

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 8 月 30 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2021

課題番号：17K07943

研究課題名(和文) 魚類の摂餌行動に関するpH感受性の分子細胞基盤の解明

研究課題名(英文) Molecular and Cellular basis of pH sensitivity involved in feeding behavior of fish

研究代表者

池永 隆徳 (Ikenaga, Takanori)

鹿児島大学・理工学域理学系・准教授

研究者番号：50553997

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：ナマズ目の一種であるゴンズイのpH感受性の神経基盤を明らかにすることを旨とし、神経活動のマーカーとして知られている最初期遺伝子(c-fos, egr-1, npas4)の、ゴンズイの神経系における発現について検討した。その結果、過剰な神経活動を誘発した個体の脳では、未処理の個体の脳に比べて多くの神経細胞で、これらの遺伝子の発現がより強い傾向がみられた。このことから、ゴンズイの神経系においても最初期遺伝子の発現を指標として、刺激に対して応答する神経細胞の検出が可能であることが示された。また、興奮性および抑制性の神経細胞のマーカー遺伝子の発現についても確認することができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

多くのナマズ目魚類と同様に、味覚の鋭敏なゴンズイは、これまで味覚系の研究の優れた実験材料として利用されてきた。神経系の機能解析において有力な手段であり、他の動物これまで利用されてきた、最初期遺伝子の発現を指標として刺激に反応する神経細胞を検出する方法が、ゴンズイでも利用可能であることが示された。また、トランスクリプトーム解析のデータより、いくつかの神経細胞のマーカー遺伝子の塩基配列を得ることができ、その情報を基にそれらの遺伝子を発現する神経細胞の標識が可能となった。これらの手法は、今後のゴンズイにおける味覚情報処理の仕組みの解明のために有力な手段となる。

研究成果の概要(英文)：To clarify the neural basis of the pH sensitivity of the sea catfish, expression of the immediate early genes (c-fos, egr-1, npas4), marker of neural activity, was examined. These genes expressed in larger number of neurons of the brains that induced excessive neural activity than those of untreated ones. These results indicate that it is possible to detect neurons that respond to stimuli by using the expression of the immediate early genes in the nervous system of sea catfish as in other animals. We also could confirm the expression of marker genes of the excitatory and inhibitory neurons in the nervous system of sea catfish.

研究分野：神経生物学

キーワード：ゴンズイ 最初期遺伝子 in situ hybridization トランスクリプトーム 味覚

## 1. 研究開始当初の背景

動物において、味覚を受容する感覚器である味蕾は受容器細胞（味細胞）を含む数十個の細胞の集合体である。ヒトを含む哺乳類では味蕾は主に口内に分布するが、魚類では口内だけでなく体表にも味蕾を有する種が存在する。例えば、ナマズ目に属する種は全体表に味蕾を有し、特に吻部の触鬚（ヒゲ）で密度が高く、鋭敏な味覚を有する。近年、ナマズ目の一種であるゴンズイの触鬚の感覚情報を運ぶ神経が、海水のわずかな pH の低下に応答することが明らかとなった (Caprio et al., 2014)。この触鬚の神経の応答は、わずか 0.1 の pH の低下によって誘発される。ゴンズイの自然環境下での餌の一種であるゴカイは底質に巣を作って潜んでおり、その呼吸の際に排出される水素イオンもしくは炭酸ガスによって巣穴出口付近で僅かな pH の低下が生じる。行動実験により、ゴンズイは水槽内で環境海水よりも低い pH の海水を流した管をついばむことが示された。従って、ゴンズイの pH 感受性の機能的意義は底質内に潜む餌の探索であると考えられる。しかしながら、どのような細胞や神経系がこの pH 感受性に寄与しているかは不明である。

