉を制御する (McCall et al., 2017)。MVST を遮断したネコでも首の筋肉が傾斜姿勢に応じた活動を示した (Wilson and Schor, 1999)。さらに LVST ニューロンが産生されない変異マウスでも、傾斜姿勢依存的な後肢の伸展運動が見られた (Di Bonito et al., 2015)。これらの結果から、前庭脊髄路ニューロン以外にも間接的に前庭情報を脊髄

に伝える細胞があると考えられていた。その候補として、網様体脊髄路神経が挙げられる (Wilson and Schor, 1999; Peterson, 2004; Sugiuchi et al., 2004)。網様体脊髄路ニューロンは前庭刺激に応答することが哺乳類やヤツメウナギでわかっている (Peterson et al., 1980; Bolton et al., 1992; Zelenin et al., 2003a)。しかしながら、網様体脊髄路ニューロンが姿勢反射 (制御) に関わるという直接的な証拠はこれまでほとんどない。また、直接経路と間接経路は姿勢制御において、異なる機能をもたらすか、協調的に働くかは不明のままである。

ゼブラフィッシュ仔魚において、耳石器がメインに傾斜刺激に応答する (Riley and Moorman, 2000、ただし、受精後 2 週間程度経過した仔魚では三半規管が発達している)。他の脊椎動物同様、傾斜刺激は耳石有毛細胞が感知し、一次前庭神経である神経節細胞を介して前庭神経核ニューロン (二次前庭神経) に伝わる (Bianco et al., 2011; Tanimoto et al., 2022)。前庭神経核ニューロン以降、非常にダイバースに前庭情報が拡散される。傾斜刺激や人工的な前庭刺激を与えた時の全脳イメージングにより、非常に多くのニューロン群が活動することがわかっている (Favre-Bulle et al., 2018; Migault et al., 2018)。しかし傾斜刺激との相関しかわからず、どのような回路で姿勢反射を引き起こすかは全くの未知のままであった。

このセクションでは、ゼブラフィッシュが泳ぐことなく微細な姿勢制御が行われるかをバイオメカニクスの観点から研究した。また、その行動を司る神経回路の解明目的に研究を行った。

3.2. 結果

3.2.1. 自由行動実験

3.2.1.1. ゼブラフィッシュ幼魚は、泳ぐことなくロール方向からの姿勢を立て直す

最初に、魚が泳ぐことなく姿勢を立て直すかどうかを調べるために、ロール方向に頭部傾斜した際、魚がどのように行動するかを観察した（図 2A, B）。ゼブラフィッシュ幼魚を小さいチャンバーに入れて、傾斜刺激を与えた時の行動を正面からと背側から動画を撮影した。魚が前庭情報に依存し、視覚情報に依存しないために、暗闇の条件で赤外線ライトを用いて行動観察を行った。左側が下側になるよう傾斜すると、魚は水の粘性に引きずられて左に傾斜した。傾斜姿勢は短時間のみで、数秒で魚の姿勢は元の姿勢に戻った（図 2C, D）。元の姿勢に回復する際に、遊泳（ここでは、体幹のくねりの運動を遊泳とした）を伴って回復する試行も見られた。私は、微細な姿勢回復メカニズムを調べるために、遊泳を伴わない試行に着目した。傾斜姿勢から元の姿勢方向に回転するときに、しばしば頭部の傾斜角度は行き過ぎていた（図 2D）。いったん、刺激方向に傾斜し、元の姿勢に戻り、しばしば反対方向に傾斜するという行動は、複数の個体で見られた（図 2E）。これらの結果から、魚は泳ぐことなく傾斜姿勢から立て直すことができ、魚にも微細な姿勢制御機構が存在することが確かめられた。

魚の姿勢の立て直しの際、胸鰭が顕著に動いていた（図 2F）。つまり、遊泳を伴わないが胸鰭のリズミックな運動を伴う姿勢の立て直しが観察された。胸鰭の動きによって姿勢が立て直されるかを調べるために、胸鰭を取り除いた魚を用いて同様の実験を行った。胸鰭を切除した魚でも正常な魚と同様に姿勢を立て直していた（図 2G-I）。ただ、4 秒の時点での頭部傾斜角度は、正常な魚に比べて高かった（図 2J）。また、反ロール運動時の角速度（最大屈曲角度から 1.5 秒間の角速度）を調べたところ、胸鰭を切除した魚は正常な魚に比べて小さかった（図 2K）。これらの結果から、胸鰭を切除した魚のロール方向の立て直しは、正常の魚よりも弱く、胸鰭の運動もロール方向からの姿勢立て直しにわずかに関与しているが、胸鰭の運動以外の機構でメインに姿勢を立て直していることが示唆された。

3.2.1.2 胴体の屈曲が傾斜姿勢と連動している

正常な魚や胸鰭を切除した魚の背側からの動画をよく観察すると、傾斜時、わずかに浮袋周辺で体を屈曲するのが見られた（図 2C, G 矢尻）。私はこのわずかな体の屈曲が姿勢の立て直しに寄与するのではないかと推測した。体の屈曲角度が非常に小さい理由として、以下の 2 点が考えられる。1 点目は、通常の飼育水では、傾斜刺激中に少しずつ姿勢を立て直しているため、体の屈曲はわずかにしか見られないと考えられる。もう 1 点は、チャンバーの傾斜中にわずかにでも姿勢を立て直すと、背面からのカメラは魚の背腹軸方向からずれて斜めから撮影することになるため、本来の体の屈曲角度が見にくくなっていると考えられる。

そこで、体の屈曲をはっきり見るために、魚をメチルセルロース入りの飼育水に浸して同様の実験を行った。メチルセルロースは粘性が高いため、通常の飼育水に浸した時に比べて、魚はゆっくり動く。このことで、体の屈曲をはっきり見えるのではないかと予想した。チャンバーを左側が下側となるよう傾斜すると、魚も左側が下側となるよう傾斜し、傾斜刺激に沿って頭部傾斜角度もだんだん大きくなった。2 秒の時点で最大角度は傾斜前に比べて 20° 程度増加していた（ 20° はちょうど傾斜刺激角度と同じである）。その後、2 秒の時点から 8 秒の時点までゆっくり頭部傾斜角度は小さくなっていき、 0° に近づいていった（図 3A, B 上）。一方、体の屈曲は右側（傾斜上側）に示した。胴体の屈曲角度は 2 秒の時点まで、傾斜刺激が増加するにつれて増加していき、その後頭部傾斜角度が減少するにつれて、胴体の屈曲角度も小さくなっていった（図 3A, B 中）。このことから、胴体の屈曲は頭部傾斜角度と連動していることが示された。この胴体の屈曲は全ての試行で観察され、反射行動であると考えられる。本論文で、胴体の屈曲は前庭刺激による屈曲反射（Vestibular-induced Bend Reflex）もしくは VBR とする。

前の段落で述べたように、VBR の屈曲角度は頭部傾斜角度と相関がある。このことは、仮に頭部が傾斜したままでは、VBR は顕著に見られ、持続するのではないかと予想した。この仮説を検証するために、頭部のみをアガロースに包埋し、浮袋周辺の胴体や尾部が自由に動かせる魚に対して、傾斜刺激を与えた。装置の写真は図 3C にある。予想通り、傾斜中の VBR は明らかに観察された。頭部を左側に傾斜した時は右側への VBR が、右側に傾斜したときは左側への VBR が観察され、VBR の方向は傾斜上側に観察された（図 3D）。メチルセルロースの実験時同様、傾斜刺激の角度が大き

くなるにつれて（つまり頭部傾斜角度が大きくなるにつれて）胴体の屈曲角度も大きくなっていった（図 3E）。刺激強度が 20°に達すると、胴体屈曲角度がだんだん小さくなっていったが、0°を上回っていた。VBR は実験を行った全ての個体、試行で観察された（図 3F）。20°の傾斜状態が持続すると、屈曲角度のばらつきが時間経過で大きくなっていった。このことから、傾斜状態が維持しても、必ずしも胴体の屈曲角度も持続しないことが明らかとなった。しかしながら、メチルセルロースの実験と頭部包埋実験から、VBR は頭部傾斜と強く関わるということがわかり、私はロール傾斜からの姿勢を立て直しに関わる可能性が高いと考えた。

3.2.1.3. VBR によって重力と浮力がずれることにより、力のモーメントがかかり、姿勢を立て直す

もし、VBR が傾斜姿勢からの立て直しのメカニズムの場合、VBR によりどのような力が働いているのであろうか。私は、2つの力（重力と浮力）を用いたモデルを立てた（図 4A）。重力は質量がある部分に働き、1つの力で表すと重心（Center of Mass; COM）に働く。浮力は物体が押しのけた流体の重力と等しいので、1つの力で表すと体積中心（Center of Volume; COV）に働く。ゼブラフィッシュ仔魚では、重心と体積中心は、浮袋周辺に存在していることが知られている（Ehrlich and Schoppik, 2017, Stewart and McHenry, 2011）。まず、VBR を示さない背が上の状態を考える。重心と体積中心は、正中線上に存在し、力の大きさが等しく、ベクトル方向が反対であるため、魚はロール方向に平衡状態であると考えられる（図 4A 左）。では、傾斜姿勢時、傾斜上側に VBR を示す場合を考える。体の屈曲により、頭部と体の尾部は屈曲側（傾斜上側）に移動するが、作用—反作用の効果により浮袋周辺の体は屈曲と反対側（傾斜下側）に移動する（図 4A 右上、右中）。体が「く」の字型に折れると、重心と体積中心の位置は変化する（図 4A 右中）。重心と体積中心が位置する浮袋あたりの断面図では、重心と体積中心は正中線からずれ、傾斜上側に位置する。しかしながら、重心と体積中心は同じ場所に位置せず、重心の方が体積中心に比べて外側に位置する（図 4A 右下）。これは、傾斜下側にある、気体で満たされた浮袋には、重力はかからず浮力のみしかかからないからである。重心が体積中心に比べて、傾斜上側のより外側に位置することで、姿勢を立て直す方向に力のモーメントが発生すると考えられる。

前の段落では、重力と浮力をそれぞれ1つの力として考えていた。一方、重力と浮力の合力を微小体積ごとに考えると直感的にわかりやすい。繰り返しになるが、重力 (mg) は質量がある部分に働く。浮力 (ρVg) は体積がある部分に働き、その大きさは、押し除ける流体 (水) の重力と等しい。つまり、魚の浮き沈みは重力と浮力の合力に影響を受け、その合力 ($mg - \rho Vg = (\rho_{\text{tissue}} - \rho_{\text{water}})Vg$) は組織と水の密度の差 ($\rho_{\text{tissue}} - \rho_{\text{water}}$) に比例する。浮き袋を除く組織の密度 (1.008 mg/mm^3) は水 (0.997 mg/mm^3) に比べて、わずかに高い一方、浮き袋の密度 (0.00131 mg/mm^3) は水に比べて圧倒的に小さいことが既に知られている (Ehrlich and Schoppik, 2017)。このことから、浮き袋を除く組織では、合力はわずかな下向き (沈む方向) になる一方、浮き袋では、合力は圧倒的な上向き (浮く方向) になる (図 4C, D、合力の大きさの比は約 100 倍異なる)。まず、VBR を示さない背が上の状態を考えると、浮き袋を除く組織も浮き袋も左右対称に位置するため、魚はロール方向に平衡状態であると考えられる (図 4E 左)。では、傾斜姿勢時、傾斜上側に VBR を示す場合を考える。体が「く」の字型に折れると、屈曲側に、合力が下向きになる組織が移動する一方、反対側には、合力が上向きになる組織 (浮き袋) が移動する (図 4E 中)。このことから、傾斜上側が下向き、傾斜下側が上向きの力を受け、姿勢を立て直すとも考えられる。

もし、これらの重力と浮力を用いたモデルが正しければ、浮袋内の気体を抜いた魚は、傾斜姿勢から立て直すことができないと予想できる。浮袋内の気体がないと、体の密度がどの部分でもほぼ一様となり、傾斜時、魚が VBR を示しても重心と体積中心がずれずに、重力と浮力は同じ軸上でかかるため、力のモーメントが発生しないからであろう (図 4B)。微小体積系で考えると、体の密度がほぼ一様になると、傾斜上側と傾斜下側で同様の合力がかかるからであろう (図 4E 右)。この予想を検証するために、浮袋内の空気を抜いた魚を準備し、実験を行った。浮袋内の気体がないと、通常状態に比べて、浮力が小さくなる。この浮力の減少を保証するため、12.5% スクロース液を含む水に浸して実験を行った。(スクロースを添加することで、液体の密度を増やし、通常状態と同じ浮力を得られるようにした。) 予想通り、たいていの試行で魚は傾斜姿勢から立て直すことができなかった (図 5A-C)。全ての魚の試行から、傾斜開始から 4 秒時点の頭部傾斜角度の中央値は 15.9° で、1.7 秒時点の頭部傾斜角度の中央値の 15.2° とほとんど変わっていない (図 5C)。さらに正常な魚と頭部屈曲角度を比較すると、1.7 秒でも 4 秒の時点でも正常な魚に比べて浮き袋内の空気を抜いた

魚の屈曲角度は有意に高かった (図 5D, E)。このことは、やはり浮袋内の気体を抜いた魚は傾斜姿勢から立て直していないことを示している。この結果から、先に提唱した重力と浮力のモデルは正しいであろう。さらに、魚は傾斜姿勢中ずっと VBR を行っていた (図 5A, B 中)。これは、ちょうどアガロースに頭部が包埋されているときのよ
うに、浮袋内の空気を抜いた魚は、頭部傾斜したままであるからであろう。結果をまとめると、魚は VBR を行うことで、傾斜姿勢から立て直していることが明らかとなった。

3.2.2. VBR を司る神経回路の探求

3.2.2.1. Tan-nMLF-PHM 経路が VBR を引き起こす可能性

次に傾斜中の VBR を引き起こす神経回路を探索した。以前の研究から、中脳に存在し脊髄に投射する nucleus of the medial longitudinal fasciculus (nMLF)ニューロンを光遺伝学で活性化させると、VBR 様の行動を引き起こすことが示されていた (Thiele et al., 2014)。この nMLF ニューロンは自然または人工的な前庭刺激により、活動することが知られている (Migault et al., 2018; Favre-Bulle et al., 2018)。解剖学的な実験から、nMLF は前庭神経核である Tangential nucleus (TAN)から入力を受けている (Bianco et al., 2012; Schoppik et al., 2017)。この TAN ニューロンも前庭刺激により活動することが知られている (Migault et al., 2018; Favre-Bulle et al., 2018)。さらに、Thiele et al., 2014 の論文では、この nMLF ニューロンの活性化時に、Posterior hypaxial muscles (PHMs)の活動も上昇することが知られている。これらの知見から、前庭情報が TAN ニューロン-nMLF ニューロンを介して脊髄に伝達され、PHM を介して VBR が引き起こされていると仮説を立てた (図 6)。この仮説を検証するために、私はそれぞれの細胞群に対し、Ca²⁺イメージングと細胞破壊実験を行った。結果を以降のセクションで記述していく。

3.2.2.2. *evx2* 陽性 TAN ニューロンは興奮性ニューロンである

まず、TAN ニューロンを遺伝学的に同定するために、TAN ニューロンでレポーター遺伝子を発現するトランスジェニック魚を探した。TAN ニューロンは、後脳菱脳節 5 の一番外側に位置している (Suwa et al., 1999; Bianco et al., 2012) ことを指標に探

したところ、*evx2* トランスジェニック魚では、TAN ニューロンの可能性のあるニューロンを染めていた。TAN ニューロンの可能性のあるニューロンの形態を調べるために、*Tg(evx2:Gal4; UAS:Dendra2)* (Kimura et al., 2014; Taniguchi et al., 2016) を用いて、色変換実験を行った。TAN ニューロンの可能性のあるニューロン集団の形態は、反対側に投射し、上行性と下行性に分岐し、内側縦束 (medial longitudinal fasciculus) に沿って伸びていた (図 7A)。上行性軸索は、中脳まで到達しており、下降性軸索は長いものは脊髄の第3セグメントまで到達していた。また電気穿孔法 (エレクトロポレーション) によって単一細胞の形態も調べたところ、反対側分岐性のもの (6/8) と、反対側上行性のもの (2/8) の2種類が観察できた (図 7B, C)。これらの形態は過去に報告された TAN ニューロンの形態とよく似ていた。このことから、*evx2* トランスジェニック魚で標識される後脳菱脳節5外側に位置するニューロンは TAN ニューロンであることがわかった。

さらに、TAN ニューロンが興奮性か抑制性ニューロンかを調べるために、*Tg(evx2:GFP)* と神経伝達物質特異的に RFP を発現するトランスジェニック魚を掛け合わせた (図 7D)。*vglut1*、*vglut2a* トランスジェニック魚と掛け合わせると GFP と RFP の二重陽性細胞があった。一方、*glyt2*、*gad1b* トランスジェニック魚と掛け合わせた場合、二重陽性細胞は確認されなかった。このことから *evx2* トランスジェニック魚で標識される TAN ニューロンの大抵が興奮性ニューロンであることが明らかとなった。

3.2.2.3. 傾斜下側の TAN ニューロンが活動する

傾斜中の TAN ニューロンの活動イメージングを行うために、回転ステージに取り付けられた対物レンズと魚が同時に傾斜するイメージングシステムを組み立てた (図 7E, F, Tanimoto et al., 2022)。この系では、励起光が一様ではないため、傾斜すると蛍光強度がどうしても変化してしまう。傾斜による蛍光強度変化を低減させるために、レシオメトリックなイメージングを用いた (Tanimoto et al., 2022)。まず、レシオメトリックイメージングにおいて、傾斜そのものに由来する緑/赤蛍光強度比 ($\Delta R/R_0$) の変動を調べるために、TAN ニューロンで *Dendra2* を発現する魚 *Tg(evx2:Dendra2)* を用いた。魚に紫色光を照射し、わずかに *Dendra2*(緑) から *Dendra2*(赤) への色変換を行い、傾斜中の $\Delta R/R_0$ の変化を測定した (図 7G)。20°の傾

斜で $\Delta R/R_0$ は最大でも 7% の範囲内に抑えられた (図 7H)。このため、今後のイメージングで $\Delta R/R_0$ が 7% 以上変化した場合、神経細胞由来のシグナルとみなした。

TAN ニューロンに緑色の Ca^{2+} 指示蛍光タンパク質である jGCaMP7b と赤色蛍光タンパク質の tdTomato を発現する魚、 $Tg(evx2:tdTomato-GCaMP7b)$ を用いて TAN ニューロンの細胞集団の活動イメージングを行った (図 7I 上)。図 7I に示す魚の例では、左側が下側となるよう傾斜すると左側の TAN ニューロンの細胞群が、右側が下側となるよう傾斜すると右側の TAN ニューロンの細胞群の $\Delta R/R_0$ が上昇した。この上昇率が 7% を超えているので、細胞と同側が下側に傾斜する時に活動していると判断できた。7 匹の魚いずれにおいても、細胞と同側が下側に傾斜するときに活動していた (図 7J)。反対に細胞と同側が上側に傾斜するときもわずかに $\Delta R/R_0$ が上昇しており、わずかに活動していることが明らかとなった (図 7I, J)。しかしながら、下側に傾斜した時の方が、上側に傾斜した場合に比べてより大きな活動を示した (下側に傾斜した場合は 3.2 倍大きい、 $p = 0.0003$ 、図 7J)。また、傾斜持続中は $\Delta R/R_0$ はだんだん減少していき、アダプテーションが起きることが示唆された。TAN ニューロンのイメージングでは、同側が下側に傾斜した場合、反対側への傾斜より大きく活動することが明らかとなった。

3.2.2.4. TAN ニューロンを破壊すると、反対側への VBR が低下する

次に、 $evx2$ 陽性の TAN ニューロンが VBR に必要かどうかを調べた。そのために、 $Tg(evx2:GFP)$ 魚を用いて片側の TAN ニューロンを破壊し、頭部を包埋した状態での傾斜時の VBR の胴体屈曲を観察した (図 8A)。GFP 陽性の TAN ニューロンの全て (だいたい 18 個) に対してレーザー破壊を試みた。左側の細胞を破壊した魚では、左側が下側に傾斜時の右側への VBR の角度が浅くなったのに対して、右側が下側に傾斜時の左側への VBR 角度は概ね観察された (図 8B, C)。これは細胞破壊側が下側となるよう傾斜した際の反対側への胴体屈曲が大きく阻害されていた。同様の結果は複数個体 (7 個体) で見られ、破壊側が下側に傾斜した時に示す VBR の角度は、上側に傾斜した時に比べて小さく比べて顕著に低下していた。 ($p = 0.003$ 、図 8D)。コントロールとして TAN ニューロンの内側に位置する細胞を同数程度破壊したところ、両側への明らかな VBR が観察された (図 8E-G)。コントロールの破壊実験を行った 4 個体

では、傾斜方向と VBR 屈曲角度の間に顕著な違いが見られなかった。 ($p=0.23$ 、図 8H)。

両側の TAN ニューロンの破壊個体では、両側への VBR の屈曲がともに小さくなると予想し、実験を行った (図 8I)。1 匹しか実験を行っていないが、確かに傾斜中の VBR の屈曲角度は両側とも小さくなっていた (図 8J-L)。

細胞破壊の結果から、TAN ニューロン群は下側になるよう傾斜するとき、その細胞群と反対側への胴体の屈曲に必要であることが示された。

3.2.2.5. TAN ニューロンの光遺伝学的活性化で反対側への胴体の屈曲が誘発される

では、片側の TAN ニューロンを活性化した時に胴体は屈曲するのであるか。私は TAN ニューロンにチャネルロドプシンを発現する $Tg(evx2\text{-hs:CoChR-GFP})$ の魚において、片側の *tangential nucleus* に青色光照射して胴体の屈曲を観察した (図 9A)。右側、左側の *tangential nucleus* にそれぞれ青色光を 5 秒間照射すると、胴体はそれぞれ左側、右側に屈曲し、照射した側とは反対側へ胴体を屈曲させた (図 9B, C)。照射終了後は、だんだん元の位置に戻っていった。照射中の屈曲角度 (照射開始後 4 秒から 5 秒の間の屈曲角度の平均) は照射前の屈曲角度 (照射 1 秒前から照射直前までの屈曲角度の平均) に比べて、明らかに大きくなっており ($p=0.002$ 、図 9D)、複数個体でも照射とは反対側への胴体の屈曲をもたらすことが明らかとなった。光遺伝学活性化のコントロール実験として、 $Tg(evx2\text{-hs:CoChR-GFP})$ の魚において TAN ニューロンの内側に位置する *evx2* 陽性細胞に照射した。多くの場合、わずかに屈曲角度の変化が見られる程度であった (図 9E-G)。複数の個体でも、照射すると、わずかではあるが、反対側への胴体の屈曲をもたらすことが明らかとなった ($p=0.02$ 、図 9H)。

(一部の試行で左右対称な遊泳運動が引き起こされたが (図 9I, J)、遊泳が観察された試行は、解析から除いている。) 実験群とコントロール群の 2 つの条件での照射時の胴体屈曲角度を比べると、TAN ニューロン活性化時により大きな屈曲角度を示していた ($p=0.003$ 、図 9K)。以上のことから、*evx2* で標識される TAN ニューロンは、反対側への胴体の屈曲を誘発する細胞集団であることが示された。

3.2.2.6. nMLF ニューロンの一部は傾斜上側の時に活動する

次のターゲットとして、nMLF ニューロンに着目した。nMLF ニューロンは、網様体脊髄路ニューロンの一部であり、中脳に存在し、内側縦束に沿って軸索を伸ばし、脊髄に投射するニューロン群である (Metcalf et al., 1986; Thiele et al., 2014)。私は、スピニングディスク共焦点ユニットが取り付けられた対物レンズ傾斜顕微鏡を用いて、単一細胞レベルで nMLF ニューロンの Ca^{2+} イメージングを行った (Tanimoto et al., 2022)。nMLF ニューロンをイメージングするために、緑色の Ca^{2+} 指示薬である Cal-520 と赤色の蛍光色素の rhodamine dextran を脊髄吻側に注入し、nMLF ニューロンを逆行的に標識した。図 10A では、最大値投影画像と 1 光学切片の画像を示す。傾斜時、大きな $\Delta R/R_0$ は一部の小さい細胞で観察された (図 10B の細胞#1、#7、#8)。場所と大きさから一意に識別可能な大きな nMLF ニューロン (MeLr、MeLc、MeLm) はほとんど活動しない、または活動が比較的小さかった (図 10B の細胞#4、#5、#10)。イメージングを行った 10 匹のすべてのニューロン (333 個) のうち、約 1/3 のニューロンが、同側が上側となるように傾斜したときに明らかな活動を示した (図 10C の擬似カラー画像で赤色、オレンジ、黄色、白色の部位)。同側が上側となるよう傾斜した時の活動は、図 6 の仮説と一致している。nMLF ニューロンは反対側の TAN ニューロンから興奮性の入力を受け、その TAN ニューロンは、細胞と同側が下側になる際に活動していた。一方、同側が下側になるよう傾斜した際、多くの nMLF ニューロンの $\Delta R/R_0$ はわずかに低下していた (図 10C の擬似カラーで紫色のものがより黒くなった)。このことは、nMLF ニューロンと同側が下側になるよう傾斜した際、わずかに抑制されていることが示された。1 細胞ごとに傾斜方向と $\Delta R/R_0$ の最大値を比べると、やはり同側が上側に傾斜したときの活動が反対方向への傾斜に比べて顕著に高くなっていた ($p = 2.2 \times 10^{-16}$ 、図 10D)。全体のどのくらいの細胞が傾斜で活動するかを定量的に調べるために、傾斜そのものに由来する $\Delta R/R_0$ の変化は 0.1 範囲内で抑えられるという実験結果から、0.1 以上の $\Delta R/R_0$ の増加をニューロンの活動とみなした (Tanimoto et al., 2022)。最大 $\Delta R/R_0$ が 0.1 を超す、つまり活動する細胞の割合は、41% (136/333) の細胞が同側が上側に傾斜したときのみ活動し、14% (46/333 個) の細胞が両側への傾斜時に活動し、わずかなニューロン (12/333 個、4%) だけが同側が下側に傾斜したときのみ活動した (図 10D)。このことから、細胞と同側が上側になるよう傾斜したときに、半分程度のニューロン (182/333 個、55%) が活動したと判断できた。

さらに、傾斜中に活動を示したニューロンの特徴を調べるために、細胞体の大きさや位置と最大 $\Delta R/R_0$ を比較した。比較的大きな活動を示すニューロンの多くは、細胞体が小さいニューロンであった (図 11A)。前述したように、一意に識別可能な大きな nMLF ニューロン (MeLr、MeLc、MeLm、MeM) の多くはほとんど活動しない、もしくは比較的活動が小さかった。細胞体の位置との関係を調べるために、複数の個体由来のニューロンの位置を前後軸方向と内外軸方向に標準化した (図 11B)。前後軸や内外軸と最大 $\Delta R/R_0$ は明確な相関はみられなかった (図 11C, D)。一方、背腹軸と最大 $\Delta R/R_0$ を比べると、背側に位置する細胞が比較的高い最大 $\Delta R/R_0$ を示していた (図 11E)。

結果をまとめると、nMLF ニューロンの Ca^{2+} イメージング実験では、傾斜上側の半分程度の nMLF ニューロンが活動した。nMLF ニューロンのうち、比較的活動が高いニューロンの大抵は小さく、背側に位置する傾向が見られた。

3.2.2.7. nMLF ニューロンを破壊すると、同側への VBR が低下する

つぎに、nMLF 破壊実験を行ったときの VBR を観察した。逆行的に nMLF ニューロンを染めた魚では、脊髄が損傷を受けるため、脊髄損傷が VBR 行動に影響を与えてしまう。そのため、遺伝学的に nMLF ニューロンを標識する遺伝子の同定を試みた。過去の知見から、*pitx2* トランスジェニック魚が nMLF ニューロンを標識することが知られている (Wolman et al., 2008)。私は Tg(*pitx2:Dendra2*) 魚を作成し、逆行的に染めることで、nMLF ニューロンのうちのどの程度が Dendra2 陽性かどうかをまず調べた (図 12A)。その結果、約 80% の逆行的に染まる nMLF ニューロンが Dendra2 陽性であることが明らかとなった (図 12A 下)。しかしながら、nMLF 以外にも多くの細胞集団で Dendra2 陽性細胞が存在するため、光学的な逆行染色を行った (Kimura et al., 2013、図 12B)。そして、Dendra2 (赤) を頼りに nMLF ニューロンの破壊を行った (図 12C)。この際、片側おおよそ 25 個の細胞が色変換され、そのすべてを破壊の対象とした。

左側の nMLF ニューロンを破壊した個体は、左側が上側に傾斜した時の左側への VBR の角度が浅くなったのに対して、右側が上側に傾斜した時の右側への VBR は概ね観察された (図 12D, E)。これは細胞破壊側が上側となるよう傾斜した際の同側への胴体屈曲が大きく阻害されていた。同様の結果は複数個体 (8 個体) で見られ、破

壊側が上側に傾斜した時に示す VBR の角度は、下側に傾斜した時に比べて小さく比べて顕著に低下していた ($p=0.003$ 図 12F)。コントロールとして後脳に位置する Dendra2 陽性細胞を同数程度破壊したところ、両側への明らかな VBR が観察された (図 12G-I)。コントロール実験では、傾斜方向と VBR 屈曲角度の間にそれほど顕著な違いが見られなかった ($p=0.05$ 、図 12J)。細胞破壊の結果から、nMLF ニューロンはそのニューロンが上側となるよう傾斜するとき、その細胞と同側への胴体の屈曲に必要であることが示された。

3.2.2.8. PHM には速筋タイプと遅筋タイプが含まれ、3つのセグメントに分かれる

次に posterior hypaxial muscles (PHMs)に着目した。PHM は浮袋付近で斜めに走る腹側筋の一種である (Haines et al., 2004)。体幹の筋肉は、速筋と遅筋で構成されていることが知られている (Wang et al., 2011) ので、PHM も速筋、遅筋で構成されるかを調べた。速筋で発現する α -actin (Haines et al., 2004) と遅筋の一種類で発現する *smyhc2* (Elworthy et al., 2008) の 2 種類の遺伝子を用いた。Tg(α -actin:GFP) トランスジェニック魚 (Higashijima et al., 1997) と新たに作成した Tg(*smyhc2*:loxP-RFP-loxP-DTA) 魚を掛け合わせたところ、PHM には速筋タイプ、遅筋タイプの両方が存在していた (図 13A)。速筋繊維は比較的背腹軸方向に太いのに対し、遅筋繊維は細く、さらに、遅筋繊維は速筋繊維に挟まれていることが明らかとなった (図 13B)。また、速筋タイプも遅筋タイプも 3つのセグメントに分かれていることも明らかとなった (図 13A)。これは、以前の研究 (Windner et al., 2011; Talbot et al., 2019) と一致する。私は、これら 3つのセグメントを前から、rostral、middle、caudal セグメントと定義した。いずれのセグメントにおいても、一部は浮袋の脇に位置していた。

3.2.2.9. 傾斜上側の遅筋タイプの PHM が活動する

2 種類のタイプの PHM に関して、それぞれ活動イメージングをするため、広視野タイプの対物レンズ傾斜顕微鏡を用いて、PHM を腹側から観察した。蛍光観察と同時に、頭部を包埋した状態の魚の行動を背側から観察した (図 13C, D)。ここで、PHM のイメージング時、蛍光強度変化は以下の要因の合計となる。1) サンプルの傾斜に由来するもの (顕微鏡の励起光の完全に均一ではない照射による、これは図 7G, H と同様のアーチファクトである)、2) 筋肉の収縮弛緩自体による筋肉の大きさの変化に

由来するもの、3) VBR の結果で筋肉の移動に由来するもの、4) 筋肉の活動変化に由来するもの。1)~3)はすべてアーチファクトであり、4)は検出したいシグナルである。複数の要因に由来するアーチファクトレベルを推定するため、遅筋タイプの PHM で *Dendra2* を発現する魚 *Tg(pitx2:Dendra2)* を用いた (図 14A)。魚に紫色光を照射し、わずかに *Dendra2*(緑) から *Dendra2*(赤) への変換を行い、傾斜中の $\Delta R/R_0$ の変化を測定した (図 14B)。20° の傾斜で $\Delta R/R_0$ の最大値は、たいてい 10% の範囲に収まっていた (一部の試行は、最大 15% となっていた、図 14C, D)。この実験によりアーチファクトを超える $\Delta R/R_0$ を筋肉の活動に由来するものとみなした。

遅筋タイプの PHM をイメージングのため、*Tg(smyhc2:tdTomato-jGCaMP7b)* 魚を作成した (図 15A)。腹側から観察すると、体の両側に PHM 由来の蛍光を、正中線沿いには卵黄や腸由来の自家蛍光が見られた (図 15A 右)。傾斜刺激を与えなくても、PHM (特に rostral と middle セグメント) は自発的に活動することが見られ、この自発的活動は魚の尾のわずかな動きと時間的に対応していた (図 15B)。この行動が意味することは不明であるが、もしかしたらピッチ方向の姿勢制御に関わっているかもしれない (後に考察する)。解析には、自発的な活動が見られない試行を用いた。図 14C にはセグメント毎の遅筋タイプの PHM の活動を示す。右側が上側となるように傾斜すると、右側の middle と caudal セグメントの $\Delta R/R_0$ が大きな増加を示し、左側が上側となるように傾斜すると、左側の middle と caudal セグメントの $\Delta R/R_0$ が大きな増加を示した。rostral セグメントに関しては、その筋肉が上側となるように傾斜すると、 $\Delta R/R_0$ が上昇したが、その変化率は middle と caudal セグメントに比べて小さかった。3 つのセグメントすべてにおいて、傾斜下側でも時折アーチファクトレベルを超える活動を示していたが、その場合に比べて傾斜上側になるよう傾斜した場合、大きな $\Delta R/R_0$ 上昇が見られた (rostral セグメント: 2.0 倍、 $p=0.02$ 、middle セグメント: 5.7 倍、 $p=0.01$ 、caudal セグメント: 3.5 倍、 $p=0.0006$ 、図 15D)。イメージングの結果と一致して、より活動した側に VBR の胴体の屈曲が観察された (図 15C)。

次に速筋タイプの PHM の活動を *Tg(α -actin:tdTomato-jGCaMP7f)* を用いて測定した (図 16A)。遅筋タイプとは異なり、速筋タイプの PHM の自発的な活動は見られなかった。Ca²⁺ イメージングの結果、3 つのセグメントすべてにおいて、アーチファクトを超える活動は観察されなかった (図 16B, C)。また、傾斜上側と下側に位置に依らず $\Delta R/R_0$ の顕著な違いが見られなかった (rostral セグメント: $p=0.59$ 、middle セグメ

ント： $p=0.67$ 、caudal セグメント：、 $p=0.11$ 、図 16B, C)。結果をまとめると、速筋タイプではなく、遅筋タイプの PHM が、上側となるよう傾斜した際により活動することが明らかとなった。遅筋タイプの PHM のうち、特に middle と caudal セグメントが顕著な活動上昇を示した。

3.2.2.10. 遅筋タイプの PHM が VBR を生成する重要な役割を担う

では、遅筋タイプの PHM が VBR に必要かどうかを調べた。このため、PHM を含む移動性筋肉の前駆体で発現する *tbx2* (Windner et al., 2011) を用いて、*Tg(tbx2:Cre)* を作成した。この魚を *Tg(smyhc2:loxP-RFP-loxP-DTA)* 魚と掛け合わせ、遅筋タイプの PHM の破壊を試みた。ダブルトランスジェニック魚では、Cre により遅筋タイプの PHM で組み換えが起こり、RFP ではなくジフテリア毒素 A フラグメントの発現が誘導される (図 17A 左)。遺伝学的な遅筋タイプの PHM 破壊は S58 抗体を用いた抗体染色で確認できた。*Tg(tbx2:Cre)* を持たない魚では、体幹の筋肉でも PHM でも遅筋が染色された (図 17A 上中、上右)。一方、*Tg(tbx2:Cre)* を持つ魚では、体幹の筋肉は遅筋が染色されたのに対し、遅筋タイプの PHM の染色がほとんどなくなっていた。

(図 16A 下中、下右、しかしながら、*Tg(tbx2:Cre)* を持つ魚では、PHM より吻側に位置する sternohyoideus muscles (SHM) でも RFP 蛍光が消失していたことから、SHM も破壊されている可能性が高い。) このことからダブルトランスジェニック魚では、他の筋肉への影響を排除できないが、遅筋タイプの PHM が破壊されていることを確認できた。

一方、このダブルトランスジェニック魚では、速筋タイプの PHM は破壊されていないと推定できた。これは F59 抗体を用いた抗体染色で確認された。*Tg(tbx2:Cre)* を持たない個体では、RFP を発現する筋肉以外にも F59 で染色される筋肉が存在すること (図 17B 上)、F59 は遅筋タイプだけではなく速筋タイプの PHM を染色すると考えられる。実際、細い遅筋繊維だけではなく、比較的太い速筋繊維も染色された。*Tg(tbx2:Cre)* を持つ魚では、RFP の蛍光が消失し遅筋タイプの PHM が破壊されていた状態では F59 での PHM の染色が残ったままあった (図 17B 下)。これらの繊維はおおむね太い繊維だったことから、速筋タイプは破壊されていないと推測される。

遺伝学的に遅筋タイプの PHM を破壊したときの傾斜時の VBR を観察した。遅筋タイプの PHM が破壊されると、左右への VBR の屈曲角度が減少した (図 17C,

D)。コントロールに比べて、Tg(*tbx2:Cre*)を持つ PHM 破壊魚では、最大屈曲角度が約 1/3 に減少していた (図 17E)。この結果から、PHM が VBR に非常に重要な役割を果たす筋肉であることが示唆された。

3.2.2.11. PHM 運動ニューロンの一部を破壊すると、同側への VBR が低下する

順番は前後するが、最後に PHM 運動ニューロンに着目する。PHM 運動ニューロンに対する研究は、今回が初めてなので、PHM 運動ニューロンの形態を最初に調べた。運動ニューロンで Kaede を発現する Tg(*vachta:Gal4; UAS:Kaede*) 魚を用いた (Hatta et al., 2006; Taniguchi et al., 2017)。PHM 筋肉に伸ばしている神経軸索に光学的に逆行染色 (色変換) を行ったところ、rostral セグメントの PHM を支配する運動ニューロンは主に第 5 セグメントに 15 個程度、わずかではあるが第 4 セグメントに数個存在していた (図 18A)。middle セグメントの PHM を支配する運動ニューロンは第 6 セグメントに 11-15 個程度、caudal セグメントの PHM を支配する運動ニューロンは第 7 セグメントに 6-11 個程度存在していた (図 18B)。Gal4-UAS システムでは確率的にしかならぬので、Kaede 陰性の PHM 運動ニューロンもあると予想されることから、これらの細胞数のばらつきが大きいと考えられる。また、注意したいのは、色変換した PHM 運動ニューロンは、速筋タイプの PHM を支配する運動ニューロンと、遅筋タイプの PHM を支配する運動ニューロンの両方を区別せず標識することである。いずれのセグメントの PHM 運動ニューロンも、Kaede 陽性細胞の細胞体が観察される脊椎のカラムの腹側半分に位置していた。

セクション 3.2.2.10. (遅筋タイプの PHM の破壊実験) から、PHM を支配する運動ニューロンも VBR に必要だと容易に推測できるが、それを確かめるために、PHM 運動ニューロンを破壊した個体での行動実験を行った。セクション 3.2.2.9.において、遅筋タイプの PHM (筋肉)、特に middle と caudal セグメントは上側となるよう傾斜すると活動することが明らかとなった (図 15C)。この結果から、middle と caudal セグメントの PHM を支配する運動ニューロンが、同側が上側になるよう傾斜するときの VBR に必要だと予想できる。それらの運動ニューロンに対して、光学的に逆行染色を行い、色変換後の Kaede(赤)を持つニューロンをレーザー破壊するのを試みた (図 18B, C)。片側おおよそ 20 個前後の細胞が色変換され、そのすべてを破壊の対象とした。

右側の PHM 運動ニューロンを破壊した個体は、右側が上側に傾斜した時の右側への VBR の角度が浅くなったのに対して、左側が上側に傾斜した時の左側への VBR は概ね観察された (図 18D, E)。これは細胞破壊側が上側となるよう傾斜した際と同側への胴体屈曲が大きく阻害されていた。同様の結果は複数個体 (7 個体) で見られ、破壊側が上側に傾斜した時に示す VBR の角度は、下側に傾斜した時に比べて小さく比べて顕著に低下していた ($p=0.004$ 、図 18F)。コントロールとして背側に位置する Kaede 陽性細胞を同数程度破壊したところ、両側への VBR が観察された (図 18G-I)。コントロール破壊の 4 個体で見ても、一方向への VBR 屈曲角度の顕著な低下は見られなかった ($p=0.89$ 、図 18J)。細胞破壊の結果から、middle と caudal セグメントの PHM を支配する運動ニューロンが、上側になるよう傾斜するとき、同側への胴体の屈曲に必要であることが示された。ただ middle、caudal セグメントの PHM の運動ニューロンのどちらか一方または両方が VBR に必要かは不明のままである。さらに、rostral セグメントの PHM の運動ニューロンが必要かどうかはこの実験では明らかではない。

3.2.3. VBR を担う細胞の破壊時の自由行動実験

3.2.3.1. TAN ニューロンの破壊で、姿勢立て直しが遅くなる

これまでの活動イメージングと細胞破壊または細胞活性化実験により、TAN ニューロン—nMLF ニューロン—PHM 運動ニューロン—PHM の神経回路で VBR を誘発することが明らかとなった。では、VBR の屈曲角度が浅くなったときに、実際の傾斜姿勢からの立て直しに異常が出るかどうかを次に調べた。実験では、TAN ニューロン破壊魚と、PHM (筋肉) 破壊魚の 2 種類を用いた。

セクション 3.2.2.4.では、レーザー照射により片側の TAN ニューロンが破壊された魚では、破壊側が下側になるよう傾斜したときに、VBR の屈曲角度が小さくなった (図 8A-D)。この結果から、破壊側が下側になるよう傾斜した時、傾斜姿勢からの立て直しに異常がでると予想できる。図 19A-D では、左側の TAN ニューロンを破壊した魚の左右への傾斜時の行動を示す。右側が下側 (破壊されている側が上側) となるように傾斜すると、すぐに姿勢を回復した (図 19A, B)。一方、左側が下側 (破壊されている側が下側) となるようになるよう傾斜すると、頭部傾斜角度はより大きくなり、姿勢を立て直すまでの時間が長くなっていた (図 19C, D)。同様の結果が複数個体 (3 個体) で観察された。破壊された側が上側になるよう傾斜した時、すべての試行で姿勢を立て直したのに対し、破壊された側が下側になるよう傾斜した時、姿勢の立て直しが遅い、またはできていない試行が観察された (図 19E, F)。傾斜刺激直前の頭部傾斜角度は、同程度だったが、傾斜刺激中では、破壊側が下側となるよう傾斜した時の方が、頭部傾斜角度が高くなっていた。また、反ロール運動時の角速度は破壊側が下側になるよう傾斜した時の方が小さくなっていた (図 19G)。これらのことから、破壊側が下側になるよう傾斜したとき、その反対に傾斜したときに比べて、傾斜姿勢からの立て直しが鈍くなっていることが明らかとなった。さらに、破壊された側が上側になるよう傾斜したときの、頭部傾斜角度のオーバーシュートの度合いが正常な個体に比べて、非常に大きくなっていた (図 19B, E)。これは、オーバーシュートになると、破壊側が下側となるよう傾斜することになるためであると考えられる。この実験から、TAN ニューロンの片側破壊で、傾斜姿勢からの立て直しに左右差が生まれ、破壊側が下側となるよう傾斜した場合により影響を受けることが明らかとなった。

3.2.3.2. 遅筋タイプの PHM を破壊すると、わずかに姿勢立て直しが鈍くなる試行もある

遅筋タイプの PHM 破壊魚では、本当に姿勢立て直しに影響が出るかどうかを次に調べた。セクション 3.2.2.10.と同様、遺伝学的に両側の遅筋タイプの PHM が破壊されている個体を用いた。予想通り、傾斜姿勢からの立て直しができない試行が観察された一方、立て直した試行も多く観察された（図 20A, B）。そのため、傾斜開始 4 秒後の頭部角度は試行毎にばらついており、正常な個体よりもばらつきが大きくなっていった（図 20E）。反ロール運動の角速度を調べると、正常個体に比べて小さくなっていった（ $p=0.03$ 、図 20G）。この結果から、遅筋タイプの PHM が破壊されると、全体的には姿勢立て直しに影響が出ていることが明らかとなった。しかしながら、遅筋タイプの PHM が機能しなくても、ロール方向の姿勢の偏位からの立て直しが可能であることも同時に明らかとなった。

では、なぜ遅筋タイプの PHM 破壊魚の多くの試行で、姿勢立て直しが可能であるのであろうか。セクション 3.2.2.1.で姿勢制御における胸鰭の運動の寄与が挙げられたことから、遅筋タイプの PHM と胸鰭運動の協調的に働いている可能性を考えた。そこで、遅筋タイプの PHM 破壊魚に対し、さらに胸鰭を取り除いた魚を用いて同様の実験を行った（図 20C）。結果として、姿勢を立て直すことができない試行もあれば、姿勢を回復した試行も観察された（図 20D）。この魚においても、傾斜開始 4 秒後の頭部傾斜角度は試行ごとにばらつきが大きかった（図 20F）。反ロール運動時の角速度は正常魚に比べて小さくなっていった（ $p=0.03$ 、図 20G）が、劇的に小さくなってはいなかった。この結果から、胸鰭が取り除かれた、遅筋タイプの PHM 破壊魚は、姿勢立て直しに影響はありつつも、依然ロール方向からの立て直しが可能であることが示された。理由として、遅筋タイプの PHM を破壊した魚においても、わずかながら VBR を行うことが可能であるからであろう。PHM を破壊魚の頭部包埋条件でも VBR の屈曲角度は、コントロールに比べて小さいが、0 ではなかった（図 17D, E）。また、姿勢を立て直した試行の背側からの画像を見返すと、わずかに屈曲する試行も確認された（図 20C）。これらのことから、遅筋タイプの PHM は VBR において重要な役割を担うが、他の筋肉と協調して VBR そして姿勢制御に関わることが示唆された。

3.2.4. その他のニューロンの可能性

3.2.4.1. 前庭脊髄路ニューロンを破壊しても VBR は残る

これまで、前庭神経核である TAN ニューロンから網様体脊髄路ニューロンの nMLF ニューロンという経路で脊髄に伝達され、VBR が誘発されていることが明らかとなった (図 6)。しかし、脊髄に前庭情報を伝達する経路は、これだけではない。ゼブラフィッシュや他の動物で、前庭脊髄路 (vestibulo-spinal; VS) ニューロンが前庭情報を前庭神経核から脊髄に直接投射することが知られており、この経路が姿勢反射の重要な役割を担っていると考えられている。ゼブラフィッシュの電子顕微鏡の再構成画像から、VS ニューロンに接続する有毛細胞は卵形囊耳石器官の内側に存在する有毛細胞で、有毛細胞の繊毛の向きから、同側が下側となるような傾斜で反応すると考えられていた (Liu et al., 2022)。このことは傾斜中のイメージングで確認されている (Migault et al., 2018)。私も予備的な実験ではあるが、nMLF ニューロンのイメージングと同様の手法で、Cal-520 と rhodamine-dextran の混合液を脊髄に注射し、逆行的に VS ニューロンを染め、傾斜刺激を与えた実験を予備実験であるが 1 度行った。VS ニューロンは同側が下側となるような傾斜時に活動することが確かめられた。

では、傾斜刺激時の VBR においても VS ニューロンが関わるかどうかを調べるために、片側の VS ニューロンを破壊した時の VBR を観察した (図 21A)。Tg(*nefma*:GFP)トランスジェニック魚で標識され、後脳菱脳節 4 に存在し、マウスナー細胞 (巨大な一対の細胞) の細胞体の外側に位置する細胞群が VS ニューロン群である (Hamling et al., 2021)。標識された VS ニューロンの 11-14 個をレーザー破壊の対象とした。右側の VS ニューロンを破壊した魚を傾斜すると、左右への VBR はある程度観察された (図 21B, C)。破壊実験を行ったのは、3 匹だけであるが、一方への VBR の屈曲角度の顕著な低下は見られなかった ($p=0.79$ 、図 21D)。このことから、傾斜時の VBR に関して、VS ニューロンの寄与の可能性は完全には否定されていないが、やはり TAN ニューロン-nMLF ニューロンをメインに介して誘発されていることが明らかとなった。

3.3. 考察

3.3.1. 姿勢制御の行動について

3.3.1.1. 生体力学的な観点からみた姿勢立て直し機構

魚において、泳いでロール方向への姿勢偏位から立て直すことが知られていた (Zelenin et al., 2003; Bagnall and McLean, 2014)。しかしながら姿勢の偏位から泳がず立て直すメカニズムは全く知られていなかった。過去の知見から、人工的に耳石を移動させると、泳ぎを伴わない胴体の屈曲反射が引き起こされることが知られているが、これが遊泳を伴わない場合に、どのような生理学的な意味を持つかわかっていなかった (Favre-Bulle et al. 2017; 2018)。今回、遊泳を伴わない姿勢の立て直しに、浮袋の周辺で起こる胴体の屈曲反射 (VBR と定義した) が極めて重要であることが明らかとなった。ロール傾斜時、傾斜上側への VBR が引き起こされる。VBR によって、頭部と尾側の体は傾斜上側に移動する一方、作用-反作用の効果で、浮袋周辺の体は ear-down side に移動する (図 4A 右)。魚の体に対して、体の質量中心と体積中心は ear-up side に移動するが、浮袋の密度は非常に小さいことから、重心は体積中心より傾斜上側の外側に位置すると考えられる。このことから、重力が浮力に比べてより傾斜上側の外側にずれることで、立て直す方向に力のモーメントがかかるというモデルが推測された (図 4A 右)。このモデルは、浮袋内の気体を抜いた魚を用いることで強く支持された (図 4B、5A-C)。浮袋内の気体がないと、傾斜中に VBR が起きても、重力と浮力がずれないので力のモーメントが生成されず、立て直すことができない。そのため、浮袋内の空気がない魚は、ロール方向に傾斜した際、VBR を行い続けるも傾斜姿勢から立て直すことができない。

物理的観点から、VBR は内的な筋収縮のため、重心の絶対位置は変化しない (浮袋付近の断面では、浮袋付近の体の位置が傾斜下側に移動したため、相対的に重心が傾斜上側に移動したとみなせる、図 4A)。絶対的な重心位置から考えると、VBR は頭部と尾部側の体を傾斜上側に移動し、浮袋周辺の体を傾斜下側に移動させる行動といえる。浮袋周辺の体の密度が圧倒的に小さいため、体積中心の絶対位置は傾斜下側に移動すると考えられる (図 22A, B)。

重力と浮力のずれで引き起こされる力のモーメントが大きいほど、姿勢を立て直しが素早く行える。力のモーメントは重心と体積中心間の水平方向（魚の断面の水平方向）の距離に依存する。最大の分離距離を得る（つまり、最大の力のモーメントを得る）には、理論的には以下の2つの条件を満たす必要がある。1) 密度が圧倒的に小さい浮袋が、重心付近に存在することと、2) 屈曲が重心付近で起きることである。今回のゼブラフィッシュ幼魚のVBRはこの2つの条件を満たしている。1) に関して、重心は浮袋付近に位置することが既に知られている（Ehrlich and Schoppik, 2017）。2) に関しては、今回の研究を含め、VBR時の胴体の屈曲は浮袋周辺で観察された（図3A）。また、遅筋タイプのPHMのイメージングにより、屈曲位置に関する詳細なデータが得られた。最も顕著に活動した部位は、rostralとcaudalセグメントであり、これらはそれぞれ浮袋の直脇と浮袋の尾側の脇に位置している（図15A, C, D）。このため、物理的観点から、VBRは合理的で、姿勢を立て直しに最も効率のよい行動だと見なすことができる。

傾斜姿勢から立て直す際、頭部傾斜角度は反対方向に傾斜（オーバーシュート）していた（図2C, D, H）。これには2つの理由が考えられる。1つ目は、与えた傾斜刺激が20°付近に達した際の負の角加速度が大きい（つまり急減速する）のが原因かもしれない。自然界で引き起こされる加速度の変化以上の刺激が加えられており、負の加速度が大きい人工的な刺激に対応できず、結果的に反対方向にオーバーシュートするのではないかと考えられる。もう1つの理由として、魚は意図的にオーバーシュートとなるよう反ロール運動を引き起こしているかもしれない。機械の制御系において、安定状態への姿勢を回復させる際、偏位角度から安定状態に戻る分の復元力を作り出す「静安定」と、時間経過とともに復元力が減衰し、振動しながら安定状態に漸近する「動安定」がある。静安定では、最小限のエネルギーで復元するが、安定状態付近に戻るのに非常に時間がかかる。一方動安定性はオーバーシュートを繰り返すが、比較的安定状態付近に戻るのに素早く制御できる。飛行機の制御において静安定と動安定の両方を用いて、機体を安定させている。ゼブラフィッシュを含め動物も、静安定と動安定の両方を組み合わせることで、偏位姿勢から姿勢を立て直すのではないかと考えている。

3.3.1.2. 静的な姿勢制御について

陸上脊椎動物は、直立状態では不安定であり、微細な姿勢制御を刻々行うことで直立状態を保つことが知られている (Dickinson, 2000; Morasso et al., 2005; Le Mouel and Brette, 2007)。ゼブラフィッシュ幼魚では、背腹方向の重心と体積中心の位置が非常に近いこと、魚はロール方向に不安定であることが示唆される (Ehrlich and Schoppik, 2017, Stewart and McHenry, 2011)。今回の研究をもとに考えると、ゼブラフィッシュもわずかなロール方向の姿勢の乱れに対し頻繁に VBR を行うことで、背が上の状態を保つのではないかと推測できる。この推測が正しければ、魚の VBR による姿勢制御機構は、陸上脊椎動物の微細な姿勢制御に相当することが考えられる。

