

平成 30 年 5 月 8 日現在

機関番号：34419

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07590

研究課題名(和文) 魚類の競争行動は脳内でどのように制御されているのか

研究課題名(英文) The neural mechanisms underlying the regulation of aggressive behaviors in male medaka fish

研究代表者

加川 尚 (KAGAWA, Nao)

近畿大学・理工学部・准教授

研究者番号：80351568

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではメダカを用いて雄間競争時に攻撃行動をとる優位個体と逃避行動をとる劣位個体の神経ペプチドホルモン(バソトシン)の脳内作用機構を明らかにすることを試みた。優位個体と劣位個体において、バソトシンを高発現する神経の軸索の脳内投射領域が異なることが分かった。また、それぞれの軸索投射領域では、異なるサブタイプのバソトシン受容体が高発現することが明らかになった。さらに、これらの受容体のうち1つのサブタイプの遺伝子をノックアウトしたメダカを用いて2個体間の雄間競争を観察したところ、いずれの個体も高い攻撃性を示し、競争の決着がつかなくなる傾向がみられた。

研究成果の概要(英文)：In this study, we examined the neural mechanisms underlying the regulation of aggressive and submissive behaviors by neuropeptide hormone (arginine vasotocin; AVT) in male medaka fish. We demonstrated that the neurons with high expression of AVT mainly send their fibers into the distinct brain regions between the aggressive (dominant) male and the submissive (subordinate) male after their competition. The different subtypes of AVT-receptors (AVT-R) was shown at a high level in each brain region of the dominants and the subordinates. In addition, we conducted a preliminary contest between two males of the AVT-R gene knock-out medaka. These males have similar high aggression throughout the contest.

研究分野：水圏生命科学

キーワード：攻撃行動 雄間競争 神経ペプチド メダカ

1. 研究開始当初の背景

多くの動物にとって、生殖、競争、摂食といった行動は、その個体の生命維持に不可欠な本能である。脊椎動物の場合、これらの本能行動の中核は脳であるが、行動を制御する脳内メカニズムは未だに不明な点が多い。魚類の行動制御機構についても例外ではなく、本能行動が脳内でどのように制御されているのかを知ることは、生物学的に重要な知見を得るだけでなく、水産増養殖における有用種の適切な管理法の確立に向けても大切である。本能行動をとる動物の脳内では、複数の神経ペプチドホルモンの発現が変化することがこれまでに報告されている。これらの報告の多くは、げっ歯類を用いた研究によるものであるが、高等脊椎動物の脳構造や行動は複雑であるため、行動を制御する神経分子基盤を解明するのは困難である。一方、魚類は脊椎動物のなかで比較的単純な脳構造を持ち、本能行動を観察する際に明瞭かつ単純な行動パターンを示す。また、神経ペプチドホルモンの多くは、脊椎動物間で広く保存されており、魚類は行動神経内分泌学の実験材料に適している。実際、研究代表者はこれまでにメダカやハゼを用いて、神経ペプチドホルモンであるアルギニンバソトシン(AVT)の発現量が個体間競争行動の頻度に応じて変化することや、AVT 投与が個体の攻撃性を高めることなどを明らかにしてきた(J. Fish Biol.,2013; Gen. Comp. Endocrinol.,2013; Zool. Sci.,2014)。さらに、これらの研究により、AVT ニューロンの細胞体が異なる複数の脳部位に存在することや、各脳部位の AVT 発現が競争行動の種類(攻撃か逃避か)によって異なることが明らかになった。これらの事実は、1つの神経ペプチドホルモンが発現領域の違いによって多彩な本能行動を制御する可能性を示唆している。

脊椎動物一般に、脳の複数部位に存在する AVT(哺乳類では AVP)ニューロンのうち、脳下垂体に軸索を投射するニューロンは、下垂体ホルモンとして AVT を末梢組織に分泌することで、体内塩類濃度の調節といった生理的な役割を果たすことが知られている。一方、これまでに研究代表者が行ってきた研究では、競争行動時に AVT 発現量を変化させるニューロンが、脳下垂体以外の脳領域にも広く軸索を投射する可能性があることを示してきた。しかし、このような AVT ニューロンが実際にどの脳領域に軸索を投射し、競争行動時にどのような役割を果たしているのかは、魚類をはじめ多くの脊椎動物においても不明であった。また、メダカは複数の AVT 受容体を有することが近年示されているが、AVT 受容体の行動制御に及ぼす役割についても未解明であった。

2. 研究の目的

そこで本研究では、魚類の個体間競争行動

時における脳内の AVT の機能を解明するために、主に以下の3点を明らかにすることを目的とした。

(1) AVT ニューロンの脳内投射領域を明らかにする。競争行動をとる個体の脳内における AVT ニューロンの軸索投射領域を細胞形態学的に調べ、攻撃行動と逃避行動でそれらに差異があるか比較する。