## 2. 研究の目的

ゴンズイの触鬚には多数の味蕾が分布している。ゴンズイを始めとする真骨魚類の味蕾は味細胞によって構成されるが、それに加えて味蕾の基底部に皮膚の触覚を受容するメルケル細胞に似た形態の基底細胞が存在する。また、味蕾の周囲には三叉神経由来と思われる自由神経終末が多数分布する。ゴンズイにおける pH の変化の検出に、これらのうちのどの細胞や神経が関与しているかは不明である。感覚刺激に対する細胞の応答は、生きた標本を用いた電気生理学的手法か、カルシウムイメージングなどの光学的測定法によって通常評価されるが、これらの実験は高度な技術と、専用の機器を要する。これに対し、固定した標本において神経や細胞の刺激に対する応答を検出する方法として、*c-fos* 遺伝子をはじめとする、最初期遺伝子の発現を指標とする実験が知られている。このような実験では、動物の神経系の組織標本における最初期遺伝子の mRNA、もしくはそれをコードするタンパク質を標識する。この手法はキンギョやメダカなど真骨魚類でも利用されている。本研究では、神経活動を組織学的に検出するマーカー遺伝子 (*c-fos*、*egr-1*、*npas4*) を用いて、ゴンズイにおける通常の味覚刺激と低 pH 刺激に応答する細胞や神経の種類を解析することを目的とした。

## 3. 研究の方法

ゴンズイの脳より抽出した mRNA より合成した cDNA と、他の魚種の *c-fos* 遺伝子の塩基配列を参考に設計したプライマーを用いた PCR 産物を鋳型として、ゴンズイ *c-fos* 遺伝子の RNA プローブを合成した。また、ゴンズイの脳より抽出した RNA を用いたトランスクリプトーム解析によって得られたデータより、ゴンズイの *egr-1* 遺伝子と *npas4* 遺伝子の塩基配列の情報を取得した。それらの情報を基に作製したプライマーを用いた PCR、およびその産物を鋳型とした RNA プローブの合成を行った。

ゴンズイの神経細胞における *c-fos*、*egr-1*、*npas4* 遺伝子の神経活動に対する応答性を確認するために、過剰な神経活動を誘発することが知られているペンタメチレンテトラゾール (PTZ) 溶液中で処理したゴンズイの脳を用いた *in situ* hybridization 法を実施した。PTZ 処理することで異常行動が誘発されたゴンズイに灌流固定を施した後、脳を摘出し、厚さ 25  $\mu\text{m}$  の凍結切片を作製した。PTZ で未処理の個体についても同様に灌流固定および脳の凍結切片の作製を実施した。これらの切片に対し、作製した RNA プローブを用いた *in situ* hybridization 法を施した。切片を顕微鏡で観察し、PTZ 処理した個体と未処理の個体の脳における各最初期遺伝子の発現を比較した。また、様々な脳部位における発現についても検討した。

ゴンズイの脳より抽出した RNA を用いたトランスクリプトーム解析によって得られた情報より、グルタミン酸を神経伝達物質とする神経細胞のマーカーである *vglut2.1* 遺伝子と、GABA を

神経伝達物質とする神経細胞のマーカーである *gad* 遺伝子 (*gad1*、*gad2*) の塩基配列をそれぞれ取得し、上記と同様の手順によってそれらの遺伝子の RNA プロブの合成、およびゴンズイの脳に対する *in situ hybridization* 法を実施した。

#### 4. 研究成果

PTZ 溶液中で処理したゴンズイと未処理のゴンズイの脳における *c-fos* 遺伝子の発現を、*in situ hybridization* 法によって解析した。その結果、PTZ で刺激した個体の脳では、未処理の個体の脳に比べて多くの神経細胞で、より強く標識される傾向がみられた。この傾向は、終脳、間脳、中脳、小脳、延髄と、脳全体で同様であった。このことから、ゴンズイの神経系においても *c-fos* 遺伝子の発現を指標として、刺激に対して応答する神経細胞を検出することが可能であると考えられる。PTZ 処理した個体の脳において特に強い *c-fos* 遺伝子の発現がみられた部位として、終脳では背側野外側部、腹側野背側部および腹側野腹側部、間脳では下葉散在核、外側陥凹核、視床核、中脳では視蓋の脳室周囲層、小脳の顆粒細胞層があげられる。ゴンズイの延髄の一次味覚中枢である顔面葉や迷走葉でも標識された細胞は観察されたが、上述の部位に比べると弱い標識であった。