また、力学的、機械の観点から考えると、VBR というゼブラフィッシュ幼魚の姿勢立て直しは、船の復元力と、重力と浮力のずれによるという点で似ている。しかし、根本的な違いは、魚の姿勢立て直しは能動的な神経筋活動が必要に対し、船の復元力は、受動的なものであるという点である。理論的には、魚の体積中心が重心に比べて、圧倒的に背側に配置すれば、VBR を行わなくとも受動的に力のモーメントがかかり姿勢を安定させることができる。なぜ、魚はこのような体の構造をとらないのであろうか。1つの可能性として、一般的に、安定性と操縦性は相反 (例として、2輪自転車では安定性は低い操縦性が高いのに対し、3輪自転車は安定性が高い操縦性が低い) するが、魚は操縦性を重視するため安定性を犠牲にしているからであろう

(Webb, 2005)。魚の静的不安定性は最低限の動きで補償され、動的安定性をとることで、操縦性と安定性を同時に達成していると考えられる。

3.3.1.3. 姿勢制御における胸鰭の関与

今回の実験で VBR が姿勢制御に非常に重要ということが明らかとなった。しかし、VBR 以外にも、胸鰭も姿勢の立て直しに部分的に寄与すると考えられる。胸鰭を取り除いた魚では、反ロール運動時の角速度が正常魚に比べて小さくなり、さらに、傾斜開始後 4 秒の時点での頭部傾斜角度の中央値は、正常な魚に比べて高めであった (図 3J, K)。この結果から、胸鰭を切除した魚のロール方向の立て直しは、正常の魚よりも弱く、胸鰭の運動もロール方向からの姿勢立て直しにわずかに関与していることが明らかとなった。予備的な実験ではあるが、ロール傾斜時の胸鰭のリズミックな運動は左右非対称であり、左右一方の胸鰭が単純開閉しているのに対し、他方の

胸鰭は内転時ひねりを伴っている印象を持った。今後、傾斜時の胸鰭運動の詳細な解析やその神経回路機構の解明にも迫れればと考えている。

3.3.1.4. ピッチ方向の姿勢制御について

ゼブラフィッシュにおいてロール方向（左右方向）への偏位からの姿勢を立て直しには微細な姿勢制御が関わっていることが明らかとなった。では、ピッチ方向（頭尾方向）への偏位からの立て直しはどうであろうか。魚は頭部が重いので頭部が下側になるように傾斜してしまうが、遊泳を通してピッチ方向の姿勢を立て直すことが知られている（Ehrlich and Schoppik, 2017）。私の予備的な実験から、頭部包埋条件でピッチ方向に傾斜した際、遊泳を伴わず、胴体が背側、または腹側に屈曲した。さらに、頭部包埋条件での遅筋タイプの PHM のイメージング中に、rostral と middle セグメントのリズミックな活動に対応して胴体もわずかに動いていた（図 15B）。胴体のわずかな動きに合わせて、胴体撮影画像の焦点がずれたように観察されたので、胴体が背腹軸方向に動いていたのかもしれない。これら背腹方向への胴体の屈曲は、遊泳時引き起こすことでピッチ方向の姿勢の立て直し寄与する可能性は十分に考えられる。その可能性以外に、屈曲自体が姿勢の回復に寄与し微細な姿勢制御を達成する可能性も考えられる。浮き袋の脇に位置する PHM が収縮することで、浮き袋の位置をわずかに前後方向に移動させることができるのではないかと予想する。重心と体積中心は前後軸方向に非常に近い（Stewart and McHenry, 2010; Ehrlich and Schoppik, 2017）ので、わずかな浮き袋の移動によって重心と体積中心の前後方向の位置関係をずらし、姿勢を立て直す方向への力のモーメントを容易に得ることが可能であるのかもしれない。所属研究室において、ピッチ方向の姿勢制御の研究を行う予定であるので、今後詳しいメカニズムの解明が期待される。

3.3.1.5. 他の動物の姿勢制御

ゼブラフィッシュ幼魚では、ロール方向の傾斜姿勢から立て直しに VBR が非常に関わっていることが明らかとなった。この VBR は水棲脊椎動物で共通する姿勢制御メカニズムであろうか。予備的な実験から、ゼブラフィッシュ生魚やメダカにおいてもロール方向への傾斜中に VBR 様行動を引き起こしていることが判明しており、ロール傾斜から立て直しに関わると強く示唆される。マグロやカツオ、一部のサメ等、

泳ぎ続けている魚に関して、常に遊泳によるダイナミックな制御で姿勢を維持することが可能であると容易に推測できる。さらに、これらの魚には浮き袋がない、または小さいことから、VBRによる姿勢制御システムはそこまで機能していないと考えられる。カレイやヒラメ、アンコウ等、海底と広く接触している魚も、容易に安定状態を維持することができるので、VBR様の姿勢制御は必須ではないだろう。底と接触しておらず、水中で泳がずその場に居留する魚は、微細な姿勢制御を持つと予想できる。体の大きさに対する胸鰭の大きさの割合や浮き袋の大きさの割合によって、魚ごとに、胸鰭とVBRの行動の寄与度が変わるのかもしれない。最後に鯨やイルカ等の水棲哺乳類は、浮き袋ではなく、肺を持つ。また体温調節のため、多くの脂肪を持つことが知られ、その脂肪の密度は水よりも小さい。これらの動物では、VBR様行動による姿勢制御は可能であるかもしれない。

ゼブラフィッシュで観察されたVBRによる姿勢制御は、水棲脊椎動物での微細な姿勢制御機構に関して、はじめて報告したメカニズムである。このメカニズムでは、重力と浮力をずらし立て直す方向に力のモーメントを生み出すことで達成されていた。陸上脊椎動物での微細な姿勢制御においても、重力と床反力をずらし、力のモーメントを生み出すことで傾斜姿勢から立て直すことが知られている。また、鳥類においても、姿勢がわずかにずれた際、翼の形状を調整することで、安定した姿勢に戻ることが知られている。翼の微調整により、重力と揚力をずらし力のモーメントを生み出すことで姿勢を立て直している。このように、環境は違うが、重力と重力に拮抗する上向きの力の位置をずらして立て直すという共通点が見られる。今後、それぞれの機構の詳細や切り替えについての研究が行われると期待したい。

3.3.2. 神経回路について

3.3.2.1. 間接経路の重要性

前庭脊髄反射は、直接脊髄に投射する前庭脊髄路ニューロンが関わりと古くから知られている (Uchino and Kushiro, 2011; McCall et al., 2017; Witts and Murray, 2019; Olechowski-Bessagnet et al., 2020)。しかしながら前庭脊髄反射は、前庭脊髄路の遮断する実験においても前庭脊髄路ニューロンを介した直接経路だけではなく、前庭神経核

ニューロンから網様体脊髄路ニューロンを介する間接回路も関わりと推測されている。ヤツメウナギや哺乳類においても、網様体脊髄路ニューロンは前庭刺激に応答することはわかっている (Peterson et al., 1980; Bolton et al., 1992; Zelenin et al., 2003b)。哺乳類では、網様体脊髄路ニューロンも前庭頸反射に関わるのではないかと推測されていたが、これまで直接的な証明はほとんどされていなかった (Wilson, 1993; Wilson and Schor, 1999; Peterson, 2004; Sugiuchi et al., 2004; Murray et al., 2018)。今回、ゼブラフィッシュにおいて、*tangential nucleus* という前庭神経核から、*nMLF* ニューロンという網様体脊髄路ニューロンという回路が姿勢反射に非常に重要であると示すことができた。さらに、前庭脊髄路ニューロンの可能性は完全には排除できないが、その寄与度がかなり低いことも明らかとなった (図 21)。このことから、VBR を担う神経回路は直接経路よりむしろ間接経路が重要であることが明らかとなった。私の研究は、脊椎動物の間接経路の共通性を支持するとともに、前庭脊髄反射の間接経路の重要性を強く示唆することができた。

3.3.2.2. TAN ニューロンについて

TAN ニューロンは、外眼筋運動ニューロン (第 3、第 4 脳神経) に投射し、前庭動眼反射に関わることがすでに知られている (Bianco et al., 2012)。形態的な研究から外眼筋運動ニューロンに加えて、それらの神経核より吻側に位置する *nMLF* ニューロンにも接続することが示唆されている (Bianco et al., 2012; Schoppik et al., 2017)。今回の研究は形態的な研究を支持するとともに、さらに、TAN ニューロン-*nMLF* ニューロンが姿勢制御に関わることを明らかにすることができた。このため、TAN ニューロンが眼球運動と姿勢制御の 2 役を担っていることが明らかとなった。哺乳類でも、外眼筋運動ニューロンと脊髄運動ニューロンの 2 ヶ所へ直接投射する前庭神経核が知られていた (Isu et al., 1988; Minor et al., 1990)。今回の結果を演繹すると、眼球運動の制御と同時に、間接的に脊髄を制御する前庭神経核が、哺乳類にも存在する可能性が十分考えられる。

前庭動眼反射は脊椎動物で共通した反射であり、その神経回路も保存されている。今回は前庭動眼反射 (と姿勢反射の両方) に関わる TAN ニューロンは *evx2* 転写因子を発現することが明らかとなった (図 7A)。このため、他の動物においても前庭動眼反射に関わる外眼筋運動ニューロンに投射する前庭神経にも、転写因子 *evx2* の発現

が保存されている可能性が高い。一方、ゼブラフィッシュにおいて、反対側の前庭神経核付近に投射する交差性 (vestibulo-commissural) TAN ニューロンも知られている

(Bianco et al., 2012) が、今回 *evx2* でそのようなニューロンは染まらなかった。哺乳類では交差性ニューロンを介しての反対側の前庭神経核の抑制が知られており、前庭刺激の感受性に関わると考えられている (Uchino et al., 2001)。ゼブラフィッシュにおいても *evx2* 陰性の TAN ニューロンの機能解明を通して、更なる前庭系のメカニズム、神経回路の解明に繋がると考えられる。

TAN ニューロンは、上行性の軸索を持つタイプと上行性と下降性の軸索を持つタイプがある。今回、上行性軸索が nMLF ニューロンに投射すし VBR を担う経路の重要性が明らかとなった。しかしながら、TAN ニューロンの下行性軸索も PHM-MN に接続している可能性が考えられる。哺乳類において、眼球と姿勢の両方に関わる前庭神経核ニューロンは、下降性ニューロンを介して脊髄運動ニューロンに投射している

(Isu et al., 1988; Minor et al., 1990)。私たちの解剖学的な実験から、TAN ニューロンの下降性軸索は長くてもても脊髄第3セグメントにまでしか投射しておらず、PHM 運動ニューロンが位置するセグメント (第5-7セグメント) には届いていない (図 7A, 18A, B)。TAN ニューロンの下降性軸索も VBR に関与するという可能性は十分考えられるが、もしそうであっても間接的にしか PHM 運動ニューロンに接続していないだろう。

3.3.2.3. nMLF ニューロンについて

nMLF ニューロンは逃避や遊泳行動に関わることが知られている (Gahtan et al., 2002; Orger et al., 2008; Sankrithi and O'Malley, 2010; Severi et al., 2014; Thiele et al., 2014; Wang and McLean, 2014)。nMLF ニューロン光遺伝学的活性化で VBR 様行動を示した研究がある (Thiele et al., 2014)。この研究で、nMLF ニューロンによる VBR 行動は、左または右にバイアスのかかった遊泳をもたらすことで、魚は遊泳方向を変えることができること示唆していた。この遊泳中の役割の他に、本実験では、nMLF ニューロンは傾斜に応答し、遊泳を伴わない姿勢立て直しの VBR にも必要であることが明らかとなった。

傾斜刺激は、時折遊泳運動を引き起こすため、傾斜中の nMLF ニューロンの活動は、VBR だけではなく、遊泳によるものの可能性が挙げられる。しかしながら、この可能性は排除できると考えられる。なぜなら、遊泳時左右両方の nMLF ニューロン

が活動するという先行研究 (Orger et al., 2008; Thiele et al., 2014) から、仮にバイアスのかかった遊泳でも、活動のバイアスがありながらも左右の nMLF ニューロンが活動すると推測できる。また、人為的な耳石移動実験で、VBR 様の行動が引き起こされる状況においての nMLF ニューロンの活動は、片側の Ca^{2+} 反応が上昇する一方、もう片側の反応が減少するという先行研究がある (Favre-Bulle et al., 2018)。今回の私の結果はちょうどこの先行研究の結果と合致していることから、私も VBR に伴う活動をイメージしていると考えられる。さらに、今回のイメージングでは、傾斜下側の nMLF はほとんど活動を示さなかったので (図 10C)、バイアスのかかった遊泳を伴っていないと考えられる。さらに今回、急激な細胞の移動が起きた試行を排除していることから、遊泳を伴う神経細胞の活動の多くを排除できていると考えられる。

nMLF ニューロンを詳細に調べると、傾斜時に活動するニューロンの多くは細胞体が小さいことも明らかとなった (図 11A)。これは、大きな細胞体に比べて小さい細胞体のニューロンの方が、VBR 様の行動に影響を与えるという知見と一致している (Thiele et al., 2014)。さらに、小さい細胞体のニューロンは吻側脊髄あたりまでしか投射しておらず (Thiele et al., 2014)、ちょうど PHM 運動ニューロンの細胞体が位置するセグメントである (図 18A, B)。PHM 運動ニューロンと単シナプスで接続している可能性が考えられるが、nMLF ニューロンと PHM 運動ニューロンの接続様式の解明は次の課題である。

一方、MeLr や MeLc、MeLm といった大きな細胞は逃避や遊泳の際に活動すると知られている (Gahtan et al., 2002; Snkrithi and O'Malley, 2010; Wang and McLean, 2014)。このことから、低強度の運動の場合には小さいニューロンが動員されるが、だんだん高強度になるとより大きなニューロンが動員されることが考えられる。脊髄の運動ニューロンや興奮性介在ニューロンの V2a ニューロンでは、低周波数の弱い運動は小さい細胞が活動するのに対し、高周波数の強い運動には大きな細胞も活動することが知られており、これらの違いは、ニューロンの接続だけではなく、個々の細胞特性 (特に抵抗値) が関係している (McLean et al., 2007; Menelaou and McLean, 2012; Ampatzis et al., 2014)。nMLF ニューロンも、運動強度に依存して動員されるニューロン群を変化させることで、さまざまな運動への寄与を可能にしていると考えられる。

3.3.2.4. 筋肉について

傾斜上側に位置する遅筋タイプの PHM が活動した。一方、傾斜下側に位置する PHM もしばしばアーチファクトを超えるわずかなアクティビティも観察された (図 15C, D)。このことから、バイアスはかかっているが、左右ともに両収縮する試行もある。もしかしたら左右の PHM の両収縮によって腹側への屈曲がわずかに起きているのかもしれない。理論的に、単なる傾斜上側への胴体の屈曲に比べて、腹側屈曲を伴うとより大きな力のモーメントが生成されるだろう (図 23)。これは、重心が体積中心より離れて位置するようになると考えられる。しかしながら、頭部包埋条件傾斜実験では、カメラのデフォーカスは観察されなかった (図 3D) ことから、尾部の腹側への屈曲は限定的であろう。傾斜によって主に活動する側と反対側の TAN ニューロンや nMLF ニューロンも、わずかに活動する可能性があることから、私はむしろ単なる神経回路の特性上不可避なことであると推測している。

遅筋タイプの PHM 破壊魚において、VBR は完全にはなくなっておらず、姿勢偏位からの立て直しに成功している試行があった (図 17E, 20A, B)。このことから、遅筋タイプの PHM 以外の筋肉も関わりと予想できる。例えば浮き袋周辺の体幹の筋肉も候補に考えられる。実際、予備的な実験から、遅筋タイプの体幹筋でも、傾斜刺激時に活動することがあった。また、先行研究から、nMLF ニューロンの光遺伝学的活性化において、同側の PHM が大きな活動をもたらしていたが、同側側の体幹の筋肉もわずかに活動していた (Thiele et al., 2014)。傾斜で活動する小さい nMLF ニューロンは遅筋タイプの PHM だけではなく、一部の体幹の筋肉に投射する運動ニューロンにも機能的に接続しているだろう。PHM が主要な筋肉であるのは明らかであるが、複数の筋肉も協調的に収縮することによって完全な VBR が達成されていると考えられる。

4. ダイナミックな姿勢制御の神経回路の研究

4.1. 序論

大きく姿勢が乱れた際に、ステップや歩行（ヒト、図 1C, D）、羽ばたき（鳥）、または遊泳（魚、図 24A）等ダイナミックに姿勢を制御する（Harvey et al., 2019; Maki et al., 2003; Warrick et al., 2002; Zelenin et al., 2003）。ヒトでは、ダイナミックな姿勢制御はバイオメカニカルな観点や筋活動に関してはよく研究されているが（Maki and McIlroy, 1997）、ヒトをはじめとする哺乳類で、どのような神経回路によって達成されているか完全には理解されていない。この理由として、多くの関節が同調的に動くことから、神経回路が複雑であることが考えられる。また、ダイナミックな姿勢制御はロコモーションの機構をもとに、左右、前後、背腹の筋肉や屈筋伸筋等わずかに調整することで達成されるが、そのロコモーションの神経回路も未解明な部分が多い。

近年分子遺伝学の発展により、ロコモーションに関わるニューロンについての理解が大きく進んだ。発現する遺伝子の違いによって、細胞の多様性が生み出される。脊髄内においても、神経前駆細胞は背腹軸に沿っていくつかの領域に分かれ、その領域ごとに異なる転写因子が発現することで、様々なニューロンタイプに分化していく（Goulding and Pfaff, 2005; Goulding, 2009; Arber, 2012; Kiehn, 2016）。たとえば、前駆細胞の p2 ドメインの未分化な細胞の一部は、転写因子 *chx10* や *sox14* を発現し、脊髄 V2a ニューロンに分化する。V2a ニューロンはメインに軸索を同側下行性に伸ばし、運動ニューロンや他の V2a ニューロンと興奮性シナプスを形成し、ロコモーションにおいて重要な役割を担っている（Lundfald et al., 2007; Crone et al., 2008; Kimura et al., 2012; Ampatzis et al., 2014; Song et al., 2016）。これら分化したニューロン群（V2a ニューロンだけではなく、他のニューロン群も同様）の中でも、さらに転写因子の発現の違いによりタイプが細分化し、細胞特性や機能、接続性が異なるサブタイプが生み出されることが知られている（Dougherty et al., 2013; Bikoff et al., 2016; Hayashi et al., 2018; Hoang et al., 2018）。このように細胞の異種性（heterogeneity）は遺伝子によって規定されると考えられている。

魚において、ロール方向の傾斜から泳いで姿勢を立て直す際、左右、背腹の筋活動の違いにより姿勢を立て直す方向に力のモーメントがかかることで達成される

(Bagnall and McLean, 2014、図 24A, B)。それぞれの筋肉を神経支配する運動ニューロンのバイアスのかかった活動によって生み出される (Zelenin, et al., 2007; Bagnall and McLean, 2014)。ゼブラフィッシュの速い遊泳運動を伴う姿勢の立て直しにおいて、傾斜上側では、背側筋 (軸上筋) 運動ニューロンに比べて腹側筋 (軸下筋) 運動ニューロンがより活動し、反対に傾斜下側では、背側筋運動ニューロンがより活動することがわかっている。背側筋、腹側筋運動ニューロンに興奮性入力を送るニューロンの一部は、背側系・腹側系と分離しており、主に脊髄 V2a ニューロンが担うと考えられている (Bagnall and McLean, 2014; Menelaou and McLean, 2019)。しかし、背側系または腹側系の V2a ニューロンについて、傾斜時の活動やその上流ニューロンについてはわかっていない。行動を司る神経回路の全体から見ても、感覚入力から脊髄投射までの神経回路について予想されているが、脊髄内でどのような回路で引き起こされているか完全には解明されていない (図 24C)。

V2a ニューロンは、リクルートされる遊泳速度によって、fast タイプから slow タイプまで勾配状に存在しており、より速い遊泳で活動するニューロンほど、脊髄の背側に位置する傾向がある (McLean et al., 2007; McLean et al., 2008; Kimura et al., 2012)。fast タイプの V2a ニューロンの中でも、*chx10* の発現強度の違いにより、タイプ I とタイプ II の 2 種類のサブタイプに分かれ、タイプ I は背側筋・腹側筋運動ニューロンの両方に接続するのに対し、タイプ II は背側筋または腹側筋運動ニューロンのどちらか一方にしか接続しないことが知られている (Menelaou and McLean, 2019)。このことから、タイプ II V2a ニューロンが、ロール傾斜時の背側筋と腹側筋運動ニューロンの活動のバイアスのかかった活動に強く関わりとされる。背側系または腹側系の V2a ニューロンサブタイプも転写因子等の遺伝子で規定されると推測できるが、サブタイプ特異的な遺伝子についてはわかっていなかった。

今回、私は背側系と腹側系運動ニューロンの活動の差異をもたらす V2a ニューロンのサブタイプ (背側系・腹側系 V2a ニューロン) を同定し、それぞれの細胞特性や機能、上流ニューロンを調べることで、魚のダイナミックな姿勢制御機構の神経回路の解明を目的に実験を行った。まず、V2a ニューロンのサブタイプを同定するために、バルクや単一細胞の RNAseq を行うことで、それぞれ特異的な遺伝子の同定を試みた。

4.2. 結果

4.2.1. V2a ニューロンと V0v ニューロンのバルク RNAseq (断念)

まず、背側系または腹側系 V2a ニューロンサブタイプで特異的に発現する遺伝子は、他のニューロン群に比べて V2a ニューロン群での発現が多いと予想し、V2a ニューロン群と、V0v ニューロン群（脊髄内の p0 ドメインから分化する興奮性ニューロン）のバルク RNAseq を行い、遺伝子を比較した。V2a ニューロンは Tg(*sox14*:GFP) で染まり、V0v ニューロンは Tg(*evx2*:GFP) で染まる。それぞれのニューロンで GFP が発現する魚の脊髄を切り出し、細胞単離後セルソーターにかけて、GFP 陽性細胞のみを回収し（1 サンプル約 5,000 個の細胞、5 サンプルずつ）、RNAseq を行った。

図 25A に V2a と V0v ニューロンで各遺伝子の発現量の比較を載せる。マーカー遺伝子である *sox14* と *evx2* はそれぞれ V2a ニューロン、V0v ニューロンでより高く発現していた。また、V2a で発現することが知られている *chx10*、*shox2* も、V0v ニューロンより V2a ニューロンの方が発現量が高くなっていることを確認できた。V0v ニューロンに比べて V2a ニューロンで有意に高く発現する遺伝子（主に転写因子）のうち、ゼブラフィッシュのデータベース (zfin) を参考に、初期に体全体で発現しないような遺伝子を選んだ（初期に体全体で発現する遺伝子のトランスジェニック魚では、レポーター遺伝子は体全体で発現してしまう）。*bhlhe22*、*cacn1b*、*mafaa*、*sax2* の遺伝子に関してトランスジェニック魚を作成し *sox14* トランスジェニック魚と掛け合わせた。そのうち、*mafaa* 遺伝子のみが、タイプ II V2a ニューロンの一部のみを染めていた（図 25B）。電気生理的な実験で、*mafaa* 陽性 V2a ニューロンと腹側筋運動ニューロンまたは背側筋運動ニューロンとの接続を確認したが、両方に接続していた。このことから着目した 4 遺伝子は、背側系または腹側系 V2a ニューロンサブタイプで特異的に発現する遺伝子ではないと考えられる。並行して単一細胞 RNAseq を行っていたが、そちらの方が目的遺伝子を取りやすいと考え、バルク RNAseq で得られた遺伝子に関する実験は断念した。

4.2.2. トランスシナプティック的に V2a ニューロンサブタイプの標識 (断念)

背側系または腹側系 V2a ニューロン特異的な遺伝子を見つけるためには、背側系と腹側系 V2a ニューロン間の遺伝子を比較する方法が最適と考えられる。そこで背

側系と腹側系 V2a ニューロンを識別するために、トランスシナプティックウイルス (vesicular stomatitis virus, VSV) を使用した (Mundell et al., 2015)。受精後 3 日目の Tg(*sox14*:RFP)トランスジェニック魚に対し、感染すると GFP を発現する VSV-GFP を腹側筋にインジェクションし、約 1 日経過した魚を顕微鏡で観察した。

インジェクションを行った 49 匹の魚のうち、筋肉のみ GFP で染まった個体が 26 匹、運動ニューロンで GFP を発現している個体は 9 匹得られた。前運動ニューロン性のニューロンに関して、GFP 陽性の V2a 介在ニューロンは 1 匹 1 細胞のみだった (図 26A)。一方、運動ニューロンに接続する脳脊髄液接触ニューロン (cerebrospinal fluid-contacting neuron; CSF-cN) に関して、GFP 陽性細胞が存在する個体が数匹確認できた (図 26B)。この結果から、現段階で V2a ニューロンを高頻度に標識するのは非常に難しいことが明らかとなった。インジェクション後の時間を長くすれば多くの V2a ニューロンを一定割合標識である可能性があった。しかし、受精後 2 日目で既に接続ができており、受精後 5 日目には回路が機能的に働くことから、成長とともに、背側系と腹側系 V2a ニューロンを規定する遺伝子の発現も落ちると予想され、仮に RNAseq が可能であったとしても遺伝子の特定は困難になると考えられる。これらのことを踏まえて、ウイルスを用いた標識は断念した。

4.2.3. 電気生理で V2a ニューロンサブタイプ確認後細胞回収 (断念)

次に、背側系または腹側系 V2a ニューロンを電気生理学的に同定する方法を試みた。方法としては、Tg(*sox14*:tTA)トランスジェニック魚の受精卵に、tetO:Dendra2-2A-ChR cDNA をインジェクションし (Tet-off システムを使用し、ドキシサイクリンは常に投与しない)、まばらに V2a ニューロンにチャンネルロドプシンと Dendra2 を発現させた。受精後 3 日目の魚に対し、背側筋または腹側筋運動ニューロンの細胞内記録 (voltage-clamp) をとりながら、チャンネルロドプシンを発現する V2a ニューロンに対し、単一細胞レベルで青色光を照射した。図 27A, B に接続が確認できたペアの写真と電気生理のグラフを載せる。接続が確認された V2a ニューロンに対し紫色光を照射し、緑色から赤色への Dendra2 の色変換を行った (図 27C)。その後細胞を部分的に単離し、赤色の Dendra2 を持つ細胞を回収しようとした。しかし、神経突起が残る細胞を回収するとき、どうしても細胞にダメージを与えてしまい、シークエンス可能ほど

の mRNA を得ることができなかった。一方、完全に単離し回収する方法も試みたが、何万もの細胞から 1 細胞を見つけ出すのが非常に困難であり、この方法を断念した。

4.2.4 V2a ニューロンのランダムな単一細胞 RNAseq (断念)

4.2.2.や 4.2.3.で背側系または腹側系 V2a ニューロンを特定し、それを回収するのは非常に難しいことがわかった。そこでランダムに単一の V2a ニューロンを回収して RNAseq の結果を解析し、2 クラスターに分かれた場合、それが背側系・腹側系の違いを反映していると仮定して、それぞれの特異的な遺伝子を探す方法に切り替えた。過去の研究から、*chx10* の発現強度で V2a ニューロンは 2 つのサブタイプに分けられる (Menelaou and McLean, 2019)。*chx10* の発現が高いタイプ I V2a ニューロンは、軸索が下行性であり、さらに、背側筋・腹側筋運動ニューロンの両方に接続する。一方、*chx10* の発現が弱いタイプ II V2a ニューロンは軸索が分岐性であり、さらに、背側筋または腹側筋運動ニューロンへの一方しか接続しない。この先行研究を基に、私はタイプ II V2a ニューロンのランダムな細胞回収を試みた。

chx10 トランスジェニック魚の蛍光に比べて、*sox14* トランスジェニック魚の蛍光の方がより明るいので、私たちの研究室では、*sox14* トランスジェニック魚を用いている。まず、*sox14* で標識される V2a のタイプを調べるために、受精後 2 日目の Tg(*chx10*:GFP; *sox14*:RFP)魚の蛍光観察を行った。*chx10*:GFP の明るさの違いからタイプ I か II かを判断したところ、*sox14* で標識される V2a ニューロンの多くはタイプ II であった (図 28A)。

次に、*sox14* で多く標識されるタイプ II V2a ニューロンが、先行研究同様に、背側筋運動ニューロンまたは腹側筋運動ニューロンのどちらか一方にしか接続しないかを電気生理学的に調べた。受精後 2 日目の Tg(*sox14*:GFP)トランスジェニック魚に対して、推定タイプ II V2a ニューロンにルースパッチをして細胞外から電流注入し発火させた (図 28Bi)。各運動ニューロンが同一の V2a ニューロンから興奮性入力を受けるとどうかをホールセル記録 (voltage-clamp) で記録した (図 28Bii-v)。あるタイプ II V2a ニューロンは背側筋運動ニューロンには興奮性入力を送るのに対し (図 28Bii, iii)、腹側筋運動ニューロンには興奮性入力を送っていない (図 28Biv, v)。2 種類の運動ニューロンとの接続を記録できた V2a ニューロンは 1 細胞 (2 ペア) のみであったが、先行研究と合致して、背側系または腹側系 V2a ニューロンのどちらか一方で

あることを確認できた。さらに、背側筋または腹側筋運動ニューロンのどちらか一方と、推定タイプII V2aニューロンのダブルパッチを4ペアについて記録することができ、そのうち1ペアに関してのみ接続が確認された。接続割合が100%ではなかったことから、やはりタイプII V2aニューロンは、背側筋と腹側筋運動ニューロンの両方とも接続しているのではなく、背側筋または腹側筋運動ニューロンのどちらか一方にしか接続していないことが示唆された。

タイプII V2aニューロンを1細胞ずつ回収する方法を図29に示す。まず、タイプII V2aを確実に同定するために受精後2日目のTg(*sox14:Dendra2*)トランスジェニック魚に対して、推定タイプII V2aニューロンに光照射して、色変換を行った(図29A)。数時間後それぞれの細胞の形態を観察して、タイプIIの特徴である分岐性であることを確認するとともに、仮にタイプIの特徴の下行性ニューロンであった場合は、2光子レーザーで破壊し、赤色Dendra2を持つ細胞はすべてタイプII V2aニューロンという状況にした。(図29B, C)。その後、魚を単離し(図29D)、赤色のDendra2の蛍光を頼りに、ガラスピペットでタイプII V2aニューロンを1細胞ずつ回収した(図29E)。

計106個の細胞を回収したうち、48細胞に関してはcDNA合成まで進み、その内、32細胞に関してはシーケンスに成功した。32細胞の遺伝子発現をt-SNEで次元圧縮すると2つのクラスターに分かれた(図30A)。まず、Dendra2遺伝子やハウスキーピング遺伝子の*tubal1a*は、全ての細胞である程度高い発現であったのが、V2aニューロンのマーカー遺伝子(*sox14*、*chx10*)は全細胞での高い発現を確認できなかった(図30B)。このことから、マーカー遺伝子ですら、確実に遺伝子発現を定量できていないことが明らかとなった。一部の遺伝子の発現情報が欠損しているのを考慮に入れつつ、2クラスター間で顕著に発現量が異なる転写因子を探し、ゼブラフィッシュのデータベース(zfin)を参考に、初期に体全体で発現しないような遺伝子を選んだ(図30C)。*cadml1a*、*creb3l3l*、*dachd*、*lin28a*、*pou3f2b*、*scrt2*、*slit3*、*smarca*の遺伝子に関してトランスジェニック魚を作成し、*sox14*トランスジェニック魚と掛け合わせたが、どの遺伝子についてもタイプII V2aの一部を標識しているようには見受けられなかった。ポジティブコントロールであるマーカー遺伝子の高発現を確認できなかったことと、今回2クラスターに分かれたのは背側系、腹側系以外のサブタイプを示している可能性があることから、単一細胞RNAseqで得られた遺伝子に関する実験は断念した。

4.3. 考察

今回の研究で、ダイナミックな姿勢制御に関わる V2a ニューロンのサブタイプを遺伝学的に同定することを最初の目的と設定していたが、結果としてはうまくいかなかった。

運動ニューロンに接続する興奮性ニューロン (V2a ニューロン) だけではなく、抑制性ニューロンもマイルドではあるが背側系・腹側系と分離している (Bagnall and McLean, 2014)。抑制性入力の一つとして、CSF-cN (脳脊髄液接触ニューロン) が知られている。CSF-cN は体の屈曲で活性化され、腹側系運動ニューロンの一つである CaP にのみ抑制的に接続しており、その他の fast な運動に関わる運動ニューロンには接続していない (Hubbard et al., 2016)。また、この CSF-cN 欠損魚では、ロール方向への姿勢異常が見られることが知られている。一方、背側系抑制性入力のソースは、不明なままである。マウスでは、脊髄 V1 ニューロン (抑制性ニューロンの 1 種類のタイプ) でサブタイプを規定する転写因子は V2a でも発現することが知られている (Bikoff et al., 2016)。このことから、ニューロン群が異なっても、同一の転写因子の発現により、同様の細胞内特性や接続様式を示すのではないかと推測する。ゼブラフィッシュにおいても、V2a ニューロンの背側系を規定する転写因子は、抑制性ニューロンでも背側系を規定しているかもしれない。

V2a ニューロンの上流ニューロンの候補として、前庭脊髄路ニューロンが予想されている (Bagnall and Schoppik, 2018)。しかし、ゼブラフィッシュにおいて前庭脊髄路ニューロンの投射先は全くわかっていない。哺乳類での前庭脊髄路ニューロンは、脊髄内で、屈筋運動ニューロンに比べて伸筋運動ニューロンに優先的に接続することが知られている (Murray et al., 2018)。このような優先的な接続が背側系または腹側系のどちらか一方の V2a ニューロンや抑制性ニューロンに対しても存在する可能性があるかと推測する。今後下流からまたは上流からの研究により、ダイナミックな姿勢制御の神経回路の解明が期待される。

5. 全体的な考察

ゼブラフィッシュにおいて、微細な姿勢制御は網様体脊髄路ニューロンを介して引き起こされていることを私は示した。一方、ダイナミックな姿勢制御は前庭脊髄路ニューロンを介して引き起こされると推測されている (Bagnall and Schoppik, 2018) が、実際は証明されていない。もしこの仮説が正しいなら、運動のアウトプットによって、直接経路 (前庭脊髄路ニューロン) と間接経路 (網様体脊髄路ニューロン) が使い分けられていることとなり、非常に興味深い。

哺乳類において、前庭脊髄路ニューロンと網様体脊髄路ニューロンについての接続先や機能的な解析が多く研究されてきた。前庭脊髄路経路は、脊髄内の伸筋運動ニューロンに優先的に興奮的に接続し、屈筋運動ニューロンには抑制ニューロンを介して、抑制的に接続することが知られている (Markham, 1987; Basaldella et al., 2015; Murray et al., 2018)。一方、網様体脊髄路ニューロンは、屈筋運動ニューロン、伸筋運動ニューロンともに興奮的、または抑制的な効果をもたらし、関節ごとに異なる屈曲伸展を制御すると言われている (Mackinnon, 2018; Murray et al., 2018)。これらのことから、前庭脊髄路ニューロンは関節を伸展させることで、重力に逆らって、体を鉛直方向に制御するシステムに主にに関わり、網様体脊髄路ニューロンは、関節ごとの屈伸の協調をもとに、複雑な運動に寄与するのではないかと推測されている (Schepens and Drew, 2004; Mackinnon, 2018)。仮にそれが正しいなら、動員される前庭脊髄路ニューロンと網様体脊髄路ニューロンパターンを変えることで、異なる姿勢制御メカニズムを引き起こすことができるのかもしれない。哺乳類においてもゼブラフィッシュにおいても、生物には多重の姿勢制御機構が存在しており、行動ごとの回路の使い分けがどのように行われるかという問いは、神経科学の点でも進化的にも非常に面白い問いになるだろう。

6. 材料と方法

使用した動物

ゼブラフィッシュ (*Danio rerio*) 胚、仔魚、生魚は 28.5°C で、14 時間–10 時間、または、12 時間–12 時間の明暗条件で生育させた。ただし、チャンネルロドプシン、Dendra2、Kaede を発現する胚、仔魚は暗条件で生育させた。受精後 5 日以降に餌を与えた。

表 1 に今回使用したトランスジェニック魚を列挙する。すでに発表されているものは参考論文を、今回作成したトランスジェニック魚のうち、CRISPR/Cas9 システムで作成したものは、sgRNA のターゲット配列も書いた (表 1-1, 1-2)。Tg(α -*actin*:tdTomato-jGCaMP7f) は Tol2 ベースにした方法で作成した (Urasaki et al., 2006)。 α -*actin* プロモーターは Higashijima et al. (1997) と同じものを使用した。tdTomato-GCaMP7b および tdTomato-GCaMP7f のフュージョンタンパク質は Dong et al. (2017) を参考に作成した。CoChR-GFP (CoChR-GFP-Kv2.1) 配列は McRaven et al. (2020) で述べられているものを使用した。

チャンバー内での自由行動実験

行動実験は図 2B の装置を使い行った。受精後 6 日の仔魚をアクリルチャンバー (1.2mm (幅) × 50mm (長さ) × 1mm (高さ)) に移し、水槽水で満たし、魚の正面と背面側をカバーガラスで覆った。魚入りのチャンバーを、電動回転ステージ (Thorlabs, HDR50/M) に取り付けた T 字型のユニットの光路の交差する位置に置いた。魚の正面と背面からの画像を取得するために、2 ペアのレンズ (Olympus, 5×/NA 0.15) を配置した。それぞれのペアのレンズを、レンズの先端を外側になるように配置した。背面のカメラ (Teledyne FLIR, GS3-U3-236M) と正面のカメラ (Basler, ac A640-750 um) を撮像面に配置した。光源として、赤外線ライト (Mightex, SLS-0208-E) を魚の腹側に配置した。20° の傾斜刺激 (速度: 15°/s、加速、減速: 15°/s²) を右側が下となるよう、または左が下となるように与えた。2 つのカメラのフレームレートは 100 フレーム毎秒で撮影した。背面からのカメラはチャンバーの傾斜と同時に傾斜する (図 2A)。これにより、背面からの画像では、傾斜刺激中に魚の姿勢が元に戻ると、魚の斜め方向から観察される。

高粘性を用いた実験（図 3A, B）では、0.8%メチルセルロースを含む飼育水を用いた。胸鰭を切除した魚の実験（2F, G）では、受精後 5 日目（行動実験の 1 日前）の魚を 0.02% MS222（Ethyl 3-aminobenzoate methanesulfonate salt, Cat# A5040, Sigma Aldrich）で麻酔をかけ、ピンセットで両側の胸鰭を切除した。手術後に、魚を行動実験まで回復させた。浮き袋（鰾）内の空気を抜いた魚の実験（図 5）では、受精後 6 日目（行動実験の 3、4 時間前）の魚に対して麻酔をかけ、ガラスピペットを浮き袋に刺した。浮き袋の前方背側の皮膚からアクセスし、近くに存在する posterior hypaxial muscles（PHMs）を傷つけないようにした。浮き袋内の空気を体外に逃した。浮力の減少を補償するため、行動実験では、12.5% スクロースを含む飼育水を用いた。（水の密度が高くなるため、浮力を増やすことができる。）

頭部包埋条件の行動実験

受精後 6 日目の魚をアクリルチャンバー（12mm（幅）×15mm（長さ）×4mm（高さ））に移し、2%低融点アガロースに包埋した。浮き袋より尾側に位置するアガロースを取り除き、魚が尾側の体を動かせるようにした。飼育水を満たし、チャンバーの上部をカバーガラスで覆った。魚の行動を図 3C で示す装置を用いて行った。この装置は自由行動実験の装置から正面の画像を撮影する部位を除いたものと等しい。傾斜刺激は、自由行動実験と同じものを用いた。傾斜中の行動のスナップショットを示す際、最大屈曲を示した魚の画像を用いた。

TAN ニューロンの Dendra2 色換え実験

TAN ニューロンの色換え実験（図 7A）は、受精後 5 日目の Tg(*evx2*:Gal4; UAS:Dendra2)トランスジェニック魚を用いた。仔魚を MS-222 で麻酔をかけ、腹が上側となるようガラスボトムディッシュで 2%の低融点アガロースで包埋した。ディッシュを倒立顕微鏡（Leica microsystems, TCS SP8 MP）に置き、405nm レーザーを TAN ニューロンと予想されるニューロンに照射した。照射後少なくとも 3 時間放置し、色変換されたタンパク質が軸索まで輸送されるのを待ってから、共焦点顕微鏡画像を取得した。

電気穿孔実験（エレクトロポレーション）

単細胞のラベリング（図 7B, C）は以前の論文（Bhatt et al., 2004; Shimazaki et al., 2019）を参考に行った。受精後 5 日目の Tg(*evx2*:GFP)トランスジェニック魚を MS-222 で麻酔をかけた。仔魚を 3%の低融点アガロース入り細胞外液（NaCl:134 mM、KCl: 2.9 mM、CaCl₂: 2.1 mM、MgCl₂: 1.2 mM、HEPES: 10 mM、グルコース: 10 mM、290 mOsm、NaOH で pH 7.8 に調整）で包埋した。頭部を覆うアガロースを取り除き、頭部の皮膚を剥がし、TAN ニューロンより背側に位置する細胞をガラスピペットを用いて取り除いた。Dextran Tetramethyl-rhodamine (Thermo Fisher Scientific, Cat#D3308)を電気穿孔法で、GFP 陽性の細胞に取り込ませた（Shimazaki et al., 2019）。その後、少なくとも 3 時間放置し、正立の共焦点顕微鏡（Leica microsystems, TCS SP8 MP）で観察した。

Ca²⁺イメージングのセットアップ

電動回転ステージ（Thorlabs, DDR100/M）に取り付けられた対物レンズと魚が同時に傾斜した時の Ca²⁺イメージングを蛍光強度比を用いて行った（図 7F; Tanimoto et al., 2022）。青色光を魚に照射し、Ca²⁺依存的な緑色のシグナル（GCaMP または Cal-520）と赤色シグナル（tdTomato または tetramethyl-rhodamine）をイメージスプリッティング光学系（浜松ホトニクス, W-View Gemini）を用いて分割した。2 色の画像を 1 つのデジタルカメラ（浜松ホトニクス, ORCA-Flash4.0 V3）で 10 フレーム毎秒の速度で撮影した。nMLF ニューロンのイメージングには、スピニングディスク共焦点スキャナー（横河電機、CSU-X1）が光学経路に組み込んである共焦点タイプの対物レンズ傾斜顕微鏡を用いた。TAN ニューロンと PHM のイメージングでは、広視野タイプ（共焦点ではない）の対物レンズ傾斜顕微鏡を用いた。この系では、励起光（Excelitas Technologies, X-cite exacte）を落斜照明装置（オリンパス、BX-URA2、オリンパス BX-51WI のパーツ）、対物レンズを通して、魚に照射した。落射照明装置のフィルターは、励起フィルター：BP460-490（オリンパス）、ダイクロイックミラー：FF495-Di03（セムロック）、吸収フィルター：FF01-512/630（セムロック）である。蛍光シグナルはチューブレンズ（オリンパス、U-TR30-2）、カメラマウントアダプター（オリンパス、U-TV0.63XC）を通してイメージスプリッティング光学系に渡る。イメージスプリッティング光学系のフィルターは、ダイクロイックミラー：DM570（オリンパス）、

短波長（緑色）チャンネルの吸収フィルター：FF01-514/30（セムロック）、長波長（赤色）チャンネルの吸収フィルター：BA575-625（オリンパス）である。傾斜刺激は行動実験時と同様である。

Ca²⁺イメージングのためのサンプル準備

Ca²⁺イメージングは受精後6日目の仔魚で *nacre* 変異(*mitfa*^{-/-})を持っている魚を用いて行った (Lister et al., 1999)。アクリルチャンバー (12mm (幅) × 15mm (長さ) × 4mm (高さ)) 上で、仔魚を 2% 低融点アガロースに包埋した。チャンバーを飼育水で満たし、フッ素化エチレンプロピレン (FEP) シートで覆った。FEP の屈折率は 1.34 と、水の屈折率 1.33 に近い。サンプルは FEP シートを通してイメージングを行うため、TAN ニューロンと nMLF ニューロンのイメージングには魚を背が上の状態、PHM のイメージングに腹が上の状態となるよう包埋した。また、PHM のイメージングの際に、行動も同時に観察するため、尾側の体を覆うアガロースを取り除いた。

Ca²⁺イメージングの手順

魚は背が上の状態となるよう、対物レンズ傾斜顕微鏡に取り付けた。全ての画像は 10 フレーム毎秒で撮影した。TAN ニューロンのイメージング (図 7I, J) のために、Tg(*evx2:tdTomato-jGCaM7b*) トランスジェニック魚を用いた。イメージングでは 20×/NA 0.5 水浸レンズ (オリンパス、UMPLANFT) を用いた。TAN ニューロンは左右共に青色光 (サンプル面の光強度 4.3 mW/mm²) 照射し、背側からイメージングした。たまに、イメージング中に画像が急激に動くことがあり、これはアガロース内で逃避様行動を引き起こしていると考えられる。解析データからはこのような試行を排除した。

nMLF ニューロンのイメージング (図 10) のために、25% Cal-520-dextran (AAT bioquest, Cat# 20601) と 25% rhodamine-dextran を細胞外液に溶かした混合液を用いて、nMLF ニューロンを逆行的に標識した。混合液はタングステンピンを用いて、受精後 5 日目の魚の脊髄の第 2-4 セグメントに注入した。一晚回復させた後、40×/NA 0.8 水浸レンズ (オリンパス、LUMPLANFLN) を用いて共焦点型傾斜顕微鏡セットで行った (Tanimoto et al., 2022)。488 nm レーザー (COHERENT, Sapphire 488-50 CDRH) を光源とし、レーザーパワーはサンプル面では 0.3-1.5 mW/mm² で行った。

nMLF ニューロンは背側からイメージングを行った。Cal-520 の脱感作のため、各光学切片のイメージングは1回ずつしか行えなかった。

PHM のイメージング (図 15, 16) の際、魚の行動も同時に観察した (図 13C, D) 。 Ca^{2+} イメージングは魚の腹側から行い、行動は背側から行った。遅筋タイプの PHM のイメージングのために、 $\text{Tg}(smyhc2:\text{tdTomato-jGCaMP7b})$ を用い、速筋タイプの PHM のイメージングのために、 $\text{Tg}(\alpha\text{-actin}:\text{tdTomato-jGCaMP7f})$ を用いた。筋肉のイメージングの時、 $10\times/\text{NA } 0.3$ 水浸レンズ (オリンパス、UMPLANFLN) を用い、励起光の強度は遅筋タイプ、速筋タイプそれぞれ $4.2 \text{ mW}/\text{mm}^2$ 、 $5.7 \text{ mW}/\text{mm}^2$ だった。行動実験は、カメラ (Teledyne FLIR, GS3-U3-236M) 、レンズ (タムロン、M118FM50) を用い、赤外線ライト (Mightex, SLS-0208-E) を照射して 100 フレーム毎秒で撮影した。イメージング用の青色光が行動観察用の画像に入り込まないように、ロングパスフィルター (オリンパス、BA610IF) を光学経路に組み込んだ。

広視野タイプの傾斜顕微鏡の性能評価

広視野タイプの傾斜顕微鏡において、傾斜による人工的な (神経活動に依存しない) 蛍光強度比 ($\Delta R/R_0$) を調べるために、緑色と赤色の Dendra2 タンパク質を持つ魚を用いた (図 7G, H) 。 $\text{Tg}(evx2:\text{Gal4}; \text{UAS}:\text{Dendra2})$ トランスジェニック魚に対し、短時間紫色の光 (400–420 nm) を照射し、一部の緑色の Dendra2 を赤色に色変換した。20°傾斜した時の TAN ニューロンを観察すると、傾斜に由来する $\Delta R/R_0$ は ± 0.07 の範囲だった。このことから、0.07 を超える $\Delta R/R_0$ は神経活動に由来することがわかった。

PHM のイメージングにおいて、サンプルの傾斜と筋肉の収縮・移動によるアーチファクトを推定するために、遅筋タイプの PHM で Dendra2 を発現する $\text{Tg}(pitx2:\text{Dendra2})$ 魚を用いた。上記と同様に、Dendra2 の一部を光変換した。傾斜時、最大 $\Delta R/R_0$ は大抵 0.1 以内に収まり、時折 0.15 まで上昇していた (図 14) 。

TAN ニューロンの破壊実験

TAN ニューロンのレーザー破壊実験 (図 8, 19) は、受精後 5 日目の $\text{Tg}(evx2:\text{GFP})$ トランスジェニック魚を使用した。仔魚を MS-222 で麻酔し、ガラスボトムディッシュの上で腹が上となるように 1.5% 低融点アガロースで包埋した。ガラスボトムディッシュを 2 光子倒立顕微鏡 (Leica microsystems, TCS SP8 MP) に置いた。片側

にある全ての GFP 陽性細胞（おおよそ 18 個）をレーザー破壊の対象とした。細胞破壊は 2 光子レーザー（波長 900 nm、Insight DeepSee 680–1300 nm）で行い、対物レンズは 40×N.A. 1.10 レンズ（Leica microsystems、Article No. 11506352 または 11506357）を用いた。GFP 蛍光画像の短時間な閃光または透過光画像の急激な強度減少が見られたら、直ちにレーザーを停止した。細胞破壊実験後、1 日間回復させた。行動実験後に、TAN ニューロンでの GFP 蛍光の消失を確認した。たいてい 0~3 個の TAN ニューロンが残っており、GFP 陽性であった。コントロール破壊実験においても、TAN ニューロンより腹側かつ内側にある 18 個の GFP 陽性細胞をレーザー破壊の対象とした。

nMLF ニューロンの破壊実験

nMLF ニューロンを特異的に破壊（図 12）するために、光学的な逆行染色と組み合わせた（図 12B）。受精後 5 日目の Tg(*pitx2:Dendra2*)ホモ接合体のトランスジェニックの魚を用いた。まず、仔魚を 1.5% 低融点アガロースに魚の側面が上となるよう包埋し、倒立顕微鏡（Leica microsystems, TCS SP8）に置いた。対物レンズ 20×NA 0.75（Leica microsystems、Article No. 11506344）を使用し、405 nm レーザーを脊髄の第 3~9 セグメントに照射し、Dendra2 の色変換を行った。30 分ごとに 5~10 分の照射を 4 回行った。色変換後、魚をアガロースから救出し、短くとも 4 時間暗条件で保管した。その後、仔魚を再び包埋し（この時は腹が上となるように包埋）、2 光子倒立顕微鏡下で、色変換された（赤色）タンパク質を持つ片側の nMLF ニューロン（おおよそ 25 個）をレーザー破壊の対象とした。行動実験後に、nMLF ニューロンでの蛍光を確認したところ、たいてい 5 個程度の nMLF ニューロンが残っていた。コントロール破壊実験においても、nMLF ニューロンのより尾側に位置し、後脳に存在する 25 個の Dendra2 陽性細胞をレーザー破壊の対象とした。

PHM 運動ニューロンの破壊

PHM 運動ニューロンを破壊する（図 18）ために、光学的な逆行染色と組み合わせた。受精後 5 日目の Tg(*vachta:Gal4; UAS:Kaede*)トランスジェニックの魚を用いた。光学的な逆行染色やレーザー破壊は nMLF ニューロンの時と同様である。405 nm レーザーは PHM の middle、caudal セグメントに投射している軸索に照射した。2 光子

倒立顕微鏡下で、色変換された（赤色）タンパク質を持つ片側の運動ニューロン（18–25 個）をレーザー破壊の対象とした。行動実験後に、Kaede（赤色）蛍光の消失を確認した。たいてい3 個の Kaede（赤色）陽性の PHM 運動ニューロンが残っていた。コントロール破壊実験においても、PHM 運動ニューロンより背側に位置し、第5–8 セグメントの Kaede 陽性細胞（20 個）をレーザー破壊の対象とした。

前庭脊髄路ニューロンの破壊実験

前庭脊髄路（VS）ニューロンのレーザー破壊実験（図 21）は、受精後 5 日目の *Tg(nefma:GFP)* トランスジェニック魚を使用した。レーザー破壊の方法は TAN ニューロンの時と同様である。片側にある全ての GFP 陽性細胞（おおよそ 15 個）をレーザー破壊の対象とした。行動実験後に、VS ニューロンでの GFP 蛍光の消失を確認した。たいてい 3~5 個の GFP 陽性 VS ニューロンが残っていた。

光遺伝学実験

TAN ニューロンの光遺伝学的活性化実験（図 9）は受精後 6 日目の *Tg(evx2:CoChR:GFP)* トランスジェニック魚を使用した。仔魚をガラスボトムディッシュ上で背が上となるよう、2% 低融点アガロースに包埋した。尾側を覆っているアガロースを取り除き、魚が尾側の体を自由に動かせるようにした。ガラスボトムディッシュを正立顕微鏡（オリンパス、BX51WI）に置いた。20×NA0.5 水浸の対物レンズ（オリンパス、UMOLANFLN）を使用し、視野絞りカセット部分に直径 150 μm のピンホールを入れ、サンプル面で直径 50 μm の光照射ができるようにした。光源として、メタルハライドランプ（Excelitas Technologies, X-Cite exacte）を使用し、顕微鏡の励起フィルターはバンドパスフィルター（Semrock, FF02-482/18）を照射した。青色光（2.0 mW/mm²）を TAN ニューロンに 5 秒間照射した。コントロール実験として、TAN ニューロンの内側に位置する GFP 陽性細胞に照射した。魚の行動は下側から、2×NA0.14 レンズ（オリンパス、XLFLUOR）とカメラ（Teledyne FLIR, GS3-U3-236M）を使用し、50 フレーム毎秒で観察した（Kimura et al., 2013）。

