

平成 22 年 5 月 31 日現在

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2007 ～ 2009

課題番号：19300115

研究課題名（和文）

手綱核・脚間核神経回路の成立機構と機能の解析

研究課題名（英文）

Study of the establishment and function of the habenulo-interpeduncular tract

研究代表者

岡本 仁 (OKAMOTO HITOSHI)

独立行政法人理化学研究所・発生遺伝子制御研究チーム・シニア・チームリーダー

研究者番号：40183769

研究成果の概要（和文）：

手綱核は、終脳の情動系神経核群と、脳幹部のモノアミン神経細胞群とを中継する神経回路を構成する。我々は、手綱核を含む神経回路が、魚から哺乳類まで、高度に保存されていることを利用し、ゼブラフィッシュ手綱核の亜核の神経活動を、遺伝子操作を使って操作することによって、動物が恐怖刺激に対して、経験に依存してどのような対処をするかの決定で、手綱核を含む神経回路が、重要な役割を果たしているという手がかりを得た。

研究成果の概要（英文）：

The habenula is a part of the neural circuit connecting the telencephalic limbic system with the monoaminergic neurons in the brain stem. Taking advantage of the high degree of evolutionary conservation of this neural circuit from fish to human, we have carried out genetic manipulation to inactivate specific subnuclei of the habenula in zebrafish and obtained a clue suggesting that the habenula plays an important role for experience-dependent decision in response to fear by animals.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	7,800,000	2,340,000	10,140,000
2008 年度	5,000,000	1,500,000	6,500,000
2009 年度	2,000,000	600,000	2,600,000
総計	14,800,000	4,440,000	19,240,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：神経科学・神経科学一般

キーワード：発生・発達・再生神経科学

1. 研究開始当初の背景

手綱核の最背側部に両側性に存在し、脳の

情動系神経核群（いわゆる大脳辺縁系の一部を含む）と、中脳と後脳の境界部に接する腹側正中線上に1つだけ存在する脚間核を中継する神経回路を構成する。哺乳類では、手綱核は内側核と外側核からなる。内側手綱核には、外界の物理的状況とその情動的価値の情報が、海馬と扁桃体から、中隔核と分界線条核を介して伝わる。左右の内側手綱核は、反屈束に沿って伸びる神経によって、脚間核とつながっている。脚間核は、更に腹側被蓋野のドーパミン神経細胞や、縫線核のセロニン神経細胞などのモノアミン神経細胞とつながっている。一方外側手綱核には、選択された行動プログラムに関わる大脳皮質・基底核・視床ループの細胞集団の興奮に関する情報が、腹側淡蒼球から運ばれる。外側手綱核から伸びる神経は、脚間核を介さずに直接に、腹側被蓋野や縫線核に投射している。このような神経回路の特徴から、我々は、内側手綱核と外側手綱核とは、何らかの相互作用によって、価値判断を伴った外界状況に関する情報（外部環境情報）と、それによって喚起された目的を持った行動に関する情報（内部行動プログラム情報）との照合が行われ、照合がうまくいかなかったときに、行動プログラムの改変がおこなわれるのではないかと考えている。実際に、彦坂らを含む複数のグループの研究によって、外側手綱核の神経細胞は、報酬を期待する行動で、報酬が得られなかった時に興奮し、ドーパミン神経細胞の活動を抑制することが示されている[Hikosaka et al., J. Neurosci. 28:11825-11829, 2008]。しかしながら、内側手綱核を脚間核と結合する神経回路の役割や、内側手綱核と外側手綱核の相互作用の実態などは、殆ど分かっていない。

2. 研究の目的

手綱核を経由する神経回路が、サカナからヒトまで保存されていることを証明し、ゼブラフィッシュを使って手綱核の機能を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 遺伝子組換え技術を利用し、内側又は外側亜核で選択的に細胞死誘発因子や神経伝達効率を低下させる因子を強制発現させ、上

記と同様の行動実験への影響を調べる。

(2) 上記学習行動の成立の前後で、条件刺激の提示に対する手綱核の活動光学的イメージングと電気生理学的方法によって計測する。さらに、終脳の各部位と手綱との活動の相関を調べる。