次に、同様に *egr-1*、*npas4* 遺伝子の発現を *in situ hybridization* 法によって検討した。その結果、PTZ による処理を行った個体の脳でコントロール個体の脳に比べて、標識された細胞が多数観察された。従って、これらの最初期遺伝子もゴンズイの神経系において神経活動を検出するためのマーカーとして利用することが可能であるといえる。また、これらの遺伝子の発現も、*c-fos* 遺伝子と同様に、脳の広い範囲において観察された。脳の各部位において、最も強い標識がみられた遺伝子は異なっており、終脳と延髄の顔面葉では *egr-1* 遺伝子が、視蓋、間脳、小脳では *c-fos* 遺伝子の標識が強い傾向がみられた。

近年では次世代シーケンサーを利用することで、様々な遺伝子の塩基配列の情報の取得などがゴンズイのような非モデル生物でも可能となっており、本研究でも上述の様にトランスクリプトーム解析により *egr-1*、*npas4* 遺伝子の塩基配列の情報を取得し、それをプライマー作成に応用した。脊椎動物の神経系において、それぞれの神経細胞がどのような神経伝達物質を利用しているかを明らかにすることは、その機能の解明において重要である。そこで、トランスクリプトーム解析の情報を利用して、代表的な興奮性および抑制性の神経伝達物質であるグルタミン酸と GABA を含有する神経細胞のマーカー遺伝子である *vglut2.1*、*gad1*、*gad2*、遺伝子のプロブ作成および *in situ hybridization* 法を実施し、ゴンズイの脳でのこれらの遺伝子の発現を解析した。その結果、終脳背側野内側部で *vglut2.1* 遺伝子を、終脳腹側野腹側部、終脳腹側野背側部で *gad1*、*gad2* 遺伝子を発現する細胞が多数観察された。終脳でのこれらの遺伝子の発現パターンはシクリッドの一種で観察されているものと同様であった (Maruska et al., 2017)。小脳においては *gad1*、*gad2* 遺伝子の発現はプルキンエ細胞層の細胞で特異的に観察された。さらに、*vglut2.1* 遺伝子は小脳のプルキンエ細胞層および顆粒層内の大型の細胞で観察され、これらはその形態と分布から小脳の出力細胞であると考えられる。これらの結果は他の魚類で得られているものと一致しており、これらの遺伝子の発現を指標として、ゴンズイの小脳においても特定の神経伝達物質を持つ細胞の同定が可能であることを示す。また、顔面葉の 5 つの小葉で多数の *vglut2.1*、*gad1*、*gad2*、遺伝子を発現した細胞が観察された。*vglut2.1* 遺伝子を発現する細胞と、*gad* 遺伝子を発現する細胞は、異なる分布を示す傾向がみられた。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Miyazaki Taeko, Kato Akari, Ikenaga Takanori, Hagio Hanako, Yamamoto Naoyuki	4. 巻 280
2. 論文標題 A lambda-shaped retractor lentis muscle in the yellowfin goby <i>Acanthogobius flavimanus</i>	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Morphology	6. 最初と最後の頁 526 ~ 533
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/jmor.20961	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Inoue Yuki, Niihara Ohji, Rabor Janice B., Ikenaga Takanori, Kasai Masanori, Niidome Yasuro	4. 巻 48
2. 論文標題 Gold Nanorod-tags in Mucous Membrane of a Zebrafish	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Chemistry Letters	6. 最初と最後の頁 1488 ~ 1491
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1246/cl.190639	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Muko D, Ikenaga T, Kasai M, Rabor JB, Nishitani A, Niidome Y	4. 巻 54
2. 論文標題 Imaging mass spectrometry of gold nanoparticles in a tissue section as an immunohistochemical staining mass probe	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Mass Spectrometry	6. 最初と最後の頁 1-6
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/jms.4290	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Nakamura T, Matsuyama N, Kirino M, Kasai M, Kiyohara S, Ikenaga T	4. 巻 89
2. 論文標題 Distribution, Innervation, and Cellular Organization of Taste Buds in the Sea Catfish, <i>Plotosus japonicus</i>	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Brain, Behavior and Evolution	6. 最初と最後の頁 209-218