免疫染色

免疫染色（図 17A, B）は Zebrafish Book (https://zfin.org/zf_info/zfbook/zfbk.html) や Doganli et al. (2016) を参考に行った。一次抗体として、S58 モノクローナル抗体（DSHB, RRID: AB_528377）を 1:10 の希釈、または F59 モノクローナル抗体（DSHB, RRID: AB_528373）を 1:20 の希釈で、二次抗体として、Alexa fluor 488-conjugated goat anti-mouse IgG（Thermo Fisher Scientific, RRID: AB_2534088）を 1:500 の希釈で使用した。

データ解析

画像データは ImageJ/Fiji を使用し、数値データはエクセルを使用して解析を行った。

頭部屈曲角度と胴体屈曲角度の測定

頭部屈曲角度は水平線と 2 つの目の上端を結んだ線のなす角度である。正面のカメラは傾斜刺激に沿って回転するので、まず、画像を逆回転して、画像の回転を相殺した。目の上端を検出するために、画像を二値化し、上端から 20 ピクセルの平均を求めた。傾斜刺激前の頭部傾斜角度が $\pm 10^\circ$ 以内の試行のみを解析に用いた。解析前に、ノイズを除くため、7 フレームの単純移動平均を適用した。

自由行動実験での胴体屈曲角度は、以下の 2 本の線のなす角度である。(1) 左右の目の中心と浮き袋の尾側先端を繋いだ線、(2) 浮き袋の尾側先端と尾の先端を繋いだ線。それぞれの点は二値化画像からそれぞれ検出した。浮き袋の尾側先端と尾の先端は、それぞれ、端から 10、20 ピクセルの平均位置である。メチルセルロースの実験では、粘性が高いため、尾側の体がまっすぐにならない。このため、尾の先端の代わりに、尾の中央の点（浮き袋の尾側先端と尾の先端間の距離を 1 としたときの、1/2 の位置）を用いて胴体屈曲角度を算出した。ノイズを除くため、7 フレームの単純移動平均を適用した。胴体を背腹方向から撮影しなければ、胴体屈曲角度を正確に測ることができない。（この状況では、背面からの画像では、魚が斜めに観察され、胴体屈曲角度の誤差が大きくなってしまう。）このため、傾斜刺激角度と頭部傾斜角度の差が 10° を超えたら、胴体屈曲角度の計測を終えた。

頭部包埋実験での胴体屈曲角度は、上記と似たように計測した。尾の先端は同様に検出した。一方、左右の目の中点と浮き袋の尾側の先端は動かないため、マニュアルで検出した。傾斜刺激前の角度を基準とし、基準角度との差を胴体屈曲角度とした。ノイズを除くため、7フレームの単純移動平均を適用した。

Ca²⁺イメージングのデータ解析

対物レンズ傾斜顕微鏡では、傾斜中画像が回転する。画像位置合わせのため、緑チャンネルと赤チャンネルの画像を逆回転した (Tanimoto et al., 2022)。そして、画像を xy 方向に位置合わせ (translation) を行うため、ImageJ プラグイン Template Matching and Slice Alignment Plugin (<https://sites.google.com/site/qingzongtseng/template-matching-ij-plugin>, Tseng, 2011) を用いた。画像の逆回転と位置合わせはバイリニア法で補完した。R₀を最初の10フレームの平均として、各ROIの $\Delta R/R_0$ をフレーム毎に計算した。ノイズを除くため、7フレームの単純移動平均を適用した。

異なる魚から計測した nMLF ニューロンの細胞体の位置をアライメントするために、正中線 (吻尾軸) と MeLm の位置 (内外軸) を基準とした。左右の MeLm が染まった場合、尾側の MeLm を基準とした。背腹軸のアライメントは、MeLr と MeM の位置を指標に行い、4つのゾーンに分けた。MeLr より背側をゾーン1、MeLr と MeM の間の背側半分をゾーン2、MeLr と MeM の間の腹側半分をゾーン3、MeM より腹側をゾーン4とした。細胞体の大きさは最大となる切片で計測した。

統計

Ca²⁺イメージングと行動実験では、1匹に対し、複数試行していた。メチルセルロースの実験は1匹に対し、1、2試行しか行えなかった。これは、繰り返し実験していくと VBR がだんだん小さくなっていくからである。(これは、遅筋タイプの PHM の収縮が減弱していくからかもしれない。) 遅筋タイプの PHM も、1匹につき、1または2試行のみしか解析していない。これは、リズムミクなバースト活動が起きた試行を排除したからである。1匹につき複数試行実験を行えた場合には、平均値を算出し、1匹の代表とした。

統計解析は R を用いて行った。統計解析は、*t* 検定、ウィルコクソン順位和検定、スティーールドワズ検定で検定した。関連2群の *t* 検定を行う際、2群間の差の値の

正規性をシャピローウィルク検定で検定した。独立2群の t 検定を行う際、正規性と標準偏差の確認で、それぞれシャピローウィルク検定と F 検定を用いて検定した。統計結果を*(p -value < 0.05)、**(p -value < 0.01)、*** (p -value < 0.001)、N.S. (not significant、 p -value \geq 0.05)、または p 値で標した。

7. 図・表

図1

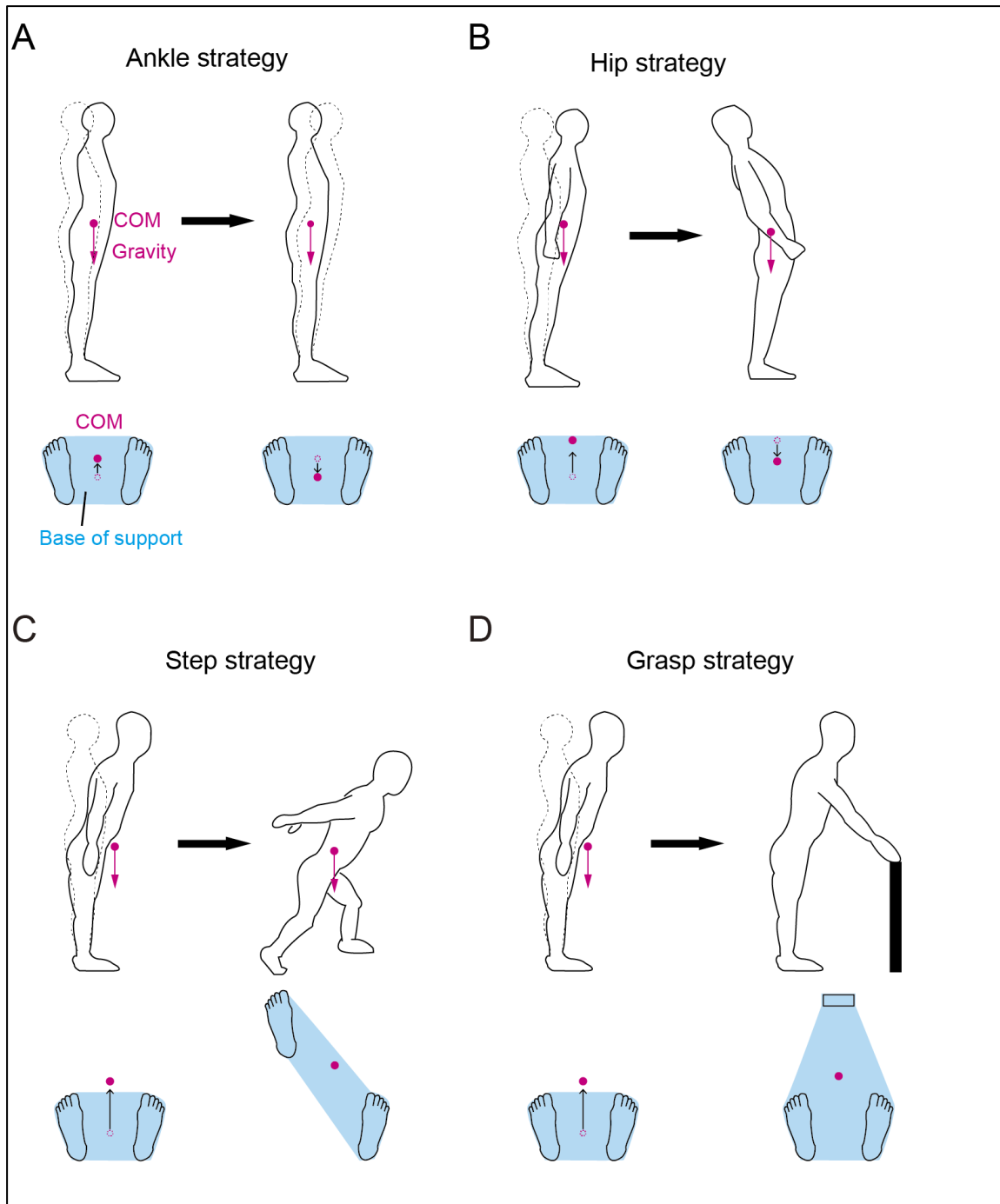


図1. 陸上生物の姿勢制御

ここではヒトの4つの姿勢制御メカニズムを示す。重力の正味の力として、重心 (Center of mass; COM) を起点に働く。支持基底面 (Base of support) は環境と接する部位を囲んだ領域である。重心の移動距離や速度に応じて様々な戦略をとり、重心が支持基底面の範囲内に居留するようにする。

Figure 2

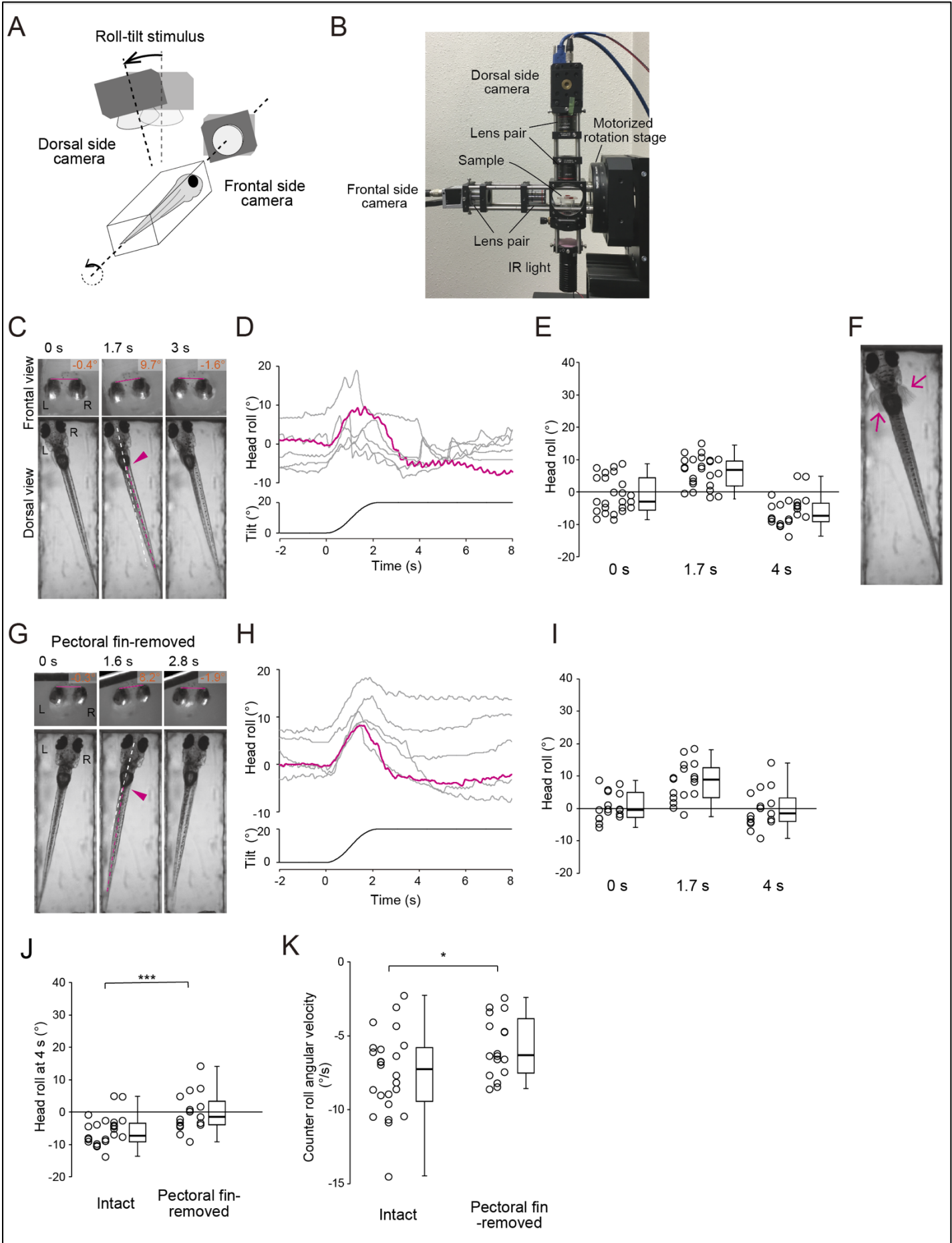


図 2. ゼブラフィッシュ仔魚はロール方向への傾斜姿勢からの立て直し時に、胴体の屈曲を伴う

(A) 行動実験の模式図。傾斜刺激に対する魚の行動を正面からと背面から撮影する。

(B) 行動実験時に使用する装置の横からの写真。

(C-F) 正常個体の行動実験

(C) 左が下になるよう傾斜した時の魚のスナップショット。正面からの画像は水平方向に反転させ、背面からの画像と左右が合うようにした。正面の画像の線は2つの目の上端をつないだ線である。その線と水平線のなす角を頭部傾斜角度とし、上に示す。背面からの画像において、白い波線は体の前方の正中線を示し、マゼンタの波線は浮き袋の尾側の端と尾の先端を繋いだ線である。矢尻は、かすかに胴体が屈曲していることを示す。傾斜刺激後、魚が姿勢を立て直すと、背側からの画像では、魚の斜めからの画像になる。

(D) 傾斜刺激に対する頭部屈曲角度の時間経過。1匹からの6試行を示す。マゼンタの線は、(C)の試行に対応する。

(E) 全ての試行の0秒、1.7秒、4秒の時点の頭部屈曲角度。5匹24試行を示す。同一個体からの試行は同一鉛直上に並べた。右側に箱ひげ図を示す。箱ひげ図は、第一四分位数と第三四分位数間（四分位範囲）を箱で示し中央値を太い線で示す。最小値から、第一四分位まで、最大値から第三四分位までの範囲で、かつ四分位範囲の1.5倍の範囲内のものをひげで示す。

(F) 0秒~2秒の間の背側からの画像の最小投影画像。矢印は胸鰭の運動を示す。

(G-I) 胸鰭を取り除いた魚の行動実験

(G) 胸鰭を取り除いた魚のスナップショット。

(H) 頭部屈曲角度の時間経過。1匹からの6試行を示す。

(I) 全ての試行の0秒、1.7秒、4秒の時点の頭部屈曲角度。3匹17試行を示す。

(J) 正常な魚と胸鰭を切除した魚の4秒時点の頭部屈曲角度の比較。 $p = 0.0005$ （ウィルコクソン順位和検定）

(K) 正常な魚と胸鰭を切除した魚の反ロール運動時の角速度。反ロール運動が顕著に観察される時間の幅（頭部傾斜角度が最大になった時点から1.5秒間）の角速度を示す。

$p = 0.04$ （ウィルコクソン順位和検定）

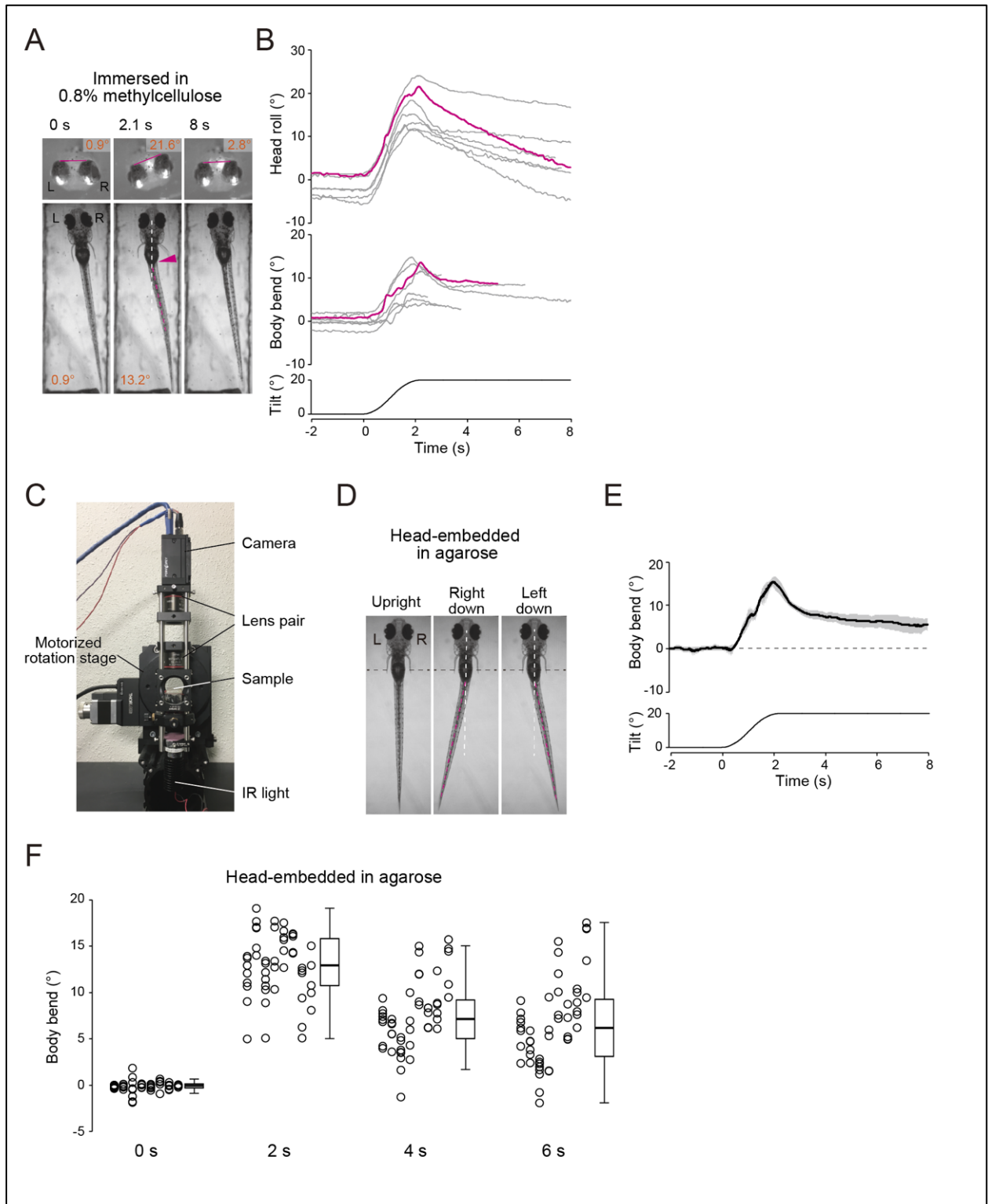


図3 傾斜姿勢からの立て直しがすぐにできない条件では、胴体の屈曲が顕著に観察される

- (A) メチルセルロース溶液に浸した魚のスナップショット。背面からの画像において、2本の波線のなす角を胴体屈曲角度とし、下に示す。
- (B) メチルセルロース溶液に浸した魚における傾斜刺激に対する頭部傾斜角度と胴体屈曲角度。5匹7試行を示す。マゼンタの線は(A)と同一試行である。
- (C) 頭部包埋実験時に使用する装置の前からの写真。
- (D) 傾斜刺激に対する魚の行動のスナップショット。傾斜時の画像では、最大屈曲を示したときの画像を示す。
- (E) 傾斜刺激に対する胴体屈曲角度の時間経過。1匹、5試行の平均と標準偏差をそれぞれ黒色の線と灰色で示している。
- (F) 頭部包埋実験での全ての試行の0秒、2秒、4秒、6秒の時点の胴体屈曲角度を示す。箱ひげ図を右側に示す。

図 4

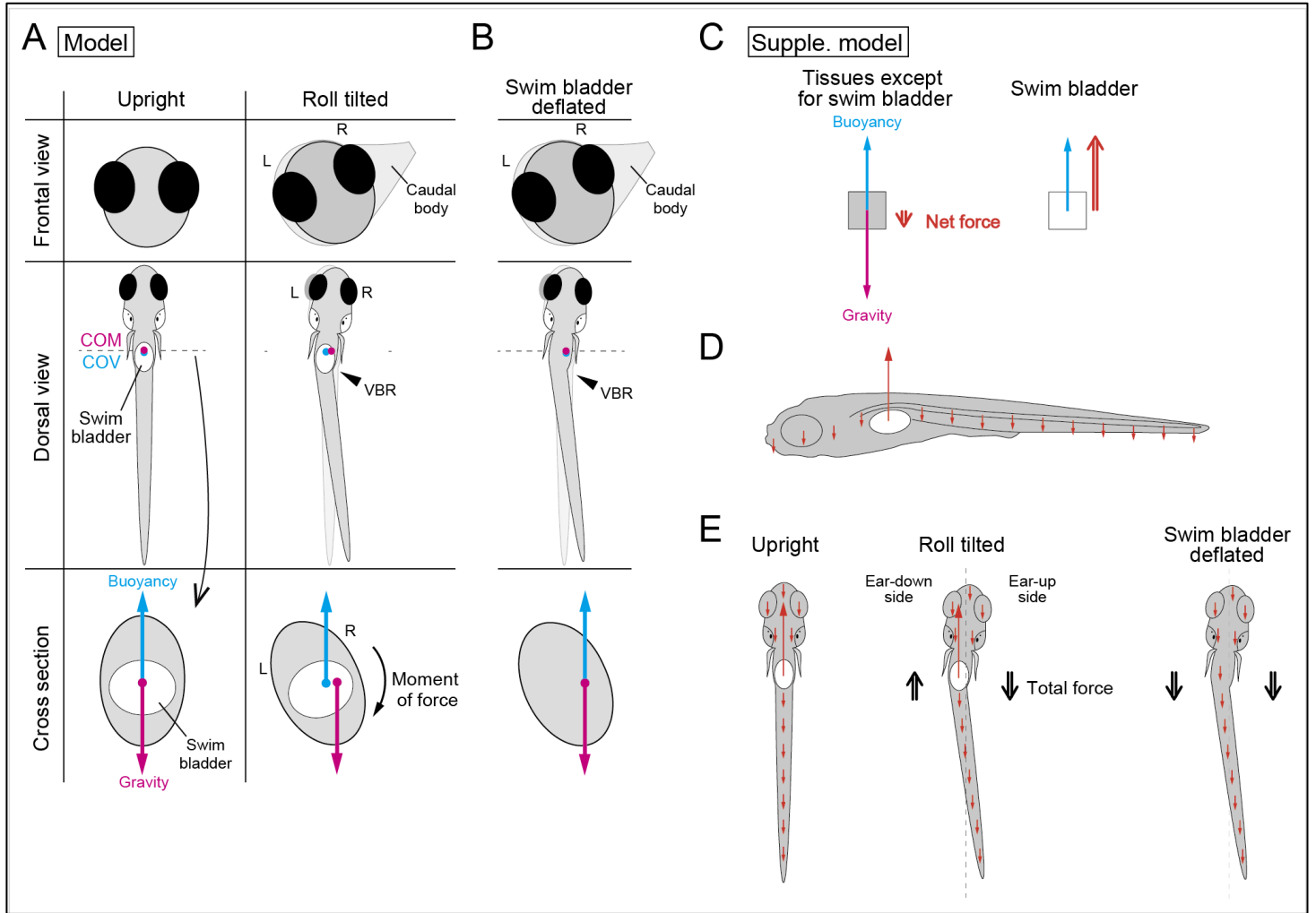


図 4 胴体の屈曲により傾斜姿勢から立て直すモデル

(A, B) VBR により傾斜姿勢から立て直すモデル。重力と浮力を魚全体で 1 つずつの力として考えたモデル。

(A)正面からと背面からの図と浮き袋近くでの断面図を示す。重力 (Gravity) と浮力 (Buoyancy) はそれぞれ重心 (Center of mass, COM) と体積中心 (Center of volume, COV) にかかる。重心と体積中心は浮き袋近くに位置し、重心は体積中心に比べてわずかに前側に位置している (Ehrlich and Schoppik, 2017)。背腹軸方向には重心と体積中心は一致していると仮定した。(左) 重心と体積中心は正中線に位置する。(右) 傾斜時、VBR を行うことで、頭部と尾側の体は傾斜上側に、浮き袋周辺の体は傾斜下側に移動する (上と中の図)。断面図において、重心と体積中心は傾斜上側に移動する。浮き袋の密度がその他の部分に比べて極めて低いので、重心は体積中心に比べて、さらに傾斜上側に移動する。これによって重力と浮力がずれることで、姿勢を立て直す方向に力のモーメントがかかる。

(B) 浮き袋内の空気を抜いた魚のモデル。VBR を引き起こしても、重心と体積中心は同一軸上に位置する。このことで、重力と浮力が同じ鉛直軸上にかかることから、力のモーメントは発生せず、立て直すことができない。

(C-E) 微小体積ごとに重力と浮力の合力を考えるモデル。このモデルは(A, B)のモデルと本質的には同一である。

(C) 浮き袋とそれ以外の組織において、重力と浮力の合力を考えた。浮き袋を除く組織では、重力の大きさが浮力の大きさに比べてわずかに大きいため、合力はわずかに下向きの力になる。浮き袋では、重力はほぼ0で、浮力のみしか働かないため、合力は浮力にほぼ等しい。

(D) 魚の各部位における重力と浮力の合力。浮き袋以外の組織では、わずかな下向きの力が働くのに対し、浮き袋では、圧倒的な大きさの上向きの力が働く。

(E) 各姿勢時の各部位の合力。上向きの矢印は鉛直上側、下側の矢印は鉛直下側の力を示す。(左) 正常個体の背が上の姿勢では、左右対称な力が働く。(中) VBR を行うことで、頭部と尾側の体は傾斜上側に、浮き袋周辺の体は傾斜下側に移動する。傾斜上側では、合力の合計として、わずかな下向きの力が働くのに対し、傾斜下側では合力の合計として上向きの力が働く。これにより、姿勢を立て直す方向に力のモーメントがかかる。(右) 浮き袋内の気体がない魚が傾斜姿勢をとると、傾斜上側、下側に問わず一様な下向きの力を受けるので、姿勢を立て直すことができない。

図 5

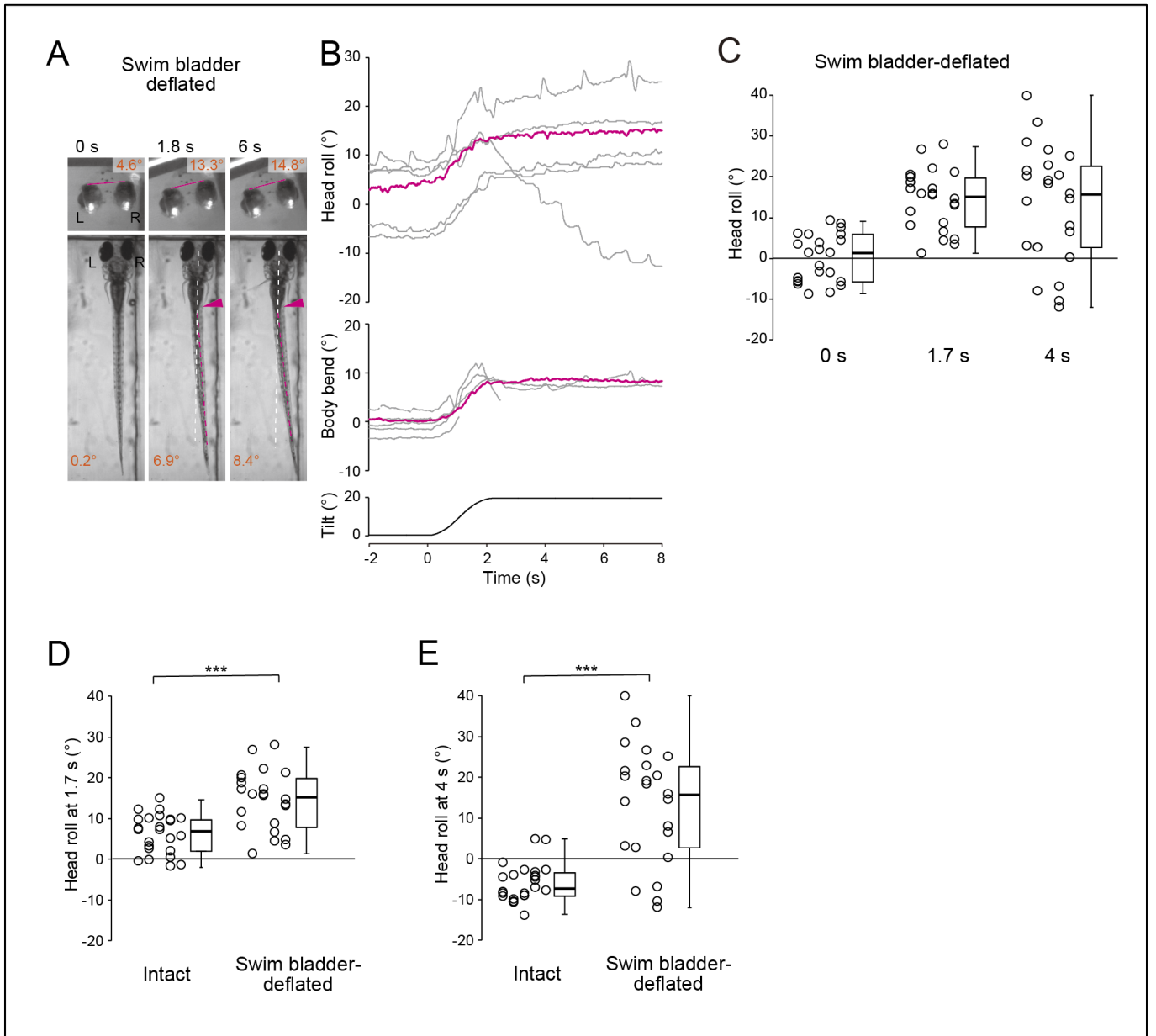


図 5 浮き袋内の空気を抜いた魚での行動実験

(A) 浮き袋内の空気を抜いた魚の傾斜刺激に対する行動のスナップショット。

(B) 浮き袋内の空気を抜いた魚の頭部傾斜角度と胴体屈曲角度の時間経過。1匹からの6試行を示す。マゼンタの線は(C)と同一試行を示す

(C) 浮き袋内の空気を抜いた魚の全ての試行の0秒、1.7秒、4秒の時点の頭部屈曲角度(5匹23試行)。右側に箱ひげ図を示す。

(D, E) 正常な個体と浮き袋内の空気を抜いた魚の1.7秒(D, $p = 0.0002$)、4秒(E, $p = 4.8 \times 10^{-6}$)の時点の頭部屈曲角度の比較。それぞれウィルコクソン順位和検定

図 6

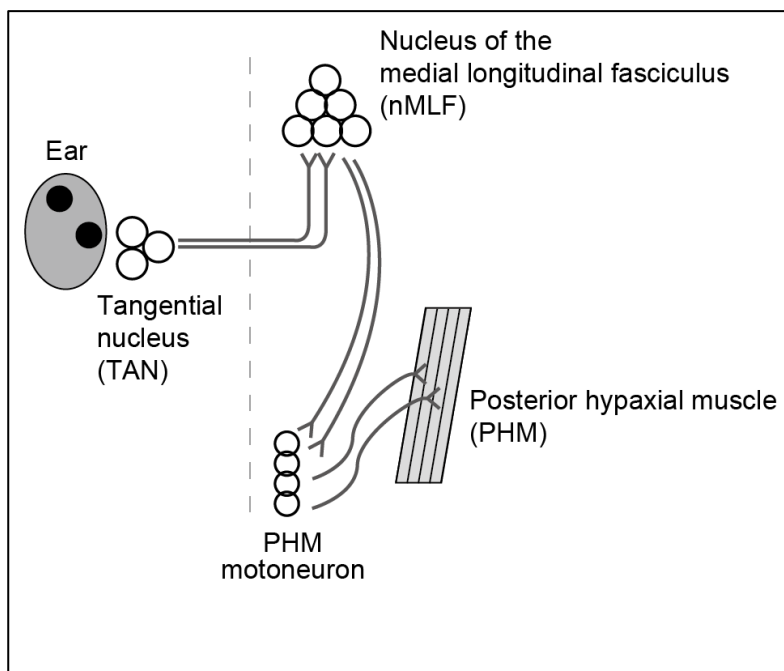


図 6 VBR を司る神経回路の仮説

前庭情報は tangential nucleus のニューロン (TAN ニューロン) を活性化する。TAN ニューロンは反対側の nucleus of the medial longitudinal fasciculus のニューロン (nMLF ニューロン) に接続する。nMLF ニューロンの軸索は脊髄に投射し、posterior hypaxial muscles (PHM) を支配する運動ニューロンに接続する。画像の上側は吻側であり、波線は正中線を示す。

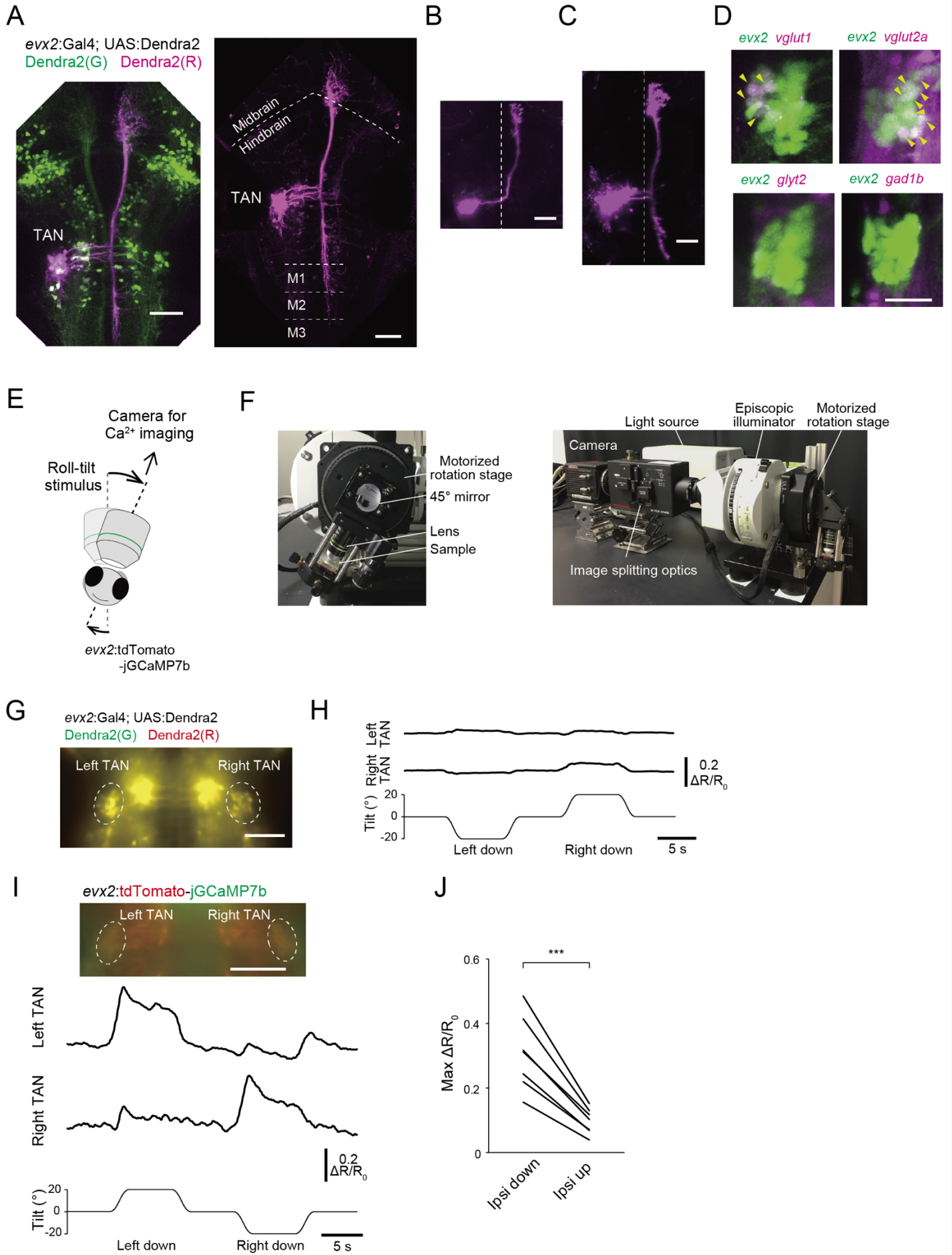


図7 TANニューロンの特質とTANニューロンのCa²⁺イメージング

(A) 受精後5日目のTg(*evx2:Gal4; UAS:Dendra2*)魚を用いたTANニューロンの色換え実験。共焦点顕微鏡画像のスタック画像(最大投影像)を示す。画像上側は吻側、左側は魚の左側を示す。(左)Dendra2(緑)とDendra2(赤)蛍光像を重ね合わせた画像を示す。(右)Dendra2(赤)蛍光像のみを示す。M1~M3はそれぞれ脊髄の第1~3セグメントを示す。

(B, C) エレクトロポレーションによる単一細胞の形態。波線は正中線を示す。(B)上行性軸索をもつTANニューロン、(C)分岐性軸索をもつTANニューロン

(D) *evx2*陽性TANニューロンの神経伝達物質の特性。Tg(*evx2:GFP*)個体を、以下の神経伝達物質特異的マーカー遺伝子下でRFPを発現する魚と掛け合わせた。

Tg(*vglut1:RFP*)、Tg(*vglut2a:RFP*)、Tg(*glyt2:RFP*)、Tg(*gad1b:RFP*)。 *vglut1*と*vglut2a*はグルタミン酸作動性のニューロン(興奮性ニューロン)のマーカーであり、*glyt2*はグリシン作動性ニューロン(抑制性ニューロン)のマーカー、*gad1b*はGABA作動性ニューロン(抑制性ニューロン)のマーカーである。黄色の矢頭は蛍光の重なりを示す。

(E) TANニューロンのイメージング実験の模式図。アガロースに包埋した魚を対物レンズ傾斜顕微鏡でイメージングした。

(F) 正面からと横からみた広視野タイプ(共焦点でないタイプ)の対物レンズ傾斜顕微鏡の写真。

(G) Tg(*evx2:Gal4; UAS:Dendra2*)魚を用いて、一部のDendra2を色換えした後の画像である。緑色と赤色のチャンネルを重ねた。

(H) 神経活動に由来しない場合の $\Delta R/R_0$ の時間経過。緑色と赤色のDendra2をもつ魚を傾斜して、傾斜時のアーティファクトを計測した。

(I) Tg(*evx2:tdTomato-jGCaMP7b*)魚の画像と、左右のTANニューロンの傾斜刺激に対する $\Delta R/R_0$ の時間経過。

(J) 同側が下側になったときと上側になったときの最大 $\Delta R/R_0$ の比較。1匹あたり4~6試行を行い、その平均値を1匹の代表値とし、計7匹行った。 $p = 0.0003$ (関連2群の t 検定)

スケールバー：(A, B, C, G, I) 50 μm 、(D) 20 μm

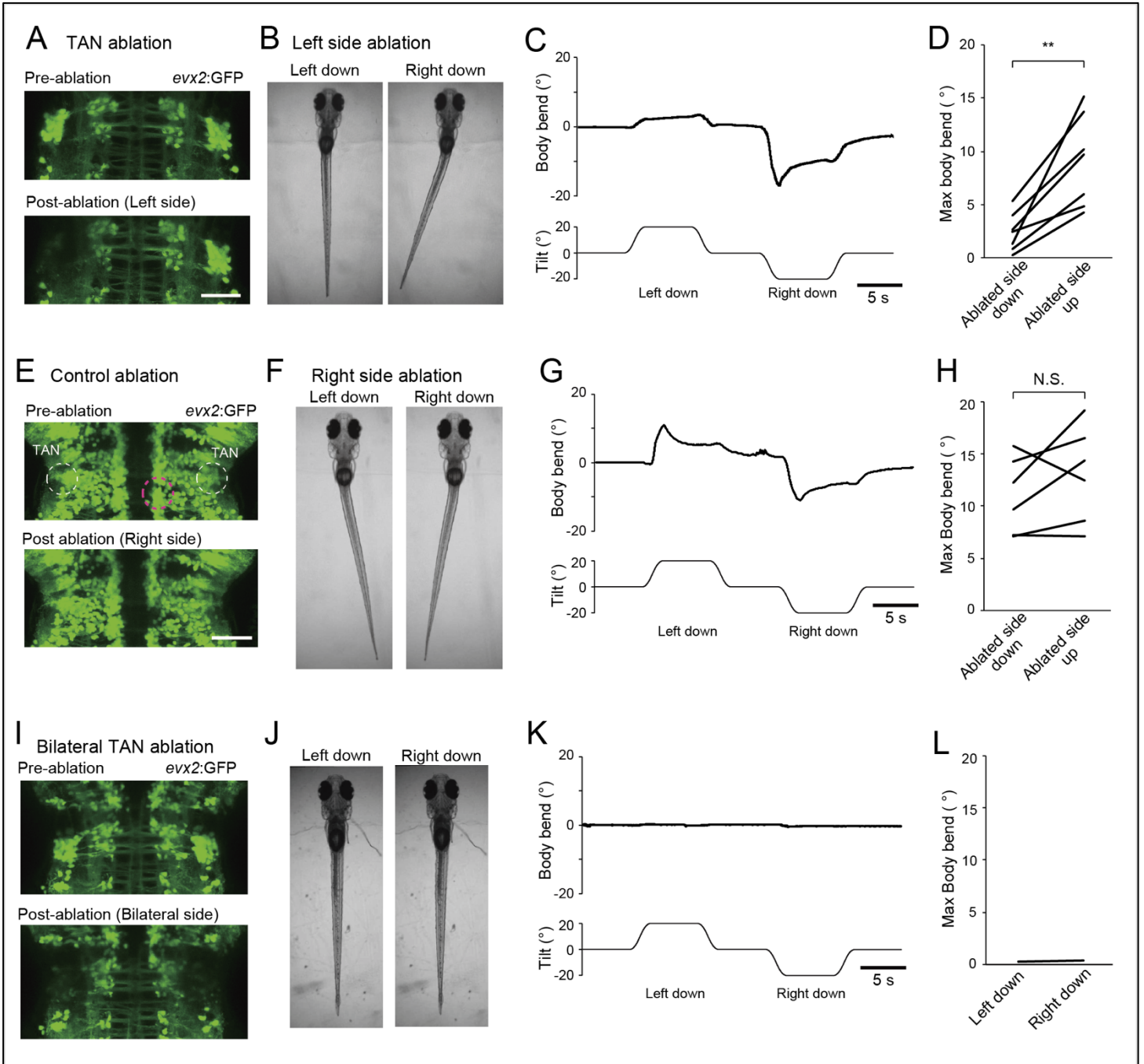


図8 TANニューロン破壊

(A~D) 片側の TAN ニューロンのレーザー破壊実験

(A) レーザー破壊前後の Tg(*evx2*:GFP)魚の共焦点スタック画像。

(B) 頭部包埋条件での傾斜時の行動。

(C) 傾斜刺激に対する胴部屈曲角度の時間経過。(B)と同一試行を示す。

(D) 破壊した側が下側になったときと上側になったときの胴部屈曲角度の最大値の比較。7 個体のうち、3 匹は左側の破壊で、4 匹は右側の破壊である。1 匹あたり 2 試行を行い、その平均値を 1 匹の代表値とした。 $p=0.003$ (関連 2 群の t 検定)

(E~H) コントロール実験

(E) レーザー破壊前後の Tg(*evx2*:GFP)魚の共焦点スタック画像。赤色の波線で示す領域がターゲット領域である。

(F) 頭部包埋条件での傾斜時の行動。

(G) 傾斜刺激に対する胴部屈曲角度の時間経過。(F)と同一試行を示す。

(H) 破壊した側が下側になったときと上側になったときの胴部屈曲角度の最大値の比較。6 個体のうち、3 匹は左側の破壊で、4 匹は右側の破壊である。1 匹あたり 4 試行を行い、その平均値を 1 匹の代表値とした。 $p=0.23$ (関連 2 群の t 検定)

(I~L) 両側の TAN ニューロンのレーザー破壊実験

(I) レーザー破壊前後の Tg(*evx2*:GFP)魚の共焦点スタック画像。

(J) 頭部包埋条件での傾斜時の行動。

(K) 傾斜刺激に対する胴部屈曲角度の時間経過。(J)と同一試行を示す。

(L) 左側が下側になったときと右側が下側になったときの胴部屈曲角度の最大値の比較。4 試行を行い、その平均値を代表値とした。

スケールバー：50 μm

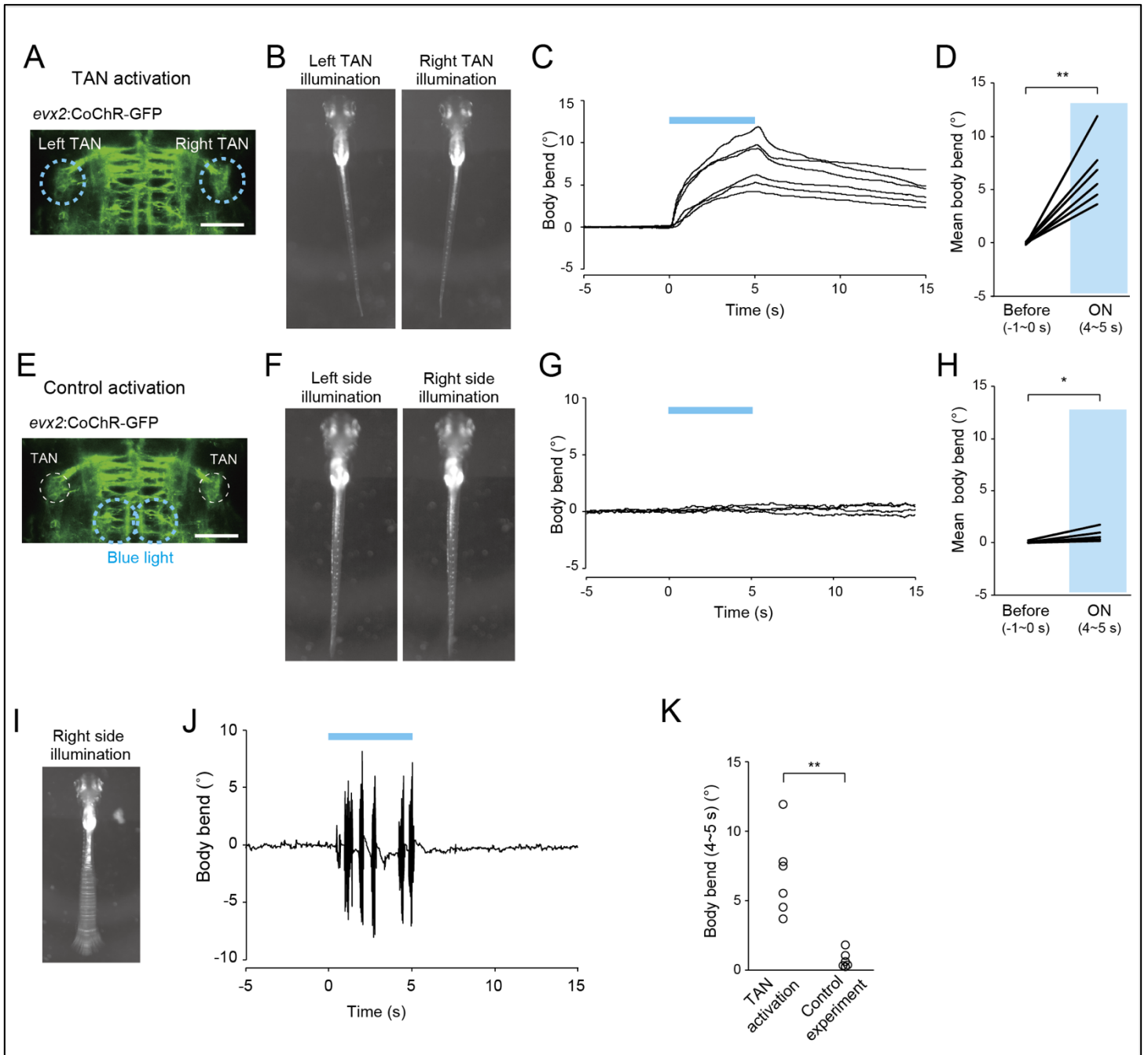


図9 TANニューロンの光遺伝学活性化

(A~D) TANニューロンの光遺伝学活性化

(A) Tg(*evx2:CoChR-GFP*)魚の共焦点スタック画像。青色光の波線で示す領域が光照射のターゲット領域である。

(B) 頭部包埋条件での活性化時の行動。

(C) 胴部屈曲角度の時間経過。縦軸の正は光照射と反対側への屈曲を示す。青線は5秒間の光照射を示す。それぞれの線は1試行を示す。

(D) 照射前 (-1-0 秒) と照射中 (4-5 秒) の平均屈曲角度の平均の比較。1匹あたり2~6試行行い、その平均値を1匹の代表値とし、計6匹行った。 $p = 0.002$ (関連2群の t 検定)

(E~J) 光遺伝学活性化のコントロール実験

(E) Tg(*evx2:CoChR-GFP*)魚の共焦点スタック画像。青色光の波線で示す領域が光照射のターゲット領域である。

(F) 頭部包埋条件での活性化時の行動。

(G) 胴部屈曲角度の時間経過。縦軸の正は光照射と反対側への屈曲を示す。

(H) 照射前 (-1-0 秒) と照射中 (4-5 秒) の平均屈曲角度の平均の比較。1匹あたり4~6試行行い、その平均値を1匹の代表値とし、計6匹行った。 $p = 0.02$ (関連2群の t 検定)

(I) コントロール実験時の遊泳運動。青色照射中の画像の最大投影像を示す。

(J) 胴部屈曲角度の時間経過。(I)と同一試行を示す。

(K) TANニューロンの光遺伝学活性化とコントロール実験時の胴部屈曲角度の比較。

(D)と(H)の照射時の胴部屈曲角度の比較した(各条件6個体ずつ、照射開始後4-5秒後の胴体屈曲角度の平均値を示す)。 $p = 0.004$ (独立2群の t 検定)

スケールバー：50 μm

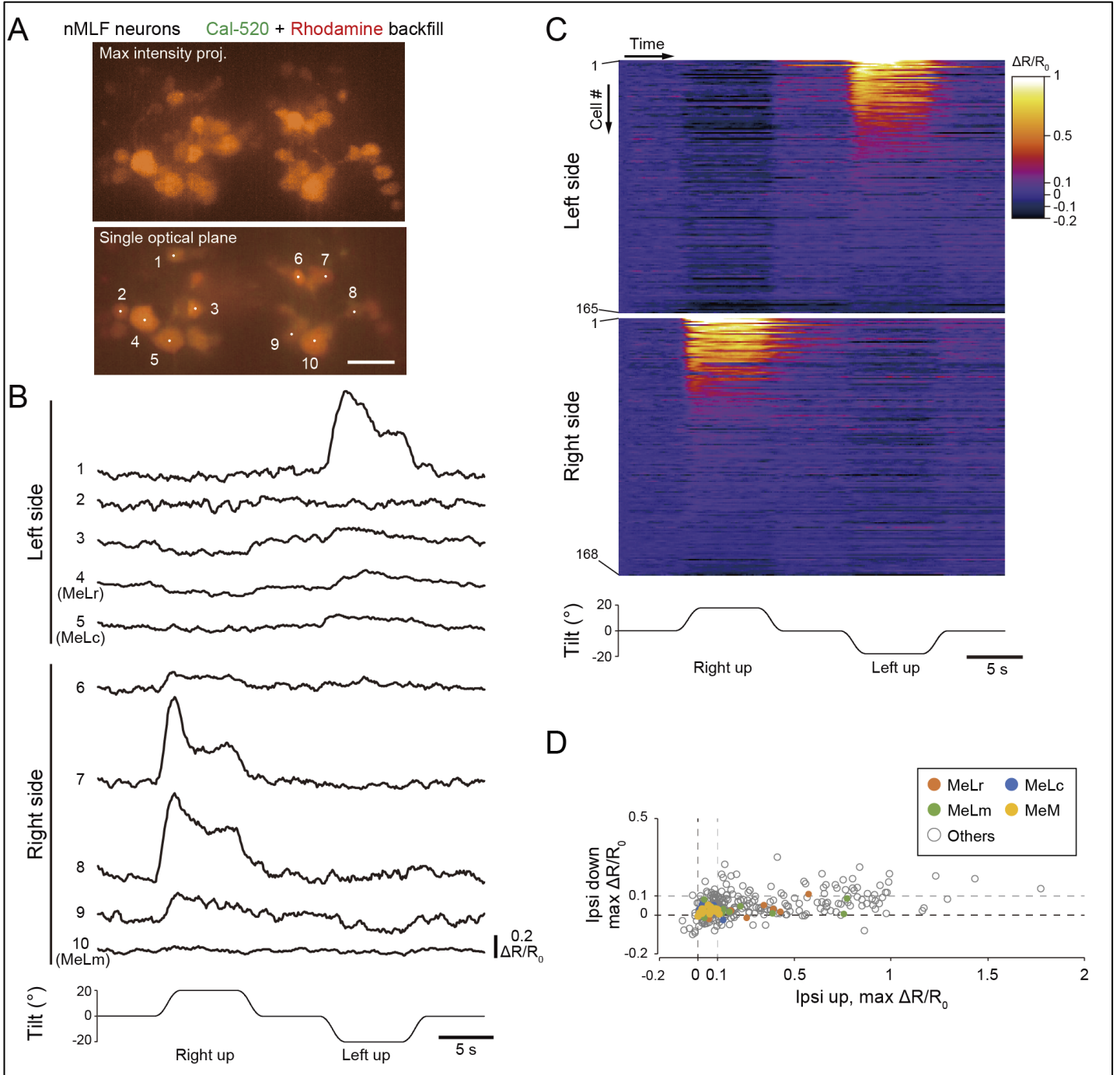


図 10 nMLF ニューロンの Ca^{2+} イメージング

- (A) Ca^{2+} 指示薬の Cal-520 と rhodamine-dextran で逆行的に nMLF ニューロンを標識したときの、共焦点スタック画像と単一光学切片の画像。スケールバー：20 μm
- (B) 各ニューロンの傾斜刺激に対する $\Delta\text{R}/\text{R}_0$ の時間経過。ニューロンの番号は(A)の番号のニューロンと同一である。
- (C) 記録したすべてのニューロン（左側 165 個、右側 168 個、計 333 個）の傾斜刺激に対する $\Delta\text{R}/\text{R}_0$ の時間経過の擬似カラー表示。ニューロンは同側が上側となるよう傾斜したときの $\Delta\text{R}/\text{R}_0$ の最大値が高い順に並べた。
- (D) 各ニューロンの同側が下側になったときと上側になったときの最大 $\Delta\text{R}/\text{R}_0$ の比較。黒色と灰色の波線はそれぞれ、 $\Delta\text{R}/\text{R}_0$ が 0、0.1 の部分を示す。 $\Delta\text{R}/\text{R}_0$ が 0.1 を超えたものは活動したとみなした。 $p = 2.2 \times 10^{-16}$ （ウィルコクソン順位和検定）