4. 研究成果

(1) ゼブラフィッシュを用いた背側手綱核(哺乳類の内側手綱核に相当)の機能解析

我々は、ゼブラフィッシュでは背側手綱核と腹側手綱核が、マウスの内側手綱核と外側手綱核に相当することを発見した(Aizawa et al., J. Neurosci, 2010)。更に我々は、ゼブラフィッシュの背側手綱核が、更に外側と内側の亜核に分かれており、外側亜核は脚間核の背側半分に、内側亜核は脚間核の腹側半分に選択的に投射すること、左側の手綱核では外側亜核が内側亜核よりも有意に大きく、右側の手綱核ではその反対であることを発見した(Aizawa et al., Current Biology, 2005; Devel. Cell, 2007)。更に、背側手綱核の外側亜核が投射する背側脚間核は、脅威や性的衝動に基づく本能的行動の中枢である中心灰白質に投射し、内側亜核が投射する腹側脚間核は、セロトニン神経細胞を含み戦略的行動プログラムの成立に関わる縫線核に投射することも証明している(Agetsuma et al., 改訂中)。

このような神経回路を特異的に操作するために、これまでに、背側手綱核の全体や、外側亜核だけに特異的にGal4-VP16を発現するトランスジェニック・ゼブラフィッシュを作成している。これらの系統を使って、背側手綱核や、外側亜核だけを選択的に破壊したり、神経活動を抑制できるようになった。

Narp (Neuronal Acitivity Regulated Pentraxin) は、シナプス間隙に分泌されて、AMPA型グルタミン酸受容体の集積を促進する働きを持ち、マウスでは、Narpのノックアウト個体は、モルヒネによる場所嗜好記憶の消去などに障害を示す。ゼブラフィッシュでは、Narpが手綱核の背側手綱核の外側亜核に特異的に発現することから、我々のトランスジェニック系統を用いて、背側手綱核の外側亜核の神経細胞を選択的に不活化して、記憶(特に恐怖記憶)とその消去にどのような影響が

出るかを調べた。背側手綱核の外側亜核の神経細胞で、特異的に破傷風毒素を産生し、背側脚間核への神経伝達の特異的に遮断されたトランスジェニック・ゼブラフィッシュでは、恐怖学習の成立後の、恐怖反応が、異常に亢進していることが明らかになった。即ち、野生型のゼブラフィッシュでは、恐怖学習の後に条件刺激を提示すると、一時的な遊泳活動の亢進が見られるだけだが、このようなトランスジェニック系統は、条件刺激と提示後、完全に行動を停止した（フリージング）。この状態は、条件刺激の提示終了後も数分間持続した。このことから我々は、**背側手綱核（哺乳類の内側手綱核）の外側亜核が、恐怖学習の成立や消去と密接に関わっているのではないかと考えられるようになった。**

一方理化学研究所の吉原らは、我々が研究の過程で偶然単離同定した、嗅上皮特異的に発現する LIM/ホメオドメイン型転写因子 Lhx2a のプロモーターを使って、GFP を発現するトランスジェニック・ゼブラフィッシュを作成した。吉原らは、この系統で、嗅球の特異的な一部の糸球体から、紆余曲折を経ながらも最終的には、右側の背側手綱核の内側亜核のみに投射する GFP 発現神経細胞を同定した (Miyasaka et al., J Neurosci. 29:4756-4767, 2009)。ゼブラフィッシュは、ゼブラフィッシュの皮膚の破砕物抽出液の匂いに対して、先天的な恐怖行動（パニックの後フリージング）を示すことが知られており、この神経回路との関わりが強く疑われる。

以上のこれまでの研究から、ゼブラフィッシュの背側手綱核の外側亜核と背側脚間核とを結ぶ神経回路は、内側亜核と腹側脚間核とを結ぶ神経回路と、拮抗的に働き、学習による恐怖反応や、先天的な恐怖応答の程度や特異性の調節において重要な役割を果たしているのではないかと考えられる。