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1159/000471758	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ryuzono S, Takase R, Kamada Y, Ikenaga T, Chigwechokha PK, Komatsu M, Shiozaki K	4. 巻 135
2. 論文標題 Suppression of Neu1 sialidase delays the absorption of yolk sac in medaka ( <i>Oryzias latipes</i> ) accompanied with the accumulation of 2-3 sialo-glycoproteins	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Biochimie	6. 最初と最後の頁 63-71
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.biochi.2017.01.008	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計8件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 池永隆徳
2. 発表標題 魚類の味覚系の多様性
3. 学会等名 日本動物学会第91回大会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Takanori Ikenaga, Minaki Tsuji, Tatsufumi Nakamura, Tatsushi Tajiri, Sadao Kiyohara
2. 発表標題 Diversity of serotonergic cells in the taste bud of fish
3. 学会等名 2019 J.B. Johnston Club for Evolutionary Neuroscience Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takanori Ikenaga, Rinko Shimomai, Kazumasa Matsumoto, Satoru Kimura
2. 発表標題 Histological analysis of the cerebellum of <i>Polypterus senegalus</i>
3. 学会等名 Neuroscience 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 池永隆徳, 鈴あゆみ, 前田雄大
2. 発表標題 キンギョの摂餌行動とその神経基盤の解析
3. 学会等名 第71回日本動物学会九州支部大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Takanori Ikenaga, Rinko Shimomai, Kazumasa Matsumoto, Akihisa Takeuchi
2. 発表標題 Histological analysis of the cerebellum of ancestral actinopterygian fish, <i>Polypterus senegalus</i>
3. 学会等名 日本比較生理生化学会第40回神戸大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 山田大智, 塩崎一弘, 加藤太一郎, 清原貞夫, 池永隆徳
2. 発表標題 ゴンスイのc-fos遺伝子のクローニングと発現解析
3. 学会等名 平成30年度日本水産学会九州支部大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 池永隆徳, 中村達史, 鶴園悠暉, 清原貞夫
2. 発表標題 真骨魚類の体表における味蕾の分布
3. 学会等名 平成31年度日本水産学会春季大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 池永隆徳, 辻美奈希, 中村達史, 清原貞夫
2. 発表標題 魚類の味蕾におけるセロトニン免疫陽性細胞の形態と分布
3. 学会等名 第12回 水棲動物の行動と神経系シンポジウム
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計3件

1. 著者名 池永隆徳	4. 発行年 2018年
2. 出版社 丸善出版	5. 総ページ数 756
3. 書名 嗅覚/味覚、魚類学の百科事典（一般社団法人日本魚類学会編）	

1. 著者名 Takanori Ikenaga, Sadao Kiyohara	4. 発行年 2018年
2. 出版社 Springer	5. 総ページ数 315
3. 書名 Chemosensory systems in the sea catfish, <i>Plotosus japonicus</i> , Zebrafish, Medaka, and Other Small Fishes (Hiromi Hirata, Atsuo Iida eds)	

1. 著者名 池永隆徳	4. 発行年 2019年
2. 出版社 一色出版	5. 総ページ数 480
3. 書名 第9章 魚の味覚と摂餌行動の多様性, 遺伝子から解き明かす魚の不思議な世界（神田真司編）	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	清原 貞夫  (Sadao Kiyohara)  (50117496)	鹿児島大学・その他部局等・理事    (17701)	
研究 分 担 者	塩崎 一弘  (Kazuhiro Shiozaki)  (70390896)	鹿児島大学・農水産獣医学域水産学系・准教授    (17701)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関