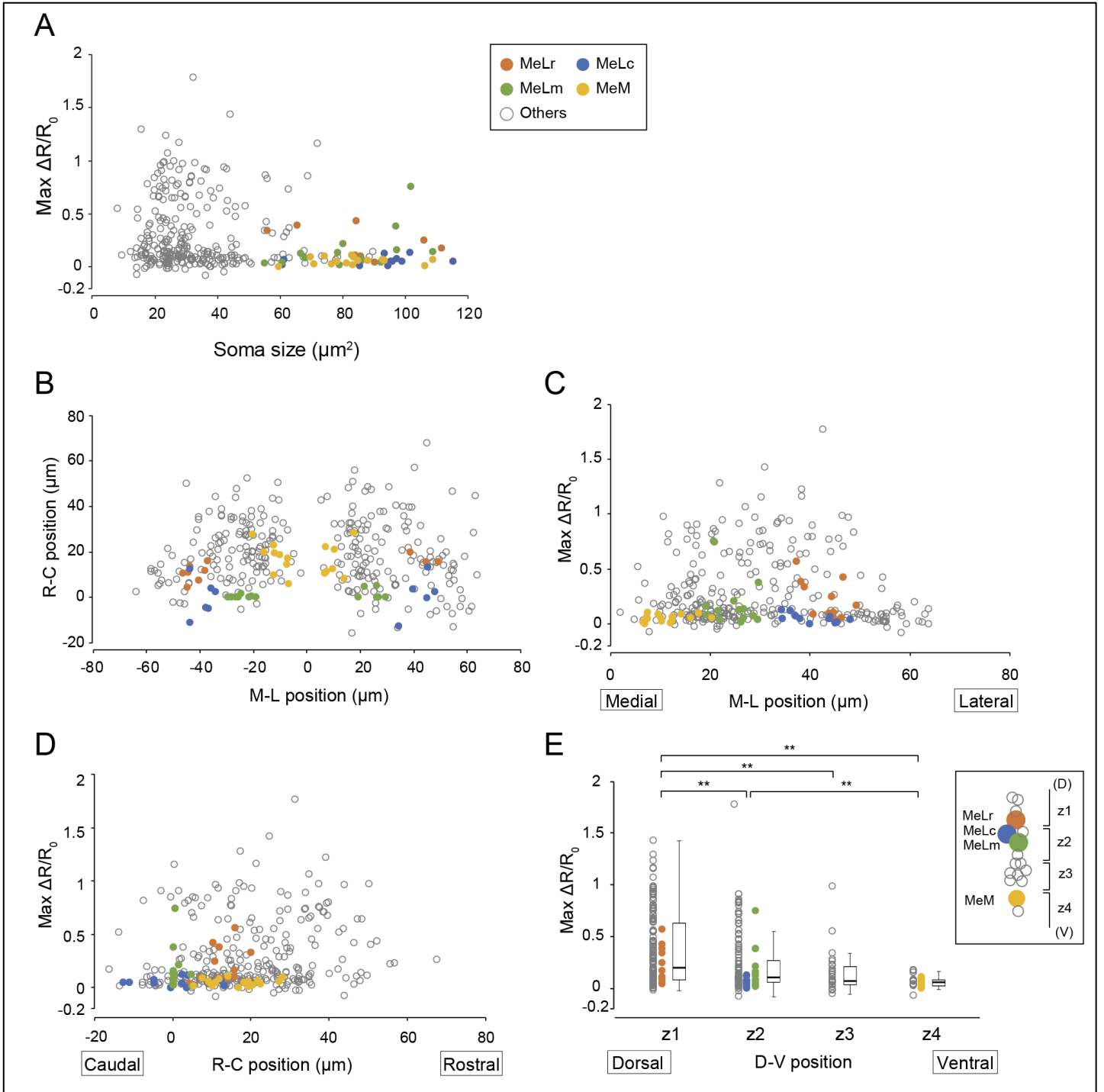


図 11 nMLF ニューロンのイメージングの詳細な解析

計測したすべてのニューロン（10 匹から 333 個）について、細胞体の位置や大きさと同側が上側になったときの最大 $\Delta R/R_0$ との比較。

(A) 細胞体の大きさと同側が上側になったときの $\Delta R/R_0$ の最大値との比較。

(B) 内外軸と前後軸に関して標準化した後の細胞体の位置。正中線と MeLm を指標に標準化を行った。

(C, D) 同側が上側になったときの $\Delta R/R_0$ の最大値と細胞体の内外軸に対する位置(C)、前後軸に対する位置(D)との比較。

(E) 同側が上側になったときの $\Delta R/R_0$ の最大値と細胞体の背腹軸に対する位置の比較。

背腹軸は MeLr と MeM を指標に 4 つの相対位置に分けた。z1 vs. z2: $p = 0.0074$ 、z1 vs. z3: $p = 0.0073$ 、z1 vs. z4: $p = 1 \times 10^{-6}$ 、z2 vs. z3: $p = 0.43$ 、z2 vs. z4: $p = 0.0011$ 、z3 vs. z4: $p = 0.50$ (スティーールドワズ 検定)

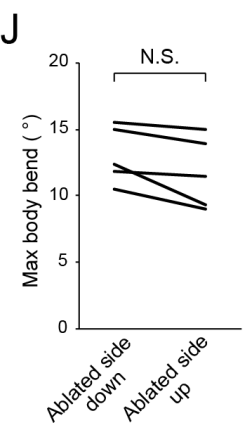
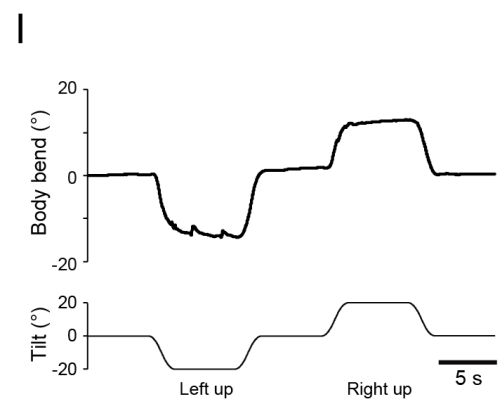
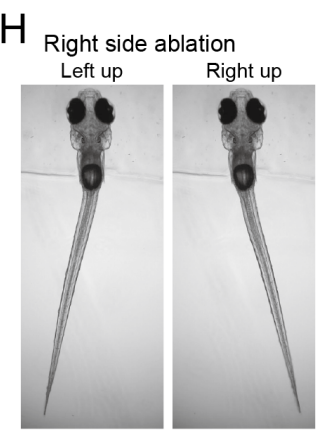
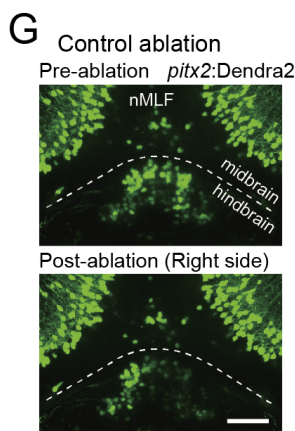
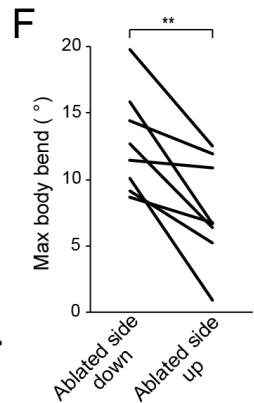
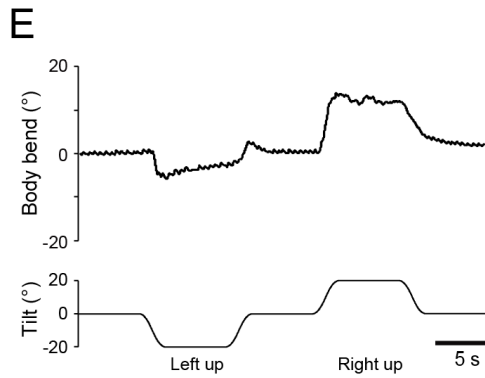
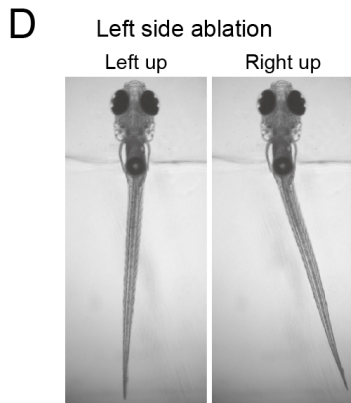
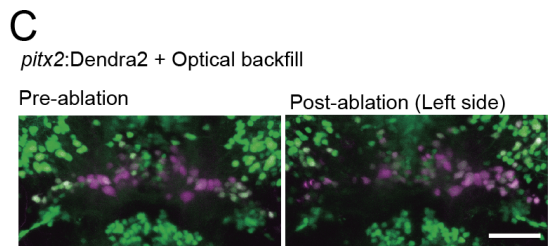
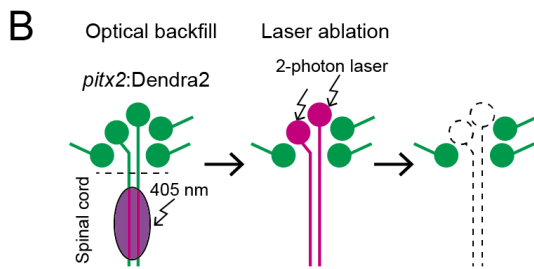
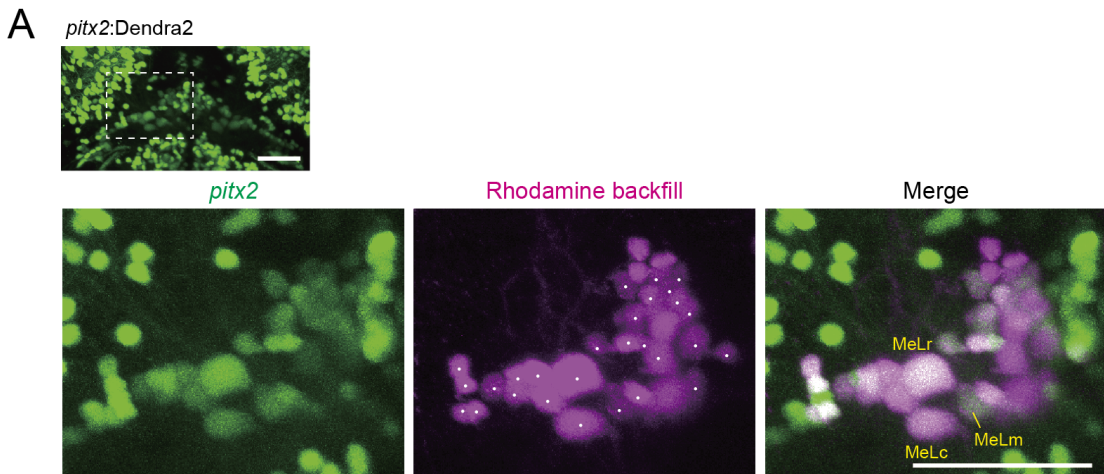


図 12 nMLF ニューロン破壊実験

(A) Tg(*pitx2:Dendra2*)魚に対し rhodamine dextran を逆行的染色した魚の共焦点スタック画像。(上) Dendra2 のみの画像、(下) 上の画像の波線で囲われた部分の拡大画像。各チャンネルと重ね合わせ画像を示す。中の画像の点は Dendra2 陽性の rhodamine で標識された nMLF ニューロンを示す。

(B) nMLF ニューロンを特異的に破壊する実験の模式図。

(C~F) 片側の nMLF ニューロンのレーザー破壊実験

(C) レーザー破壊前後の魚の共焦点スタック画像。マゼンタで示す細胞 (赤色の Dendra2 蛍光を持つ細胞) を破壊した。

(D) 頭部包埋条件での傾斜時の行動。

(E) 傾斜刺激に対する胴部屈曲角度の時間経過。(D)と同一試行を示す。

(F) 破壊した側が下側になったときと上側になったときの胴部屈曲角度の最大値のの比較。8 個体のうち、4 匹は左側の破壊で、4 匹は右側の破壊である。1 匹あたり最低 5 試行行い、その平均値を 1 匹の代表値とした。 $p = 0.003$ (関連 2 群の t 検定)

(G~J) コントロール実験

(G) Tg(*pitx2:Dendra2*)魚のレーザー破壊前後の魚の共焦点スタック画像を示す。コントロールとして、後脳のニューロンの片側を破壊した。波線は中脳と後脳の境界線を示す。

(H) 頭部包埋条件での傾斜時の行動。

(I) 傾斜刺激に対する胴部屈曲角度の時間経過。(H)と同一試行を示す。

(J) 破壊した側が下側になったときと上側になったときの胴部屈曲角度の最大値の比較。5 個体のうち、2 匹は左側の破壊で、3 匹は右側の破壊である。1 匹あたり 6~8 試行行い、その平均値を 1 匹の代表値とした。 $p = 0.05$ (関連 2 群の t 検定)

スケールバー : 50 μm

図13

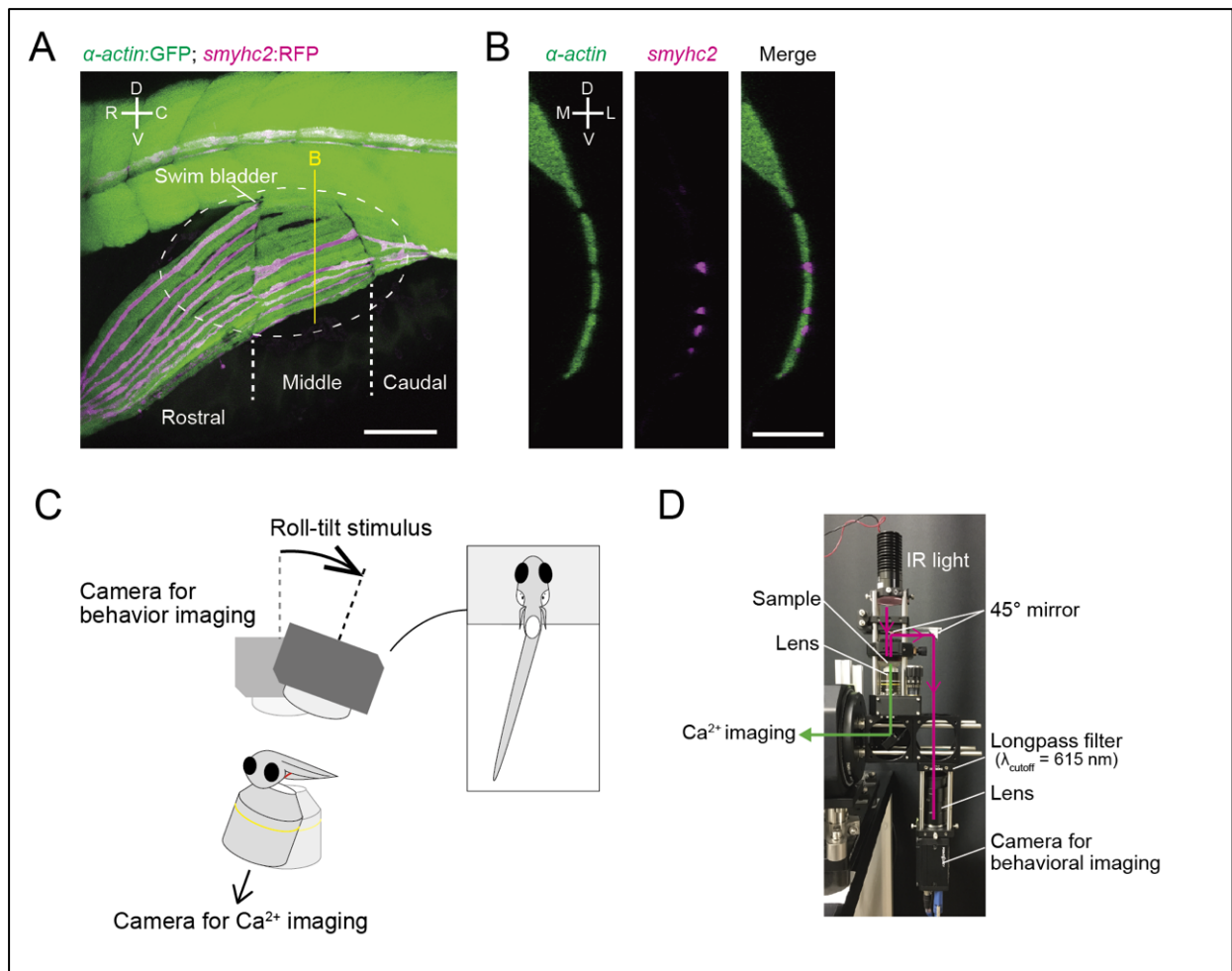


図13 PHMの特徴とPHMのCa²⁺イメージングの方法

(A) Tg(*α-actin*:GFP; *smyhc2*:loxP-RFP-loxP-DTA)魚の、横から観察した共焦点スタック画像。PHMは3つのセグメント(rostral、middle、caudal)で構成されている。白色の波線で囲まれた部分は、浮き袋の位置を示す。

(B) (A)で黄色い線で示された部分の断面図。

(C) PHMのCa²⁺イメージングと行動観察を同時計測の模式図。Ca²⁺イメージングは魚の腹側、行動観察は背側から行う。

(D) PHMのCa²⁺イメージングと行動観察を同時に行う装置の横からの写真。Ca²⁺イメージングと行動観察の光路を、それぞれ緑色とマゼンタで示している。

スケールバー：(A) 100 μm, (B) 50 μm

図 14

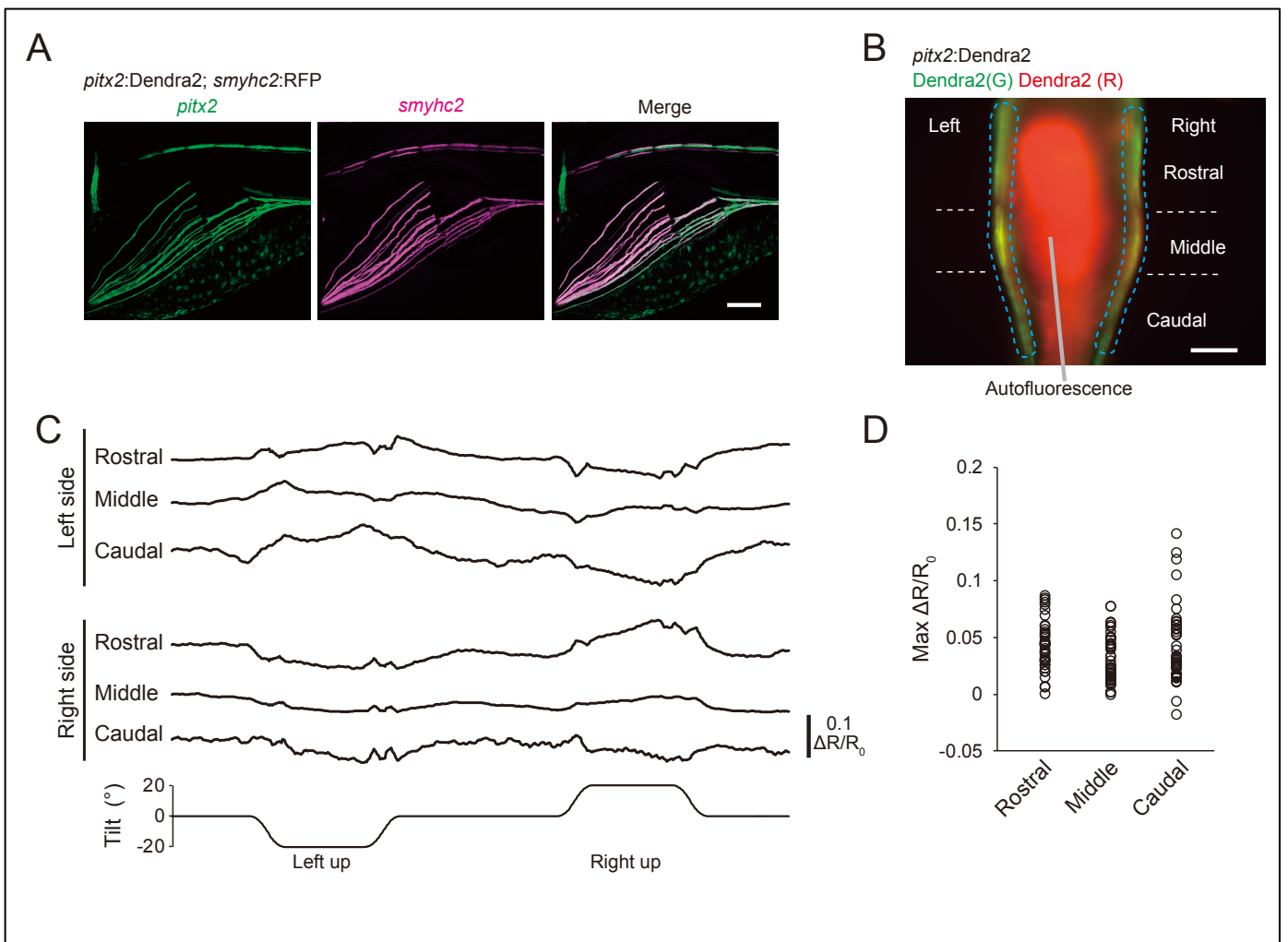


図14 PHMイメージング時のアーチファクト推定

(A) *Tg(pitx2:Dendra2; smyhc2:loxP-DsRed-loxP-DTA)*魚の、PHM周辺部の横からの共焦点スタック画像。*pitx2*は遅筋タイプのPHMで発現する。

(B) *Tg(pitx2:Dendra2)*魚を用いて、一部のDendra2を色換えした後の画像である。緑色と赤色のチャンネルを重ねた。腹側からの写真。

(C) 遅筋タイプのPHMの各セグメントの $\Delta R/R_0$ の時間経過。緑色と赤色のDendra2をもつ魚を傾斜して、傾斜時のアーティファクトを計測した。

(D) 各セグメントにおける $\Delta R/R_0$ の最大値。各セグメント42個(21試行の左右の筋肉、5匹)の点を示す。

スケールバー：100 μm

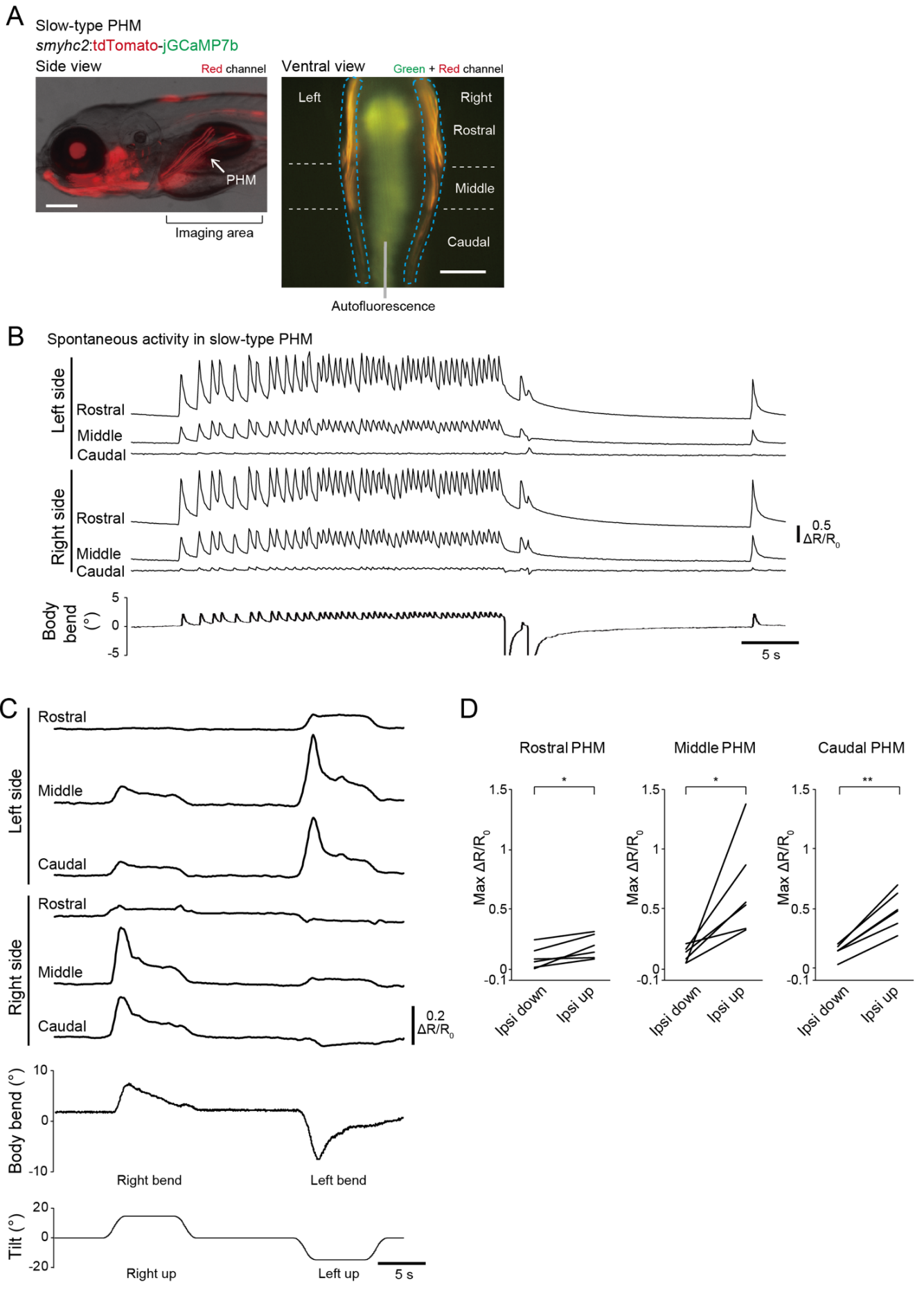


図 15 遅筋タイプの PHM の Ca^{2+} イメージング

(A) Tg(*smyhc2:tdTomato-jGCaMP7b*)魚の蛍光写真。(左) 魚の横からの写真。赤色蛍光像と透過光像を重ね合わせた画像を示す。(右) 左の画像の”imaging are”で示した部分の腹側からの写真。緑色蛍光像と赤色蛍光像を重ね合わせた画像を示す。PHM は魚の両側に位置し、青色の波線で示す。PHM は 3 セグメントに分かれている。魚の正中線沿いには腸や卵黄由来の自家蛍光が観察される。スケールバー：200 μm

(B) 傾斜刺激を与えていない時に見られた PHM の自発的なリズム活動。

(C) 傾斜刺激に対する遅筋タイプのセグメント毎の $\Delta R/R_0$ と胴体屈曲角度の時間経過。

(D) 遅筋タイプの PHM の各セグメントにおいて、同側が下側になったときと上側になったときの $\Delta R/R_0$ の最大値の比較。1 匹あたり 1、2 試行行い、2 試行の場合はその平均値を 1 匹の代表値とした。計 6 匹行った。rostral : $p = 0.01$ 、middle : $p = 0.02$ 、caudal : $p = 0.0006$ (関連 2 群の t 検定)

図 16

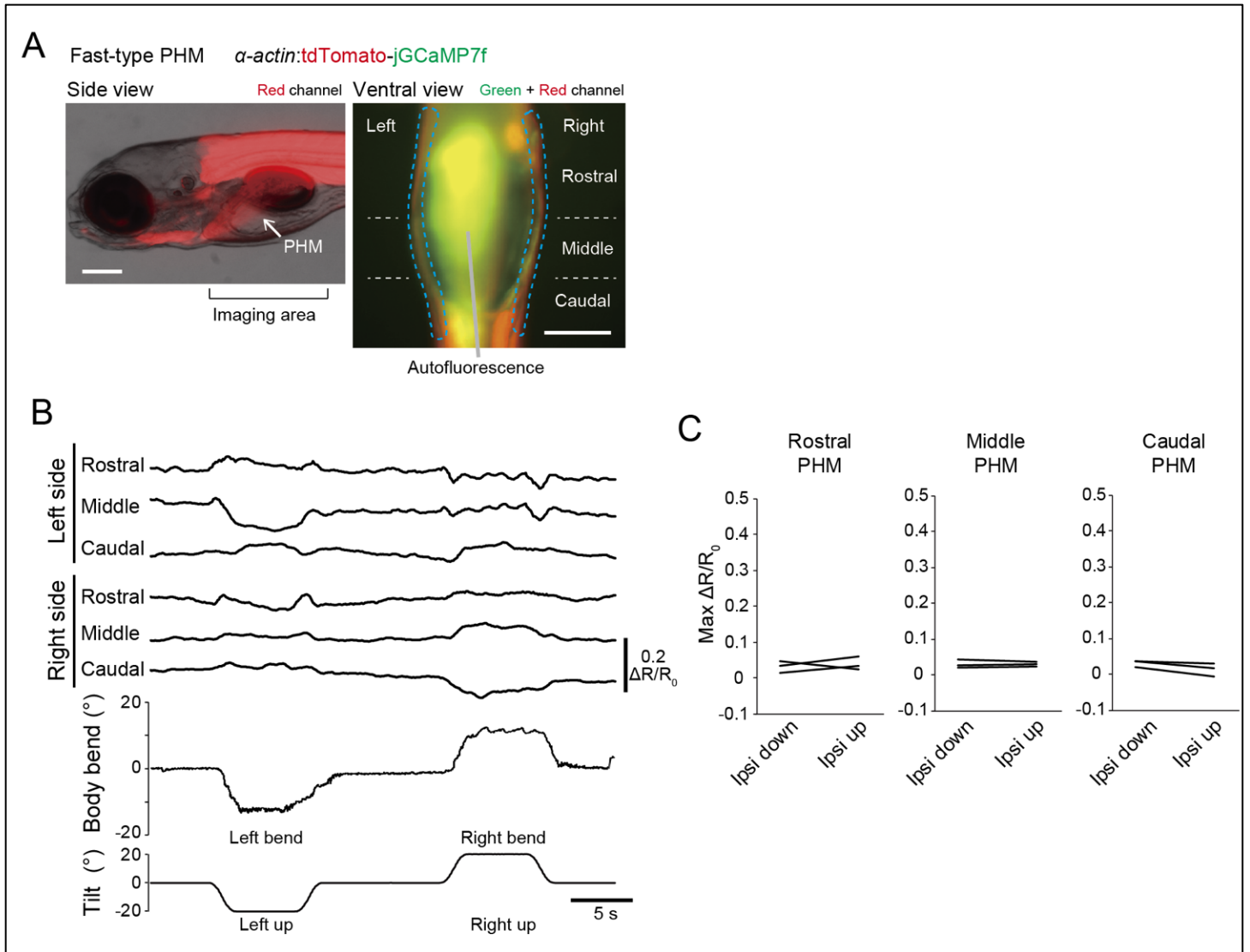


図 16 速筋タイプの PHM の Ca^{2+} イメージング

(A) $Tg(\alpha\text{-actin:tdTomato-jGCaMP7f})$ 魚の蛍光写真。(左) 魚の横からの写真。赤色蛍光像と透過光像を重ね合わせた画像を示す。(右) 左の画像の”imaging are”で示した部分の腹側からの写真。緑色蛍光像と赤色蛍光像を重ね合わせた画像を示す。PHM は魚の両側に位置し、青色の波線で示す。PHM は 3 セグメントに分かれている。魚の正中線沿いには腸や卵黄由来の自家蛍光が観察される。スケールバー：200 μm

(B) 傾斜刺激に対する速筋タイプのセグメント毎の $\Delta R/R_0$ と胴体屈曲角度の時間経過。

(C) 速筋タイプの PHM の各セグメントにおいて、同側が下側になったときと上側になったときの最大 $\Delta R/R_0$ の比較。1 匹あたり 3 試行行い、その平均値を 1 匹の代表値とし、計 3 匹行った。rostral セグメント： $p = 0.59$ 、middle セグメント： $p = 0.67$ 、caudal セグメント： $p = 0.11$ (関連 2 群の t 検定)

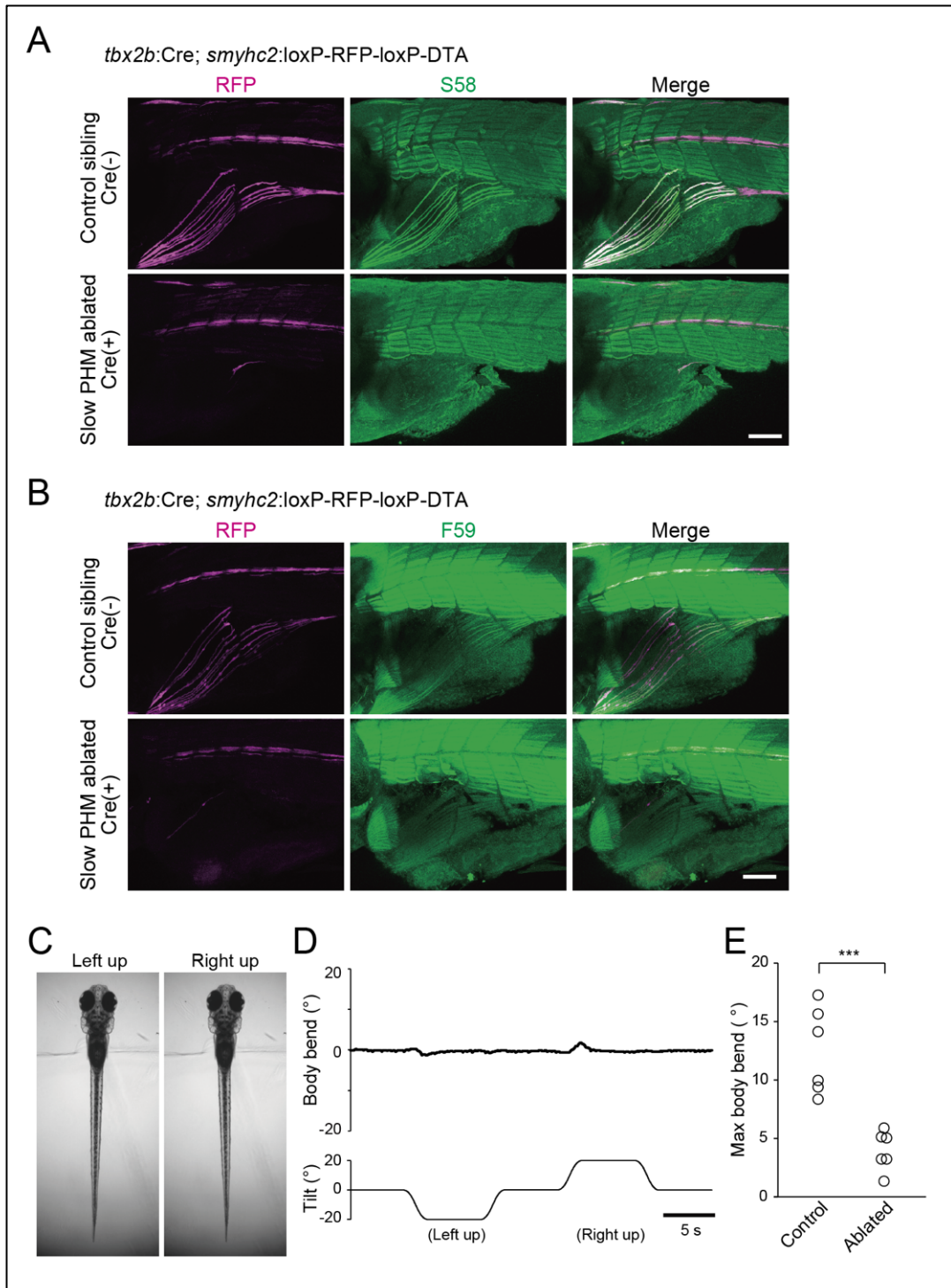


図 17 遅筋タイプの PHM 破壊で VBR が阻害される

(A, B) Tg(*smyhc2:loxP-RFP-loxP-DTA*)魚に対する免疫組織染色。(A) S58 抗体による免疫組織染色、(B) F59 抗体による免疫組織染色。それぞれ (上) Tg(*tbx2:Cre*)を持たない魚の写真 (コントロール) と (下) Tg(*tbx2:Cre*)を持つ魚の写真を示す。(B、下) 色素を持つ魚であったため、一部の筋肉は色素で隠れてしまった。

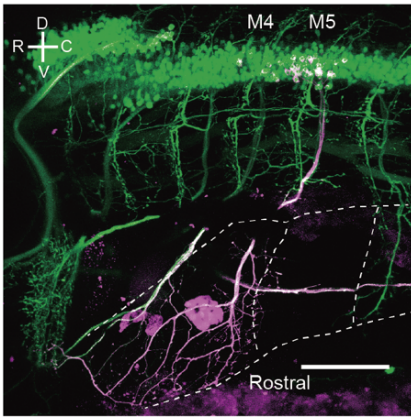
(C) Tg(*tbx2:Cre; smyhc2:loxP-RFP-loxP-DTA*)魚の頭部包埋条件での傾斜時の行動。

(D) 傾斜刺激に対する胴部屈曲角度の時間経過。(C)と同一試行を示す。

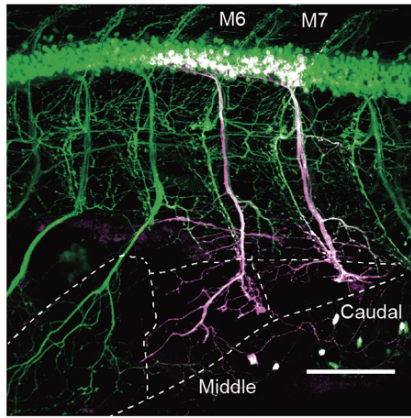
(E) コントロール (Tg(*tbx2:Cre*)を持たない) と遅筋タイプの PHM 破壊魚 (Tg(*tbx2:Cre*)を持つ) の胴体屈曲角度の最大値の比較。それぞれ 6 匹行った。1 匹あたり最低 5 試行を行い、その平均値を 1 匹の代表値とした。 $p = 0.0004$ (独立 2 群の t 検定)

スケールバー : 100 μ m

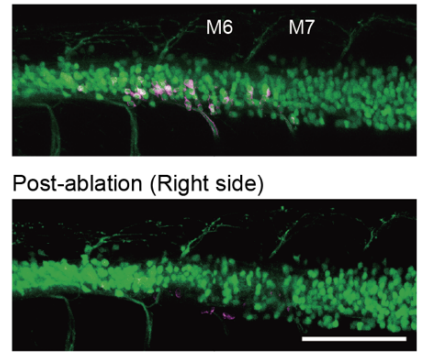
A Rostral PHM motoneuron
vachta:Gal4; UAS:Kaede
 Kaede(G) Kaede(R)



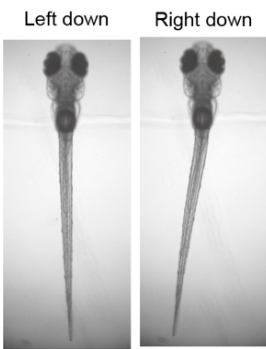
B Middle & caudal PHM motoneuron
vachta:Gal4; UAS:Kaede
 Kaede(G) Kaede(R)



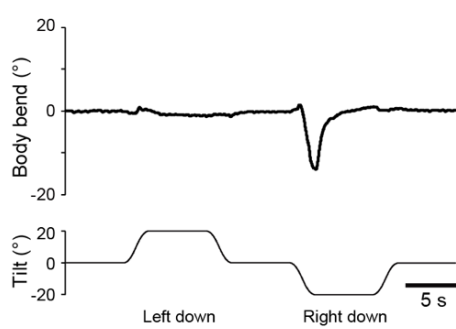
C Middle & caudal PHM motoneuron ablation
 Pre-ablation
 Post-ablation (Right side)



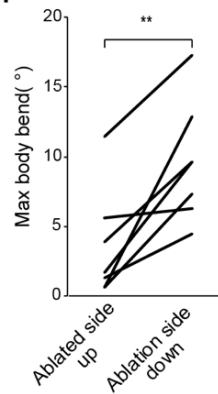
D Right side ablation



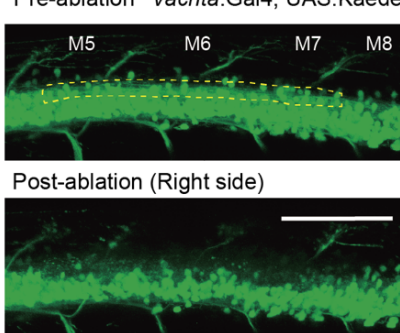
E



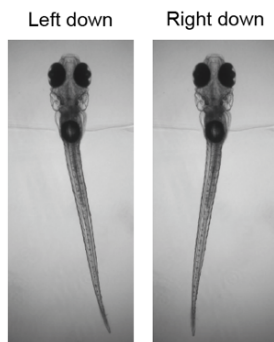
F



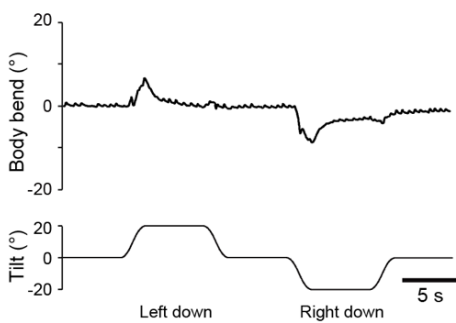
G Control motoneuron ablation
 Pre-ablation *vachta:Gal4; UAS:Kaede*



H Right side ablation



I



J

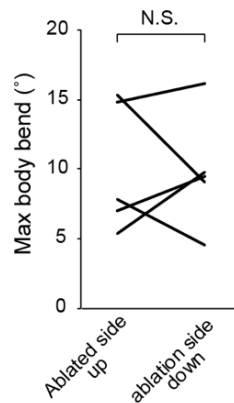


図 18 PHM 運動ニューロンの破壊で VBR が阻害される

(A, B) PHM 運動ニューロンを逆行的に染色した時の共焦点スタック画像。(A) rostral セグメントの PHM に投射する運動ニューロン。色素を持つ魚であったため、一部分の蛍光を観察できなかった。(B) middle と caudal セグメントの PHM に投射する運動ニューロン。

(C–F) middle、caudal セグメントの PHM 運動ニューロンの破壊実験

(C) middle と caudal セグメントに投射する運動ニューロンを逆行的に色変換した魚に対し、光変換されたタンパク質を持つニューロン（マゼンタのニューロン）の破壊前後の共焦点スタック画像を示す。右側の運動ニューロンが破壊された。

(D) 頭部包埋条件での傾斜時の行動。

(E) 傾斜刺激に対する胴部屈曲角度の時間経過。(D)と同一試行を示す。

(F) 破壊した側が下側になったときと上側になったときの胴部屈曲角度の最大値の比較。7 個体すべて右側の運動ニューロンの破壊である。1 匹あたり 6–8 試行行い、その平均値を 1 匹の代表値とした。 $p = 0.004$ (関連 2 群の t 検定)

(G–J) コントロールニューロンの破壊実験

(G) レーザー破壊前後の共焦点スタック画像を示す。黄色の波線で示す脊髓の背側に位置する Kaede 陽性細胞を破壊した。

(H) 頭部包埋条件での傾斜時の行動。

(I) 傾斜刺激に対する胴部屈曲角度の時間経過。(H)と同一試行を示す。

(J) 破壊した側が下側になったときと上側になったときの胴部屈曲角度の最大値の比較。5 個体すべて右側破壊である。1 匹あたり 3–6 試行行い、その平均値を 1 匹の代表値とした。 $p = 0.89$ (関連 2 群の t 検定)

スケールバー：100 μm

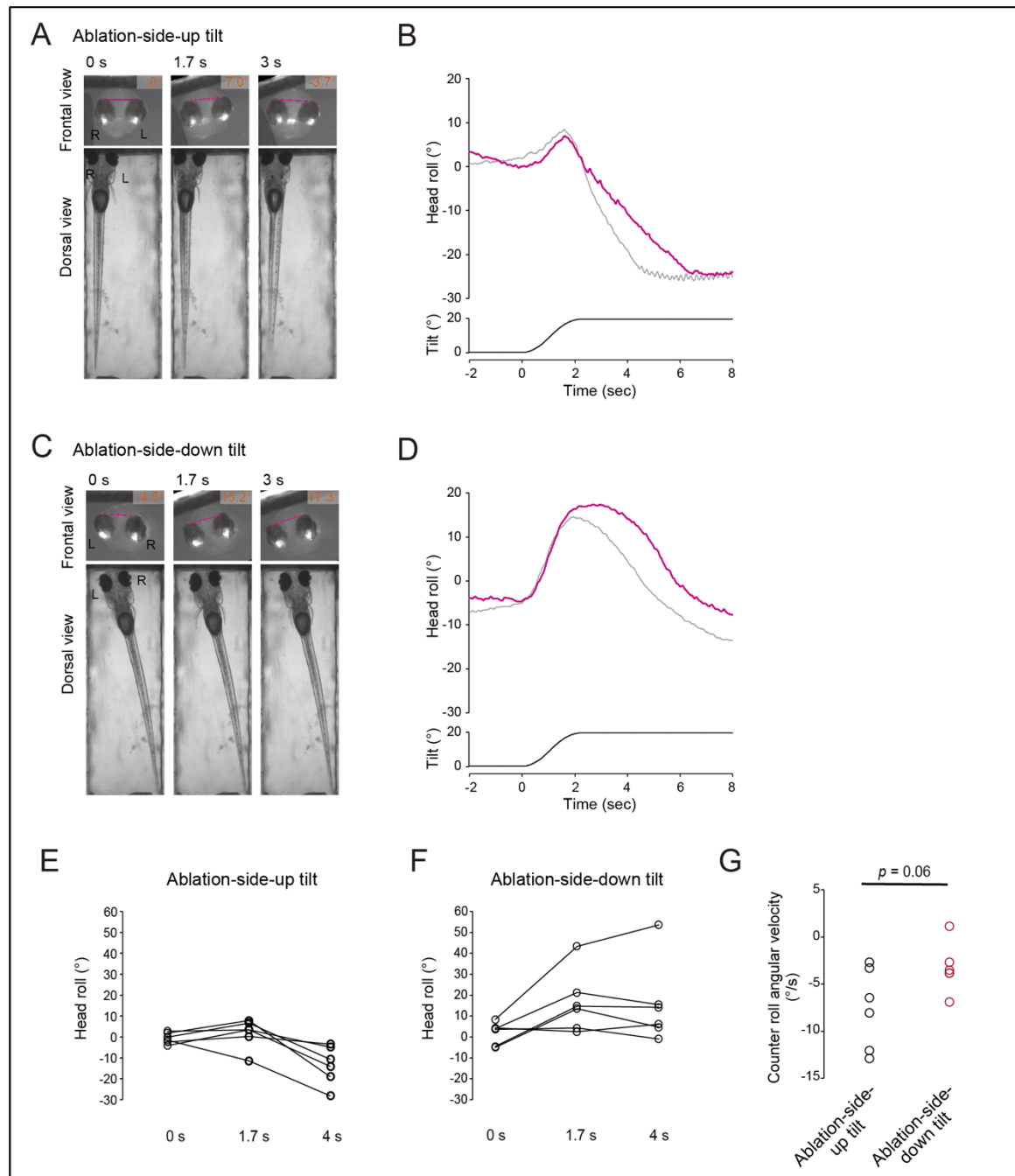


図 19 TAN ニューロン片側破壊時の自由行動実験

(A–D) 左側の TAN ニューロンを破壊した個体の自由行動実験。全て同一個体の結果である。

(A) 右側が下になるよう傾斜した時の魚のスナップショット。画像の左に魚の右側がくるように反転させた。

(B) 右側が下になるよう傾斜した時の、頭部屈曲角度の時間経過。2 試行を示す。マゼンタの線は、(A)の試行に対応する。

(C) 左側が下になるよう傾斜した時の魚のスナップショット。画像の左に魚の左側がくるように反転させた。

(D) 左側が下になるよう傾斜した時の、頭部屈曲角度の時間経過。2 試行を示す。マゼンタの線は、(C)の試行に対応する。

(E, F) 実験を行った 3 匹の全ての試行の 0 秒、1.7 秒、4 秒の時点の頭部屈曲角度。(E) TAN ニューロン破壊側が上側になるよう傾斜した試行（計 6 試行）、(F) TAN ニューロン破壊側が下側になるよう傾斜した試行（計 6 試行）を示す。

(G) TAN ニューロンの破壊側が上側、または下側に傾斜した時の、半ロール運動時の角速度の比較。 $p=0.06$ （関連 2 群の t 検定）

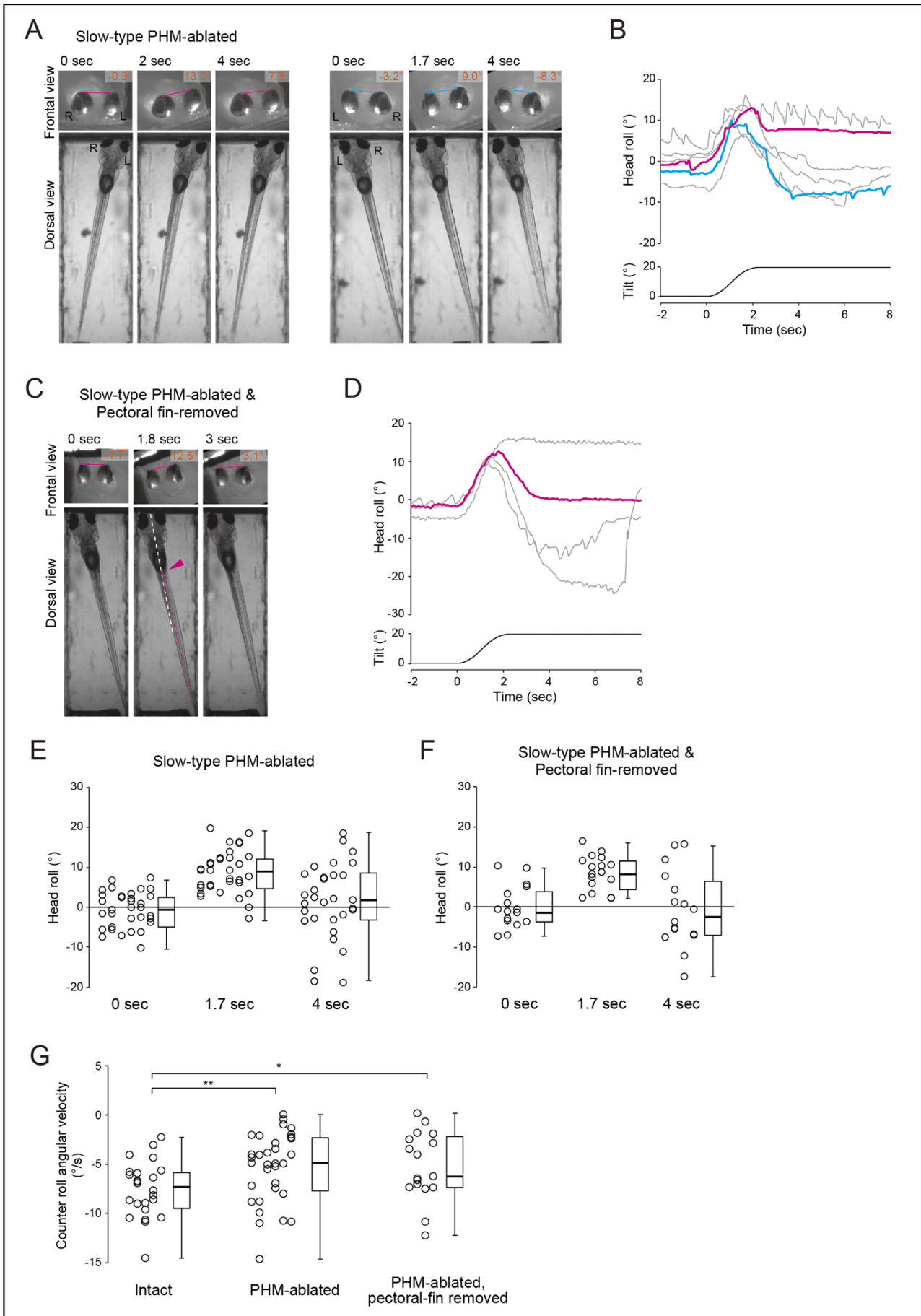


図 20 遅筋タイプの PHM 破壊魚の自由行動実験

- (A) *Tg(tbx2:Cre; smyhc2:loxP-RFP-loxP-DTA)*魚で、傾斜刺激を与えたときの行動のスナップショット。2 試行を示す。
- (B) 傾斜刺激に対する頭部屈曲角度の時間経過。1 匹からの 6 試行を示す。マゼンタの線は、(A)の左側の試行、シアンの線は(A)の右側の試行に対応する。
- (C) *Tg(tbx2:Cre; smyhc2:loxP-RFP-loxP-DTA)*の胸鰭を取り除いた魚に傾斜刺激を与えた時の行動のスナップショット。
- (D) 傾斜刺激に対する頭部屈曲角度の時間経過。1 匹からの 4 試行を示す。マゼンタの線は(C)の試行に対応する。
- (E, F) 全ての試行の 0 秒、1.7 秒、4 秒の時点の頭部屈曲角度を示す。(E) *Tg(tbx2:Cre; smyhc2:loxP-RFP-loxP-DTA)*で遅筋タイプの PHM が破壊された魚 (6 匹 33 試行)、(F) *Tg(tbx2:Cre; smyhc2:loxP-RFP-loxP-DTA)*魚の胸鰭を取り除いた魚 (4 匹 17 試行) を示す。
- (G) 半ロール運動時の角速度の正常個体、遅筋タイプの PHM 破壊魚、胸鰭を切除した遅筋タイプの PHM 破壊魚の比較。正常-遅筋タイプの PHM 破壊魚 : $p=0.007$ 、正常-胸鰭を切除した遅筋タイプの PHM 破壊魚 : $p=0.03$ (ウィルコクソン順位和検定)