また、脳内の各部位に局在する AVT ニューロン群の神経発火活動の同期性の有無を調べ、ニューロン間におけるネットワークの有無と行動との関連性を調べる。

(2) AVT 受容体の脳内発現領域を明らかにする。行動時における AVT 受容体の脳内発現領域を調べ、攻撃行動と逃避行動でそれらに差異があるか比較する。また、受容体発現がみられた脳領域における他の神経ペプチドホルモンの発現も調べ、AVT との関連性を考察する。

(3) 行動時に発現変化がみられた AVT 受容体に関して、その遺伝子をノックアウト(KO)メダカを作成し、それらの競争行動に異常が起こるか否かを調べる。

3. 研究の方法

(1) AVT の発現を EGFP により可視化したトランスジェニック(TG)メダカを用いて、AVT ニューロンの局在および軸索投射領域を組織学的に調べた。複数の雄個体を一定時間観察し、攻撃行動回数が多い優位個体と攻撃行動回数の少ない劣位個体を得た。次に、行動観察直後の各個体の脳を摘出し、細胞が生きたままの状態のライブスライス標本を作成した。得られた標本を蛍光顕微鏡下で観察し、AVT ニューロンの細胞体の局在および軸索や樹状突起の投射領域を調べた。また、スライス標本に用いたカルシウムイメージング法を実施し、一定時間内に観察される AVT ニューロンの神経発火活動頻度をイメージングし、複数の AVT ニューロン群間における神経発火活動の同期性の有無を解析した。

(2) 競争行動時に脳内 AVT 受容体(AVT-R)の発現量に変化する領域を調べた。優位個体と劣位個体の脳を PFA 溶液にて固定し、パラフィン切片にした後、*in situ hybridization* (ISH)法によって4つのサブタイプの AVT-R の発現領域を特定するとともに、その発現量を解析した。解析の結果、優位個体と劣位個体の間で AVT-R 発現量に差異がみられた脳領域を中心に、他の神経ペプチドホルモンの発現についても ISH 法により調べた。

(3) 行動時に発現変化がみられた AVT-R の遺伝子をノックアウトした(KO)メダカを作成し、競争行動試験に供し、攻撃行動に異常がみられるか調べた。KO メダカの作出にはゲ

ノム編集ツール (CRISPR/Cas9 法) を採用した。

4. 研究成果

(1) 脳における AVT ニューロンの細胞体の局在と軸索の投射領域を調べたところ、細胞体は、優位個体と劣位個体のいずれにおいても異なる複数の視索前核部位 (POA) に局在した。このうち優位個体では g-POA、劣位個体では p-POA において、AVT を高発現していた。また、劣位個体では g-POA における AVT 発現はほとんど認められなかった。軸索は、いずれの POA に局在する AVT ニューロンも下垂体へ投射する他、g-POA の細胞体からは中脳背側、p-POA の細胞体からは中脳腹側および終脳腹側へも、それぞれ投射することがわかった。なお、p-POA からの AVT ニューロンの投射領域に優位個体と劣位個体の間で明瞭な差異はなかった。以上の結果の一部、すなわち AVT ニューロンの細胞体の局在および軸索の投射領域については論文にまとめ、海外の国際学術誌に発表した (発表論文)。

次に、AVT ニューロンの細胞体の神経活動をカルシウムイメージング法により調べた。前述のように優位個体では g-POA、劣位個体では p-POA において、それぞれ AVT が高発現した。これらの結果を受けて本研究では、g-POA および p-POA の 2 領域内における AVT ニューロン群の神経発火活動を調べた。その結果、優位個体の g-POA および劣位個体の p-POA の各領域内において、それぞれ複数個の細胞体が同期した神経発火活動を示したが、同一個体内における 2 つの領域間での同期性は確認されなかった。これらの結果から、各 POA 領域内における AVT 発現増加と、それぞれの領域内の AVT ニューロン群の同期した神経発火活動が連関していることが示唆された。

(2) AVT-R の発現は優位個体と劣位個体との間に明瞭な違いが認められた。各 AVT-R サブタイプの脳内発現を ISH 法により解析した結果、優位個体では中脳背側および終脳腹側において V1a 型受容体が、劣位個体では中脳腹側において V2 型受容体が、それぞれ高発現することが明らかとなった。

次に、これらの領域における AVT 以外の神経ペプチドホルモンの発現を解析した結果、優位個体では中脳背側における Kiss1 発現量が高く、劣位個体では終脳腹側における GnRH3 発現量と中脳腹側における CRH 発現量が高かった。これらのことから、優位個体では AVT は V1a 型受容体を介して中脳背側の Kiss1 ニューロンに連絡する一方、劣位個体では V2 型受容体を介して中脳腹側の CRH ニューロンに連絡して、競争行動時におけるそれぞれの個体の生理応答を制御する可能性が示唆された。この可能性については、それぞれの神経ペプチドニューロンに AVT-R サブタイプが実際に発現しているかを共染色法