(2) ゼブラフィッシュを用いた学習に伴って変化する終脳神経活動のイメージング

ヒトを含めた哺乳類の脳は大きすぎて、全体をひとつのシステムとして観察することはできない。しかし、神経回路が簡略化されているゼブラフィッシュでは、神経活動の可視化技術を用いることで、複数の神経核を含

む回路全体の動的変化を追うことが可能である。我々は理研脳センターの宮脇敦史らが開発した **Inverse Pericam** を、すべての神経細胞で発現するトランスジェニック魚をつかって、遺伝学的にコードされたカルシウム感受性蛍光蛋白による神経活動を検出する観察システムを確立した。2分割された水槽で、特定の色の条件刺激の提示後一定の時間以内に、反対側の区画に逃避すれば、非条件刺激である電気ショックを回避できるという、**能動的回避行動**を条件付け学習したトランスジェニック魚では、対照実験群として同じ回数 of 光刺激（条件刺激）を受けながら電気ショック（非条件刺激）は受けない偽条件付け学習をしたトランスジェニック魚と較べて、右眼から入った非条件刺激（赤色光刺激）に対して、**終脳の定まった部位のみでの神経活動の明らかな亢進**が見られた。反応が見られた終脳の部分は脳表面では外套とよばれる部位にあたり、ゼブラフィッシュの属する硬骨魚類では扁桃体や大脳皮質にあたる領域であると考えられている。この実験結果はゼブラフィッシュの終脳の扁桃体または大脳皮質にあたる領域において、**条件付け学習によって一群の神経細胞集団が選択され、恐怖記憶をコードするようになったことを示唆している。**

この実験系を用いて、逃げ場を与えない恐怖学習と、能動的回避学習とで、終脳で活動が変化する部分が異なるかどうかや、終脳の細胞集団で、条件刺激の意義の変化（報酬か罰など）が、興奮する細胞集団の変化として捉えられるかなどを調べられるようになった。さらに、手綱核の破壊がそれぞれにどのような影響を及ぼすかなどを調べることができるようになった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計 19 件）

- ①Amo R, Aizawa H, Takahoko M, Kobayashi M, Takahashi R, Aoki T, and Okamoto H. (2010) Identification of the zebrafish ventral habenula as a homologue of the mammalian lateral habenula. J. Neuroscience. 30:1566-1574. 査読有
- ②Ohata S, Kinoshita S, Aoki R, Tanaka H, Wada H, Tsuruoka-Kinoshita S, Tsuboi T, Watabe S, and Okamoto H. (2009) Neuroepithelial cells require fucosylated