図 21

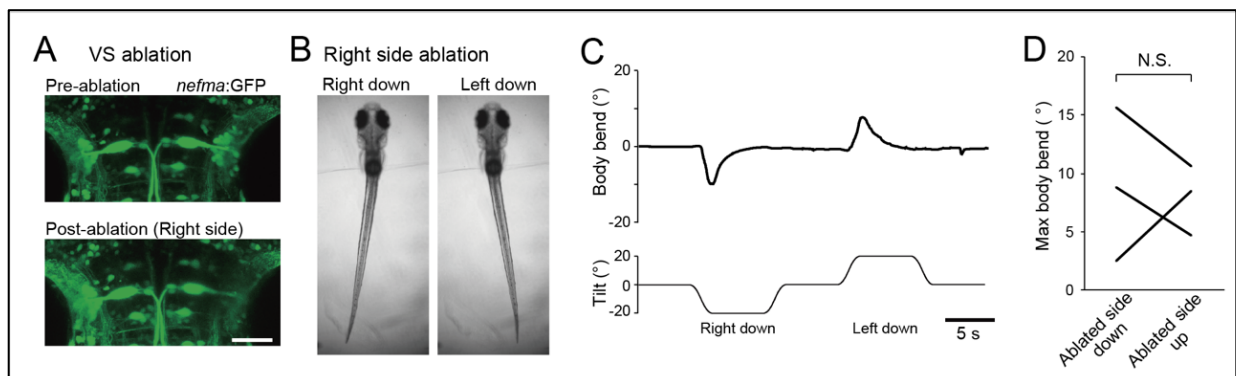


図 21 前庭脊髄路ニューロン破壊しても VBR は残る

(A) レーザー破壊前後の *Tg(nefma:GFP)* 魚の共焦点スタック画像。スケールバー：50 μ m

(B) 頭部包埋条件での傾斜時の行動。

(C) 傾斜刺激に対する胴部屈曲角度の時間経過。(B)と同一試行を示す。

(D) 破壊した側が下側になったときと上側になったときの胴部屈曲角度の最大値の比較。3 個体のうち、1 個体は左側の破壊で、2 個体は右側の破壊である。1 匹あたり 6 試行行い、その平均値を 1 匹の代表値とした。 $p=0.79$ (関連 2 群の t 検定)

図 22

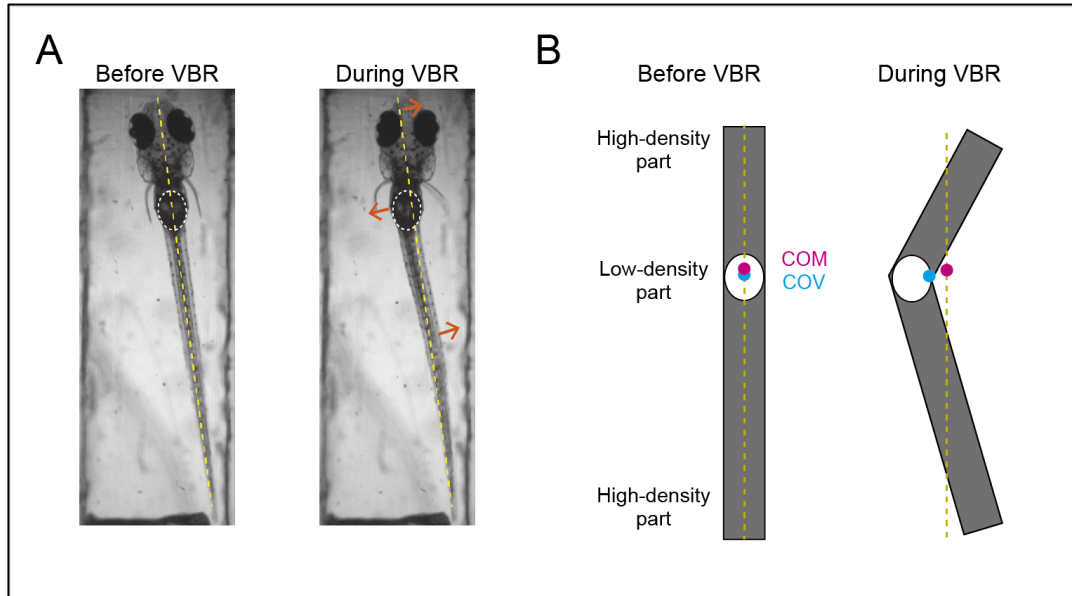


図 22 VBR により低密度部位の浮き袋周辺の体が伸展側に移動する

(A) VBR による体の偏位。VBR 前後の魚のスナップショットで、図 2A と同一である。黄色の波線は VBR を起こす前の魚の正中線を示し、白色の波線は浮き袋の位置を示す。オレンジの矢印は VBR によって各部位の偏位を示す。頭部と尾側の体は屈曲側に移動したのに対し、浮き袋周辺の体は伸展側に移動する。

(B) VBR による体の偏位を簡略化した魚で示した模式図。黄色の波線は VBR を起こす前の魚の正中線を示す。マゼンタとシヤンの丸はそれぞれ重心 (COM) と体積中心 (COV) を示す。重心の絶対位置は VBR 前後で変化しないのに対し、体積中心は伸展側に移動する。

図 23

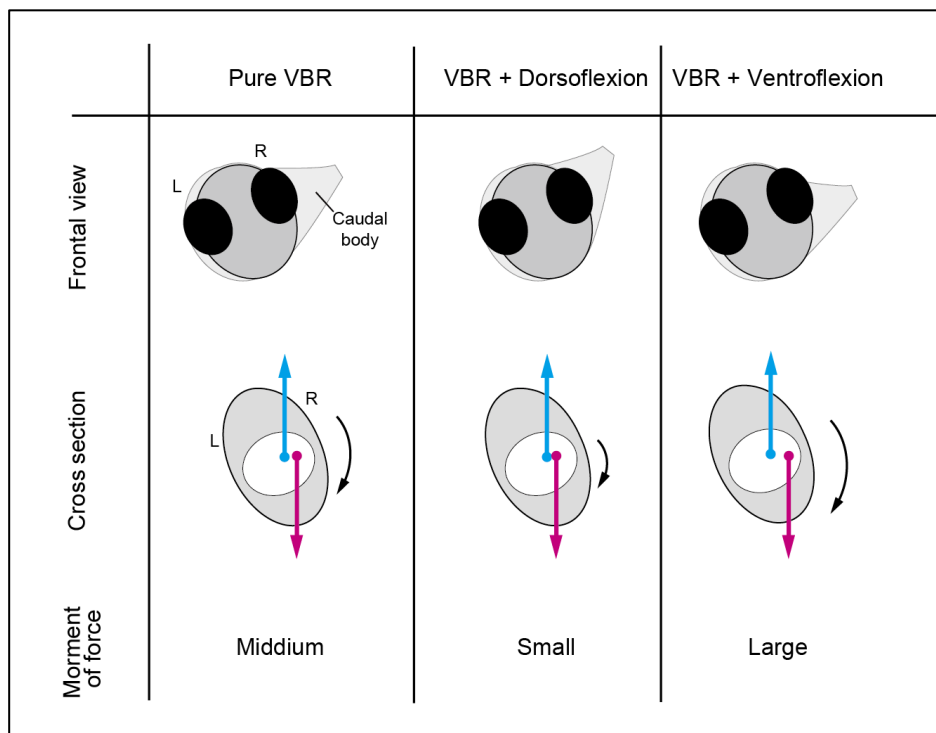


図 23 単純な VBR と VBR 時に背側屈曲、腹側屈曲をした時の比較

単純な VBR を示した場合に比べて、背側屈曲も同時に示すと重心と体積中心の位置関係が近くなり、力のモーメントが小さくなる。一方、腹側屈曲を同時に示すと重心と体積中心の位置関係が遠くなり、力のモーメントが大きくなる。

図 24

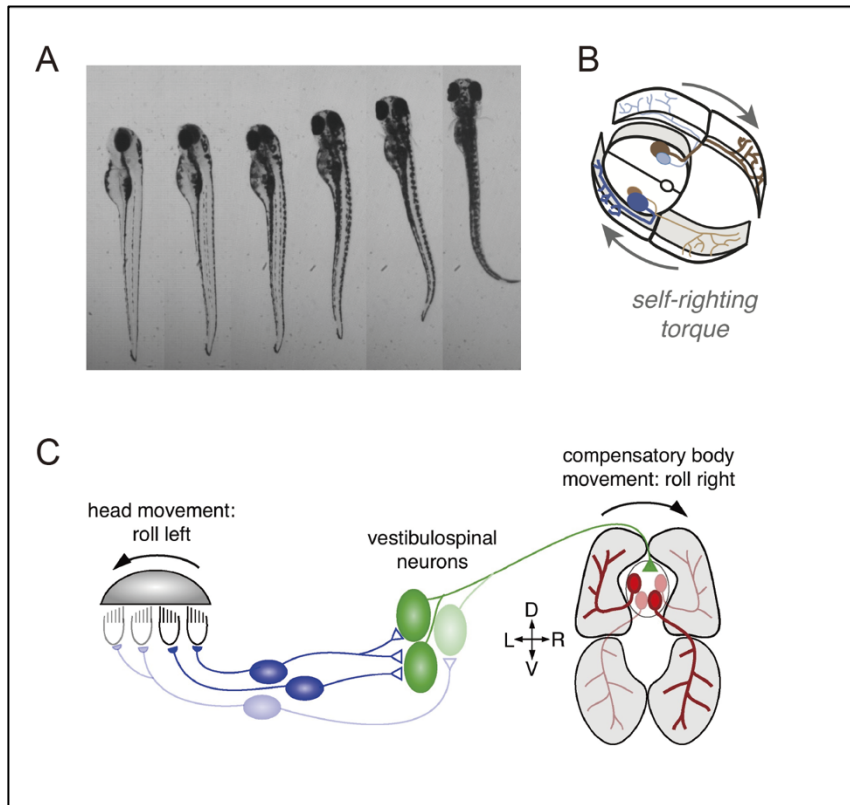


図 24 ダイナミックな姿勢制御機構

(A) ロール方向の大きな姿勢偏位 (90°の傾斜) からの遊泳を伴う姿勢立て直しのスナップショット。

(B) 遊泳を介する姿勢立て直しの力学的なメカニズム。左右背腹のバイアスのかかった筋活動により、姿勢を立て直す方向に力のモーメント (トルク) がかかる。図は Bagnall and McLean (2014)から引用した。

(C) 遊泳を伴う姿勢立て直しを司る神経回路の仮説。繊毛の方向性に従って内耳の有毛細胞の一部 (黒色細胞) が脱分極する。前庭神経節ニューロン (求心性繊維、青色細胞) が有毛細胞の情報を後脳の前庭脊髄路ニューロン (緑色細胞) に伝達する。前庭脊髄路ニューロンにより、最終的に脊髄のバイアスのかかった体幹の筋肉の活動を生み出す。しかしながら、脊髄内の回路はよくわかっていない。図は Bagnall and Schoppik (2018) から引用した。

図 25

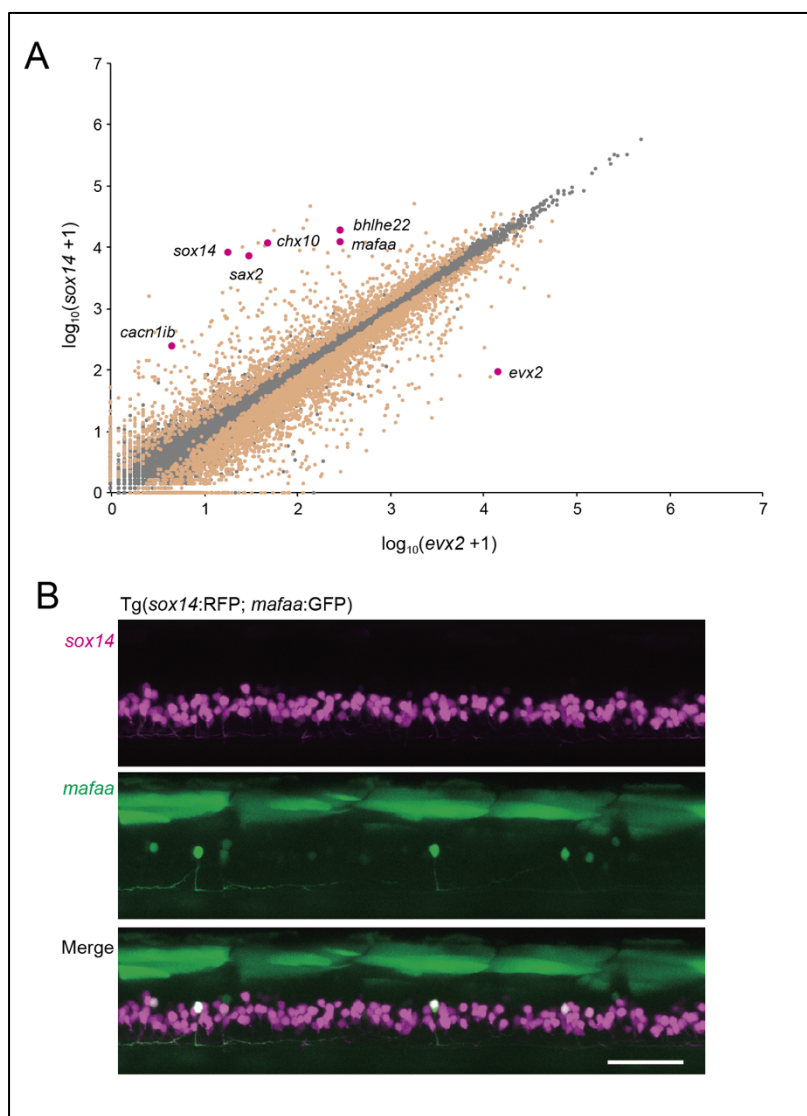


図 25 V2a-V0v ニューロンのバルク RNAseq

(A) V2a と V0v ニューロンでの各遺伝子の発現量の比較。オレンジの点は p 値が 0.01 以下の遺伝子、マゼンタの点は、着目した遺伝子を示す。

(B) *Tg(sox14:RFP; mafa:GFP)* の共焦点スタック画像。タイプ II V2a ニューロンの一部を *mafaa* 遺伝子は標識している。画像の左側が吻側、上側が背側を示す。スケールバー：50 μm

図 26

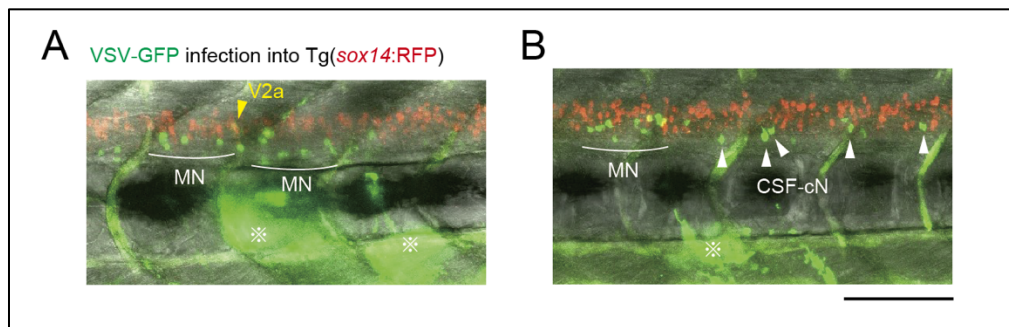


図 26 ウィルス実験による腹側系 V2a ニューロンの特定

Tg(*sox14*:RFP)魚の腹側筋に VSV-GFP をインジェクションし、逆行的に運動ニューロンを染め、さらにトランスシナプティック的に前運動性ニューロンを染めた。※マークはインジェクション部位を示す。

(A) 運動ニューロン (MN) の他に 1 細胞のみ V2a ニューロン (黄色の矢尻) で GFP が発現している。

(B) 運動ニューロン (MN) の他に、複数の脳脊髄液接触ニューロン (CSF-cN; 白色の矢尻) で GFP が発現している。

スケールバー：100 μm

図 27

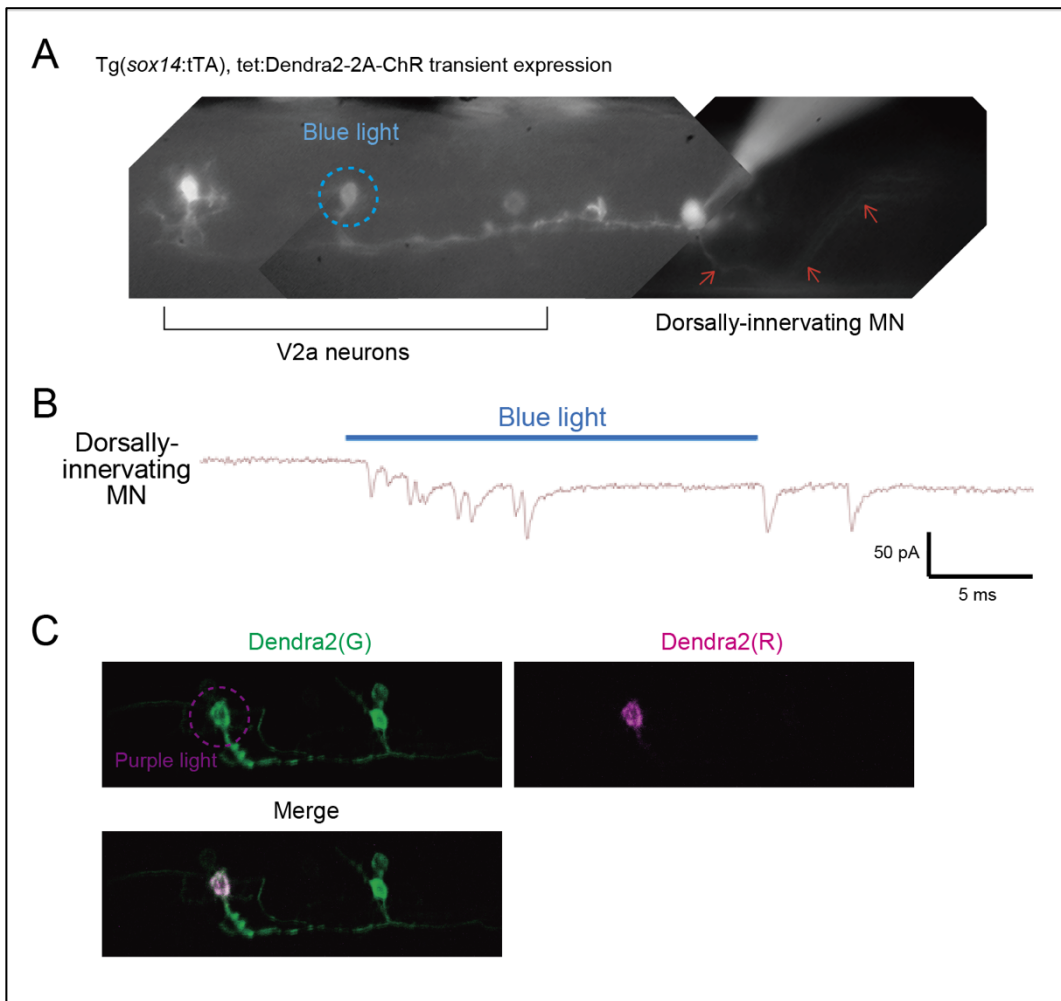


図 27 電気生理的に V2a ニューロンサブタイプの標識

(A) *Tg(sox14:tTA)* 受精卵に *tetO:Dendra2-2A-ChR* cDNA をインジェクションした魚に対し、背側筋運動ニューロンのパッチクランプ後の写真。パッチ内液に色素が含まれているので、運動ニューロンの軸索の形態（矢印）が確認できる。波線の円は青色光照射の範囲を示す。

(B) (A) で単一 V2a ニューロンに 20 m 秒青色光照射をして、光活性化した時の背側筋運動ニューロンが受ける興奮性入力。

(C) 単一細胞の色変換後の蛍光写真。単一の Dendra2（緑）陽性細胞に紫色光を照射して、1 細胞のみ Dendra2（赤）に色変換した。波線の円は紫色光照射の範囲を示す。(C) は(A), (B) と異なる魚である。

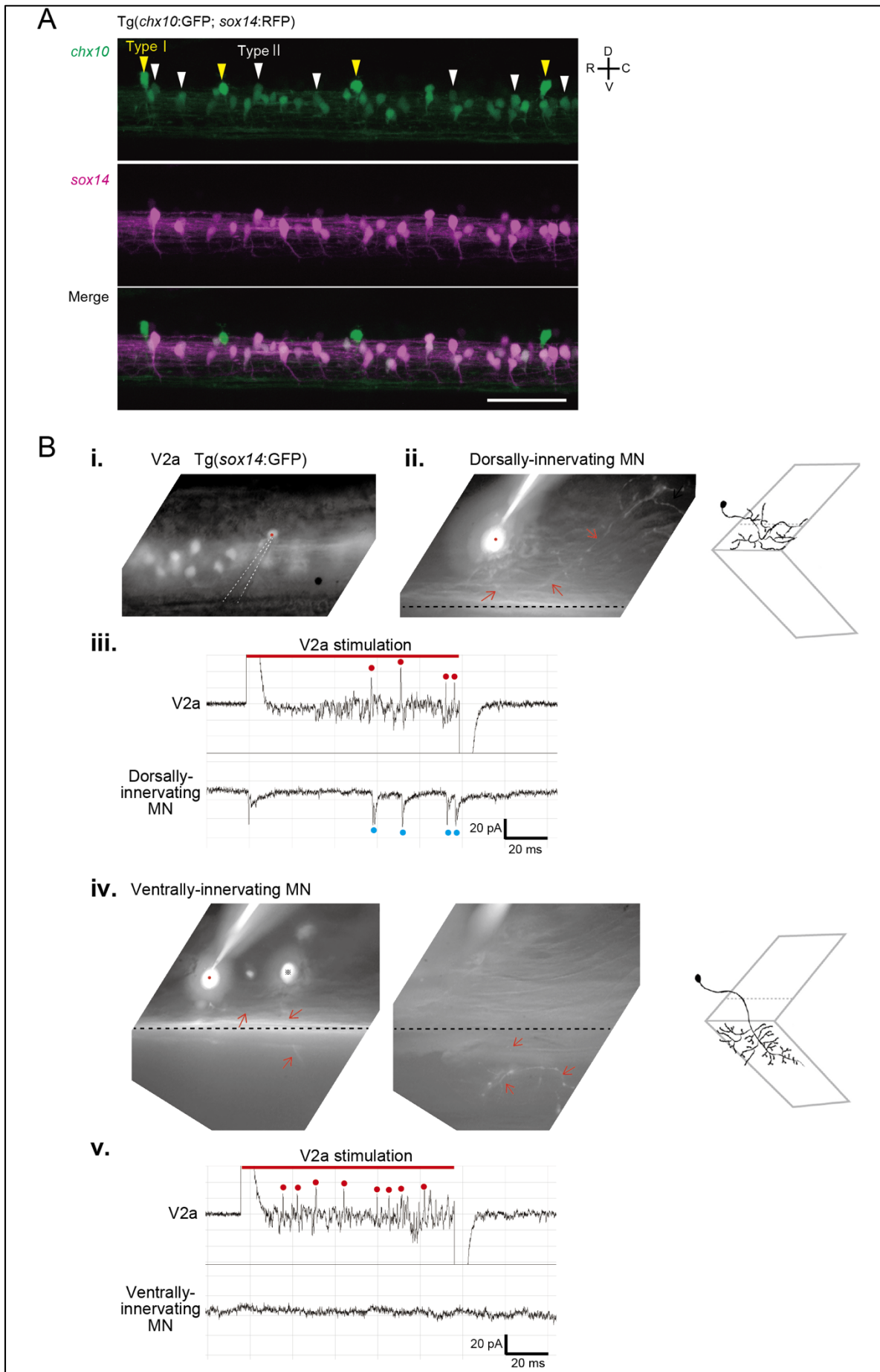


図 28 *sox14* で標識される V2a ニューロンの特性

(A) Tg(*chx10*:GFP; *sox14*:RFP)魚の共焦点スタック画像。*chx10*:GFP 発現強度により背側に位置する V2a ニューロンをタイプ I (黄色の矢尻)、タイプ II (白色の矢尻) に区別した。*sox14*:RFP はタイプ I V2a ニューロンで発現せず、タイプ II V2a ニューロンで発現した。スケールバー：50 μm

(B) 同一な推定タイプ II V2a ニューロンの背側筋・腹側筋運動ニューロンへの接続。

(i) Tg(*sox14*:GFP)魚で GFP 蛍光を頼りに、推定タイプ II V2a ニューロンの細胞外記録後の写真。点線はピペットを示す。

(ii) 背側筋運動ニューロンの細胞内記録後の蛍光写真 (左) とその細胞の模式図 (右)。軸索の位置はオレンジの矢印で示されている。

(iii) タイプ II V2a と背側筋運動ニューロンのダブルパッチ記録。V2a ニューロンに細胞外から 100 m 秒の電流を注入 (赤色のバー) し、強制的に発火させたとき (赤丸)、背側筋運動ニューロンに必ず興奮性入力 (青丸) が入った。

(iv) 腹側筋運動ニューロンの細胞内記録後の蛍光写真 (左、中) とその細胞の模式図 (右)。左図は脊髄周辺に焦点を当てた写真で、中図はより外側 (筋肉周辺) に焦点を当てた写真。

(v) タイプ II V2a と腹側筋運動ニューロンのダブルパッチ記録。V2a ニューロンに細胞外から 100 m 秒の電流を注入 (赤色のバー) し、強制的に発火させても (赤丸)、背側筋運動ニューロンには興奮性入力が入っていない。

(ii) と (iv) の運動ニューロンの模式図は Menelaou and Mclean (2012) から引用した。

図 29

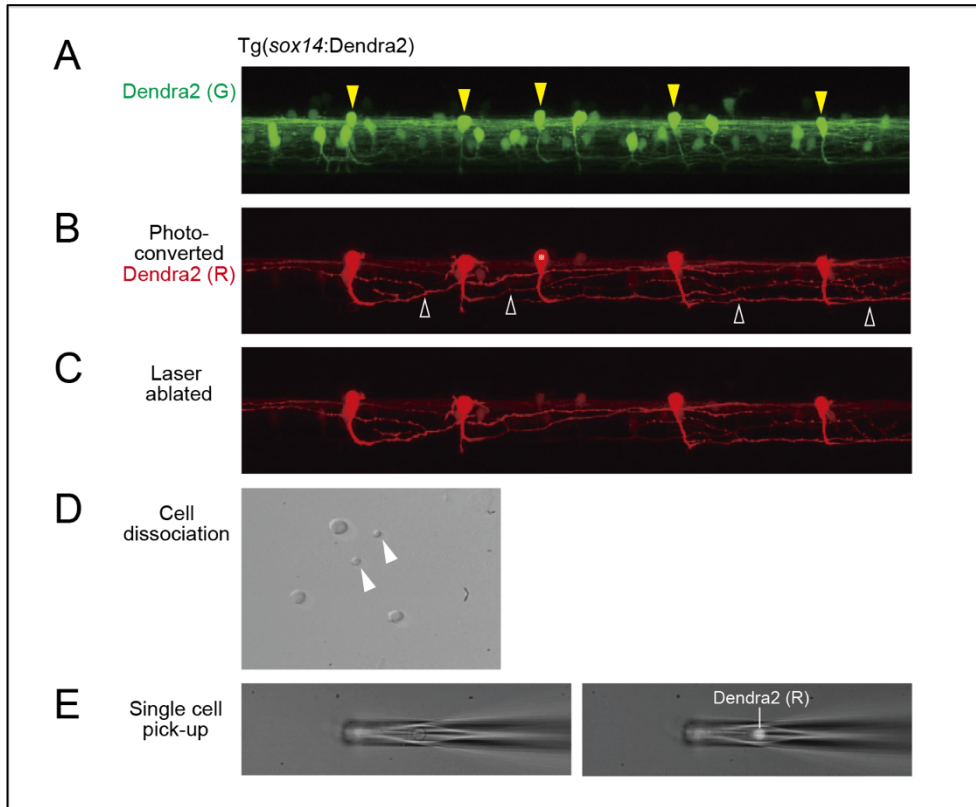


図 29 タイプ II V2a ニューロンの単一細胞回収

(A) 受精後 2 日目の $Tg(sox14:GFP)$ 魚の脊髄の共焦点スタック画像。黄色の矢尻はタイプ II V2a ニューロンと推測されるニューロンで、405 nm レーザーを照射するターゲットである。

(B) 405 nm レーザー照射により V2a ニューロンを色変換してから、数時間経過した後の共焦点スタック画像。白抜きの矢尻は、軸索が分岐点を示す。このことから、図の左右 2 つずつの細胞は、タイプ II V2a ニューロンであることがわかる。真ん中の細胞（※マークの細胞）は、2 光子レーザー照射の対象である。

(C) 2 光子レーザー照射後の共焦点スタック画像。

(D) 細胞単離して、プレートに撒かれた写真。白い矢印はニューロンを示す。

(E) ガラスピペットで単一細胞を回収する写真。透過光画像（左）と透過光像と Dendra2(red) 蛍光画像を重ね合わせた画像（右）である。

図 30

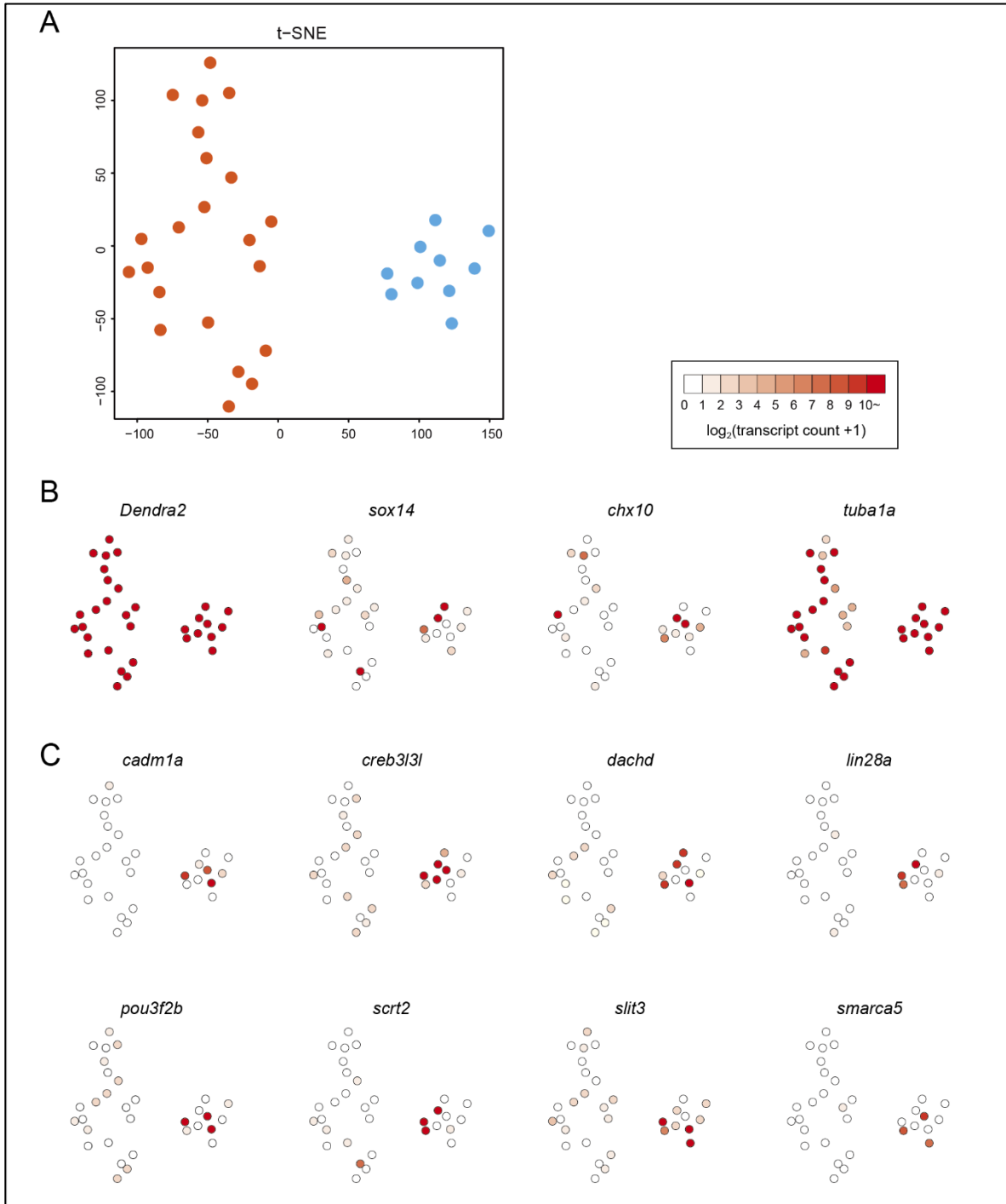


図 30 タイプ II V2a ニューロンのランダム単一細胞 RNAseq

(A) 遺伝子発現プロファイリングの t-SNE プロット。全 32 細胞について、t-SNE で次元圧縮すると、2つのクラスター（オレンジ、シアン）に分かれた。

(B, C) 各遺伝子の発現強度のヒートマップを示した t-SNE プロット。マーカー遺伝子 (B) とクラスター間で顕著に発現強度が異なる遺伝子 (C)。遺伝子の転写産物のカウントに 1 を加えた値に対する底 2 の対数値のカラーチャートを示す。

表 1-1 セクション 3. で使用したトランスジェニック魚の一覧

トランスジェニック魚	本来の名称	参照／今回作成の場合は、sgRNA のターゲット配列を記入
Tg(<i>evx2</i> :GFP)	Tg(<i>evx2</i> -hs:GFP)	Kawano et al., 2022
Tg(<i>evx2</i> :Gal4)	Tg(<i>evx2</i> -hs:Gal4)	Kimura et al., 2014
Tg(UAS:Dendra2)	Tg(UAS:Dendra2)	Taniguchi et al., 2017
Tg(<i>vglut1</i> :RFP)	Tg(<i>vglut1</i> -hs: loxP-mCherry-loxP- Gal4)	今回作成 sgRNA: gagagagactcgggcgcgcg
Tg(<i>vglut2a</i> :RFP)	Tg(<i>vglut2a</i> : loxP-RFP-loxP-GFP)	Satou et al., 2012
Tg(<i>glyt2</i> :RFP)	Tg(<i>glyt2</i> -hs: loxP-RFP-loxP-GFP)	Satou et al., 2020
Tg(<i>gad1b</i> :RFP)	Tg(<i>gad1b</i> : loxP-RFP-loxP-GFP)	Satou et al., 2013
Tg(<i>evx2</i> :tdTomato- jGCaMP7b)	Tg(<i>evx2</i> -hs: tdTomato-jGCaMP7b)	今回作成 sgRNA: Kimura et al. 2014
Tg(<i>evx2</i> :CoChR-GFP)	Tg(<i>evx2</i> -hs: CoChR-GFP-Kv2.1)	今回作成 sgRNA: Kimura et al. 2014
Tg(<i>pitx2</i> :Dendra2)	Tg(<i>pitx2</i> -hs:Dendra2)	今回作成 sgRNA: gagctttgactgtcagcgcg
Tg(<i>smyhc2</i> :tdTomato- jGCaMP7b)	Tg(<i>smyhc2</i> -hs: tdTomato-jGCaMP7b)	今回作成 sgRNA: gacttgattcatctggcg
Tg(<i>tbx2b</i> :Cre)	Tg(<i>tbx2b</i> -hs:Cre)	今回作成 sgRNA: ataaagcgtgaagccgaccg
Tg(<i>smyhc2</i> :loxP-RFP- loxP-DTA)	Tg(<i>smyhc2</i> -hs: loxP-RFP-loxP-DTA)	今回作成 sgRNA: cacaatgctgcaagctcac
Tg(α - <i>actin</i> :GFP)	Tg(α - <i>actin</i> :GFP)	Higashijima et al., 1997
Tg(α - <i>actin</i> :tdTomato- jGCaMP7f)	Tg(α - <i>actin</i> : tdTomato-jGCaMP7f)	今回作成 CRSPR/Cas9 で作成して いない (使用した動物参照)
Tg(<i>vachta</i> :Gal4)	Tg(<i>vachta</i> -hs:Gal4)	Taniguchi et al., 2017
Tg(UAS:Kaede)	Tg(UAS:Kaede)	Hatta et al., 2006
Tg(<i>nefma</i> :GFP)	Tg(<i>nefma</i> -hs:GFP)	今回作成 sgRNA: Liu et al., 2020 catcgacggatcaatgg

表 1-2 セクション 4. で使用したトランスジェニック魚の一覧

トランスジェニック魚	本来の名称	参照 / 今回作成の場合は、 sgRNA のターゲット配列を記入
Tg(<i>sox14</i> :GFP)	Tg(<i>sox14</i> -hs:GFP)	今回作成
Tg(<i>sox14</i> :RFP)	Tg(<i>sox14</i> -hs:loxP-RFP-loxP-GFP)	sgRNA: gctgattgggcgctcaggt
Tg(<i>evx2</i> :GFP)	Tg(<i>evx2</i> -hs:GFP)	Kawano et al., 2022
Tg(<i>bhlhe22</i> :RFP)	Tg(<i>bhlhe22</i> -hs:loxP-RFP-loxP-GFP)	今回作成 sgRNA: gactcgcaccacaaatgtg
Tg(<i>cacn1ib</i> :GFP)	Tg(<i>cacn1ib</i> -hs:GFP)	今回作成 sgRNA: gaacgcgcgctcacctgagg
Tg(<i>mafaa</i> :GFP)	Tg(<i>mafaa</i> -hs:GFP)	今回作成 sgRNA: tttcctcgcgttcaccttc
Tg(<i>sax2</i> :RFP)	Tg(<i>sax2</i> -hs:loxP-RFP-loxP-GFP)	今回作成 sgRNA: gaaggggaggagagccggct
Tg(<i>sox14</i> :tTA)	Tg(<i>sox14</i> -hs:tTA)	今回作成 sgRNA: gctgattgggcgctcaggt
Tg(<i>chx10</i> :GFP)	Tg(<i>chx10</i> :GFP)	Kimura et al., 2012
Tg(<i>sox14</i> :Dendra2)	Tg(<i>sox14</i> -hs:Dendra2)	今回作成 sgRNA: gctgattgggcgctcaggt
Tg(<i>cadmla</i> :GFP)	Tg(<i>cadmla</i> -hs:GFP)	今回作成 gRNA: gcgcgtgaggagatgctaa
Tg(<i>creb3l3l</i> :GFP)	Tg(<i>creb3l3l</i> -hs:GFP)	今回作成 sgRNA: gacctgtcacatgctttacc
Tg(<i>dachd</i> :GFP)	Tg(<i>dachd</i> -hs:GFP)	今回作成 gRNA: ggcgtccgctgttccacta
Tg(<i>lin28a</i> :GFP)	Tg(<i>lin28a</i> -hs:GFP)	今回作成 sgRNA: ggtagtttgagggtgttac
Tg(<i>pou3f2b</i> :GFP)	Tg(<i>pou3f2b</i> -hs:GFP)	今回作成 sgRNA: ggcatgctgggtgacgtatg
Tg(<i>scrt2</i> :GFP)	Tg(<i>scrt2</i> -hs:GFP)	今回作成 sgRNA: ggagggaggatggatcag
Tg(<i>slit3</i> :GFP)	Tg(<i>slit3</i> -hs:GFP)	今回作成 gRNA: ggggtctcgactcgagaagt
Tg(<i>smarca</i> :GFP)	Tg(<i>smarca</i> -hs:GFP)	今回作成 sgRNA: gggggaccgtgaatgacgcg

表2 使用した試薬の一覧

抗体	製造元	製品 ID
S58	DSHB	Cat# s58, RRID:AB_528377
F59	DSHB	Cat# f59, RRID:AB_528373
Goat anti-Mouse IgG (H+L) Highly Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor 488	Thermo Fisher Scientific	Cat# A-11029, RRID:AB_2534088
化学物質	製造元	製品 ID
Ethyl 3-aminobenzoate methanesulfonate salt (MS-222)	Sigma Aldrich	Cat# A5040
Methylcellulose	Sigma Aldrich	Cat# A0387
Agarose-LM	nacalai tesque	Cat# 01161-12
Sucrose	Wako	Cat# 196-00015
Cal-520 Dextran conjugate MW 10,000	AAT bioquest	Cat# 20601
Dextran, Tetramethylrhodamine, 3000 MW, Anionic, Lysine Fixable	Thermo Fisher Scientific	Cat# D3308

表3 使用した機器の一覧

機器	製造元	製品番号
Motorized rotation stage	Thorlabs	HDR50/M
Motorized rotation stage	Thorlabs	DDR100/M
Light source	Excelitas Technologies	X-Cite exacte
Episcopic illuminator	Olympus	BX-URA2
Tube lens unit	Olympus	U-TR30-2
C-mount camera adaptor	Olympus	U-TV0.63XC
Image splitting optics	Hamamatsu Photonics	W-VIEW GEMINI, A12801-01
Digital camera	Hamamatsu Photonics	ORCA-Flash4.0 V3, C13440-20CU
Digital camera	Teledyne FLIR	GS3-U3-23S6M-C
Digital camera	Basler	acA640-750um

表4 使用したソフトウェアの一覧

ソフトウェア	製造元	URL
Kinesis	Thorlabs	https://www.thorlabs.com/newgrouppage9.cfm?objectgroup_id=10285
FlyCature2	Teledyne FLIR	https://flycap2-viewer-release.software.informer.com
Pylon Viewer	Basler	https://www.baslerweb.com/en/products/basler-ylon-camera-software-suite/
ImageJ/Fiji	NIH	https://imagej.net
Template Matching and Slice Alignment Plugin	Tseng Qingzong	https://sites.google.com/site/qingzongtseng/template-matching-ij-plugin
R	R Core Team	https://www.r-project.org/
Excel	Microsoft	https://www.microsoft.com/en-us/microsoft-365/excel

8. 参考文献

- Ampatzis, K., Song, J., Ausborn, J., El Manira, A. (2014). Separate microcircuit modules of distinct v2a interneurons and motoneurons control the speed of locomotion. *Neuron*. 83, 934-943
- Arber S. (2012). Motor circuits in action: specification, connectivity, and function. *Neuron*. 74, 975-989
- Bagnall, M.W., and McLean, D.L. (2014). Modular organization of axial microcircuits in zebrafish. *Science* 343, 197-200.
- Bagnall M.W., Schoppik D. (2018). Development of vestibular behaviors in zebrafish. *Curr Opin Neurobiol*. 53, 83-89
- Basaldella, E., Takeoka, A., Sigrist, M., Arber, S. (2015). Multisensory Signaling Shapes Vestibulo-Motor Circuit Specificity. *Cell*. 163, 301-312.
- Bhatt, D.H., Otto, S.J., Depoister, B., and Fetcho, J.R. (2004). Cyclic AMP-induced repair of zebrafish spinal circuits. *Science* 305, 254-258.
- Bianco, I.H., Ma, L.H., Schoppik, D., Robson, D.N., Orger, M.B., Beck, J.C., Li, J.M., Schier, A.F., Engert, F., and Baker, R. (2012). The tangential nucleus controls a gravito-inertial vestibulo-ocular reflex. *Curr Biol* 22, 1285-1295.
- Bikoff J.B., Gabitto M.I., Rivard A.F., Drobac E., Machado T.A., Miri A., Brenner-Morton S., Famojure E., Diaz C., Alvarez F.J., Mentis G.Z., Jessell T.M. (2016). Spinal Inhibitory Interneuron Diversity Delineates Variant Motor Microcircuits. *Cell* 165, 207-219
- Bolton, P.S., Goto, T., Schor, R.H., Wilson, V.J., Yamagata, Y., and Yates, B.J. (1992). Response of pontomedullary reticulospinal neurons to vestibular stimuli in vertical planes. Role in vertical vestibulospinal reflexes of the decerebrate cat. *J Neurophysiol* 67, 639-647.
- Crone S.A., Quinlan K.A., Zagoraiou L., Droho S., Restrepo C.E., Lundfald L., Endo T., Setlak J., Jessell T.M., Kiehn O., Sharma K. (2008). *Neuron* 60, 70-83
- Cullen, K.E. (2012). The vestibular system: multimodal integration and encoding of self-motion for motor control. *Trends Neurosci* 35, 185-196.
- Diaz, C., and Glover, J.C. (2002). Comparative aspects of the hodological organization of the vestibular nuclear complex and related neuron populations. *Brain Res Bull* 57, 307-312.
- Di Bonito M, Boulland JL, Krezel W, Setti E, Studer M, Glover JC. (2015). Loss of Projections, Functional Compensation, and Residual Deficits in the Mammalian Vestibulospinal System of Hoxb1-Deficient Mice. *eNeuro*. 2, 0096-15.
- Dickinson, M.H., Farley, C.T., Full, R.J., Koehl, M.A., Kram, R., and Lehman, S. (2000). How animals move: an integrative view. *Science* 288, 100-106.
- Doganli, C., Bukata, L., and Lykke-Hartmann, K. (2016). Whole-Mount Immunohistochemistry for Anti-F59 in Zebrafish Embryos (1-5 Days Post Fertilization (dpf)). *Methods Mol Biol* 1377, 365-369.
- Dong, T.X., Othy, S., Jairaman, A., Skupsky, J., Zavala, A., Parker, I., Dynes, J.L., and Cahalan, M.D. (2017). T-cell calcium dynamics visualized in a ratiometric tdTomato-GCaMP6f transgenic reporter mouse. *eLife* 6.
- Dougherty K.J., Zagoraiou L., Satoh D., Rozani I., Doobar S., Arber S., Jessell T.M., Kiehn O. (2013). Locomotor rhythm generation linked to the output of spinal shox2 excitatory interneurons. *Neuron* 80, 920-933

- Dunsky, A., Zeev, A., Netz, Y. (2017). Balance Performance Is Task Specific in Older Adults. *Biomed Res Int.* 2017, 6987017.
- Ehrlich, D.E., and Schoppik, D. (2017). Control of Movement Initiation Underlies the Development of Balance. *Curr Biol* 27, 334-344.
- Favre-Bulle, I.A., Stilgoe, A.B., Rubinsztein-Dunlop, H., and Scott, E.K. (2017). Optical trapping of otoliths drives vestibular behaviours in larval zebrafish. *Nature communications* 8, 630.
- Favre-Bulle, I.A., Vanwalleghem, G., Taylor, M.A., Rubinsztein-Dunlop, H., and Scott, E.K. (2018). Cellular-Resolution Imaging of Vestibular Processing across the Larval Zebrafish Brain. *Curr Biol* 28, 3711-3722 e3713.
- Forbes, P.A., Siegmund, G.P., Schouten, A.C., and Blouin, J.S. (2014). Task, muscle and frequency dependent vestibular control of posture. *Front Integr Neurosci* 8, 94.
- Gahtan, E., Sankrithi, N., Campos, J.B., O'Malley, D.M. (2002). Evidence for a widespread brain stem escape network in larval zebrafish. *J Neurophysiol.* 87, 608-614
- Goulding M. (2009). Circuits controlling vertebrate locomotion: moving in a new direction. *Nat Rev Neurosci.* 10, 507-518
- Goulding M., Pfaff S.L. (2005). Development of circuits that generate simple rhythmic behaviors in vertebrates. *Curr Opin Neurobiol.* 26,2989-3002
- Haines, L., Neyt, C., Gautier, P., Keenan, D.G., Bryson-Richardson, R.J., Hollway, G.E., Cole, N.J., and Currie, P.D. (2004). Met and Hgf signaling controls hypaxial muscle and lateral line development in the zebrafish. *Development* 131, 4857-4869.
- Hamling, K.R., Harmon, K., Greaney, M., Dobler, Z., Kimura, Y., Higashijima, S.-i., and Schoppik, D. (2021). Synaptic Encoding of Vestibular Sensation Regulates Movement Timing and Coordination. *bioRxiv*, 2021.2007.2005.451142.
- Hayashi M., Hinckley C.A., Driscoll S.P., Moore N.J., Levine A.J., Hilde K.L., Sharma K., Pfaff S.L. (2018). Graded Arrays of Spinal and Supraspinal V2a Interneuron Subtypes Underlie Forelimb and Hindlimb Motor Control. *Neuron* 97, 869-884.
- Harvey, C., Baliga, V.B., Lavoie, P., and Altshuler, D.L. (2019). Wing morphing allows gulls to modulate static pitch stability during gliding. *J R Soc Interface* 16, 20180641.
- Hatta, K., Tsujii, H., and Omura, T. (2006). Cell tracking using a photoconvertible fluorescent protein. *Nat Protoc* 1, 960-967.
- Higashijima, S., Okamoto, H., Ueno, N., Hotta, Y., and Eguchi, G. (1997). High-frequency generation of transgenic zebrafish which reliably express GFP in whole muscles or the whole body by using promoters of zebrafish origin. *Dev Biol* 192, 289-299.
- Hoang P.T., Chalif J.I., Bikoff J.B., Jessell T.M., Mentis G.Z., Wichterle H. (2018). Subtype Diversification and Synaptic Specificity of Stem Cell-Derived Spinal Interneurons. *Neuron* 100,135-149.
- Horak, F.B. (2006). Postural orientation and equilibrium: what do we need to know about neural control of balance to prevent falls? *Age Ageing.* 35 Suppl 2.
- Hubbard J.M., Böhm U.L., Prendergast A., Tseng P.B., Newman M., Stokes C., Wyart C. (2016). Intraspinal Sensory Neurons Provide Powerful Inhibition to Motor Circuits Ensuring Postural Control during Locomotion. *Curr Biol.* 26, 2841-2853.