などにより確かめる必要がある。なお、優位個体の終脳腹側で高発現した V1a 型受容体の生理学的な意味は本研究では解明できなかった。以上の結果のうち、競争行動時の AVT 以外の神経ペプチドホルモンの脳内発現については、その結果の一部を論文にまとめ、海外の国際学術誌および国内誌に発表した (発表論文 および)、AVT-R の発現解析結果については、現在、海外の国際学術誌に投稿中である。

(3) 攻撃行動時に優位個体で発現増加した V1a 型受容体をノックアウトした KO メダカを作出した。次に、KO ヘテロ接合体およびホモ接合体を用いて、雄間競争行動試験を行い、野生型と比較した。なお、ホモ接合体は本研究期間内に得られた個体数が少なかったため、今後も追試験が必要である。行動試験の結果、予想に反して、KO 個体間においても野生型個体間と同程度に攻撃行動や逃避行動が観察され、優位個体と劣位個体にわかれた。しかし、KO 個体間の競争行動試験では、行動回数がほぼ同程度観察される引分け個体が、野生型個体間と比べて高頻度で得られる傾向にあった。そこで、実験に用いる KO メダカの数には少なかったが、対他個体行動について予備的な試験を行った。その試験では、野生型の遊泳行動をモニターに写して被験個体に一定時間みせ、行動の変化を定量的に解析した。その結果、被験個体のモニター面接触回数やモニター側滞在時間が、野生型では試験時間が経過するにしたがって減少したのに対して、KO 個体では試験時間を通して減少しない傾向にあった。この結果は、KO 個体が遭遇した他個体に対する接近行動を執拗にとる性質を有する可能性を示唆している。この可能性については行動試験数を増やして、今後さらに詳しく検証する必要がある。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 3 件)

Kagawa, N., Hirose, S., Fujimoto, K., Nomura, C., Fujita, Y., Honda, A., Komori, M. (2017) Social rank-dependent expression of gonadotropin-releasing hormones and kisspeptin in the medaka brain. *General and Comparative Endocrinology*, 249: 48-54. (査読あり)

Kagawa, N., Honda, A., Zenno, A., Omoto, R., Imanaka, S., Takehana, Y., Naruse, K. (2016) Arginine vasotocin neuronal development and its projection in the adult brain of the medaka. *Neuroscience Letters*, 613: 47-53. (査読あり)

加川 尚 (2015) 魚類の攻撃行動とホルモン. *海洋と生物*, 36(6):598-604. (査読なし)

〔学会発表〕(計 8 件)

本田 明、神田 真司、岡 良隆、加川 尚
(2017) 社会行動制御におけるArginine
vasotocin(AVT)の機能解析. 日本動物学会
第88回大会 (富山)

下村 祐輝、加川 尚 (2017) ストレスに伴
うメダカ*Oryzias latipes*脳内トリプトファン
水酸化酵素発現の減少. 日本動物学会第
88回大会 (富山)

Shinya, M., Kanda, S., Takahashi, A., Konno,
N., Hyodo, S., Kagawa, N., Oka, Y. (2016)
Electrophysiological and genetic
demonstration that VT neuron is critical for
water excretion in hypoosmotic conditions in
medaka. The 22nd International Congress of
Zoology (Okinawa)

本田 明、野村 千穂美、加川 尚 (2016)
雄性個体間の社会行動における Arginine
vasotocin (AVT) の機能. 2016年度日本魚
類学会 (岐阜)

下村 祐輝、寺崎 慎太郎、加川 尚 (2016)
ストレスがメダカ脳内のトリプトファン
水酸化酵素発現に及ぼす影響. 2016年度
日本魚類学会 (岐阜)

下村 祐輝、寺崎 慎太郎、加川 尚 (2016)
熱ストレスがメダカのTryptophan
hydroxylase(TPH)の発現に及ぼす影響. 平
成28年度日本水産学会秋季大会 (奈良)

本田 明、野村 千穂美、加川 尚 (2016)
メダカ雄の社会行動におけるArginine
vasotocin (AVT) の機能解析. 平成28年度
日本水産学会秋季大会 (奈良)

加川 尚 (2015) メダカ雄の社会順位変動
が神経ペプチド発現と血中コルチゾール濃
度に及ぼす影響. 日本動物学会第86回大
会 (新潟)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

[http://www.life.kindai.ac.jp/%7Ekagawa/
index.html](http://www.life.kindai.ac.jp/%7Ekagawa/index.html)

6 . 研究組織

(1)研究代表者

加川 尚 (KAGAWA, Nao)
近畿大学・理工学部・准教授
研究者番号：80351568

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：

(4)研究協力者

()