- glycans to guide the migration of vagus motor neuron progenitors in the developing zebrafish hindbrain **Development**, 136(10):1653-1663. 査読有
- ③ Miyasaka N, Morimoto K, Tsubokawa T, Higashijima S, and Okamoto H, Yoshihara Y. (2009) From the olfactory bulb to higher brain centers: genetic visualization of secondary olfactory pathways in zebrafish. *J Neurosci*. 29:4756-4767. 査読有
- ④ Okamoto H, Sato T, and Aizawa H. (2008) Transgenic technology for visualization and manipulation of the neural circuits controlling behavior in zebrafish, *Develop. Growth Differ* 50 Suppl 1:S167-75. 査読有
- ⑤ Okamoto H. (2008) An interview with Hitoshi Okamoto, M. D., Ph. D. Interview by Stephen C. Ekker. *Zebrafish*. 5:155-158. 査読有
- ⑥ 岡本仁、相沢秀紀、揚妻正和、青木田鶴 (2008) ゼブラフィッシュを使った情動系神経回路網の可視化と操作, ~手綱核神経投射の左右差の成り立ちとその意味を求めて~, 蛋白質・核酸・酵素, 53(4):475-481. 査読無
- ⑦ 岡本仁、相沢秀紀 (2008) シリーズ“気になる脳の部位”: 手綱核先端医学、8(2):134-141. 査読無
- ⑧ Aizawa H, Goto M, and Okamoto H. (2007) Temporally regulated asymmetric neurogenesis causes left-right difference in the zebrafish habenular structures *Developmental Cell*, 12:87-98. 査読有
- ⑨ Sato T, Hamaoka T, Aizawa H, Hosoya T, and Okamoto H. (2007) Genetic single-cell mosaic analysis implicates ephrinB2 reverse signaling in projections from the posterior tectum to the hindbrain in zebrafish. *J Neurosci*. 27:5271-9. 査読有
- ⑩ Tanaka H, Maeda R, Shoji W, Wada H, Masai I, Shiraki T, Kobayashi M, Nakayama R and Okamoto H. (2007) Novel mutations affecting axon guidance in zebrafish and a role for plexin signaling in the guidance of trigeminal and facial nerve axons. *Development* 134: 3259-3269. 査読有
- ⑪ Okamoto H. (2007) Yin-yang ways of controlling gene expression are now in our hands. *ACS Chem Biol*. 2007 2:646-648. 査読有
- ⑫ 相沢秀紀、岡本仁 (2007) ゼブラフィッシュを使って明らかになってきた脳の神経回路の左右差、*Medical Bio*, 9月号、82-88. 査読無
- [学会発表] (計 件)
- ① 岡本仁 “A fish’s-eye view of human emotion” 人間知性研究センター第5回シンポジウム: ヒト以外の知性について話そう! 東京 2010.3
- ② Okamoto H “Functional analysis of the habenula in control of fear” 11th Australian and New Zealand zebrafish workshop Sydney Australia 2010.2
- ③ Okamoto H “Functional analysis of the habenula in control of fear” 14th IBRO-APRC associate school of neuroscience “Synaptic plasticity: From basics to clinical applications” Bangkok Thailand 2010.1
- ④ Okamoto H “Emotion” 14th IBRO-APRC associate school of neuroscience “Synaptic plasticity: From basics to clinical applications” Bangkok Thailand 2010.1
- ⑤ 岡本仁 “ゼブラフィッシュ研究から見たヒトの心の成り立ち” 大阪バイオサイエンス研究所 Monthly Lecture 吹田 2010.1
- ⑥ Okamoto H “Zebrafish as a model animal to study neural circuits against fear” INCF Topical Workshop on Roles of neuroinformatics in the process of building, evaluating and using genetic animal models for brain diseases Stockholm Sweden 2009.12
- ⑦ 岡本仁 “恐怖研究の新しいモデル実験動物としてのゼブラフィッシュ” 第32回日本分子生物学会年会 横浜 日本 2009.12
- ⑧ Okamoto H “Zebrafish as a model system for study of fear” IBRO-APRC Neuroscience associate school: Hormones, Brain and Behaviour Bandar Sunway Malaysia 2009.11
- ⑨ Okamoto H “Roles of Mosaic eyes/Crumbs complex in coordination of proliferation with the apico-basal polarity of the neuroepithelial cells” Construction and Reconstruction of the Brain Awaji Japan 2009.10
- ⑩ 岡本仁 “手綱核: 行動と記憶のスイッチボードを求めて” 千里ライフサイエンスセ