- Isu, N., Uchino, Y., Nakashima, H., Satoh, S., Ichikawa, T., and Watanabe, S. (1988). Axonal trajectories of posterior canal-activated secondary vestibular neurons and their coactivation of extraocular and neck flexor motoneurons in the cat. *Exp Brain Res* 70, 181-191.
- Kiehn O. (2016). Decoding the organization of spinal circuits that control locomotion. *Nat Rev Neurosci.* 17,224-238
- Kimura, Y., Hisano, Y., Kawahara, A., and Higashijima, S.-i. (2014). Efficient generation of knock-in transgenic zebrafish carrying reporter/driver genes by CRISPR/Cas9-mediated genome engineering. *Sci Rep* 4.
- Kimura, Y., Satou, C., Fujioka, S., Shoji, W., Umeda, K., Ishizuka, T., Yawo, H., and Higashijima, S.I. (2013). Hindbrain V2a Neurons in the Excitation of Spinal Locomotor Circuits during Zebrafish Swimming. *Curr Biol* 23, 843-849.
- Le Mouel, C., and Brette, R. (2017). Mobility as the Purpose of Postural Control. *Front Comput Neurosci* 11, 67.
- Lister, J.A., Robertson, C.P., Lepage, T., Johnson, S.L., and Raible, D.W. (1999). nacre encodes a zebrafish microphthalmia-related protein that regulates neural-crest-derived pigment cell fate. *Development* 126, 3757-3767.
- Liu, Z., Kimura, Y., Higashijima, S.I., Hildebrand, D.G.C., Morgan, J.L., and Bagnall, M.W. (2020). Central Vestibular Tuning Arises from Patterned Convergence of Otolith Afferents. *Neuron* 108, 748-762 e744.
- Liu, Z., Hildebrand, D.G.C., Morgan, J.L., Jia, Y., Slimmon, N., Bagnall, M.W. (2022). Organization of the gravity-sensing system in zebrafish. *Nat Commun.* 13, 5060.
- Lundfald L., Restrepo C.E., Butt S.J., Peng C.Y., Droho S., Endo T., Zeilhofer H.U., Sharma K., Kiehn O. (2007). Phenotype of V2-derived interneurons and their relationship to the axon guidance molecule EphA4 in the developing mouse spinal cord. *Eur J Neurosci.* 11,2989-3002.
- MacKinnon, C.D. (2018). Sensorimotor anatomy of gait, balance, and falls. *Handb Clin Neurol.* 5, 3-26.
- Maki, B.E., McIlroy, W. E. (1997). The role of limb movements in maintaining upright stance: the "change-in-support" strategy. *Pys Ther.* 77, 488-507.
- Maki, B.E., McIlroy, W.E., and Fernie, G.R. (2003). Change-in-support reactions for balance recovery. *IEEE Eng Med Biol Mag* 22, 20-26.
- Markham, C.H. (1987). Vestibular control of muscular tone and posture. *Can J Neurol Sci.* 3, 493-496.
- McCall, A.A., Miller, D.M., and Yates, B.J. (2017). Descending Influences on Vestibulospinal and Vestibul sympathetic Reflexes. *Front Neurol* 8, 112.
- McLean, D.L., Fan, J., Higashijima, S., Hale, M.E., Fetcho, J.R. (2007). A topographic map of recruitment in spinal cord. *Nature.* 446, 71-75
- McLean D.L., Masino M.A., Koh I.Y., Lindquist W.B., Fetcho J.R. (2008). Continuous shifts in the active set of spinal interneurons during changes in locomotor speed. *Nst Neurosci.* 12, 1419-1429
- McRaven, C., Tanese, D., Zhang, L., Yang, C.-T., Ahrens, M.B., Emiliani, V., and Koyama, M. (2020). High-throughput cellular-resolution synaptic connectivity mapping in vivo with concurrent two-photon optogenetics and volumetric Ca²⁺ imaging. *bioRxiv*, 2020.2002.2021.959650.
- Menelaou, E., McLean, D.L. (2012). A gradient in endogenous rhythmicity and oscillatory drive matches recruitment order in an axial motor pool. *J Neurosci.* 32, 10925-10939
- Menelaou E., McLean D.L. (2019). Hierarchical control of locomotion by distinct types of spinal V2a interneurons in zebrafish. *Nat Commun.* 10, 4197

- Metcalfe, W.K., Mendelson, B., and Kimmel, C.B. (1986). Segmental homologies among reticulospinal neurons in the hindbrain of the zebrafish larva. *JCompNeurol* *251*, 147-159.
- Migault, G., van der Plas, T.L., Trentesaux, H., Panier, T., Candelier, R., Proville, R., Englitz, B., Debregeas, G., and Bormuth, V. (2018). Whole-Brain Calcium Imaging during Physiological Vestibular Stimulation in Larval Zebrafish. *Curr Biol* *28*, 3723-3735 e3726.
- Minor, L.B., McCrea, R.A., and Goldberg, J.M. (1990). Dual projections of secondary vestibular axons in the medial longitudinal fasciculus to extraocular motor nuclei and the spinal cord of the squirrel monkey. *Exp Brain Res* *83*, 9-21.
- Morasso P., Bottaro A., Casadio M., Sanguineti V. (2005). Preflexes and internal models in biomimetic robot systems. *Cognitive Processing* *6*, 25-36.
- Murray AJ, Croce K, Belton T, Akay T, Jessell TM. (2018). Balance Control Mediated by Vestibular Circuits Directing Limb Extension or Antagonist Muscle Co-activation. *Cell Rep.* *22*, 1325-1338.
- Nicolson, T. (2005). The genetics of hearing and balance in zebrafish. *Annu Rev Genet* *39*, 9-22.
- Olechowski-Bessaguet, A. , Grandemange, R., Cardoit, L., Courty, E., Lambert, F.M., Le Ray D. (2020). Functional organization of vestibulospinal inputs on thoracic motoneurons responsible for trunk postural control in *Xenopus*. *J Physiol.* *598*, 817-838
- Orger, M.B., Kampff, A.R., Severi, K.E., Bollmann, J.H., and Engert, F. (2008). Control of visually guided behavior by distinct populations of spinal projection neurons. *Nat Neurosci* *11*, 327-333.
- Peterson, B.W. (2004). Current approaches and future directions to understanding control of head movement. *Prog Brain Res* *143*, 369-381.
- Peterson, B.W., Fukushima, K., Hirai, N., Schor, R.H., and Wilson, V.J. (1980). Responses of vestibulospinal and reticulospinal neurons to sinusoidal vestibular stimulation. *J Neurophysiol* *43*, 1236-1250.
- Riley, B.B., and Moorman, S.J. (2000). Development of utricular otoliths, but not saccular otoliths, is necessary for vestibular function and survival in zebrafish. *J Neurobiol* *43*, 329-337.
- Sankrithi, N.S., O'Malley, D.M. (2010). Activation of a multisensory, multifunctional nucleus in the zebrafish midbrain during diverse locomotor behaviors. *Neuroscience.* *166*, 970-993
- Satou, C., Kimura, Y., and Higashijima, S. (2012). Generation of multiple classes of V0 neurons in zebrafish spinal cord: progenitor heterogeneity and temporal control of neuronal diversity. *J Neurosci* *32*, 1771-1783.
- Satou, C., Kimura, Y., Hirata, H., Suster, M.L., Kawakami, K., and Higashijima, S. (2013). Transgenic tools to characterize neuronal properties of discrete populations of zebrafish neurons. *Development* *140*, 3927-3931.
- Satou, C., Sugioka, T., Uemura, Y., Shimazaki, T., Zmarz, P., Kimura, Y., and Higashijima, S.I. (2020). Functional Diversity of Glycinergic Commissural Inhibitory Neurons in Larval Zebrafish. *Cell Rep* *30*, 3036-3050 e3034.
- Schepens, B., Drew, T. (2004). Independent and convergent signals from the pontomedullary reticular formation contribute to the control of posture and movement during reaching in the cat. *J Neurophysiol.* *92*, 2217-2238.
- Schoppik, D., Bianco, I.H., Prober, D.A., Douglass, A.D., Robson, D.N., Li, J.M.B., Greenwood, J.S.F., Soucy, E., Engert, F., and Schier, A.F. (2017). Gaze-Stabilizing Central Vestibular Neurons Project Asymmetrically to

- Extraocular Motoneuron Pools. *J Neurosci* 37, 11353-11365.
- Severi, K.E., Portugues, R., Marques, J.C., O'Malley, D.M., Orger, M.B., and Engert, F. (2014). Neural control and modulation of swimming speed in the larval zebrafish. *Neuron* 83, 692-707.
- Shimazaki, T., Tanimoto, M., Oda, Y., and Higashijima, S.I. (2019). Behavioral Role of the Reciprocal Inhibition between a Pair of Mauthner Cells during Fast Escapes in Zebrafish. *J Neurosci* 39, 1182-1194.
- Song J., Pallucchi I., Ausborn J., Ampatzis K., Bertuzzi M., Fontanel P., Picton L.D., El Manira A. (2020). Multiple Rhythm-Generating Circuits Act in Tandem with Pacemaker Properties to Control the Start and Speed of Locomotion. *Neuron* 105, 1048-1061.
- Straka, H., and Baker, R. (2013). Vestibular blueprint in early vertebrates. *Front Neural Circuits* 7, 182.
- Stewart, W.J., McHenry, M.J. (2010). Sensing the strike of a predator fish depends on the specific gravity of a prey fish. *J Exp Biol.* 15, 3769-3777.
- Sugiuchi, Y., Kakei, S., Izawa, Y., and Shinoda, Y. (2004). Functional synergies among neck muscles revealed by branching patterns of single long descending motor-tract axons. *Prog Brain Res* 143, 411-421.
- Talbot, J.C., Teets, E.M., Ratnayake, D., Duy, P.Q., Currie, P.D., and Amacher, S.L. (2019). Muscle precursor cell movements in zebrafish are dynamic and require Six family genes. *Development* 146.
- Taniguchi, A., Kimura, Y., Mori, I., Nonaka, S., and Higashijima, S.I. (2017). Axially-confined in vivo single-cell labeling by primed conversion using blue and red lasers with conventional confocal microscopes. *Dev Growth Differ* 59, 741-748.
- Tanimoto, M., Watakabe, I., and Higashijima, S. (2022). Tilttable objective microscope visualizes discrimination of static and dynamic head movement originates at hair cells. *Nat. Commun.* 13, 7622.
- Thiele, T.R., Donovan, J.C., and Baier, H. (2014). Descending control of swim posture by a midbrain nucleus in zebrafish. *Neuron* 83, 679-691.
- Uchino, Y., Sato, H., Zakir, M., Kushiro, K., Imagawa, M., Ogawa, Y., Ono, S., Meng, H., Zhang, X., Katsuta, M., Isu, N., Wilson, V.J. (2001). Commissural effects in the otolith system. *Exp Brain Res.* 136, 421-430.
- Uchino, Y., and Kushiro, K. (2011). Differences between otolith- and semicircular canal-activated neural circuitry in the vestibular system. *Neurosci Res* 71, 315-327.
- Ulluen, Eacute, N, F., Deliagina, T., Orlovsky, G., and Grillner, S. (1995). Spatial orientation in the lamprey. I. Control of pitch and roll. *J Exp Biol* 198, 665-673.
- Urasaki, A., Morvan, G., and Kawakami, K. (2006). Functional dissection of the Tol2 transposable element identified the minimal cis-sequence and a highly repetitive sequence in the subterminal region essential for transposition. *Genetics* 174, 639-649.
- Wang, W.C., and McLean, D.L. (2014). Selective responses to tonic descending commands by temporal summation in a spinal motor pool. *Neuron* 83, 708-721.
- Wang, X., Ono, Y., Tan, S.C., Chai, R.J., Parkin, C., Ingham, P.W. (2011). Prdm1a and miR-499 act sequentially to restrict Sox6 activity to the fast-twitch muscle lineage in the zebrafish embryo. *Development.* 138, 4399-4404.
- Warrick, D.R., Bundle, M.W., and Dial, K.P. (2002). Bird maneuvering flight: blurred bodies, clear heads. *Integr Comp Biol* 42, 141-148.
- Webb, P.W. (2005). Stability and Maneuverability. 281-332.

- Wilson, V.J. (1993). Vestibulospinal reflexes and the reticular formation. *Prog Brain Res Progress in brain research* 97, 211-217.
- Wilson, V.J., and Schor, R.H. (1999). The neural substrate of the vestibulocollic reflex. What needs to be learned. *Exp Brain Res* 129, 483-493.
- Windner, S.E., Steinbacher, P., Obermayer, A., Kasiba, B., Zweimueller-Mayer, J., and Stoiber, W. (2011). Distinct modes of vertebrate hypaxial muscle formation contribute to the teleost body wall musculature. *Dev Genes Evol* 221, 167-178.
- Witts E.C, Murray A.J. (2019). Vestibulospinal contributions to mammalian locomotion. *Curr Opin Physiol Current Opinion in Physiology* 8, 56-62.
- Wolman, M.A., Sittaramane, V.K., Essner, J.J., Yost, H.J., Chandrasekhar, A., and Halloran, M.C. (2008). Transient axonal glycoprotein-1 (TAG-1) and laminin-alpha1 regulate dynamic growth cone behaviors and initial axon direction in vivo. *Neural Dev* 3, 6.
- Zelenin, P.V., Grillner, S., Orlovsky, G.N., and Deliagina, T.G. (2003a). The pattern of motor coordination underlying the roll in the lamprey. *J Exp Biol* 206, 2557-2566.
- Zelenin, P.V., Pavlova, E.L., Grillner, S., Orlovsky, G.N., and Deliagina, T.G. (2003b). Comparison of the motor effects of individual vestibulo- and reticulospinal neurons on dorsal and ventral myotomes in lamprey. *J Neurophysiol* 90, 3161-3167.
- Zelenin P.V., Orlovsky G.N., Deliagina T.G. (2007) Sensory-motor transformation by individual command neurons. *J Neurosci.* 27, 1024-1032.

9. 謝辞

本研究を進めるにあたり、ご指導をしていただきました東島眞一先生と谷本昌志先生に深く感謝申し上げます。私の研究では多くのトランスジェニック魚を使用しました。渡我部育子技術支援員、竹内靖技術職員にはトランスジェニック魚の作成で、また多くの技術支援員の方には、魚の管理をしていただき、大変お世話になりました。木村有希子先生をはじめ神経行動学研究部門の皆様には、数多くのディスカッションをしていただき、研究を深めることができました。生命科学プロGRESSにおいて、渡辺英治先生、椎名信之先生、作田拓先生、檜山武史先生（現岡山大学）にはディスカッションを通してご指導頂きました。所属研究室以外の先生方とのディスカッションを通して、新たな視点で自らの研究を考えるきっかけとなりました。

セクション 4. の研究においては、多くの先生方との共同研究がなければ行えなかった研究です。バルクの RNAseq の実験では、基礎生物学研究所生物機能解析センターの重信秀治先生をはじめ、山口勝司技術員、尾納隆大技術員（現定量生物学研究部門）、兵庫県立大学の二階堂昌孝先生には大変お世話になりました。私にとっても所属研究室にとっても初めての RNAseq の実験で、一から丁寧に実験を教えていただきました。また、理科学研究所脳神経科学研究センターの岡本仁先生にウィルス実験の機会をいただき、柿沼久哉先生には実験のご指導をいただきありがとうございました。単一細胞 RNAseq の実験では、生理学研究所郷康広先生、辰本将司先生に細胞回収以降の段階から解析までしていただき、ありがとうございました。これらの実験では、残念ながらポジティブな結果が得られず断念しましたが、私の視野が広がり、今後の研究人生の糧としていきたいと考えております。




研究以外の面では、所属研究室の当時の大学院生である植村悠人さんと川野幸平さん、技術支援員の皆様に感謝申し上げます。昼食時のプライベートな話や悩み相談を通して、研究へのモチベーションを保つことができました。最後に、大学院博士後期課程に進学することを理解してくれた家族には大変感謝しております。特に、妻の優子さんには生活費の援助や家事育児の面で非常に大きなサポートをしてくださいました。どんなに感謝しても感謝しきれません。本当にありがとうございました。

Biomechanics and neural circuits for vestibular-induced fine postural control in larval zebrafish

Received: 22 September 2022

Accepted: 10 February 2023

Published online: 10 March 2023

 Check for updatesTakumi Sugioka ^{1,2,3}, Masashi Tanimoto ^{1,2,3,4} ✉ & Shin-ichi Higashijima ^{1,2,3,4} ✉

Land-walking vertebrates maintain a desirable posture by finely controlling muscles. It is unclear whether fish also finely control posture in the water. Here, we showed that larval zebrafish have fine posture control. When roll-tilted, fish recovered their upright posture using a reflex behavior, which was a slight body bend near the swim bladder. The vestibular-induced body bend produces a misalignment between gravity and buoyancy, generating a moment of force that recovers the upright posture. We identified the neural circuits for the reflex, including the vestibular nucleus (tangential nucleus) through reticulospinal neurons (neurons in the nucleus of the medial longitudinal fasciculus) to the spinal cord, and finally to the posterior hypaxial muscles, a special class of muscles near the swim bladder. These results suggest that fish maintain a dorsal-up posture by frequently performing the body bend reflex and demonstrate that the reticulospinal pathway plays a critical role in fine postural control.

Maintaining posture is important for survival in many animals. Deviation from desirable body orientation evokes corrective movements to recover the original orientation. When the posture is disturbed, two types of postural correction movements occur in land-walking vertebrates. The first type is vigorous movements (dynamic control); when deviations are large, animals correct their posture by performing stepping or walking¹. The second type is fine movements (static control); upon small deviations, animals correct their posture by adjusting the contractions of anti-gravity muscles². Because the body slightly sways all the time, this fine control is continuously working in land-walking vertebrates when they are standing³.

Vestibular information plays an important role in the neural mechanisms that control posture^{4,5}. The head orientation relative to gravity is received by the otolith organ in the inner ear. The vestibular signal (i.e., tilt) is transmitted to the vestibular nuclei in the hindbrain, and ultimately, the motor commands are sent to the spinal cord. Numerous studies have been conducted to identify the neuronal pathways that are involved in postural controls. These studies

highlight the importance of vestibulo-spinal neurons, which convey the vestibular signal from the vestibular nuclei directly to the spinal cord^{6–8}. In addition to this direct pathway, it is presumed that indirect pathways from the vestibular nuclei through reticulospinal (RS) neurons to the spinal cord also play a role in the vestibular-induced postural responses^{9–12}. In most cases, however, conclusive evidence for the functional importance of the indirect pathways is lacking except for a limited number of recent studies¹³.

The larval zebrafish is a useful animal model to study neuronal circuits for vestibular-dependent postural control. The vestibular system is largely conserved among vertebrates^{14–16}. By 5 days post-fertilization, larvae start maintaining a dorsal-up posture¹⁷, indicating that neuronal circuits for postural control are functional by this stage. The transparent brain enables functional imaging in the animals that are subjected to vestibular stimuli^{18–20}.

For postural correction movements, larval zebrafish can recover from a roll-tilted posture by performing swimming²¹, similar to other fish such as lamprey²². In contrast to this dynamic postural control, it

¹Exploratory Research Center on Life and Living Systems, Okazaki, Aichi 444-8787, Japan. ²National Institute for Basic Biology, Okazaki, Aichi 444-8787, Japan.

³The Graduate University for Advanced Studies, SOKENDAI, Okazaki, Aichi 444-8787, Japan. ⁴These authors jointly supervised this work: Masashi Tanimoto, Shin-ichi Higashijima. ✉ e-mail: tanimoto@nibb.ac.jp; shigashi@nibb.ac.jp

remains unclear whether larval zebrafish (and other fish) possess a fine postural control mechanism to recover from roll-tilted posture. A study showed that an artificial otolith displacement induces a body bend reflex that does not accompany swimming²³. This body bend reflex may be a fine postural correction behavior. However, how the behavior contributes to postural correction remains unknown. Moreover, the neuronal circuits that control this behavior remain unclear.

Here, we examined biomechanics and neural circuits for fine postural control in larval zebrafish. We first showed that without swimming, fish correct their roll-tilted postures using a reflex behavior, which is a slight body bend near the swim bladder. Thus, this study reveals the physiological role of the bend reflex that was previously reported²³. We also provide a physical model for the postural correction mechanism; the bend produces a misalignment between gravity and buoyancy, generating a moment of force with a rotational direction toward recovering the upright posture. We then revealed the neuronal circuits that control the reflex, including the tangential nucleus (a vestibular nucleus) through neurons in the nucleus of the medial longitudinal fasciculus (a class of RS neurons) to the spinal

cord, and finally to the posterior hypaxial muscles. This study highlights the importance of indirect postural control pathways in vertebrates.

Results

Larval zebrafish correct their roll-tilted posture by performing the body bend reflex

To examine whether larval zebrafish possess fine postural control mechanisms, we first observed how fish responded to postural perturbation in the roll axis. A larva was placed in a small chamber, and its behavior was imaged from the frontal and dorsal sides (Fig. 1a, Supplementary Fig. 1a). To focus on mechanisms that were independent on visual information, experiments were performed in a dark room using infrared light illumination. During a leftward tilt of the chamber (Fig. 1a), the larva was also tilted in the left-downward direction due to the viscosity of the surrounding water (Fig. 1b, middle top). The fish returned to the original posture within a few seconds (Fig. 1b, right top; Supplementary Movie 1; note that the dorsal view of the fish became oblique, not vertical, after the postural correction due to rotation of

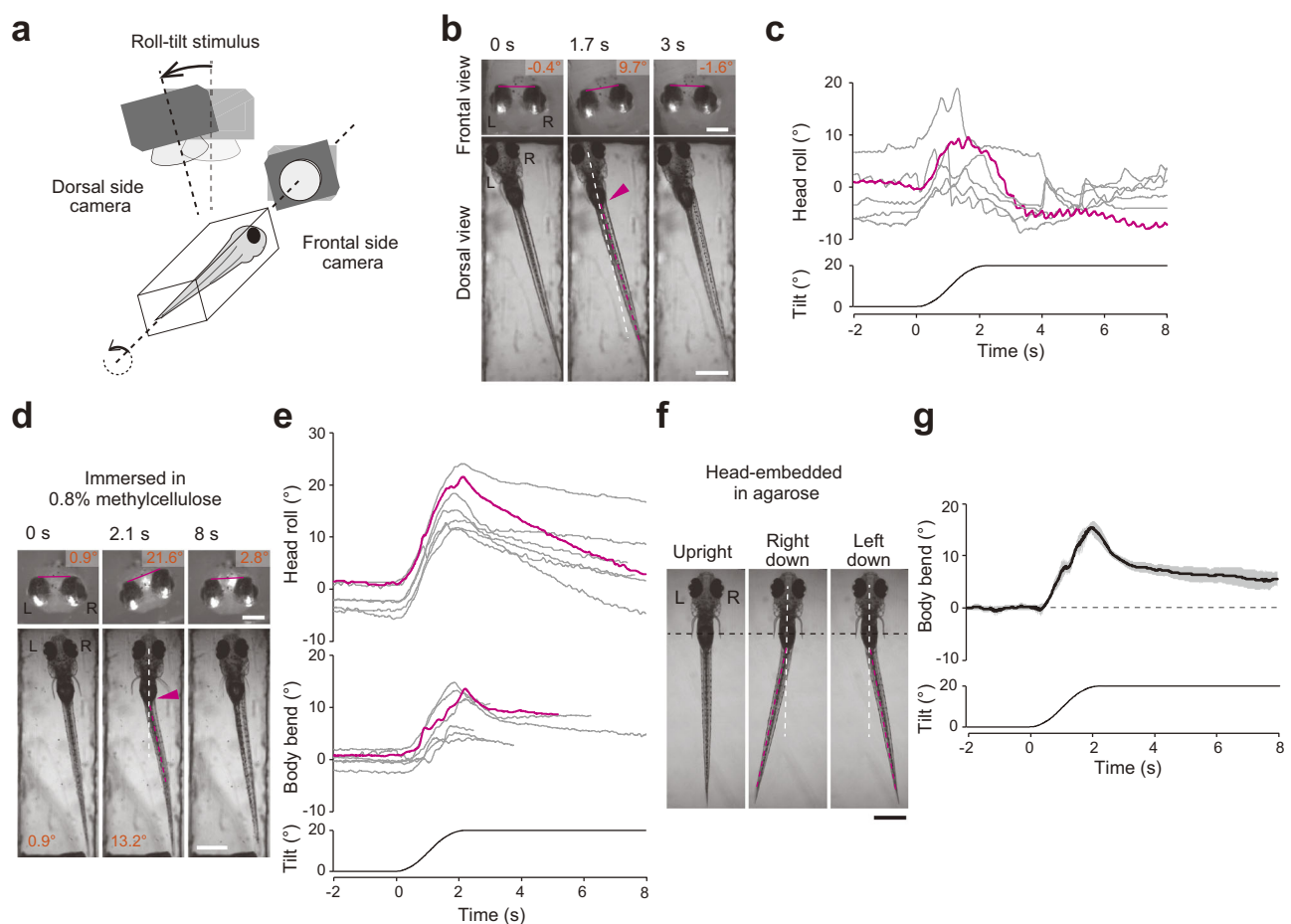


Fig. 1 | Larval fish perform the vestibular-induced bend reflex (VBR) during roll tilt. **a** Schematic illustration of the behavioral imaging. **b** Snapshots of the fish during a left-down tilt. The frontal images are horizontally flipped (mirror-imaged) such that the left–right relationship matches with that of the dorsal images. The bars in the frontal images show the lines connecting the tops of the eyes. Head-roll angles are indicated at the top. The white dashed line denotes the midline of the rostral region of the fish. The magenta dashed line denotes the line connecting the caudal end of the swim bladder and the tail end. The magenta arrowhead indicates a body bend. The dorsal view of the fish became oblique when the fish recovered the posture (3 s) due to rotation of the dorsal side camera. **c** Time course of the head roll angles in response to tilt stimuli. Six trials in a fish are shown. The magenta trace corresponds to the trial shown in **b**, **d**, **e**. Same as **b** and **c**, except fish were in water

containing 0.8% methylcellulose. The body bend angles are shown in the bottom panels in **d**. In the middle panel in **e**, traces of the body bend angles are shown. Traces are terminated when the difference in the tilt angles between the chamber (bottom) and the head (top) exceeded 10° (see Methods). Seven trials from five fish are shown. The magenta traces correspond to the trial shown in **d**. **f** Snapshots of the head-embedded fish imaged from the dorsal side. In the middle and right panels, images of the fish with the maximum bends are shown. The black dashed lines indicate the edge of the agarose. **g** Time course of the body bend angles of a fish in response to tilt stimuli. The average and standard deviation of five trials from one fish are shown using the black line and gray shade, respectively. Scale bars, frontal images in **b**, **d** 200 μm ; dorsal images in **b**, **d**, **f** 500 μm . Source data are provided as a Source Data file.

the dorsal side camera). Fish occasionally performed swimming to correct the perturbed posture during the trials. To focus on fine postural control mechanisms, we only collected trials in which the fish did not perform swimming. The peak of the head roll was observed at approximately 1.7 s under our experimental conditions (Fig. 1c). We measured the angular velocity of the corrective counter-roll movement when the movements were prominent (a 1.5-s time window starting at the peak of the head roll). The median value was $-7.2^\circ/\text{s}$ (Supplementary Fig. 1g). The counter-roll movements often overshoot the upright position, and in many trials, the head roll angles were below the original values (Fig. 1b, c, Supplementary Fig. 1d; median value at 0 s was -3.0° , while that at 4 s was -7.4°). These results indicate that fish have the capability to recover from the roll-tilted posture without performing swimming.

During the postural recovery, rhythmic pectoral fin movements were often observed (Supplementary Movie 1). To examine whether the pectoral fin movements were the main cause for the postural recovery, the same experiments were conducted on fish that had their pectoral fins amputated. The fin-removed fish recovered the upright posture in most of the trials (Supplementary Fig. 1b, c, e; Supplementary Movie 2). The angular velocity amplitude of the counter-roll movement was slightly decreased compared with that of the intact fish (Supplementary Fig. 1g, median values, $-7.2^\circ/\text{s}$ for the intact fish compared with $-6.3^\circ/\text{s}$ for the finless fish, $p = 0.04$). Additionally, the overshooting counter-roll movements were not obvious (Supplementary Fig. 1e, median value, -0.4° at 0 s, and -1.5° at 4 s) and the roll angles at 4 s of fin-removed fish were larger than those of intact fish (Supplementary Fig. 1h, $p = 0.0005$). The slight decrease of the angular velocity amplitude and disappearance of the overshoot suggests that the counter-roll movements became less powerful, and thus, the pectoral fins may partially contribute to the postural recovery. However, the results strongly suggest that the fine postural control in the roll axis is mainly achieved by mechanisms without the pectoral fins.

Upon close examinations of the dorsal side images, we noticed that the body was slightly bending to the ear-up direction near the swim bladder during the recovery phase in both the intact and fin-removed fish (magenta arrowheads in Fig. 1b and Supplementary Fig. 1b; Supplementary Movies 1, 2). We speculated that this body bending contributes to the postural recovery. The bending angle of the body was small, and not highly obvious. We speculated that this is probably because the fish continuously corrected the perturbed posture using the small bend.

To observe the body movement more clearly, we performed the experiments in water containing 0.8% methylcellulose. The expectation was that the high viscosity of methylcellulose solution would slow the postural recovery process, enabling clearer observation of the body movements. The results showed that the postural recovery process was greatly slowed. Upon roll tilt of the chamber, the head roll angle showed a clear increase with its maximum sometimes reaching the maximum tilt angle of the chamber (20°) at ~ 2 s, which corresponded to the end timepoint of the chamber tilt (Fig. 1d, middle top; Fig. 1e). Then, the head roll angle slowly returned toward the original angle between 2 s and 8 s (Fig. 1d, top; Fig. 1e, top; Supplementary Movie 3). The body bent near the swim bladder toward the ear-up direction (arrowhead in Fig. 1d; Supplementary Movie 3). The angle of the body bend increased as the chamber tilted and then slowly decreased as the fish returned to the upright position. The bending consistently occurred in all the trials (Fig. 1e, middle). The results showed that the body bend reflex is associated with the fine postural recovery. In this paper, this behavior is referred to as the vestibular-induced bend reflex (VBR).

As noted above, the degree of the VBR showed a temporal correlation with the head roll angle (Fig. 1e, top and middle). This suggested that the VBR would be pronounced or persistent under conditions where the fish were unable to recover from a tilted posture.

We tested this idea by applying the roll-tilt stimuli to larvae with their heads embedded in agarose. The behavior of the fish during the roll tilt was observed using the apparatus shown in Supplementary Fig. 1i. As expected, the VBR was observed when the fish was tilted (Fig. 1f; similar behaviors were observed in the artificial otolith displacement experiments²³). The tail deflected to the right during the left-down tilt, whereas it deflected to the left during the right-down tilt (Fig. 1f; Supplementary Movie 4). The body bend angle increased as the head tilt angle increased. When the tilt angle reached a constant value (20°), the bend angle began to decrease. However, the angle was kept above 0° , as expected (Fig. 1g). VBR was observed in all the fish tested, although the body bend angle varied across trials and fish examined (Supplementary Fig. 1j).

Our results thus far strongly suggest that VBR is the behavior that corrects a roll tilt. Then, how does the VBR produce the force that recovers upright posture from the roll tilt? We built a simplified model using two forces, as described below. Gravity acts at the center of mass (COM), while buoyancy acts at the center of volume (COV). In larval fish, both the COM and COV are located near the swim bladder²⁴. When a fish is in the upright posture without the VBR, the fish is in an equilibrium state in the roll axis. In this situation, the COM and COV are on the midline, and gravity and buoyancy are antiparallel with the same strength on the same axis (Fig. 2a, left bottom). Upon the roll tilt, a fish performs the VBR with the bend near the swim bladder. This bend deflects head and caudal body toward ear-up side, and in reaction, the body around the swim bladder moves toward the ear-down side (Fig. 2a, right top and middle). With this dogleg-shaped body bend, the positions of the COM and COV change in the body. In the cross-section near the swim bladder around where both the COM and COV are located, the COM and COV are no longer on the midline, and both move toward the ear-up side. However, the degree of the shifts is not equal. This is because the density of the gas-filled swim bladder is smaller than that of the rest of the body. Due to this large difference in density, the COM shifts more laterally than the COV (Fig. 2a, right bottom; for more details, see Supplementary Fig. 1k, l and Discussion). This results in a misalignment between gravity and buoyancy, generating a moment of force that counter-rotates the tilted body to the upright posture (Fig. 2a, right bottom).

If the model described above is correct, swim bladder-deflated fish would not be able to recover from the tilted posture because in this condition, the density of the body has become nearly uniform, and thus, gravity and buoyancy remain aligned on the same axis regardless of the VBR (Fig. 2b, bottom). To verify this idea, we conducted behavioral experiments using fish with deflated swim bladders. To compensate for the decrease in buoyancy in the fish, experiments were performed in water that contained 12.5% sucrose. As expected, the fish was unable to recover the upright posture in most of the trials (Fig. 2c; Fig. 2d, top; Supplementary Movie 5). Population data (Supplementary Fig. 1f) showed that the median head roll angle at 4 s was 15.9° , which was not much different from that at 1.7 s (15.2°). Additionally, the head roll angles at 4 s of swim bladder-deflated fish were significantly larger than those of intact fish (Supplementary Fig. 1h; $p = 4.8 \times 10^{-6}$). These results indicate that the swim bladder-deflated fish lost the ability to recover from the roll-tilted posture. We also found that the VBR continued during the entire period when the fish was roll-tilted (arrowheads in Fig. 2c; Fig. 2d, middle; Supplementary Movie 5). This was probably because swim bladder-deflated fish were unable to recover from the tilted posture, similar to the fish that had its head embedded in agarose. Taken together, these results demonstrate that fish have a fine control mechanism to recover the upright posture in the roll axis without swimming, which is that fish correct their roll-tilted posture by performing the VBR.

TAN-nMLF-PHM pathway may produce the VBR

Next, we explored the neural circuits that are responsible for the VBR during the roll tilt. Previous studies showed that neurons in the

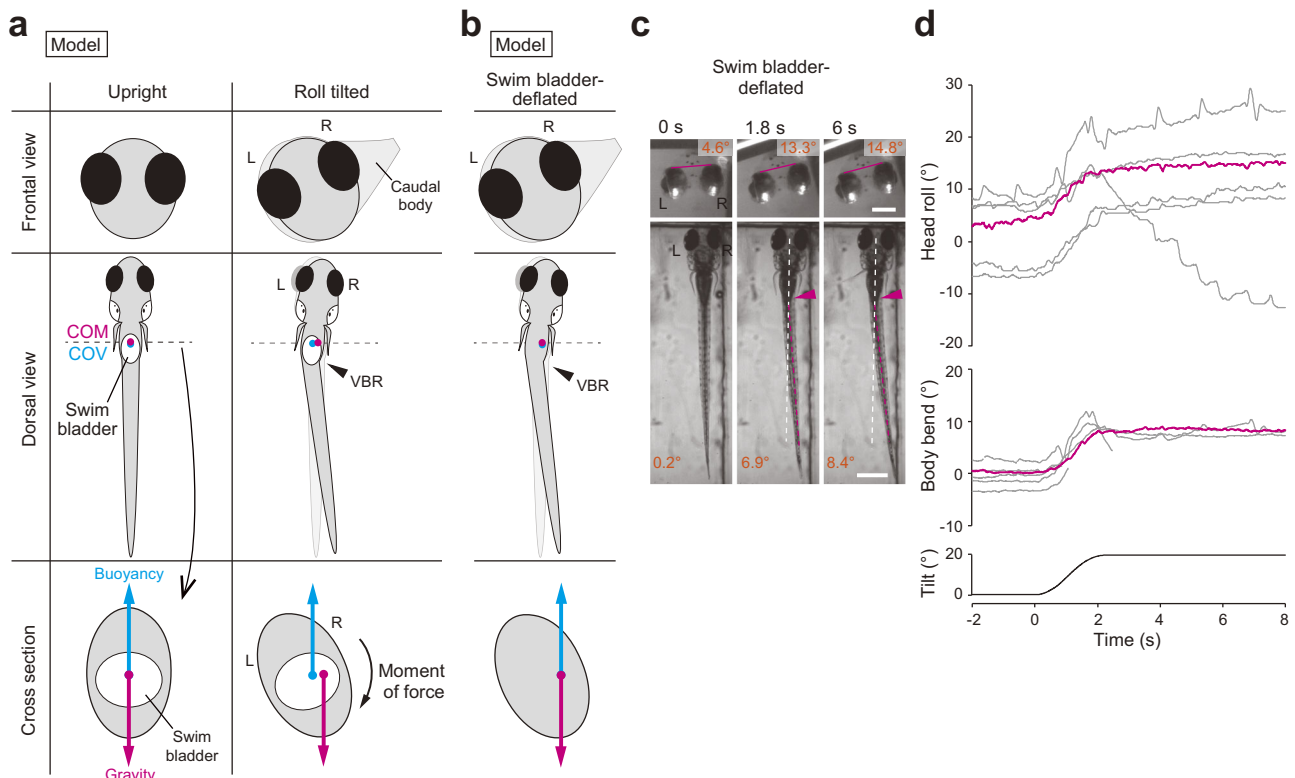


Fig. 2 | Biomechanics for the VBR-mediated postural recovery. **a** A model of postural recovery from roll tilt by the VBR. Frontal and dorsal views and cross-section around the swim bladder. Gravity and buoyancy act at the center of mass (COM) and center of volume (COV), respectively. The COM and COV are located near the swim bladder, and the COM is located slightly rostral to the COV²⁴. In the dorso-ventral axis, the model assumes that the COM and COV are located in the same position. Left: the COM and COV are on the midline. Right: in the fish performing the VBR upon a roll tilt, the head and caudal body move toward the ear-up side, while the body around the swim bladder moves toward the ear-down side (top and middle). The COM and COV move toward the ear-up direction in the cross-section (bottom). The COM moves more laterally than the COV (see main

text). This results in misalignment between gravity and buoyancy, generating a moment of force that counter-rotates the body. **b** A fish model with a deflated swim bladder. Positions of the COM and COV are the same even when fish perform the VBR (middle and bottom). Gravity and buoyancy are antiparallel on the same vertical axis (bottom). This does not generate a moment of force. **c, d** Behavioral experiments on fish with the swim bladder deflated. **c** Snapshots of the frontal and dorsal images of a fish during a left-down tilt. **d** Traces of the head roll and body bend angles of a fish in response to roll tilt. Six trials in one fish are shown. The magenta traces correspond to the trial shown in **c**. Scale bars, frontal images 200 μm ; dorsal images 500 μm . Source data are provided as a Source Data file.

tangential nucleus (TAN), a vestibular nucleus involved in vestibulo-ocular reflex²⁵, were activated during vestibular stimuli^{18,19}. These studies also showed that neurons in the nucleus of medial longitudinal fasciculus (nMLF) were activated. Anatomical evidence showed that nMLF neurons receive axonal projections from neurons in the TAN²⁵. A study reported that a VBR-like behavior occurred upon optogenetic activation of nMLF neurons²⁶. The authors also provided evidence that a class of muscles, called posterior hypaxial muscles (PHMs), is involved in this bending behavior. Based on these previous studies, we hypothesized that the VBR is produced by vestibular inputs through the TAN–nMLF–PHM pathway (Fig. 3). To test this hypothesis, we performed Ca^{2+} imaging and cell-ablation experiments for each cell population in this pathway. The results are described in the sections below.

TAN neurons are active during roll tilt when the ipsilateral ear is down

TAN neurons are located in the lateral-most region in the hindbrain rhombomere 5^{16,25}. To genetically identify TAN neurons, we looked for transgenic fish lines expressing reporter genes in prospective TAN neurons and found that *evx2* transgenic fish met this criterion. In the image shown in Fig. 4a, prospective TAN neurons, which were identified by their position, were highlighted in a *Tg(evx2:Gal4; UAS:Dendra2)* fish^{27,28} using a photoconversion technique. The axons of these neuronal population projected contralaterally and bifurcated to

ascend and descend along the medial longitudinal fasciculus. The ascending axons of TAN neurons extended to the midbrain, while the descending axons reached the third segment of the spinal cord (see also single-cell morphologies; Supplementary Fig. 2a, b). The axonal trajectory of these neurons was identical to that of TAN neurons reported in the previous studies^{25,29}. Thus, we concluded that the labeled neurons in the *evx2* transgenic fish were TAN neurons. Crossing *Tg(evx2:GFP)* to RFP-expressing transgenic fish lines for neurotransmitter phenotypes revealed that GFP-positive TAN neurons were positive for RFP reporters for *vglut1* or *vglut2a* but not for *glyt2* and *gad1b* (Supplementary Fig. 2c), indicating that TAN neurons labeled in *evx2* transgenic fish are mostly excitatory.

We aimed to perform Ca^{2+} imaging in TAN neurons during roll tilts, using the imaging system in which an objective lens and a fish were tilted together using a motorized rotation stage²⁰ (Fig. 4b; Supplementary Fig. 2d). In this imaging system, two-color ratiometric imaging is used to reduce the motion-related artificial fluorescence intensity change during the tilt. Because this study is the first to use a wide-field version of the tiltable objective microscope (note that a confocal microscopy is used in the original version²⁰), we evaluated the level of artifacts upon roll tilts using green/red-Dendra2 (the green Dendra2 was partially photoconverted to red-Dendra2 by ultraviolet light such that TAN neurons contained both green and red-Dendra2; Supplementary Fig. 2e). The amplitude of the green/red ratio change ($\Delta R/R_0$) was confined within ± 0.07 (Supplementary Fig. 2f). Thus,

$\Delta R/R_0$ that is above 0.07 was considered to be signals derived from neuronal activity.

We performed Ca^{2+} imaging in TAN neurons, as a population, using larvae of the *Tg(evx2:tdTomato-jGCaMP7b)* transgenic fish that were generated in this study (jGCaMP7b is a green fluorescent Ca^{2+} indicator, while tdTomato is a calcium-insensitive red fluorescent protein). In a representative example shown in Fig. 4c, a large increase in $\Delta R/R_0$ was observed in the left TAN neuron population when the fish was tilted in the left-down direction. Similarly, a large increase in $\Delta R/R_0$ was observed in the right population when the fish was tilted in the right-down direction. Similar phenomena were observed in other fish (seven fish; Fig. 4d). The maximum ratio changes (0.2–0.5) were much higher than the artificial changes, indicating that TAN neurons were active during the ipsilateral-down (ipsi-down) tilt. TAN neurons also

exhibited slight increases in $\Delta R/R_0$ (0.1–0.2) during the ipsi-up tilt (Fig. 4c, d), but the maximum amplitude during the ipsi-down tilt was larger than that during the ipsi-up tilt (3.2-fold larger for the ipsi-down direction; Fig. 4d). In summary, the results indicate that TAN neurons are highly activated upon ipsi-down roll tilt.

TAN neuron ablation impairs the VBR in the contralateral direction

Next, we examined the necessity of TAN neurons for producing the VBR. For this purpose, we unilaterally ablated TAN neurons using a laser (Fig. 5a; all the GFP-labeled TAN neurons, approximately 18 cells, were subjected to ablation) and examined the VBR performance during roll tilt in the head-embedded condition. When the left TAN neurons were laser ablated (Fig. 5a), the VBR to the right during the left-down tilt was greatly impaired, whereas that to the left during the right-down tilt was largely unaffected (Fig. 5b, c). The VBR performances during ablated-side-down tilts were greatly impaired, and this similar tendency was observed in seven fish (Fig. 5d). As a control ablation experiment, a similar number of *evx2*-positive neurons located ventromedial to the TAN neurons were ablated (Fig. 5e). In these animals, clear VBRs were observed during tilts in both directions (Fig. 5f–h).

Optogenetic activation of TAN neurons induces the VBR in the contralateral side

In addition to the ablation experiments described above, we performed optogenetic activation experiments by expressing channelrhodopsin in TAN neurons using *Tg(evx2:CoChR-GFP)* fish. Optogenetic activation of TAN neurons elicited the VBR with a bend direction that was opposite to the illumination (Fig. 5i–k, o). In a control experiment, optogenetic activation of non-TAN neurons elicited the VBR negligibly (Fig. 5l–n, o). Collectively, the ablation and optogenetic activation experiments indicate that TAN neurons play a critical role in producing the VBR in the contralateral direction.

nMLF neurons are active during ipsilateral-up (contralateral-down) roll tilt

nMLF neurons, a cluster of RS neurons that project axons into the spinal cord along the medial longitudinal fasciculus³⁰, were the next target of our investigation. We performed Ca^{2+} imaging in nMLF

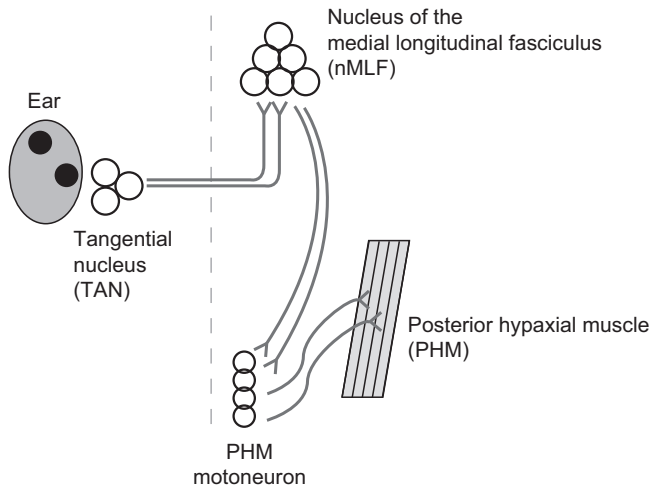


Fig. 3 | A hypothesis of the neuronal circuits that produce the VBR. Vestibular inputs activate neurons in the tangential nucleus (TAN). TAN neurons project to neurons in the nucleus of the medial longitudinal fasciculus (nMLF) on the contralateral side. The axons of the nMLF neurons descend to the spinal cord and project to motoneurons that innervate posterior hypaxial muscles (PHMs). Rostral is toward the top. The dashed line shows the midline.

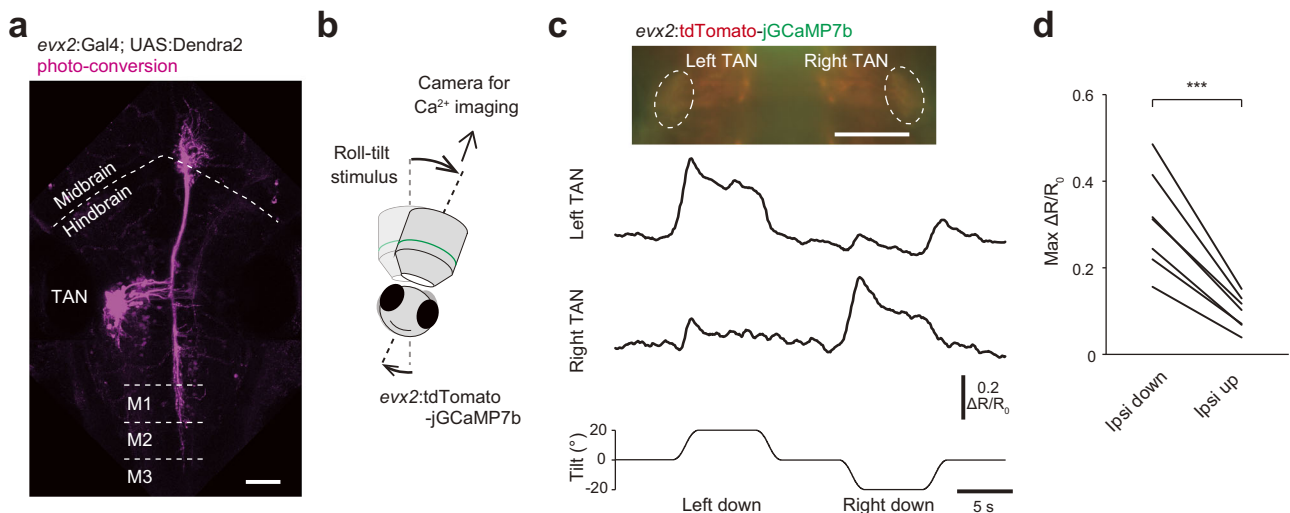
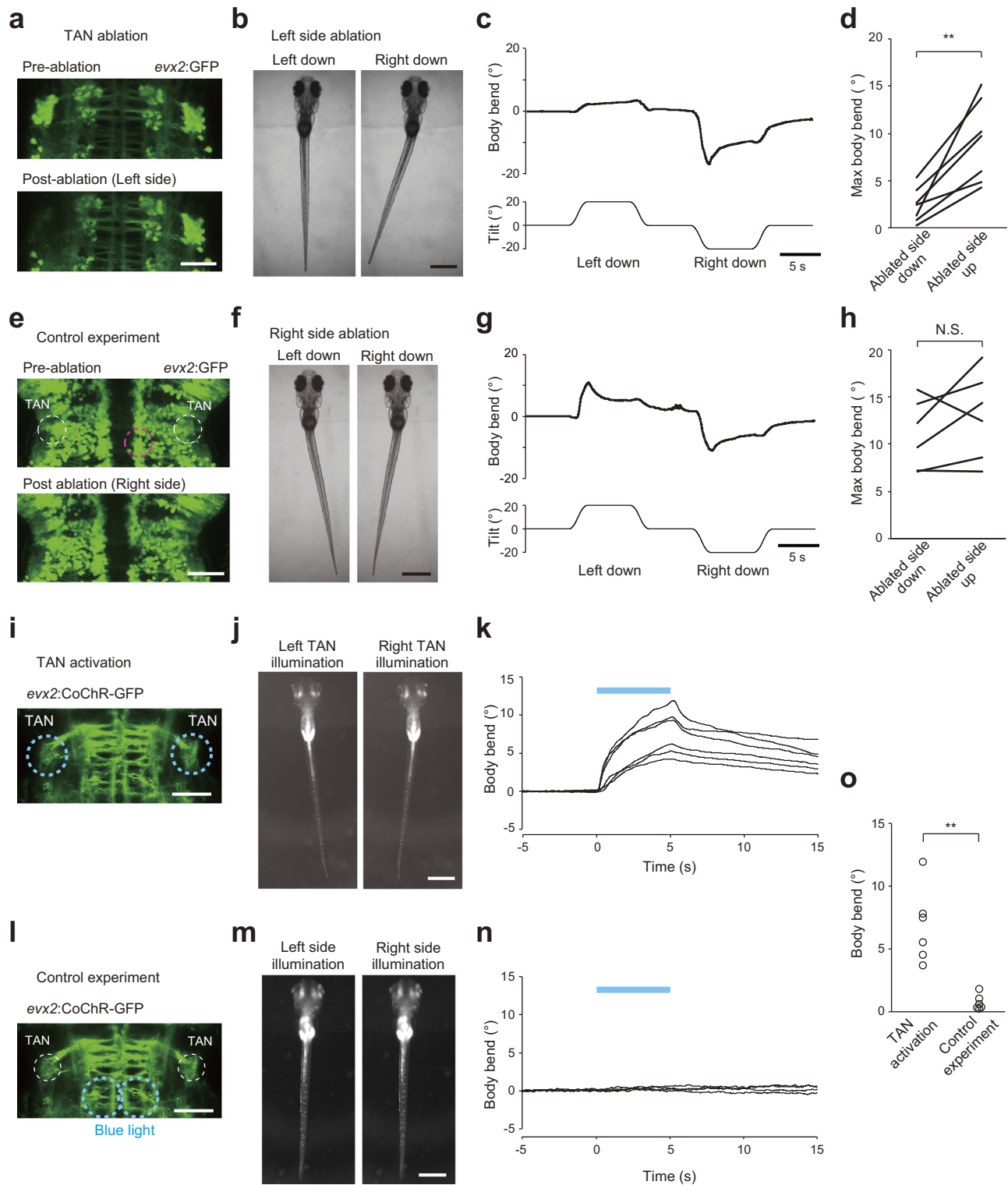


Fig. 4 | Ca^{2+} imaging of TAN neurons during roll tilts. **a** TAN neurons photo-converted from green to red in *Tg(evx2:Gal4; UAS:Dendra2)* at 5 dpf. Confocal stacked image (maximum intensity projection). M1, M2, and M3 indicate the first, second, and third muscle segments, respectively. **b** Schematic of Ca^{2+} imaging experiments. A fish embedded in agarose is imaged using a tiltable objective microscope. **c** Top: image of a *Tg(evx2:tdTomato-jGCaMP7b)* fish.

Middle and bottom: time course of $\Delta R/R_0$ in the TAN neurons in response to a roll tilt. **d** Pairwise comparison of the maximum $\Delta R/R_0$ in TAN neurons between ipsi-down and ipsi-up tilts (seven fish). Four to six trials were performed in a fish, and the average values are shown for each fish. $p = 0.0003$ (two-sided paired samples *t* test). Scale bars, 50 μm . Source data are provided as a Source Data file.



neurons at single-cell resolution using a tiltable objective microscope with a spinning-disk confocal unit²⁰. For this purpose, nMLF neurons were retrogradely labeled with a green chemical fluorescent Ca^{2+} indicator, Cal-520 dextran, and a red chemical fluorescent dye, rhodamine dextran. Figure 6a shows images with a maximum intensity projection and a single optical plane. During the tilt in the ipsi-up direction, a large increase in $\Delta R/R_0$ was observed in subsets of small-sized nMLF neurons (cell #1, #7, and #8 in Fig. 6b). Uniquely identifiable large nMLF neurons (MeLr, MeLc, MeLm), however, exhibited little or a relatively low level of $\Delta R/R_0$ increase during the tilt (cell #4,

#5, and #10 in Fig. 6b). Among all the nMLF neurons examined from ten fish ($n = 330$), approximately one-third of the neurons were obviously active when fish were tilted in the ipsi-up direction (red, orange, yellow, and white color in the pseudo-colored image in Fig. 6c). This conspicuous ipsi-up (contra-down) activity was consistent with our hypothesis, which is shown in Fig. 3 (note that nMLF neurons receive commissural axonal projections from the excitatory TAN neurons). During ipsi-down tilt, in contrast, slight decreases in $\Delta R/R_0$ occurred in many nMLF neurons (the dark blue color becomes more blackish in the pseudo-colored image in Fig. 6c). This suggests

Fig. 5 | Ablation of TAN neurons impairs the VBR, while optogenetic activation of TAN neurons induces the VBR. a–d Ablation of TAN neurons. **a** Confocal stacked images of Tg(*exx2:GFP*) fish before and after laser ablation of left TAN neurons. **b** Behaviors of head-embedded fish during roll tilts. **c** Time course of the body bend angle upon roll tilt. The same trial shown in **b**. **d** Pairwise comparison of the maximum body bend angles between ablated-side-down and ablated-side-up tilts (three fish for left side ablation and four fish for right side ablation). Average values of two to four trials are shown for each fish. $p = 0.003$ (two-sided paired samples *t*-test). **e–h** Control experiment. **e** Confocal stacked images of Tg(*exx2:GFP*) fish before and after laser ablation of non-TAN neurons on the right side (magenta circle). **f** Same as **b** upon a control experiment. **g** Same as **c** upon a control experiment. The same trial shown in **f**. **h** Same as **d** upon a control experiment (two fish for left side ablation and four fish for right side ablation).

Average values of four to six trials are shown for each fish. $p = 0.23$ (two-sided paired samples *t* test). **i–k** Optogenetic activation of TAN neurons. **i** Confocal stacked image of Tg(*exx2:CoChR-GFP*). The blue dotted circles are areas illuminated with blue light. **j** Behaviors of head-embedded fish upon blue light illumination. **k** Time course of the body bend angles. Positive values indicate body bend to the contralateral direction with respect to the illumination. The blue bar indicates illumination that lasts for 5 s. Six trials in a fish are shown. **l–n** Control experiment. **l** Same as **i**, but different areas (blue dotted circles) were illuminated as a control experiment. **m** Same as **j** upon a control experiment. **n** Same as **k** upon a control experiment. Four trials in a fish are shown. **o** Body-bend angle upon optogenetic activation (mean angle between 4 and 5 s). Six fish for each. $p = 0.004$ (two-sided two-sample *t*-test). Scale bars, **a, e, i, l** 50 μm ; **b, f, j, m** 500 μm . Source data are provided as a Source Data file.

that these neurons were slightly inhibited during ipsi-down tilt. To quantify what percentage of neurons were active, we set the threshold to 0.1 for a $\Delta R/R_0$ increase, and neurons with a maximum $\Delta R/R_0$ that was above 0.1 were considered to be active based on the artificial fluorescent intensity changes during the tilt²⁰. Based on this criterion, 41% of neurons (135/330) were active only during the ipsi-up tilt, 15% (48/330) were active during both the ipsi-up and -down tilts, and a small proportion of neurons (8/330, 2%) was active only during the ipsi-down tilt (Supplementary Fig. 3a). Therefore, during the ipsi-up tilt, more than half (55%) of the nMLF neurons were judged to be active.

We further characterized active neurons with respect to their size and position. For the soma size, highly active neurons (e.g., those neurons with a maximum $\Delta R/R_0$ above 0.5) were mostly small with a soma area size that was less than 60 μm^2 (Fig. 6d). As noted above, uniquely identifiable large nMLF neurons (MeLr, MeLc, MeLm, and MeM) exhibited little or a relatively low-level of activity. To investigate the relationship between neuronal activity and soma position, we aligned the imaged neurons in a horizontal plane and in the dorso-ventral axis (Supplementary Fig. 3b, e; see Methods). For the rostro-caudal and medio-lateral axes, no clear relationship was found between the maximum $\Delta R/R_0$ and soma positions (Supplementary Fig. 3c, d). For the dorso-ventral axis, there was a tendency that neurons located dorsally exhibited a higher maximum $\Delta R/R_0$ (Supplementary Fig. 3e).

In summary, Ca^{2+} imaging revealed that a subset of nMLF neurons on the ear-up side was active during the tilt. Among nMLF neurons, highly active neurons were mostly small neurons, and they tended to be dorsally located.

Ablation of nMLF neurons impairs the VBR to the ipsilateral direction

For laser ablation of nMLF neurons, we sought to genetically label them. Previous studies reported that nMLF neurons are labeled in *pitx2* transgenic fish³¹. We first examined the percentage of labeled nMLF neurons in Tg(*pitx2:Dendra2*) (generated in this study) by performing retrograde labeling with rhodamine dye into the larvae of the transgenic fish, and we found that approximately 80% of backfilled nMLF neurons, including small neurons, were positive for Dendra2 (Supplementary Fig. 4). In Tg(*pitx2:Dendra2*) transgenic fish, Dendra2 expression was not limited to nMLF neurons in the brain (Supplementary Fig. 4). To specifically visualize nMLF neurons, we highlighted nMLF neurons using an optical backfill technique³²; Fig. 7a). Then, we unilaterally ablated photoconverted nMLF neurons (all the optically backfilled nMLF neurons, approximately 25 cells, were subjected to laser ablation; Fig. 7b), and the resultant larvae were examined for their VBR performance upon roll tilts.

A representative example is shown in Fig. 7c, d. The larva (left side ablation) exhibited a clear impairment in the leftward VBR during left-up tilt, whereas the rightward VBR during right-up tilt was largely unaffected. The VBR performances during ablated-side-up tilts were greatly impaired, and this similar tendency was observed in eight fish (Fig. 7e). These results (impairments of the VBR to the ablated side) are consistent

with our hypothesis shown in Fig. 3. As a control ablation experiment, a similar number of Dendra2-positive neurons located in the hindbrain were ablated (Fig. 7f). In these animals, clear VBRs were observed during tilts in both directions (Fig. 7g–i). Thus, the ablation experiments indicate that nMLF neurons play an important role for producing the VBR in the ipsilateral direction during the ipsi-up head tilts.

Slow-type PHMs are active during ipsilateral-up (contralateral-down) roll tilt

PHMs, a class of hypaxial muscles that run obliquely near the swim bladder³³, were the last target of our investigation. We first performed anatomical investigations to investigate whether PHMs contained both fast- and slow-type muscles. Images of compound transgenic fish of Tg(*α -actin:GFP*)³⁴ (a marker for fast-type muscles) and Tg(*smyhc2:loxP-RFP-loxP-DTA*) (generated in this study; a marker for a subset of slow-type muscles) revealed that PHMs consisted of both fast- and slow-type muscles with thin slow-type muscles intercalating with thick fast-type muscles (Supplementary Fig. 5a, b). Images also showed that PHMs were divided into three segments (Supplementary Fig. 5a), as previously reported^{35,36}. We defined these segments as the rostral, middle, and caudal segments.

We first focused on slow-type PHMs. The PHMs were imaged from the ventral side with the wide-field version of the tiltable objective microscope (Supplementary Fig. 2d). In Ca^{2+} imaging of the PHMs, artificial fluorescent changes were derived not only from the tilt of a sample (Supplementary Fig. 2e, f), but also from muscle displacement during the VBR. To estimate the level of artifacts in this experiment, we used Tg(*pitx2:Dendra2*) fish that express green/red-Dendra2 in slow-type PHMs (Supplementary Fig. 5d, e). During tilt, the maximum $\Delta R/R_0$ was mostly confined within 0.1 (Supplementary Fig. 5f, g).

Next, we performed Ca^{2+} imaging in slow-type PHMs using Tg(*smyhc2:tdTomato-jGCaMP7b*). Simultaneously, behaviors of the head-restrained fish were observed from the dorsal side (Fig. 8a and Supplementary Fig. 5c; see Methods). Fluorescence derived from bilaterally located slow-type PHMs was clearly visible (Fig. 8b). During the imaging experiments, we noticed that slow-type PHMs occasionally exhibited bursts of rhythmic spontaneous activity (Supplementary Fig. 5h; the physiological significance of this activity is unknown). To simplify the analysis, we collected data from the trials in which the bursts of spontaneous activities did not occur. Figure 8c shows an example of $\Delta R/R_0$ from the slow-type PHMs in each segment during roll tilts. Upon a right-up tilt, large increases of $\Delta R/R_0$ were observed in the middle and caudal segments on the right side. Conversely, upon a left-up tilt, large increases of $\Delta R/R_0$ were observed in the middle and caudal segments on the left side. For the rostral segment, increases in $\Delta R/R_0$ upon roll tilts were present, but their amplitude was not large compared with those of the middle and caudal segments. Quantitative analyses of population data collected from six fish are shown in Fig. 8d. All three segments occasionally exhibited small $\Delta R/R_0$ increases that were considered active during the ipsi-down tilt, but mean amplitudes of the maximum $\Delta R/R_0$ during the ipsi-up tilt were larger than those

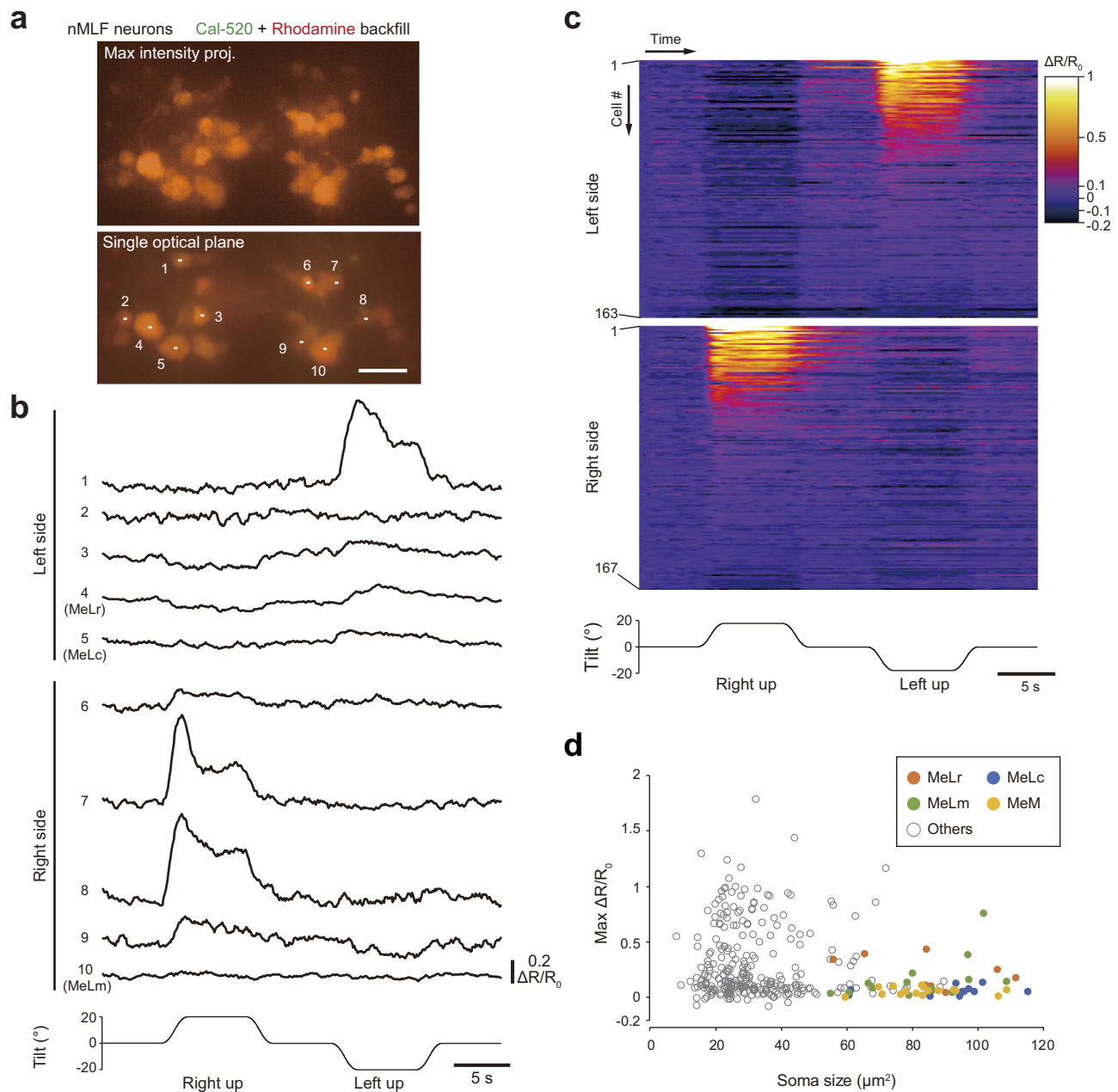


Fig. 6 | Ca^{2+} imaging of nMLF neurons during roll tilts. **a** Top: confocal stacked image of nMLF neurons that were retrogradely labeled with Ca^{2+} indicator, Cal-520, and rhodamine dextran. Bottom: single optical section. Scale bar, 20 μm . **b** Time course of $\Delta R/R_0$ in each neuron in response to roll tilt. The numbers correspond to those in **a**. **c** Color-coded $\Delta R/R_0$ traces of all nMLF neurons (330 neurons from 10

fish, with 163 for the left side and 167 for the right side) in response to a roll tilt. Neurons are grouped by their location (left or right) and are sorted by the maximum $\Delta R/R_0$ during ipsi-up tilt. Neuronal indexes are denoted on the left. **d** Graph showing the maximum $\Delta R/R_0$ during ipsi-up tilt (Y axis) vs. the soma area size (X axis). Source data are provided as a Source Data file.

during the ipsi-down tilt (2.0-fold for the rostral, 5.7-fold for the middle, and 3.5-fold for the caudal segments). Concomitant with the large increase of $\Delta R/R_0$ in slow-type PHMs, the body bent to the side where the PHMs were highly recruited during the roll tilts (Fig. 8c).

We next examined activities of fast-type PHMs. For this purpose, we generated $\text{Tg}(\alpha\text{-actin:tdTomato-jGCaMP7f)$ (Supplementary Fig. 6a). Ca^{2+} imaging in fast-type PHMs revealed no significant increase in $\Delta R/R_0$ in the three segments during the tilt (Supplementary Fig. 6b, c). Collectively, the results of Ca^{2+} imaging indicate that slow-type PHMs, not fast-type PHMs, located in the ear-up side are active when fish perform the VBR. Among slow-type PHMs, those in the middle and caudal segments exhibited higher activity than those in the rostral segment.

Slow-type PHMs play a critical role for producing the VBR

Lastly, we performed genetic ablation experiments on slow-type PHMs. For this purpose, we generated $\text{Tg}(tbx2b:\text{Cre})$ transgenic fish ($tbx2b$ is expressed in migratory muscle precursors including muscle precursors for PHMs³⁶), and crossed the fish with $\text{Tg}(smyhc2:\text{loxP-RFP-loxP-DTA})$ fish. In the resultant compound transgenic fish, Cre-mediated recombination occurred in PHMs, as shown by the absence of RFP in PHMs (Fig. 9a, left panels). This led to the expression of diphtheria toxin A fragment (DTA), which would kill slow-type PHMs. Successful ablation of slow-type PHMs was examined by immunostaining with the S58 antibody. In Cre-negative control sibling fish, slow-type muscles in both the trunk muscles and PHMs were labeled, whereas in the compound transgenic fish, labeling in PHMs

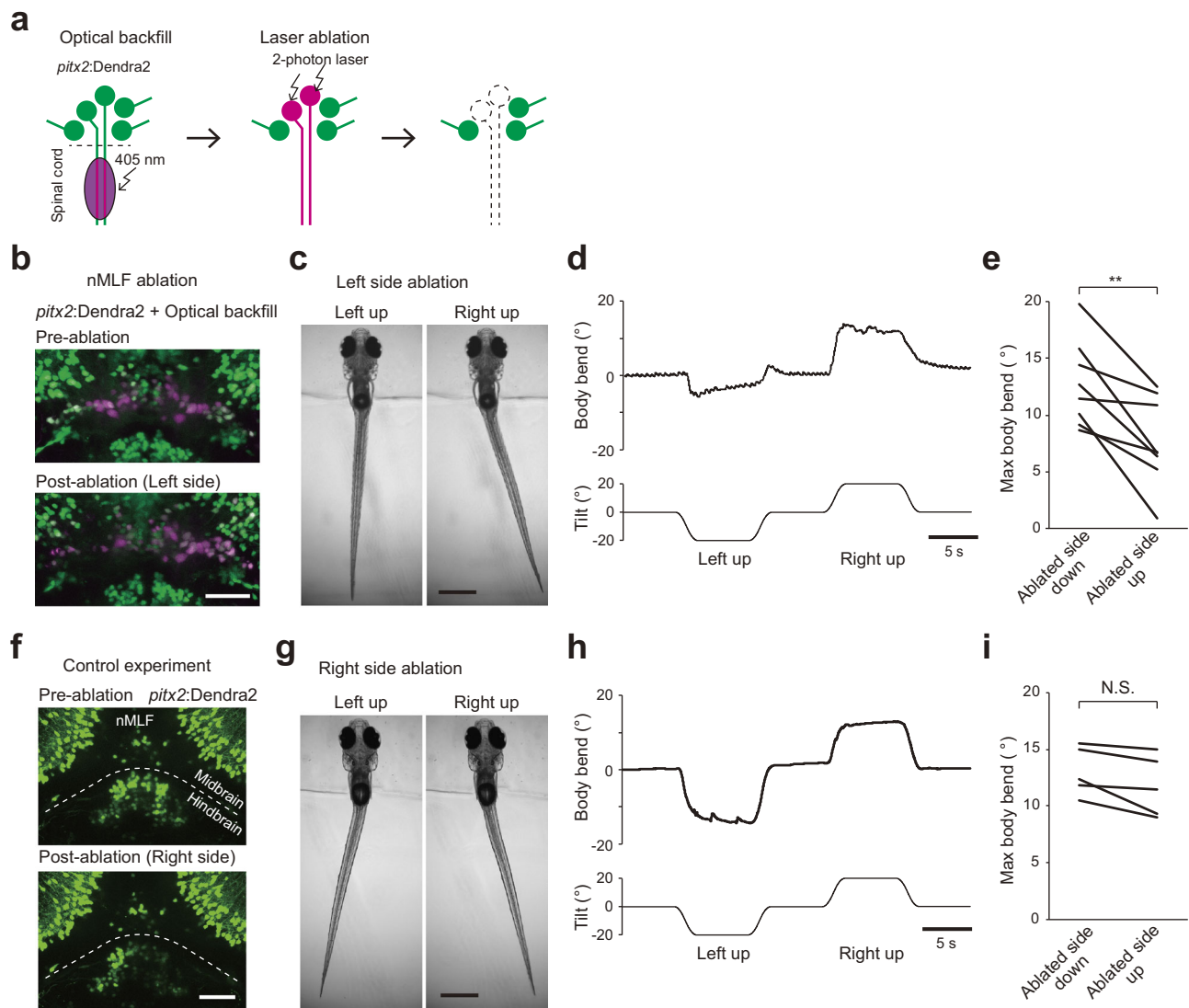


Fig. 7 | Ablation of nMLF neurons impairs the VBR. **a–e** Ablation of nMLF neurons. **a** Schematic showing optical backfill followed by laser ablation of nMLF neurons. **b** Confocal stacked images before (top) and after (bottom) laser ablation of nMLF neurons on the left side. **c** Behaviors of head-embedded fish during roll tilts. **d** Time course of the body bend angle in response to roll tilt. The same trial shown in **c**. **e** Pairwise comparison of maximum body bend angles between ablated-side-down and ablated-side-up tilts (eight fish; four for each side ablation). Average values of at least five trials are shown for each fish. $p = 0.003$ (two-sided paired

samples t test). **f–i** Control experiment. **f** Confocal stacked images fish before (top) and after (bottom) laser ablation of hindbrain neurons (non-nMLF neurons) in *Tg(pitx2:Dendra2)*. **g** Same as **c** upon a control experiment. **h** Same as **d** upon a control experiment. The same trial shown in **g**. **i** Same as **e** upon a control experiment (five fish, with three for left side ablation and two for right side ablation). Average values of five to eight trials are shown for each fish. $p = 0.05$ (two-sided paired samples t -test). Scale bars, **b**, **f** 50 μm ; **c**, **g** 500 μm . Source data are provided as a Source Data file.

was almost completely absent while labeling in the trunk muscles was intact (Fig. 9a, middle and right panels).

We examined the VBR performance of the compound transgenic fish during roll tilt in the head-embedded condition. As shown in Fig. 9b, c, VBRs of these fish were markedly reduced. Quantitative analyses of the population data verified that the maximum body bend angles in the compound transgenic fish were three-times smaller than those in Cre-negative control siblings (six fish for each; Fig. 9d). These results indicate that slow-type PHMs play a critical role for producing the VBR during the roll tilts.

Discussion

Fish possess a capability to recover from a roll-tilted posture by performing swimming^{21,22}. However, it remains unclear whether fish possess a postural control mechanism without swimming. An artificial otolith displacement was shown to induce a body bend

reflex that does not accompany swimming²³, but the physiological role of this behavior was unknown. In this study, we demonstrated that the body bend reflex, which we called VBR, is crucial for the postural recovery from a roll tilt without swimming. We also provided a physical model that explains how the VBR recovers upright posture. When a roll tilt occurs, the fish performs the VBR. This bend deflects the head and caudal body toward the ear-up side, and in reaction, the body around the swim bladder moves toward the ear-down side. Because the swim bladder has a low-density, the VBR unequally shifts the COM and COV. This results in a misalignment between gravity and buoyancy, generating a moment of force with a rotational direction toward recovering the upright posture (Fig. 2a). This model was strongly supported by experiments in which the swim bladder was deflated (Fig. 2b–d). Without gas in the swim bladder, the above-mentioned unequal shifts of the COM and COV would not occur. Fish with deflated swim

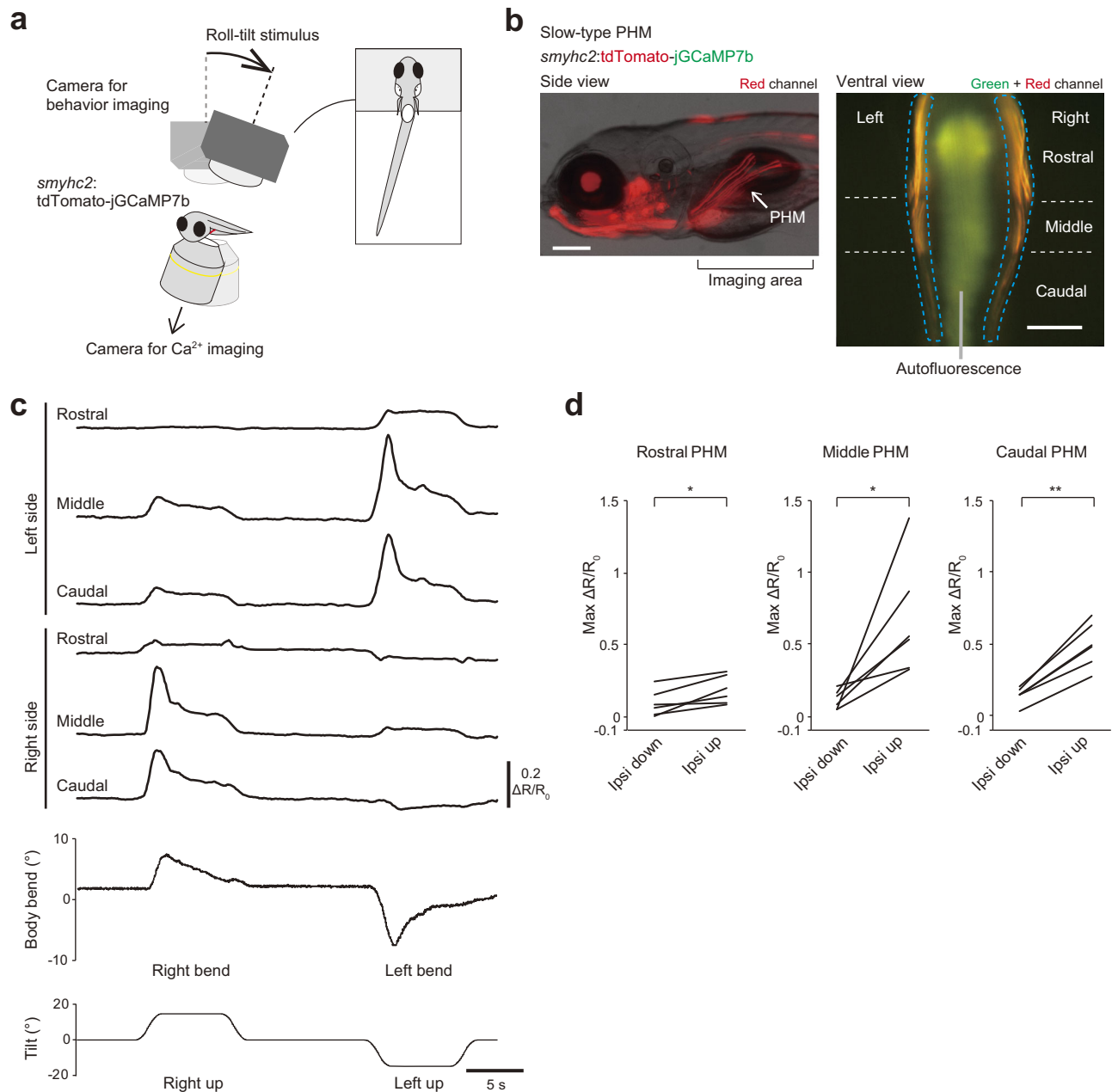


Fig. 8 | Ca^{2+} imaging of slow-type PHMs during roll tilts. **a** Schematic showing simultaneous imaging of Ca^{2+} in PHMs and fish behaviors. **b** Fluorescence images of Tg(*smyhc2:tdTomato-jGCaMP7b*) fish at 6 dpf. Left: lateral view. Red fluorescence and transmitted light images are merged. Right: ventral view of the area around PHMs (“imaging area” in the left panel). Rostral is to the top. Green and red channels are merged. PHMs are bilaterally located (dashed blue lines). They consist of the following three segments: rostral, middle and caudal segments. Autofluorescence

(greenish signal) derived from intestine and yolk is present in the middle. Scale bars, 200 μm . **c** Time course of $\Delta\text{R}/\text{R}_0$ in each segment of slow-type PHMs and body bend angles in response to a roll tilt. **d** Pairwise comparison of maximum $\Delta\text{R}/\text{R}_0$ in each segment of slow-type PHMs between ipsi-down and ipsi-up tilts (six fish). A single trial or average values of two trials are shown for each fish. $p = 0.01$ for the rostral, $p = 0.02$ for the middle, and $p = 0.0006$ for the caudal segments (two-sided paired samples t test). Source data are provided as a Source Data file.

bladders were unable to recover from a tilted posture although they continued to perform the VBR.

Taking physics into account, the absolute location of the COM in space does not change by the body bend with the internal muscular contractions (Supplementary Fig. 1k, l; note that the apparent shift of the COM in the cross-sectional view in Fig. 2a is caused by the lateral movement of the body around the COM). From this view, the VBR can be considered to be a behavior to move the low-density part of the body (i.e. swim bladder) toward the ear-down side, resulting in the lateral shift of the COV (Supplementary Fig. 1l). The strength of the recovery moment of force depends on the separation distance

between the COM and COV. The maximum separation distance (and thus, the maximum moment of force), in theory, can be obtained when the following two conditions are met: (1) the swim bladder, which is the least dense part of the body, is located near the COM; and (2) the body bend occurs near the swim bladder. Indeed, the fish body shape and the bend location fulfill these conditions, as follows: (1) the COM is located near the swim bladder²⁴; and (2) the bend occurs near the swim bladder (Fig. 1d). Our calcium imaging experiments in slow-type PHMs provide further evidence for the bend location. The most conspicuous activities were observed in the middle and caudal segments of PHMs (Fig. 8c). These two segments are located directly lateral or latero-

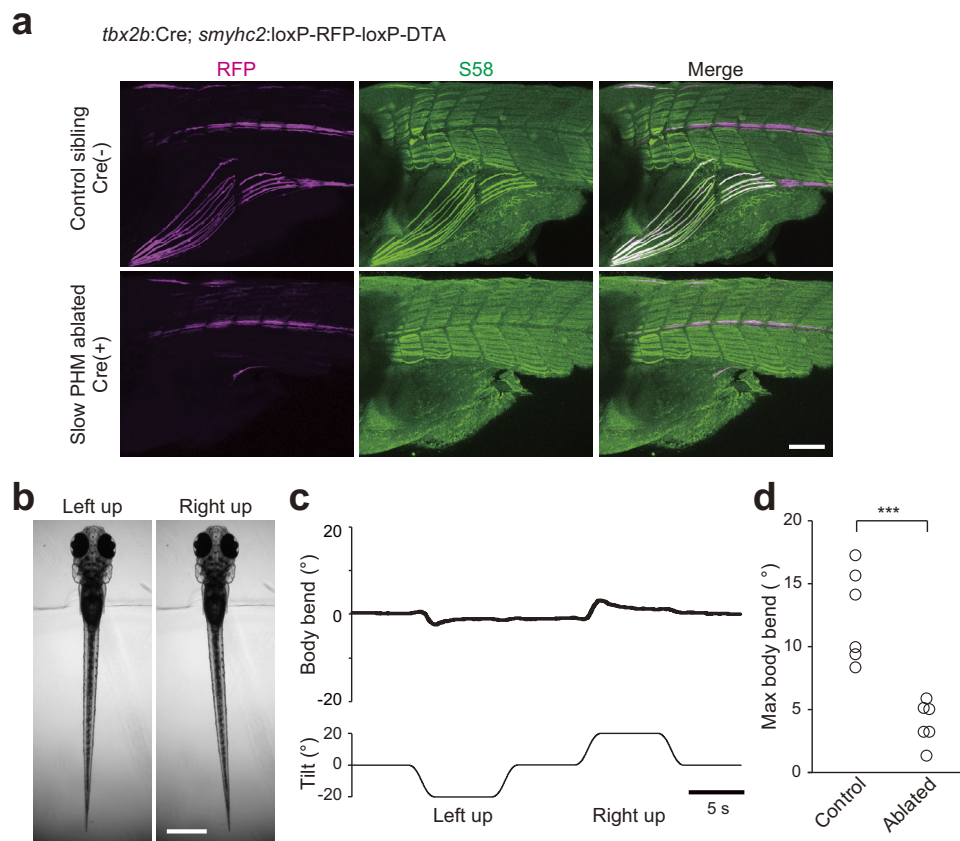


Fig. 9 | Ablation of slow-type PHMs impairs the VBR. a Images of immunohistochemistry with S58 antibody against Tg(*smyhc2:loxP-RFP-loxP-DTA*) fish. Top: images of a fish without *tbx2b:Cre* (control). Bottom: images of a fish with *tbx2b:Cre*. **b** Behaviors of Tg(*tbx2b:Cre; smyhc2:loxP-RFP-loxP-DTA*) fish in the head-embedded condition during roll tilts. **c** Time course of the body bend angle in

response to roll tilt. The same trial as shown in **b**. **d** Maximum body bend angles of control (without Cre) and PHM-ablated (with Cre) fish (six fish for each). Average values of at least five trials are shown for each fish. $p = 0.0004$ (two-sided two-sample *t* test). Scale bars, **a** 100 μm ; **b** 500 μm . Source data are provided as a Source Data file.

caudal to the swim bladder (Supplementary Fig. 5a). Thus, the VBR is a highly reasonable behavior when physics is taken into account, and it is likely to be an energy-efficient behavior for postural correction.

Terrestrial animals are unstable when standing upright, and they maintain their upright posture by continuously performing fine, static postural control^{2,3,37}. In larval zebrafish, the vertical positions of the COM and COV are close to each other²⁴, suggesting that the zebrafish is also unstable in the roll direction. Based on the results of the present study, we suggest that zebrafish keep their dorsal-up posture by frequently performing the VBR upon small disturbances. If so, the postural control by the VBR in fish may correspond to the static control in land-walking vertebrates.

Mechanically, postural recovery of larval zebrafish using the VBR shows similarities with ship stability through use of a misalignment between gravity and buoyancy. However, there is a fundamental difference between the two systems, which is that the ship stability is automatically generated, while the VBR is actively generated with the neural and muscular activities. Theoretically, fish can acquire stability in the roll axis if the COV is located far above the COM (i.e., placing the swim bladder in an extreme dorsal region of the body). Why do larval zebrafish (and perhaps other fish) not adopt this stable design? One possibility is that fish select maneuverability over stability³⁸. Another possibility is that the swim bladder cannot be situated in such an extreme dorsal location owing to the necessity to take up gas from the gastrointestinal tract. In any case, animals are likely to efficiently compensate for instability through use of the fewest movements (i.e., VBR) to achieve stability.

The vestibulo-spinal reflex involves vestibulo-spinal (VS) neurons that project directly to the spinal cord^{6–8}. However, the vestibulo-spinal reflex is thought to be controlled not only by direct pathways through VS neurons, but also by indirect pathways through vestibular nuclei and RS neurons⁹. In lamprey and mammals, RS neurons respond to vestibular stimuli^{39–42}. Recently, the functional importance of RS neurons for the vestibulo-spinal reflex was shown¹³. Our results clearly showed that circuits from neurons in the vestibular nucleus (TAN neurons) to RS neurons (nMLF neurons) play a critical role in the vestibulo-spinal reflex in zebrafish. This study supports the evolutionary conservation and importance of the indirect pathways in vertebrate vestibulo-spinal reflexes.

TAN neurons project to the extraocular motoneurons (nIII and nIV) and are involved in the vestibulo-ocular reflex²⁵. Anatomical studies strongly suggested that, in addition to the nIII and nIV, TAN neurons also directly project to the nMLF neurons^{25,29}. Results of the present study are consistent with this neuronal projection and further revealed that the TAN–nMLF pathway is involved in a postural control. Thus, TAN neurons have dual functions because they play roles in both vestibulo-ocular and vestibulo-spinal reflexes. In mammals, a class of vestibular neurons projects directly to both the extraocular and spinal motoneurons^{43,44}. Thus, the presence of vestibular neurons that are involved in both vestibulo-ocular and vestibulo-spinal reflexes is likely conserved among vertebrate species. Based on the finding of the present study, we expect that in mammals, there are vestibular neurons that control vestibulo-ocular reflex directly and vestibulo-spinal reflex indirectly via RS neurons.

In the nMLF neuron ablation experiments, the body bend was not completely abolished. A likely explanation for this is that not all nMLF neurons were ablated, and the residual nMLF neurons contributed to producing the weakened VBR. Another possibility is that nMLF-independent pathways may be involved in the VBR. A likely candidate for this is the descending axons of TAN neurons. Our anatomical study revealed that the descending axons project to the rostral spinal cord, but do not appear to reach the somata of PHM-motoneurons (Fig. 4a, Supplementary Fig. 6d). Thus, even if the descending axons contribute to producing the VBR, they would exert the action via a polysynaptic pathway.

nMLF neurons are involved in locomotor behaviors^{26,45–47}. A study showed that an optogenetic activation of nMLF neurons elicited a VBR-like bending behavior²⁶. Because the study was performed in the context of examining functional roles of nMLF neurons during swimming, the authors suggested that the bending behavior would play a role in inducing biased swimming to the left or right, thereby enabling fish to change their swimming direction. While this may be a role of bending, our results showed that, independent of swimming, bending has a clear physiological function, which is postural correction in the roll axis.

Because the tilt stimuli occasionally elicit swimming, it is possible that nMLF neuron responses in our experiments may have been associated with the swimming and not associated with the VBR alone. While this possibility cannot be completely ruled out, the observed responses of nMLF neurons were highly asymmetric with almost no activation in the ear-down side (Fig. 6c), which strongly suggests that possible contributions of swimming-associated activities are minimal (note that the swimming-related activities of nMLF neurons occur bilaterally^{26,45}). Furthermore, in our experiments, trials in which there were large displacements of the imaged field (which indicates strong movements by the fish) were excluded from the analyses. This probably contributed to reducing the chance of analyzing swimming-related neuronal activities.

Among nMLF neurons, highly active neurons were mostly small (Fig. 6d). This is consistent with the previous study showing that neurons with smaller somata had a greater impact on VBR-like behavior than those with larger somata²⁶. nMLF neurons with smaller somata project to the rostral spinal cord²⁶, where PHM-motoneurons are located (Supplementary Fig. 6d). Thus, we expect that these small nMLF neurons make monosynaptic connections onto slow-type PHM-motoneurons, although this should be tested using paired electrophysiological recordings.

In this study, we showed that the TAN–nMLF pathway plays a critical role in fine postural control in the roll axis in larval zebrafish. However, TAN–nMLF is not the only pathway that conveys vestibular information to the spinal cord. VS neurons, which have axons that descend along the ipsilateral side of the spinal cord, have long been considered to be a main pathway in postural control^{48,49}, although little is known about their mechanisms of action due to the paucity of knowledge about their output connectivity. Does the VS pathway play a role in postural control in the roll axis? If so, in what situation is it involved? One attractive possibility is that the VS pathway is involved in the postural control during dynamic movements, i.e., swimming. If this is the case, investigating how fish use the two pathways (the ipsilaterally projecting VS pathway and the contralaterally projecting TAN–nMLF pathway) properly or cooperatively, depending on the type of behavior, would be an interesting area of future research.

Similar to fish, many vertebrate species use both fine (static) and vigorous (dynamic) control strategies for correcting posture^{1–3,50,51}. The mechanism of how switching between the two strategies (fine versus vigorous) is achieved is an interesting question, and zebrafish could serve as a good model system to address this issue.

Methods

Animals

All procedures were performed in accordance with the guidelines approved by the animal care and use committees at the National Institute of Natural Sciences. Zebrafish adults, embryos, and larvae were maintained at 28.5 °C. All animals were kept on a 14:10 or 12:12 hour light:dark cycle, except for embryos and larvae expressing channelrhodopsin or Dendra2 proteins, which were kept under dark conditions. Morphological and immunostaining experiments were performed in 5 days post fertilization (dpf) larvae. Behavioral and imaging experiments were performed using 6 dpf larvae. Sex is not yet determined at the larval stage. At 5 dpf, larvae started to be fed.

The following previously published transgenic lines were used: Tg(*evx2*:GFP)⁵², Tg(*evx2*:Gal4)²⁷, Tg(UAS:Dendra2)²⁸, Tg(*vglut2a*:RFP)⁵³, Tg(*glyt2*:RFP)⁵⁴, Tg(*gad1b*:RFP)⁵⁵, Tg(α -*actin*:GFP)³⁴, Tg(*vachta*:Gal4)²⁸, and Tg(UAS:Kaede)⁵⁶. Additionally, Tg(*evx2*:tdTomato-jGCaMP7b), Tg(*evx2*:CoChR-GFP), Tg(*vglut1*:RFP), Tg(*pitx2*:Dendra2), Tg(*smyhc2*:tdTomato-jGCaMP7b), Tg(*smyhc2*:loxP-DsRed-loxP-DTA), and Tg(*tbx2b*:Cre) were generated using the CRISPR/Cas9-mediated knock-in method with the *hsp70* promoter²⁷. The sgRNA sequences for targeting the genes were as follows: ggaggagagagcagaacaga (for *evx2*)²⁷, gagagagactcggcgcgcg (for *vglut1*), gagcttgactgtcagcgcg (for *pitx2*), gacttgattcatctggcg or cacaatgtcgaagctcac (for *smyhc2*: the former was used for the generation of Tg(*smyhc2*:tdTomato-jGCaMP7b) while the latter was used for the generation of Tg(*smyhc2*:hs:loxP-RFP-loxP-DTA)), and ataaagcgaagcggaccg (for *tbx2b*). Tg(*evx2*:CoChR-GFP) was generated using CoChR-GFP-Kv2.1 sequence⁵⁷. Tg(α -*actin*:tdTomato-jGCaMP7f) was generated using the Tol2-mediated transgenesis⁵⁸ with α -*actin* promoter³⁴. Tg(*smyhc2*:tdTomato-jGCaMP7b) and Tg(α -*actin*:tdTomato-jGCaMP7f) were generated with tdTomato-jGCaMP7b or tdTomato-jGCaMP7f fusion construct⁵⁹. Zebrafish lines generated in this study have been deposited to the National BioResource Project in Japan.

Behavioral experiments without head restraint

Behavioral experiments were performed using the device shown in Fig. 1a and Supplementary Fig. 1a. A larval fish at 6 dpf was transferred in a small acrylic chamber (1.2 [length] × 50 [width] × 1 [height] in mm). The chamber was then filled with fish-rearing water, and the top and the front sides were covered with cover slips. Then, the chamber was placed at the intersection of optical paths in a T-shaped unit attached to a motorized rotation stage (Thorlabs, HDR50/M). To take images from both the dorsal and frontal sides of the fish, two pairs of lenses (Olympus, ×5/NA 0.15) were placed on either side. In each lens pair, two lenses were oriented in opposite directions. As a light source, infrared light (Mightex; SLS-0208-E) was positioned ventral to the fish. The dorsal camera (Teledyne FLIR, GS3-U3-23S6M) and frontal camera (Basler, acA640-750um) were placed on the image planes. Tilt stimulus (speed: 15°/s, acceleration, and deceleration: 15°/s²) up to 20° was applied to the left- or right-down directions. Images were taken at 100 frames per second (fps) for both the frontal and dorsal cameras. The two cameras roll-tilted together with the chamber (Fig. 1a, Supplementary Fig. 1a). This means that the dorsal view of the fish became oblique, not vertical, when the fish performed posture-correcting behaviors.

In the experiments of Fig. 1d, e, the fish was immersed in 0.8% methylcellulose solution dissolved in fish-rearing water. For experiments with fin-amputated fish (Supplementary Fig. 1b, c), the fish were temporally anesthetized with 0.02% ethyl 3-aminobenzoate methanesulfonate (MS-222), and the pectoral fins were manually removed using forceps at 5 dpf, which was 1 day before the behavioral experiments. After surgery, the larvae were allowed to recover until the behavioral experiments. In the experiments of Fig. 2c, d, swim bladder-deflated fish were prepared as described below. Three to 4 hours before the

behavioral experiment, the fish was anesthetized using MS-222, and a glass pipette was inserted into the lateral–rostral–dorsal surface on the swim bladder where there was no PHM. The air in the swim bladder was then released. In the behavioral experiments, the fish was immersed in a 12.5% sucrose solution dissolved in fish-rearing water to compensate for the decrease in buoyancy.

Head-restrained behavioral experiments

A larva at 6 dpf was embedded in 2% low-melting point agarose in a small acrylic chamber (12 [length] × 15 [width] × 4 [height] mm). Agarose located caudal to the swim bladder was removed, such that the fish was able to move the caudal body. The chamber was covered with a cover slip. The fish behaviors were filmed using the device shown in Supplementary Fig. 1i. The device was similar to that used to film head-free behaviors as described above, except that the setup for obtaining the frontal view was omitted. The head roll tilt stimulus was applied to the left- or right-down direction as described above. Images of the fish with the maximum bends are shown as examples of the fish's behavior.

Dendra2 photo-conversion in TAN neurons

Five-dpf-fish of Tg(*evx2:Gal4*; UAS:Dendra2) were used for the photo-conversion experiment. A larva was anesthetized in 0.02% MS-222 and embedded in 2% low-melting point agarose on a glass bottom dish in the ventral-up position. The dish was placed under an inverted microscope (Leica microsystems, TCS SP8 MP). A 405-nm laser was applied to the prospective TAN neurons. The fish was kept for at least 3 hours to allow photoconverted Dendra2 protein to be transported to the axons, and confocal imaging was then performed.

Electroporation

For the single-cell labeling by electroporation^{60,61}, a 6-dpf fish of Tg(*evx2:GFP*) was anesthetized in 0.02% MS-222. The fish was embedded in 3% low-melting point agarose dissolved in extracellular solution ((in mM) 134 NaCl, 2.9 KCl, 2.1 CaCl₂, 1.2 MgCl₂, 10 HEPES, and 10 glucose, 290 mOsm, adjusted to pH 7.8 with NaOH). Agarose covering the head was removed. The head skin was peeled off, and a thin layer of dorsal hindbrain was removed by suction through a glass pipette (diameter >10 μm) to allow to access to the tangential nucleus. Tetramethyl-rhodamine was electroporated into a single *evx2:GFP*-positive cell⁶¹. The fish was kept for at least 3 hours to allow the dye to be transported through the axon, and the electroporated cell was then imaged using an upright confocal microscope (Leica microsystems, TCS SP8 MP).

Ca²⁺ imaging setup

Ratiometric Ca²⁺ imaging was performed using a tiltable objective microscope²⁰. An objective lens and the fish were tilted using a motorized rotation stage (Thorlabs, DDR100/M). Blue light was shone onto the sample, and green (Cal-520 or GCaMP, Ca²⁺-dependent signals) and red (tetramethyl-rhodamine dextran or tdTomato) signals were separated using imaging-splitting optics (Hamamatsu Photonics, W-View Gemini). Images of each channel were simultaneously recorded using a single digital camera at 10 fps (Hamamatsu Photonics, ORCA-Flash4.0 V3). For the imaging of nMLF neurons, a spinning-disk confocal scanner (Yokogawa, CSU-X1) was inserted into the illumination and detection light path (the same setup as that used previously²⁰). For the imaging of TAN neurons and PHMs, a wide-field (non-confocal) version of a tiltable objective microscope (Supplementary Fig. 2d) was used. For this setup, the excitation light (Excelitas Technologies, X-Cite exacte) was delivered to the objective lens through an episcopic illuminator (Olympus, BX-URA2). The filters used in the episcopic illuminator were as follows: excitation, BP460-490 (Olympus); dichroic mirror, FF495-Di03 (Semrock); and emission, FF01-512/630 (Semrock). Fluorescence signals were

relayed to the imaging-splitting optics through a tube lens unit (Olympus, U-TR30-2) and a camera adaptor (Olympus, U-TV0.63XC). The filters used in the imaging-splitting optics were as follows: dichroic mirror, DM570 (Olympus); emission for the green channel, FF01-514/30 (Semrock); and emission for the red channel, BA575-625 (Olympus). The tilt stimuli were the same as those described in the behavioral experiments.

Sample preparation for Ca²⁺ imaging

Ca²⁺ imaging was performed using 6 dpf fish with a *nacre* background⁶². A larval fish was mounted in 2% low-melting point agarose in an acrylic chamber (12 [length] × 15 [width] × 4 [height] mm). The chamber was then filled with fish-rearing water and covered with a fluorinated ethylene propylene (FEP) sheet with a refractive index of 1.34, which is close to that of water (1.33). The sample was viewed through the FEP sheet. The fish was mounted in the dorsal-up position for TAN and nMLF neuron imaging or in the ventral-up position for PHM imaging. For simultaneous imaging of Ca²⁺ in PHMs and fish behaviors, agarose located at the caudal body was removed such that the fish was able to move the caudal part of its body.

Ca²⁺ imaging procedures

A fish was placed dorsal side up on a tiltable objective microscope. All images were recorded at 10 fps. For imaging of the TAN neurons in the Tg(*evx2:tdTomato-jGCaMP7b*) fish, Ca²⁺ imaging was performed using a ×20/NA 0.5 water immersion lens (Olympus, UMPLANFL). TAN neurons were bilaterally illuminated using blue light (4.3 mW/mm² power at the sample) and imaged from the dorsal side. Occasionally, fast shifts of the image occurred during Ca²⁺ imaging, presumably due to the occurrence of escape behaviors by the fish in agarose. The corresponding data were excluded from the analyses.

To image the nMLF, we retrogradely labeled them with 25% (w/v) Cal-520-dextran conjugate and 25% (w/v) dextran tetramethyl-rhodamine mixed in the extracellular solution. The mixture was injected into the second to fourth segments of the spinal cord in a 5 dpf larva using a tungsten pin. The larva was allowed to recover until 6 dpf. Ca²⁺ imaging was performed with a spinning-disk confocal unit with a ×40/NA 0.8 objective lens (Olympus, LUMPLANFL)²⁰. A 488-nm laser (COHERENT, Sapphire 488-50 CDRH) was used as a light source with a laser power of 0.3–1.5 mW/mm² at the sample. nMLF neurons were imaged from the dorsal side. An imaging series was performed from the dorsal to the ventral plane and vice versa. For each fish, imaging of each plane was conducted only once owing to the desensitization of Cal-520.

In Ca²⁺ imaging of PHMs, fish behaviors were monitored simultaneously (Fig. 8a, Supplementary Fig. 5c). Ca²⁺ imaging and behavior imaging were performed from the ventral and dorsal sides, respectively. Tg(*smyhc2:tdTomato-jGCaMP7b*) fish were used to image the slow-type PHMs, and Tg(*α-actin:tdTomato-jGCaMP7f*) fish were used to image the fast-type PHMs. The muscle imaging was performed using a ×10/NA 0.3 lens (Olympus, UMPLANFL). Illumination power was 4.2 and 5.7 mW/mm² for the slow- and fast-type PHM imaging, respectively. Fish behaviors were filmed at 100 fps using a camera (Teledyne FLIR, GS3-U3-23S6M) and a lens (Tamron, M118FM50) with infrared light illumination (Mightex, SLS-0208-E). To remove blue light in the behavioral images, a longpass filter (Olympus, BA610IF) was inserted into the optical path.

Evaluation of a wide-field tiltable microscope

Evaluation of the tilt-derived (not neuronal activity-derived) ΔR/R₀ in a wide-field version of the tiltable objective microscope was performed using fish that expressed green/red-Dendra2. Specifically, Dendra2-expressing TAN neurons in the Tg(*evx2:Gal4*; UAS:Dendra2) were briefly illuminated using violet light (400–420 nm) such that green-Dendra2 was partially photo-converted to red-Dendra2.

Observation of the TAN neurons during 20° tilts revealed that the amplitude of tilt-derived $\Delta R/R_0$ was confined within ± 0.07 (Supplementary Fig. 2e, f).

To evaluate the artifacts derived from the tilt of a sample and muscle displacement in the PHM imaging, we used Tg(*pix2:Dendra2*) fish that express Dendra2 at slow-type PHMs. Dendra2 was partially photo-converted, as described above. During tilt, maximum $\Delta R/R_0$ was mostly confined within 0.1, and occasionally up to 0.15 (Supplementary Fig. 5e–g).

TAN neuron ablation

Laser ablation of TAN neurons was performed in Tg(*evx2:GFP*) larvae at 5 dpf. A larva was anesthetized in 0.02% MS-222 and embedded in 1.5% low-melting point agarose in the ventral-up position. Then, the fish was placed under a two-photon inverted microscope (Leica microsystems, TCS SP8 MP). All the GFP-labeled TAN neurons on one side (approximately 18 neurons) were subjected to laser ablation. The ablation was performed using a two-photon laser (wavelength 900 nm; InSight DeepSee 680–1300 nm) with a $\times 40/1.10$ lens (Leica microsystems; No. 11506352 or 11506357). Scanning was immediately terminated when brief flashes of saturating intensity or a sudden decrease in transmitted light image intensity were observed. After laser ablation, the larva was allowed to recover and was fed until 6 dpf. Then, the larva was used for behavioral experiments. Successful ablations were verified after the behavioral experiments by checking for the absence of fluorescence. Fewer than four neurons survived. For a control ablation experiment, approximately 18 GFP-positive neurons located ventromedial to TAN neurons were subjected to laser ablation.

Ablation of nMLF neurons

To ablate nMLF neurons, a combination of optical backfill and laser ablation was used (Fig. 7a). Homozygous Tg(*pix2:Dendra2*) fish were used. First, a larva at 5 dpf was embedded lateral-side-down in 1.5% low-melting point agarose. Then the sample was placed under the inverted microscope (Leica microsystems, TCS SP8 MP). A 405-nm laser was applied from the third to ninth segments of the spinal cord using a $\times 20/0.75$ lens (Leica microsystems, No. 11506344). Five to ten min of illumination was applied every 30 min for four times. After photo-conversion, the fish was removed from the agarose and kept for at least 4 hours under dark conditions. The larva was then re-embedded in the ventral-up position. Next, all the optically backfilled nMLF neurons, ~25 cells, were subjected to laser ablation. Observation of the fluorescence after the behavioral experiments revealed that fewer than six neurons survived. For a control ablation experiment, a similar number (~25) of Dendra2-positive neurons located in the hindbrain were subjected to laser ablation.

Optogenetic activation experiments

Optogenetic activation of TAN neurons was performed in 6 dpf larvae of the Tg(*evx2:CoChR-GFP*) line. A larva was head-embedded in 2% low-melting point agarose in 35 mm glass bottom dish in the dorsal up position. Agarose located caudal to the swim bladder was removed, such that the fish was able to move the caudal body. The fish was placed under an upright microscope (Olympus, BX51WI) with a $\times 20/NA$ 0.5 water immersion objective lens (Olympus, UPLANFLN). A 150- μ m pinhole was inserted at the field-stop position, which allowed us to illuminate a target area that was ~50 μ m in diameter. As a light source, a metal-halide lamp (Excelitas Technologies, X-Cite exacte) was used. The light was filtered using a bandpass filter FF02-482/18 (Semrock). Blue light illumination (2.0 mW/mm²) was delivered to the TAN neurons for 5 s. As a control illumination experiment, *evx2*-positive neurons located medial to the TAN neurons were illuminated. Fish behaviors were filmed from the bottom³² at 50 fps using a $\times 2/NA$ 0.14 objective lens (Olympus, XLFLUOR) and a camera (Teledyne FLIR, GS3-U3-23S6M) with FlyCature2 software (Teledyne FLIR).

Immunohistochemistry

Immunostaining was conducted according to the Zebrafish Book (https://zfin.org/zf_info/zfbook/zfbk.html) and Doganli et al.⁶³. The S58 monoclonal antibody supernatant (DSHB, RRID:AB_528377) was used as a primary antibody under 1:10 dilution conditions. Alexa fluor 488-conjugated goat anti-mouse IgG secondary antibody (Thermo Fisher Scientific, RRID:AB_2534088) was used at a 1:500 dilution.

Labeling PHM-motoneurons by optical backfill

To label PHM-motoneurons (Supplementary Fig. 6d), a Tg(*vachta:Gal4*; UAS:Kaede) larva that was 5 dpf was used. The optical backfill was performed in the same way as the optical backfill of nMLF neurons that was described above. The illumination site of a 405-nm laser was the axons located in the middle and caudal segments of PHMs. After 3 to 4 hours, confocal imaging was performed.

Data analysis

Images were processed using imageJ/Fiji, and numerical data were analyzed using Excel (Microsoft).

Head-roll and body-bend angle

The head roll angle was measured as the angle between the horizontal line and the line connecting the top ends of both eyes. The frontal camera rotated together with the chamber, and therefore, the images were counter-rotated to cancel the rotation. To determine the top ends of both eyes, images were binarized, and the top position of each eye was defined as a mean position of the top 20 pixels. Trials in which the head roll angle before tilt was within $\pm 10^\circ$ were used in the analyses. To denoise, seven-frame moving averages were applied before the analyses. To calculate angular velocity of the counter-roll movements, angular velocity during a 1.5 s time window starting at the peak of the head roll was used.

The body bend angle in the head-free behavior experiment was measured as the angle between the following two lines: (1) line connecting the middle of both eyes and the caudal end of the swim bladder; and (2) line connecting the caudal end of the swim bladder and the tail end. Each point was separately detected by binarizing images. The caudal end of the swim bladder and the tail end were defined as the mean positions of ten and 20 pixels from edges, respectively. In the experiments where methylcellulose was used, the tail was not straight due to the high viscosity. Therefore, the middle point of the tail was used instead of the tail end to measure the body bend angle. The middle point of the tail was defined as half the length of the body from the swim bladder. To denoise, moving averages of seven frames were applied before the analyses. The body bend angle could not be accurately measured when the body was not viewed vertically. Thus, the measurements were terminated when the difference in tilt angle between the chamber and the head exceeded 10° (under these conditions, the dorsal view of the fish was too oblique to measure the bend angle).

In the behavioral experiments with the head embedded in agarose, the body bend angle was measured as described above. The tail end was determined as described above. The position of the middle of both eyes and the caudal end of the swim bladder did not change during the experiments. These two points were manually detected without binarization of the images. The angle before the roll tilts or photo-stimulation was converted to 0° and the body bend angle was shown as the angle difference compared to this default angle. To denoise, seven-frame moving averages were applied.

Data analyses of Ca²⁺ imaging experiments

In the tiltable objective microscopes, the images rotated during the tilt. For registration purposes, green and red channel images were counter-rotated²⁰. Then, the images were translated in the xy direction using Template Matching and Slice Alignment Plugin. Counter-rotation and

translation were performed with interpolation using the bilinear method. The $\Delta R/R_0$ of the region of interest in each frame was calculated, where R_0 was average ratio of the first ten frames. To denoise, seven-frame moving averages were applied, and the maximum $\Delta R/R_0$ s were then calculated.