- ミナー「次世代の脳研究」 豊中 2009.11
- ⑪ Okamoto H, "Functional analysis of the habenula in control of fear" 4th Asia-Oceania zebrafish meeting Jeju island Korea 2009.9
- ⑫ Okamoto H "Past, present and future of RIKEN BSI" International Symposium on Brain Science Institute Incheon Korea 2009.3
- ⑬ 岡本 仁 "ゼブラフィッシュから分かる、ヒト脳の発生と機能" 日本動物学会関東支部第61回大会シンポジウム「モデル動物を使った脳科学の新展開」 さいたま 2009.3
- ⑭ 岡本 仁 "ゼブラフィッシュ脳のイメージングから分かる脳の成り立ちと働き" 生命科学を翔るイメージング-東京大学新領域創成科学研究科附属バイオイメージングセンター(仮称)設立記念シンポジウム 東京 2009.3
- ⑮ Okamoto H "Functional analysis of the habenular nuclei in fear response based on the evolutionary conservation of the neural circuits" 3rd strategic conference of zebrafish investigators Asilomar USA 2009.1
- ⑯ 岡本 仁, 大畑 慎也, 和田 浩則, 木下 滋晴, "The neuroepithelial guidance of the migrating cranial motoneuron precursors" 第31回日本神経科学大会 (Neuroscience 2008) 東京 2008.7
- ⑰ Okamoto H "Development and Functions of the lateralized neural circuits for the emotional control of memory and behavior" CDB Symposium 2008: Turning Neurons Into a Nervous System Kobe Japan 2008.3
- ⑱ 岡本 仁 "手綱核神経回路の左右差の成立機構と機能解析" 文部科学省科学研究費特定領域研究「性分化機構の解明」第3回冬のワークショップ 御殿場 2008.3
- ⑲ Okamoto H "Genetic dissection of migration of the vagus motor neuron precursors" Asia pacific zebrafish network meeting Auckland New Zealand 2008.2
- ⑳ Okamoto H "What does comparative genomics tell us about the evolutionary conservation and dynamic changes of the regulatory mechanisms for tissue specific gene expression?" 54th NIBB conference New frontiers for the Medaka model Genome, bioresources and Biology Okazaki 2008.2
- ㉑ 岡本 仁 木下 滋晴, 大畑 慎也, 和田 浩則, "迷走運動神経細胞移動の遺伝学的解析" 第30回日本分子生物学会年会・第80回日本生化学会大会 (BMB2007) 横浜 2007.12
- ㉒ Okamoto H "Practical guides for using zebrafish in neuroscience" RIKEN BSI - Picower Workshop 2007 at RIKEN Wako Japan 2007.11
- ㉓ Okamoto H "Asymmetry of the emotion controlling neural circuits in the zebrafish brain" Karolinska Institutet - RIKEN BSI 1st Joint Symposium: The Mysteries of the Brain- New Frontiers in Neuroscience Stockholm Sweden 2007.11
- ㉔ Okamoto H "The left-right asymmetry of the neural circuit in the zebrafish limbic brain" Riken Brain Science Institute and Queensland brain institute joint symposium Wako 2007.9
- ㉕ 岡本 仁 "心の基盤となる精神回路の成り立ちを究める" 東洋紡バイオ財団設立25周年記念シンポジウム「次世代へのメッセージ: 生命科学 - 世界に羽ばたいた若手の歩み」 大阪 2007.6
- ㉖ Okamoto H "Establishment of the asymmetry in the habenulo-interpeduncular projection" Zebrafish meeting of From sensory perception to motor output: genetic bases behaviour in the zebrafish embryo Minerve France 2007.5
- ㉗ 岡本 仁 "ゼブラフィッシュによって明らかになる神経細胞の分化の動態" 日本顕微鏡学会第63回学術講演会 新潟 2007.5
- [図書] (計3件)
- ① 岡本仁 (2009) 遺伝子と経験が作る神経回路。現代生物科学入門, 第4巻, 神経生物学 (浅島誠編)、岩波書店pp1-67
- ② 岡本仁 (2008) 脳の基本設計図と心の進化、多様化、障害、シリーズ脳科学、脳の発生と発達 (岡本仁編)、東京大学出版会pp5-38.
- ③ 岡本仁 (2007) 脳の進化と心の誕生、脳科学の最前線 (上巻、脳と認知と進化)、理化学研究所、脳科学総合研究センター編、講談社ブルーバックスpp69-131

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岡本 仁 (OKAMOTO HITOSHI)

独立行政法人理化学研究所・発生遺伝子制御
研究チーム・シニア・チームリーダー
研究者番号：40183769

(2) 研究分担者

相澤 秀紀 (AIZAWA HIDENORI)
独立行政法人理化学研究所・発生遺伝子制御
研究チーム・副チームリーダー
研究者番号：80391837

青木 田鶴 (AOKI TAZU)
独立行政法人理化学研究所・発生遺伝子制御
研究チーム・研究員
研究者番号：10425605

揚妻 正和 (AGETSUMA MASAKAZU)
独立行政法人理化学研究所・発生遺伝子制御
研究チーム・研究員
研究者番号：30425607