The positions of the nMLF neurons recorded from different fish were aligned in a horizontal plane using the midline (for medio-lateral axis) and the MeLm position (for rostro-caudal axis). When left and right MeLm neurons were labeled, the caudally located MeLm was used for the alignment. The recorded neurons were aligned along the dorso-ventral axis (z-axis) using the positions of MeLr and MeM as the landmarks. Four zones (z1 to z4) were defined as follows: z1, more dorsal than MeLr; z2, the dorsal half between MeLr and MeM; z3, the ventral half between MeLr and MeM; and z4, more ventral than MeM. The size of the soma area was measured in the plane where the soma was the largest.

Statistics and reproducibility

For most of the experiments, multiple trials were performed in a fish. For the behavioral experiments in the methylcellulose solution, only one or two trials were performed in a fish. This was because the VBR performance worsened in repeated trials in the same fish, presumably due to fatigue of slow-type PHMs. For the Ca^{2+} imaging in slow-type PHMs, one or two trials were analyzed in a fish. This was because trials during which bursts of rhythmic spontaneous activity occurred were excluded from the analysis. In the experiments where multiple trials were performed in a fish, the mean value was calculated, and it was used as a representative result for the fish. In the experiments of Figs. 4a, 9a and Supplementary Figs. 2c, 4, 5a, 5b, 5d, 6d, more than two individual experiments were performed, and results that were similar to the representative images were observed across animals.

Statistical analysis was performed using R. The statistical significance was assessed using paired samples *t*-test, two-sample *t* test, Wilcoxon Exact rank-sum test, or the Steel Dwass test. All tests were two-tailed tests. Before performing paired samples *t* test, the normality of the distribution for the difference values between paired samples was confirmed using the Shapiro–Wilk test. For two-sample *t*-test, the normality of the distribution and the variance were checked using the Shapiro–Wilk test and *F* test, respectively. Statistical results were indicated as follows: *, *p* value <0.05; **, *p* value <0.01; ***, *p* value <0.001; or N.S. (not significant), *p* value \geq 0.05.

Reporting summary

Further information on research design is available in the Nature Portfolio Reporting Summary linked to this article.

Data availability

Source data are provided with this paper.

Code availability

Code used for measurements of head roll/body bend angles and the image registration are available in Zenodo with identifier <https://doi.org/10.5281/zenodo.7583110>.

References

- Maki, B. E., McIlroy, W. E. & Fernie, G. R. Change-in-support reactions for balance recovery. *IEEE Eng. Med. Biol. Mag.* **22**, 20–26 (2003).
- Le Mouel, C. & Brette, R. Mobility as the purpose of postural control. *Front. Comput. Neurosci.* **11**, 67 (2017).
- Morasso, P. B. A. C. M. S. V. Preflexes and internal models in bio-mimetic robot systems. *Cogn. Process.* **6**, 25–36 (2005).
- Cullen, K. E. The vestibular system: multimodal integration and encoding of self-motion for motor control. *Trends Neurosci.* **35**, 185–196 (2012).
- Forbes, P. A., Siegmund, G. P., Schouten, A. C. & Blouin, J. S. Task, muscle and frequency dependent vestibular control of posture. *Front. Integr. Neurosci.* **8**, 94 (2014).
- McCall, A. A., Miller, D. M. & Yates, B. J. Descending influences on vestibulospinal and vestibulosympathetic reflexes. *Front. Neurol.* **8**, 112 (2017).
- Uchino, Y. & Kushiro, K. Differences between otolith- and semi-circular canal-activated neural circuitry in the vestibular system. *Neurosci. Res.* **71**, 315–327 (2011).
- Witts, E. C. & Vestibulospinal, M. A. J. contributions to mammalian locomotion. *Curr. Opin. Physiol. Curr. Opin. Physiol.* **8**, 56–62 (2019).
- Deliagina, T. G., Beloozerova, I. N., Orlovsky, G. N. & Zelenin, P. V. Contribution of supraspinal systems to generation of automatic postural responses. *Front. Integr. Neurosci.* **8**, 76 (2014).
- Peterson, B. W. Current approaches and future directions to understanding control of head movement. *Prog. Brain Res.* **143**, 369–381 (2004).
- Sugiuchi, Y., Kakei, S., Izawa, Y. & Shinoda, Y. Functional synergies among neck muscles revealed by branching patterns of single long descending motor-tract axons. *Prog. Brain Res.* **143**, 411–421 (2004).
- Wilson, V. J. & Schor, R. H. The neural substrate of the vestibulo-collic reflex. What needs to be learned. *Exp. Brain Res.* **129**, 483–493 (1999).
- Murray, A. J., Croce, K., Belton, T., Akay, T. & Jessell, T. M. Balance control mediated by vestibular circuits directing limb extension or antagonist muscle co-activation. *Cell Rep.* **22**, 1325–1338 (2018).
- Diaz, C. & Glover, J. C. Comparative aspects of the hodological organization of the vestibular nuclear complex and related neuron populations. *Brain Res. Bull.* **57**, 307–312 (2002).
- Nicolson, T. The genetics of hearing and balance in zebrafish. *Annu. Rev. Genet.* **39**, 9–22 (2005).
- Straka, H. & Baker, R. Vestibular blueprint in early vertebrates. *Front. Neural Circuits* **7**, 182 (2013).
- Riley, B. B. & Moorman, S. J. Development of utricular otoliths, but not saccular otoliths, is necessary for vestibular function and survival in zebrafish. *J. Neurobiol.* **43**, 329–337 (2000).
- Favre-Bulle, I. A., Vanwalleghem, G., Taylor, M. A., Rubinsztein-Dunlop, H. & Scott, E. K. Cellular-resolution imaging of vestibular processing across the larval zebrafish brain. *Curr. Biol.* **28**, 3711–3722.e3713 (2018).
- Migault, G. et al. Whole-brain calcium imaging during physiological vestibular stimulation in larval zebrafish. *Curr. Biol.* **28**, 3723–3735.e3726 (2018).
- Tanimoto, M., Watakabe, I. & Higashijima, S. Tilttable objective microscope selectivity for head motion direction and dynamics in zebrafish vestibular system. *Nat. Commun.* **13**, 7622 (2022).
- Bagnall, M. W. & McLean, D. L. Modular organization of axial microcircuits in zebrafish. *Science* **343**, 197–200 (2014).
- Zelenin, P. V., Grillner, S., Orlovsky, G. N. & Deliagina, T. G. The pattern of motor coordination underlying the roll in the lamprey. *J. Exp. Biol.* **206**, 2557–2566 (2003).
- Favre-Bulle, I. A., Stilgoe, A. B., Rubinsztein-Dunlop, H. & Scott, E. K. Optical trapping of otoliths drives vestibular behaviours in larval zebrafish. *Nat. Commun.* **8**, 630 (2017).
- Ehrlich, D. E. & Schoppik, D. Control of movement initiation underlies the development of balance. *Curr. Biol.* **27**, 334–344 (2017).
- Bianco, I. H. et al. The tangential nucleus controls a gravito-inertial vestibulo-ocular reflex. *Curr. Biol.* **22**, 1285–1295 (2012).
- Thiele, T. R., Donovan, J. C. & Baier, H. Descending control of swim posture by a midbrain nucleus in zebrafish. *Neuron* **83**, 679–691 (2014).
- Kimura, Y., Hisano, Y., Kawahara, A. & Higashijima, S.-I. Efficient generation of knock-in transgenic zebrafish carrying reporter/driver

- genes by CRISPR/Cas9-mediated genome engineering. *Sci. Rep.* **4**, 6545 (2014).
28. Taniguchi, A., Kimura, Y., Mori, I., Nonaka, S. & Higashijima, S. I. Axially-confined in vivo single-cell labeling by primed conversion using blue and red lasers with conventional confocal microscopes. *Dev. Growth Differ.* **59**, 741–748 (2017).
 29. Schoppik, D. et al. Gaze-stabilizing central vestibular neurons project asymmetrically to extraocular motoneuron pools. *J. Neurosci.* **37**, 11353–11365 (2017).
 30. Metcalfe, W. K., Mendelson, B. & Kimmel, C. B. Segmental homologies among reticulospinal neurons in the hindbrain of the zebrafish larva. *J. Comp. Neurol.* **251**, 147–159 (1986).
 31. Wolman, M. A. et al. Transient axonal glycoprotein-1 (TAG-1) and laminin- α 1 regulate dynamic growth cone behaviors and initial axon direction in vivo. *Neural Dev.* **3**, 6 (2008).
 32. Kimura, Y. et al. Hindbrain V2a neurons in the excitation of spinal locomotor circuits during zebrafish swimming. *Curr. Biol.* **23**, 843–849 (2013).
 33. Haines, L. et al. Met and Hgf signaling controls hypaxial muscle and lateral line development in the zebrafish. *Development* **131**, 4857–4869 (2004).
 34. Higashijima, S., Okamoto, H., Ueno, N., Hotta, Y. & Eguchi, G. High-frequency generation of transgenic zebrafish which reliably express GFP in whole muscles or the whole body by using promoters of zebrafish origin. *Dev. Biol.* **192**, 289–299 (1997).
 35. Talbot, J. C. et al. Muscle precursor cell movements in zebrafish are dynamic and require Six family genes. *Development* **146**, dev171421 (2019).
 36. Windner, S. E. et al. Distinct modes of vertebrate hypaxial muscle formation contribute to the teleost body wall musculature. *Dev. Genes Evol.* **221**, 167–178 (2011).
 37. Dickinson, M. H. et al. How animals move: an integrative view. *Science* **288**, 100–106 (2000).
 38. Webb, P. W. Control of posture, depth, and swimming trajectories of fishes. *Integr. Comp. Biol.* **42**, 94–101 (2002).
 39. Bolton, P. S. et al. Response of pontomedullary reticulospinal neurons to vestibular stimuli in vertical planes. Role in vertical vestibulospinal reflexes of the decerebrate cat. *J. Neurophysiol.* **67**, 639–647 (1992).
 40. Peterson, B. W., Fukushima, K., Hirai, N., Schor, R. H. & Wilson, V. J. Responses of vestibulospinal and reticulospinal neurons to sinusoidal vestibular stimulation. *J. Neurophysiol.* **43**, 1236–1250 (1980).
 41. Wilkinson, K. A., Maurer, A. P., Sadacca, B. F. & Yates, B. J. Responses of feline medial medullary reticular formation neurons with projections to the C5-C6 ventral horn to vestibular stimulation. *Brain Res.* **1018**, 247–256 (2004).
 42. Zelenin, P. V., Pavlova, E. L., Grillner, S., Orlovsky, G. N. & Deliagina, T. G. Comparison of the motor effects of individual vestibulo- and reticulospinal neurons on dorsal and ventral myotomes in lamprey. *J. Neurophysiol.* **90**, 3161–3167 (2003).
 43. Izu, N. et al. Axonal trajectories of posterior canal-activated secondary vestibular neurons and their coactivation of extraocular and neck flexor motoneurons in the cat. *Exp. Brain Res.* **70**, 181–191 (1988).
 44. Minor, L. B., McCrear, R. A. & Goldberg, J. M. Dual projections of secondary vestibular axons in the medial longitudinal fasciculus to extraocular motor nuclei and the spinal cord of the squirrel monkey. *Exp. Brain Res.* **83**, 9–21 (1990).
 45. Orger, M. B., Kampff, A. R., Severi, K. E., Bollmann, J. H. & Engert, F. Control of visually guided behavior by distinct populations of spinal projection neurons. *Nat. Neurosci.* **11**, 327–333 (2008).
 46. Severi, K. E. et al. Neural control and modulation of swimming speed in the larval zebrafish. *Neuron* **83**, 692–707 (2014).
 47. Wang, W. C. & McLean, D. L. Selective responses to tonic descending commands by temporal summation in a spinal motor pool. *Neuron* **83**, 708–721 (2014).
 48. Hamling, K. R. et al. Synaptic encoding of vestibular sensation regulates movement timing and coordination. *bioRxiv*, <https://doi.org/10.1101/2021.07.05.451142> (2021).
 49. Liu, Z. et al. Central vestibular tuning arises from patterned convergence of otolith afferents. *Neuron* **108**, 748–762.e744 (2020).
 50. Harvey, C., Baliga, V. B., Lavoie, P. & Altshuler, D. L. Wing morphing allows gulls to modulate static pitch stability during gliding. *J. R. Soc. Interface* **16**, 20180641 (2019).
 51. Warrick, D. R., Bundle, M. W. & Dial, K. P. Bird maneuvering flight: blurred bodies, clear heads. *Integr. Comp. Biol.* **42**, 141–148 (2002).
 52. Kawano, K. et al. Long descending commissural VOv neurons ensure coordinated swimming movements along the body axis in larval zebrafish. *Sci. Rep.* **12**, 4348 (2022).
 53. Satou, C., Kimura, Y. & Higashijima, S. Generation of multiple classes of VO neurons in zebrafish spinal cord: progenitor heterogeneity and temporal control of neuronal diversity. *J. Neurosci.* **32**, 1771–1783 (2012).
 54. Satou, C. et al. Functional diversity of glycinergic commissural inhibitory neurons in larval zebrafish. *Cell Rep.* **30**, 3036–3050.e3034 (2020).
 55. Satou, C. et al. Transgenic tools to characterize neuronal properties of discrete populations of zebrafish neurons. *Development* **140**, 3927–3931 (2013).
 56. Hatta, K., Tsujii, H. & Omura, T. Cell tracking using a photo-convertible fluorescent protein. *Nat. Protoc.* **1**, 960–967 (2006).
 57. McRaven, C. et al. High-throughput cellular-resolution synaptic connectivity mapping in vivo with concurrent two-photon optogenetics and volumetric Ca²⁺ imaging. *bioRxiv*, <https://doi.org/10.1101/2020.02.21.959650> (2020).
 58. Urasaki, A., Morvan, G. & Kawakami, K. Functional dissection of the Tol2 transposable element identified the minimal cis-sequence and a highly repetitive sequence in the subterminal region essential for transposition. *Genetics* **174**, 639–649 (2006).
 59. Dong, T. X. et al. T-cell calcium dynamics visualized in a ratiometric tdTomato-GCaMP6f transgenic reporter mouse. *eLife* **6**, e32417 (2017).
 60. Bhatt, D. H., Otto, S. J., Depoister, B. & Fetcho, J. R. Cyclic AMP-induced repair of zebrafish spinal circuits. *Science* **305**, 254–258 (2004).
 61. Shimazaki, T., Tanimoto, M., Oda, Y. & Higashijima, S. I. Behavioral role of the reciprocal inhibition between a pair of mauthner cells during fast escapes in zebrafish. *J. Neurosci.* **39**, 1182–1194 (2019).
 62. Lister, J. A., Robertson, C. P., Lepage, T., Johnson, S. L. & Raible, D. W. nacre encodes a zebrafish microphthalmia-related protein that regulates neural-crest-derived pigment cell fate. *Development* **126**, 3757–3767 (1999).
 63. Doganli, C., Bukata, L. & Lykke-Hartmann, K. Whole-mount immunohistochemistry for anti-F59 in zebrafish embryos (1–5 days post fertilization (dpf)). *Methods Mol. Biol.* **1377**, 365–369 (2016).

Acknowledgements

We thank Yoichi Oda for critical reading of the manuscript; Minoru Koyama for sharing CoChR-GFP-Kv2.1 plasmid; Higashijima lab members for their help with generating transgenic fish, fish care, and discussion; and the Optics and Imaging Facility of the National Institute for Basic Biology for the use of their confocal microscopes. This work was supported in part by grants from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology of Japan and from National Bioresource Project in Japan (KAKENHI Grant Numbers JP18KK0215, JP19H03333, and JP22H02666 to S.H., and JP20K06866 to M.T.) and MEXT National BioResource Project (NBRP) to S.H.

Author contributions

T.S., M.T., and S.H. designed the research; T.S. performed most of the experiments under the supervision of M.T.; S.H. generated transgenic fish; and T.S. analyzed the data. T.S., M.T., and S.H. wrote the manuscript.

Competing interests

The authors declare no competing interests.

Additional information

Supplementary information The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1038/s41467-023-36682-y>.

Correspondence and requests for materials should be addressed to Masashi Tanimoto or Shin-ichi Higashijima.

Peer review information *Nature Communications* thanks the anonymous reviewer(s) for their contribution to the peer review of this work. Peer reviewer reports are available.

Reprints and permissions information is available at <http://www.nature.com/reprints>

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2023

Supplementary Information

Biomechanics and neural circuits for vestibular-induced fine postural control in larval zebrafish

Takumi Sugioka^{1,2,3}, Masashi Tanimoto^{1,2,3,4,*} and Shin-ichi Higashijima^{1,2,3,4,5,*}

¹Exploratory Research Center on Life and Living Systems, Okazaki, Aichi 444-8787, Japan

²National Institute for Basic Biology, Okazaki, Aichi 444-8787, Japan

³The Graduate University for Advanced Studies, SOKENDAI, Okazaki, Aichi 444-8787, Japan

⁴These authors jointly supervised this work

⁵Lead contact

*Correspondence: tanimoto@nibb.ac.jp; shigashi@nibb.ac.jp

Supplementary Table 1. List of transgenic lines

Transgenic lines	Source
Tg(<i>evx2</i> -hs:GFP) noted as Tg(<i>evx2</i> :GFP) in the text	Kawano <i>et al.</i> , 2022 ¹
Tg(<i>evx2</i> -hs:Gal4) noted as Tg(<i>evx2</i> :Gal4) in the text	Kimura <i>et al.</i> , 2014 ²
Tg(UAS:Dendra2)	Taniguchi <i>et al.</i> , 2017 ³
Tg(<i>vglut1</i> -hs:loxP-mCherry-loxP-Gal4) noted as Tg(<i>vglut1</i> :RFP) in the text	This paper
Tg(<i>vglut2a</i> :loxP-RFP-loxP-GFP) noted as Tg(<i>vglut2a</i> :RFP) in the text	Satou <i>et al.</i> , 2012 ⁴
Tg(<i>glyt2</i> -hs:loxP-RFP-loxP-GFP) noted as Tg(<i>glyt2</i> :RFP) in the text	Satou <i>et al.</i> , 2020 ⁵
Tg(<i>gad1b</i> :loxP-RFP-loxP-GFP) noted as Tg(<i>gad1b</i> :RFP) in the text	Satou <i>et al.</i> , 2013 ⁶
Tg(<i>evx2</i> -hs:tdTomato-jGCaMP7b) noted as Tg(<i>evx2</i> :tdTomato-jGCaMP7b) in the text	This paper
Tg(<i>evx2</i> -hs:CoChR-GFP-Kv2.1) noted as Tg(<i>evx2</i> :CoChR-GFP) in the text	This paper
Tg(<i>pitx2</i> -hs:Dendra2) noted as Tg(<i>pitx2</i> :Dendra2) in the text	This paper
Tg(<i>smyhc2</i> -hs:tdTomato-jGCaMP7b) noted as Tg(<i>smyhc2</i> :tdTomato-jGCaMP7b) in the text	This paper
Tg(<i>tbx2b</i> -hs:Cre) noted as Tg(<i>tbx2b</i> :Cre) in the text	This paper
Tg(<i>smyhc2</i> -hs:loxP-RFP-loxP-DTA) noted as Tg(<i>smyhc2</i> :loxP-RFP-loxP-DTA) in the text	This paper
Tg(<i>α-actin</i> :GFP)	Higashijima <i>et al.</i> , 1997 ⁷
Tg(<i>α-actin</i> :tdTomato-jGCaMP7f)	This paper
Tg(<i>vachta</i> -hs:Gal4) noted as Tg(<i>vachta</i> :Gal4) in the text	Taniguchi <i>et al.</i> , 2017 ³
Tg(UAS:Kaede)	Hatta <i>et al.</i> , 2006 ⁸

Supplementary Table 2. List of key reagents

Antibodies	Source	Identifier
S58	DSHB	Cat# s58, RRID:AB_528377
Goat anti-Mouse IgG (H+L) Highly Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor 488	Thermo Fisher Scientific	Cat# A-11029, RRID:AB_2534088
Chemicals	Source	Identifier
Ethyl 3-aminobenzoate methanesulfonate salt (MS-222)	Sigma Aldrich	Cat# A5040
Methylcellulose	Sigma Aldrich	Cat# A0387
Agarose-LM	nacalai tesque	Cat# 01161-12
Sucrose	Wako	Cat# 196-00015
Cal-520 Dextran conjugate MW 10,000	AAT bioquest	Cat# 20601
Dextran, Tetramethylrhodamine, 3000 MW, Anionic, Lysine Fixable	Thermo Fisher Scientific	Cat# D3308

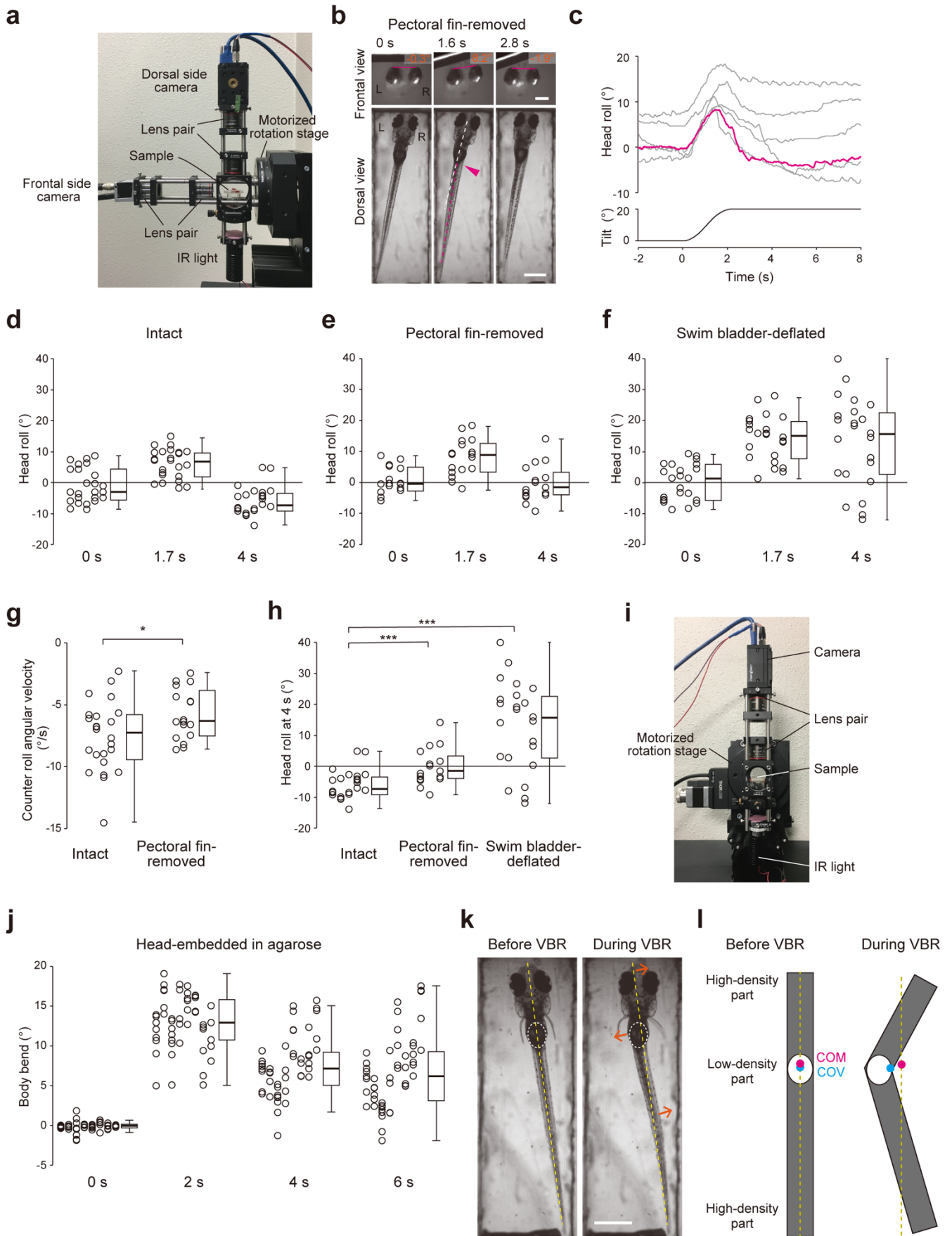
Supplementary Table 3. List of key optomechanical components

Optomechanical components	Source	Product identifier
Motorized rotation stage	Thorlabs	HDR50/M
Motorized rotation stage	Thorlabs	DDR100/M
Light source	Excelitas Technologies	X-Cite exacte
Episcopic illuminator	Olympus	BX-URA2
Tube lens unit	Olympus	U-TR30-2
C-mount camera adaptor	Olympus	U-TV0.63XC
Image splitting optics	Hamamatsu Photonics	W-VIEW GEMINI, A12801-01
Digital camera	Hamamatsu Photonics	ORCA-Flash4.0 V3, C13440-20CU
Digital camera	Teledyne FLIR	GS3-U3-23S6M-C
Digital camera	Basler	acA640-750um

Supplementary Table 4. List of key software and algorithms

Software and algorithms	Version	Source	URL
Kinesis	1.14.23	Thorlabs	https://www.thorlabs.com/newgrouppage9.cfm?objectgroup_id=10285
FlyCature2	2.13.3.61	Teledyne FLIR	https://flycap2-viewer-release.software.informer.com
Pylon Viewer	6.2.0.21487	Basler	https://www.baslerweb.com/en/products/basler-pylon-camera-software-suite/
HC Image Live	4.4.0.11	Hamamatsu	https://hcimage.com/hcimage-overview/hcimage-live/
LAS X	3.5.7.2325	Leica microsystems	https://www.leica-microsystems.com/products/microscope-software/p/leica-las-x-ls/
ImageJ/Fiji	1.53t (ImageJ) 2.9.0 (Fiji)	NIH	https://imagej.net https://fiji.sc
Template Matching and Slice Alignment Plugin	#2015/2/07	Tseng Qingzong	https://sites.google.com/site/qingzongtseng/template-matching-ij-plugin
R	4.1.2	R Core Team	https://www.r-project.org/
Excel	16.65	Microsoft	https://www.microsoft.com/en-us/microsoft-365/excel

Supplementary Figure 1



Supplementary Figure 1. Behavior of fin-removed fish and population data from behavioral experiments

a Lateral view photograph of the experimental setup for filming fish behaviors upon roll-tilt stimuli.

b, c Behavioral experiments on pectoral fin-removed fish. **b**: Snapshots of the frontal and dorsal images of a fish during a left-down tilt. **c**: Traces of the head roll angles of a fish in response to roll tilt. The magenta trace corresponds to the trial shown in **b**.

d–f Population data for the head roll angles of intact (**d**; 24 trials from five fish), pectoral fin-removed (**e**; 17 trials from three fish), and swim bladder-deflated fish (**f**; 23 trials from five fish). The head roll angles for each trial were measured at 0, 1.7, and 4 s from the onset of roll-tilt stimulus. Three to six trials were conducted for each fish. Data obtained from same fish are vertically aligned.

g Population data for the counter-roll angular velocity of the head. Box plots are shown on the right. This is the same fish as in **d** and **e**. $p = 0.04$ (two-sided Wilcoxon rank-sum test)

h Comparisons of head roll angles at 4 s. The same data as in **d–f**. $p = 0.0005$ (two-sided Wilcoxon rank-sum test) for intact vs. pectoral fin-removed, $p = 4.8 \times 10^{-6}$ (two-sided Wilcoxon rank-sum test) for intact vs. swim bladder-deflated.

i Frontal view photo of the experimental setup for filming fish behaviors in the head-embedded condition upon roll-tilt stimuli.

j Population data of the body bend angles in head-embedded fish. The body bend angles for each trial were measured at 0, 2, 4, and 6 s from the onset of the roll-tilt stimulus. Forty-nine trials from eight fish (five to eight trials for each fish) are shown. Data obtained from the same fish are vertically aligned. Box plots are shown on the right.

k Body displacement caused by the VBR. Snapshots of the fish before and during the VBR. The fish images are the same as those in Figure 1d. In both images, yellow dashed lines denote the fish midline before the VBR. White dashed circles indicate the swim bladders. Orange arrows show displacement of the corresponding body regions. The head and caudal body move toward the contraction side while the body around the swim bladder moves to the stretched side.

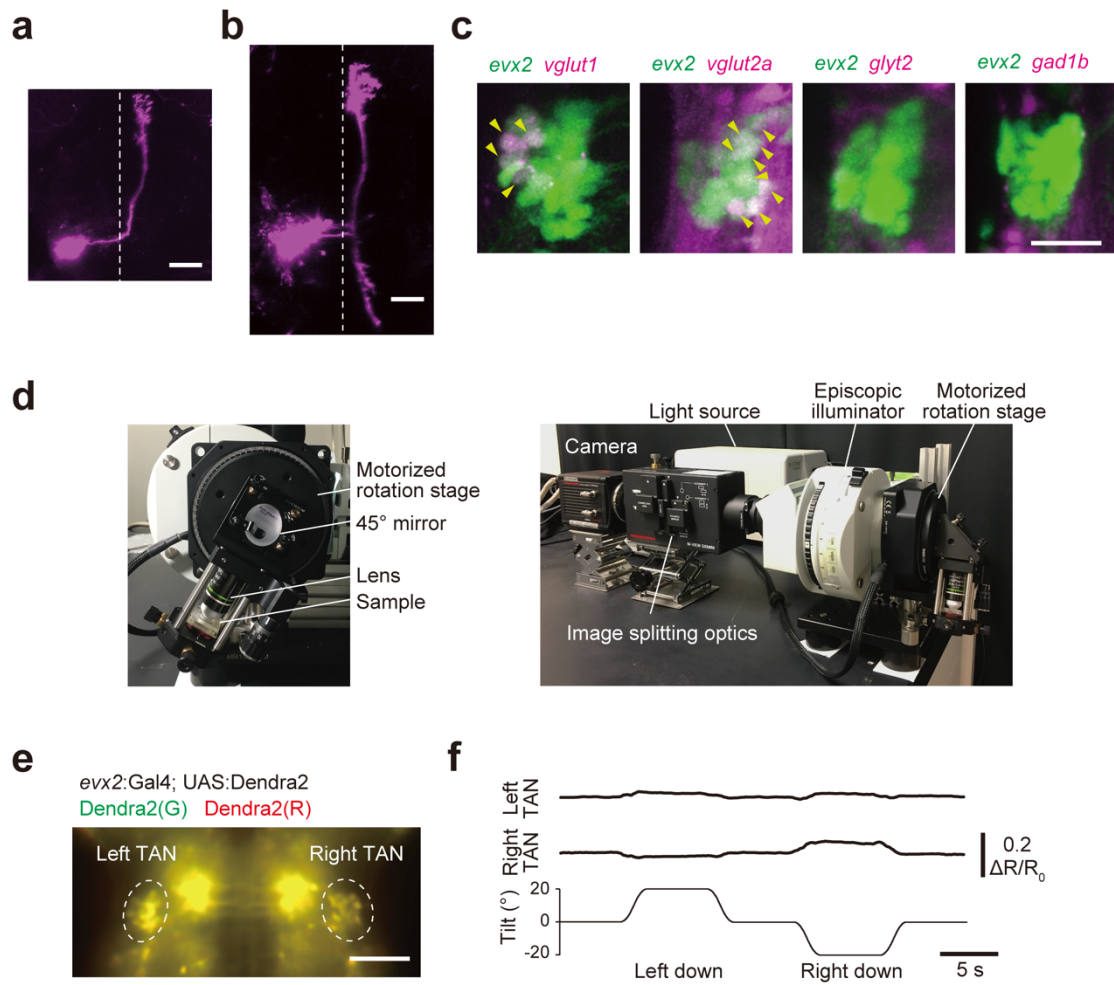
l Simplified schematic of body displacement caused by the VBR. Yellow dashed lines denote the midline before the VBR. Magenta and cyan circles indicate the center of mass (COM) and center of volume (COV), respectively. The COM position in the absolute coordinate does not change during the VBR, while the COV position moves to the stretched side.

Box plots in **d–h, j**: Boxes represent the interquartile range (IQR) between the first and third quartiles and the line inside represents the median. Whiskers denote the lowest and highest values within $1.5 \times \text{IQR}$ from the first and third quartiles, respectively.

Scale bars, frontal images in **b** 200 μm ; dorsal images in **b, k** 500 μm

Source data are provided as a Source Data file.

Supplementary Figure 2



Supplementary Figure 2. Characteristics of TAN neurons and the performance of the widefield-version of the tiltable objective microscope

a, b Single-cell morphologies of TAN neurons revealed by electroporation of rhodamine-dye. Maximum intensity projection of confocal stacks of dorsal view images. Dashed lines indicate the midlines. Rostral is to the top. Lateral is to the left. **a**: A TAN neuron with an ascending axon. Similar data was observed in 2 fish. **b**: A TAN neuron with a bifurcating (ascending/descending) axon. Similar data was observed in 6 fish.

c Neurotransmitter properties of *evx2*-positive TAN neurons, as revealed by crossing Tg(*evx2*:GFP) to RFP-expressing marker transgenic fish lines for the following neurotransmitter phenotypes: Tg(*vglut1*:RFP), Tg(*vglut2a*:RFP), Tg(*glyt2*:RFP), and Tg(*gad1b*:RFP). *vglut1* and *vglut2a* are markers for glutamatergic neurons, *glyt2* is a marker for glycinergic neurons, and *gad1b* is a marker for GABAergic neurons. Yellow arrowheads show the overlap of fluorescence. Dorsal views of confocal stacked images.

d Frontal (left) and lateral (right) views of the widefield-version (non-confocal-version) of the tiltable objective microscope for Ca²⁺ imaging of TAN neurons during roll tilts.

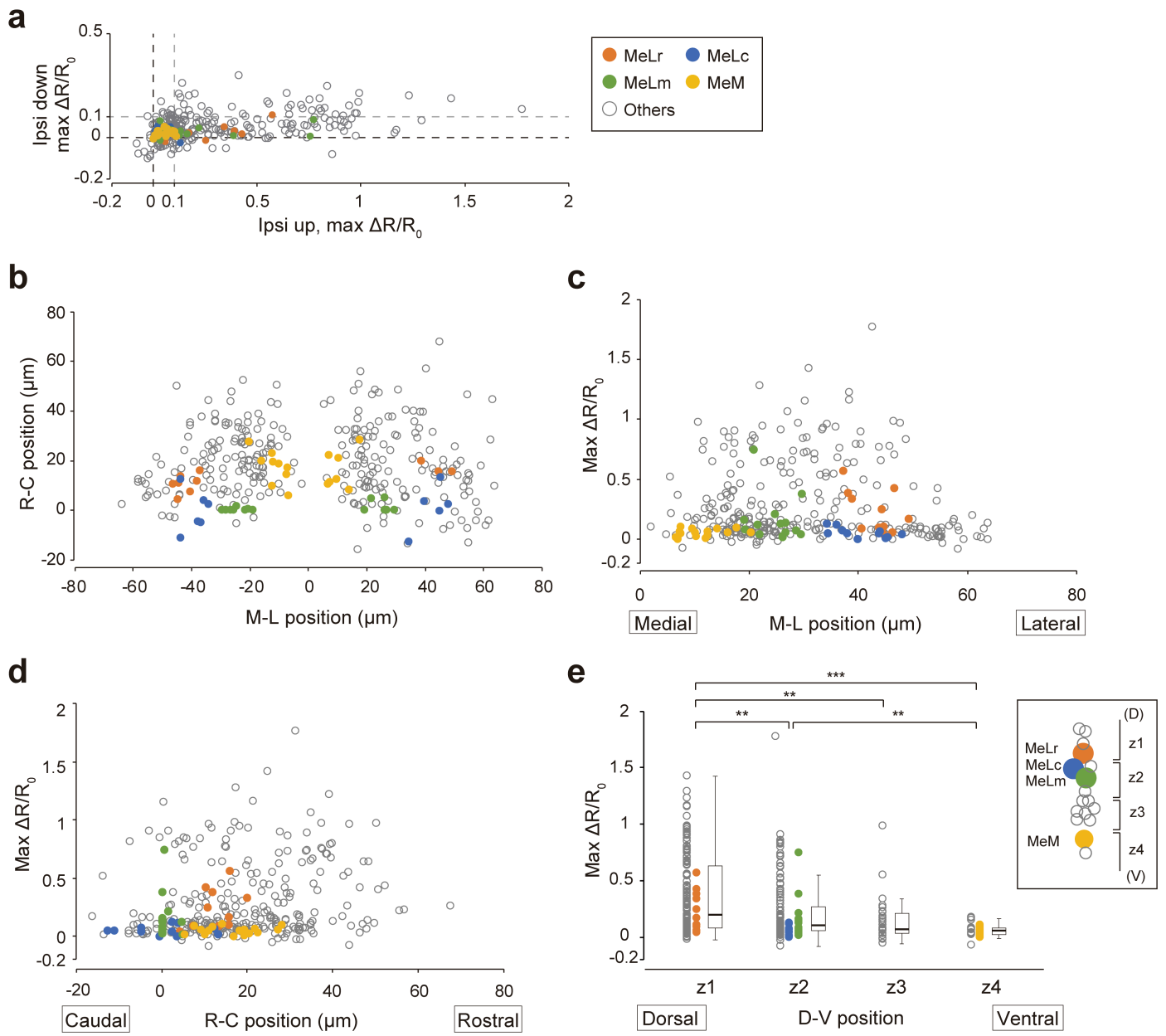
e Image (merge of the green and red channels) of Tg(*evx2*:Gal4; UAS:Dendra2) after a partial photoconversion of Dendra2.

f Time courses of $\Delta R/R_0$ in the left and the right TAN neurons in response to a roll tilt.

Scale bars, **a, b, e** 50 μm ; **c** 20 μm

Source data are provided as a Source Data file.

Supplementary figure 3



Supplementary Figure 3. Characterization of Ca^{2+} responses of nMLF neurons upon roll-tilt stimuli

Overall, 330 neurons from ten fish were analyzed. Neuronal identities (MeLr, MeLc, MeLm, MeM, and others) are shown in the right-hand side box in **a**.

a Comparison of maximum $\Delta R/R_0$ during ipsi-up and ipsi-down tilts for each neuron. The black and gray dashed lines indicate 0 and 0.1 of maximum $\Delta R/R_0$, respectively. Neurons with a maximum $\Delta R/R_0$ that was above 0.1 were judged to be active.

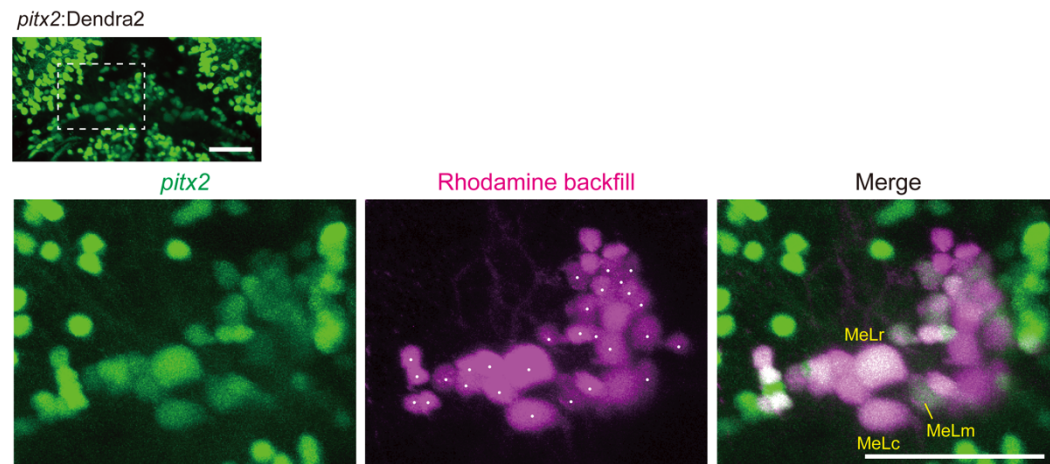
b Soma positions of medio-lateral and rostro-caudal axes are aligned based on the midline and the position of MeLm.

c, d Graphs showing the maximum $\Delta R/R_0$ during ipsi-up tilts (Y-axis) vs. the medio-lateral position (X-axis in **c**) and the rostro-caudal position (X-axis in **d**).

e Graph showing maximum $\Delta R/R_0$ during ipsi-up tilts vs. the dorso-ventral position. The dorso-ventral positions of the neurons are categorized into four groups based on their relative position to MeLr and MeM (see Methods for details of the alignment). Boxes represent the interquartile range (IQR) between the first and third quartiles and the line inside represents the median. Whiskers denote the lowest and highest values within $1.5 \times \text{IQR}$ from the first and third quartiles, respectively. z1: n=143 cells, z2: n=130 cells, z3: n=27 cells, z4: n=30 cells z1 vs. z2: $p = 0.0057$; z1 vs. z3: $p = 0.0072$; z1 vs. z4: $p = 2.7 \times 10^{-6}$; z2 vs. z3: $p = 0.44$; z2 vs. z4: $p = 0.0028$; z3 vs. z4: $p = 0.65$ (two-sided Steel Dwass test)

Source data are provided as a Source Data file.

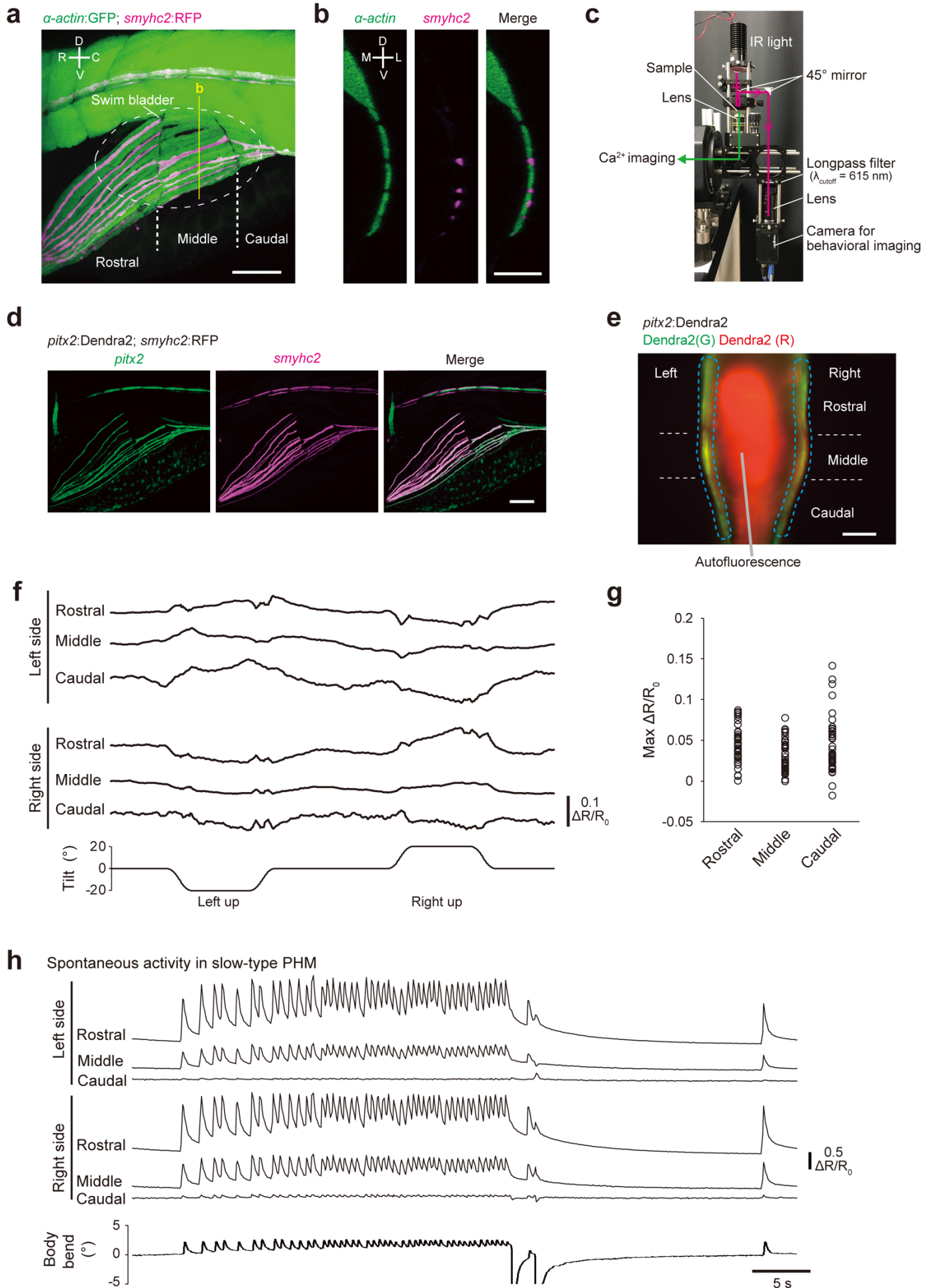
Supplementary Figure 4



Supplementary Figure 4. Characterization of nMLF neurons labeled in *Tg(pitx2:Dendra2)* fish

Top: Confocal stacked image of *Tg(pitx2:Dendra2)*. Bottom: nMLF neurons were labeled in a retrograde manner by injecting rhodamine-dextran into the rostral spinal cord. The three panels are expanded images that correspond to the white dashed box in the top panel. Dots in the middle panel indicate the rhodamine-labeled nMLF neurons that are positive for Dendra2 fluorescence. Scale bars: 50 μ m

Supplementary Figure 5



Supplementary Figure 5. Anatomical characterization of PHMs and Ca²⁺ imaging of slow-type PHMs

a Lateral view of the confocal stack image of Tg(*smyhc2:loxP-RFP-loxP-DTA*; *α-actin:GFP*) fish. PHMs consists of three segments: rostral, middle and caudal segments. White dashed circle denotes the swim bladder. R, rostral; C, caudal; D, dorsal; V, ventral.

b Cross-section view at the position of the yellow line in **a**. M, medial; L, lateral.

c Lateral view photograph of the experimental setup for both Ca²⁺ imaging and behavioral imaging. Light paths for Ca²⁺ imaging and behavioral imaging are shown in green and magenta lines, respectively.

d Lateral view of the confocal stack image of Tg(*pitx2:Dendra2*; *smyhc2:loxP-RFP-loxP-DTA*) fish. *pitx2* is expressed at slow-type PHMs.

e Image of Tg(*pitx2:Dendra2*) fish after a partial photoconversion of Dendra2. Ventral view of the area around PHMs. Green and red channels are merged. Slow-type PHMs are located at the lateral sides of fish (dashed blue lines) and are separated into three segments.

f Time course of $\Delta R/R_0$ in each segment of slow-type PHMs in response to a roll tilt.

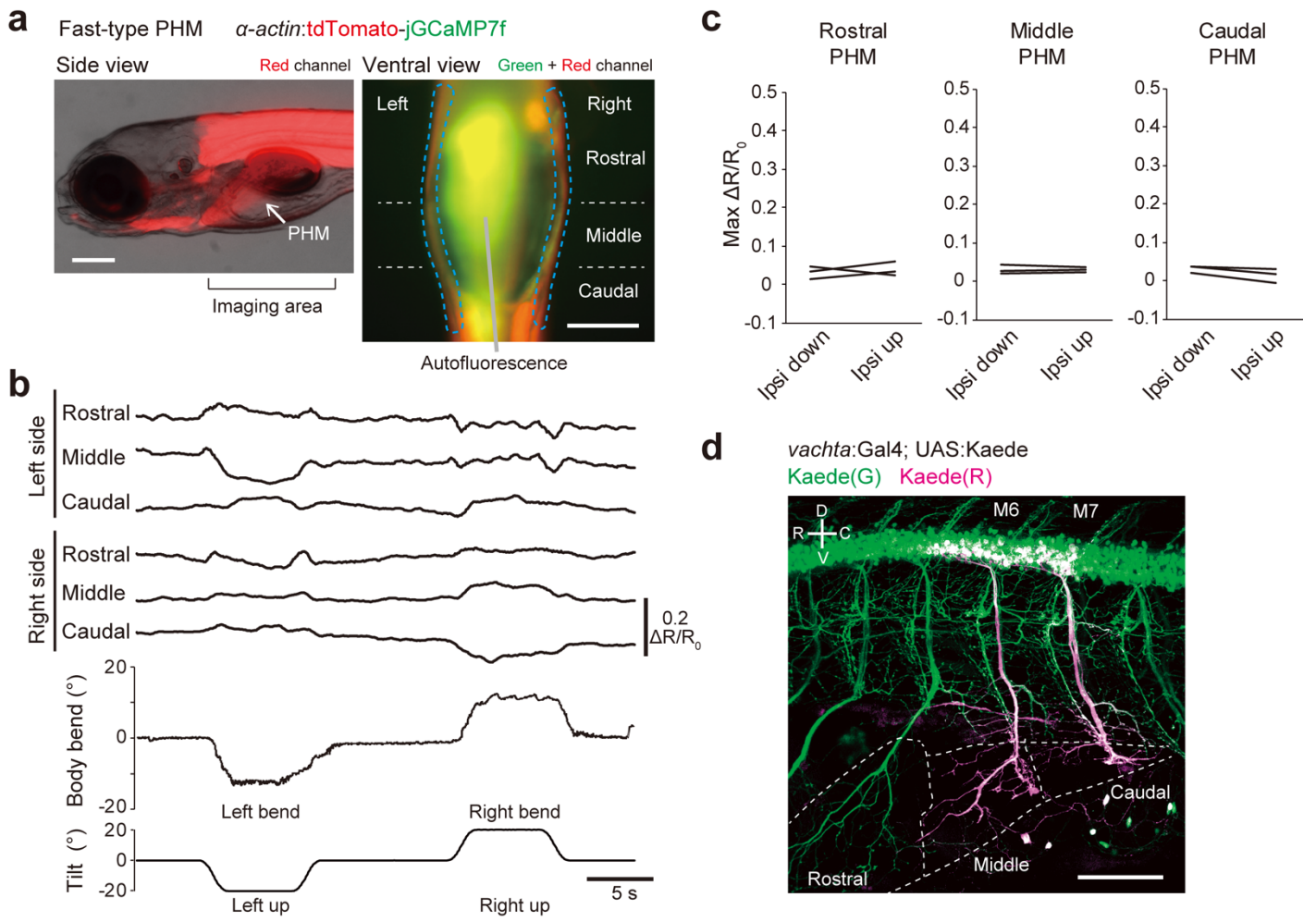
g Maximum $\Delta R/R_0$ in each segment of slow-type PHMs during tilt. 42 dots (left and right side) in each segment, 21 trials from five fish.

h Bursts of rhythmic spontaneous activities in slow-type PHMs.

Scale bars, **a**, **d**, **e** 100 μm ; **b** 50 μm

Source data are provided as a Source Data file.

Supplementary Figure 6



Supplementary Figure 6. Ca²⁺ imaging of fast-type PHMs and anatomical characterization of PHM motoneurons

a Fluorescent images of Tg(*α-actin*:tdTomato-jGCaMP7f) fish. Left, lateral view. Red fluorescence and transmitted light images are merged. Right, ventral view of the area around PHMs (“imaging area” in the left panel). Green and red channels are merged. Fast-type PHMs are located at the lateral sides of fish (dashed blue lines) and are separated into three segments.

b Time course of $\Delta R/R_0$ in each segment of fast-type PHMs and the body bend angle in response to a roll tilt.

c Pairwise comparison of the maximum $\Delta R/R_0$ in each segment of fast-type PHMs between ipsi-down and ipsi-up tilts (three fish). Average values of three trials are shown for each fish.

d Optical backfill (from green to red) of motoneurons innervating the middle and caudal segments of PHMs in Tg(*vachta*:Gal4; UAS:Kaede) at 5 dpf. M6 and M7 indicate the 6th and 7th muscle segments, respectively.

Scale bars, **a** 200 μm ; **d** 100 μm

Source data are provided as a Source Data file.

Supplementary References

- 1 Kawano, K. *et al.* Long descending commissural V0v neurons ensure coordinated swimming movements along the body axis in larval zebrafish. *Sci Rep* **12**, 4348, doi:10.1038/s41598-022-08283-0 (2022).
- 2 Kimura, Y., Hisano, Y., Kawahara, A. & Higashijima, S.-i. Efficient generation of knock-in transgenic zebrafish carrying reporter/driver genes by CRISPR/Cas9-mediated genome engineering. *Sci. Rep.* **4**, doi:10.1038/srep06545 (2014).
- 3 Taniguchi, A., Kimura, Y., Mori, I., Nonaka, S. & Higashijima, S. I. Axially-confined in vivo single-cell labeling by primed conversion using blue and red lasers with conventional confocal microscopes. *Dev Growth Differ* **59**, 741-748, doi:10.1111/dgd.12412 (2017).
- 4 Satou, C., Kimura, Y. & Higashijima, S. Generation of multiple classes of V0 neurons in zebrafish spinal cord: progenitor heterogeneity and temporal control of neuronal diversity. *J Neurosci* **32**, 1771-1783, doi:10.1523/JNEUROSCI.5500-11.2012 (2012).
- 5 Satou, C. *et al.* Functional diversity of glycinergic commissural inhibitory neurons in larval zebrafish. *Cell Rep* **30**, 3036-3050 e3034, doi:10.1016/j.celrep.2020.02.015 (2020).
- 6 Satou, C. *et al.* Transgenic tools to characterize neuronal properties of discrete populations of zebrafish neurons. *Development* **140**, 3927-3931, doi:10.1242/dev.099531 (2013).
- 7 Higashijima, S., Okamoto, H., Ueno, N., Hotta, Y. & Eguchi, G. High-frequency generation of transgenic zebrafish which reliably express GFP in whole muscles or the whole body by using promoters of zebrafish origin. *Dev Biol* **192**, 289-299 (1997).
- 8 Hatta, K., Tsujii, H. & Omura, T. Cell tracking using a photoconvertible fluorescent protein. *Nat Protoc* **1**, 960-967, doi:10.1038/nprot.2006.96 (2006).