

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 7 月 18 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22580198

研究課題名（和文） 魚類の神経筋運動系の使い回し仮説の検証

研究課題名（英文） The verification of the alternative usage hypothesis of the neuro-motor system in teleosts. An attempt in the ayu (*Plecoglossus altivelis altivelis*) as a model fish by using a molecular marker c-fos.

研究代表者

植松 一眞 (UEMATSU KAZUMASA)

広島大学・大学院生物圏科学研究科・教授

研究者番号：00116542

研究成果の概要（和文）：

裸状型卵巣を有するサケマス類やアユでは体側筋を産卵にも用いるが、この行動を制御する神経機構は不明である。

そこで産卵時に活動したニューロンを特定するためのマーカーとして、アユの c-fos 遺伝子の全塩基配列を決定し、この情報をもとに作成したアユ c-Fos 組換えタンパク質を抗原としてアユ c-Fos 抗血清を得た。産卵したメスの脳から切片を作成し、上記の特異抗体で免疫染色したところ、遊泳誘発領域である中脳の内側縦束核のニューロンが他よりも強く発色した。

研究成果の概要（英文）：

The salmonids and the ayu *Plecoglossus altivelis altivelis* use the trunk musculature also for spawning, but concerned brain regions have been unknown.

In order to obtain a specific molecular tool to determine brain regions regulating spasmodic body contraction in the spawning ayu, we firstly isolated c-fos cDNA from the ayu brain. Based on the sequence, we obtained the full length recombinant ayu c-Fos protein and specific antisera by using the protein as antigens. Immunostaining of brain sections of the spawned ayu with the antiserum suggested that the concerned brain area might correspond to the midbrain locomotor region.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：水産学・水産学一般

キーワード：アユ・脳・産卵中枢・裸状型卵巣・体側筋・c-fos・最初期遺伝子・特異抗体

## 1. 研究開始当初の背景

魚類は体側筋で遊泳と逃避行動をする。しかし、サケマス類とアユは、卵巣が腹腔に開放されているために、体側筋を遊泳と逃避行

動だけでなく産卵にも使う特異な魚種である。遊泳と逃避行動を誘発する脳内領域はそれぞれすでに同定されているが、産卵時の体側筋活動を誘発する脳領域については不明

である。このように我々は異なる脳内中枢からの指令により、脊髄内の単位回路と体側筋が、別の運動を発現するように「使い回され」ているという仮説を提唱した。本研究はアユをモデル動物として、その仮説を検証する試みである。

## 2. 研究の目的

- (1) ニューロン活動の指標となる遺伝子 *c-fos* のクローニングをアユの脳抽出物を用いて行い、明らかにした塩基配列を基に大腸菌によるアユ *c-Fos* 組換えタンパク質を得る。
- (2) アユ *c-Fos* 組換えタンパク質を抗原としてウサギに免疫することにより特異抗体を得る。
- (3) カイニン酸投与により人為的に脳活動を活性化させたアユの脳抽出物でノザンブロットティング及びウェスタンブロットティング法を行い、*c-fos* の mRNA 及びタンパク質の発現を確認する。
- (4) 同じくアユ脳切片に *in situ* ハイブリダイゼーション法を施すことにより *c-fos* の mRNA の局在を確認する。
- (5) 同じくアユ脳切片に特異抗体を用いた免疫染色を施すことにより *c-fos* タンパク質の局在を確認する。
- (6) 人工的に再現した産卵環境に完熟したアユ雌雄を収容して産卵をさせた後に、産卵した魚の脳を固定する。作成した脳切片に *in situ* ハイブリダイゼーション法もしくは特異抗体を用いた免疫染色を施し、産卵時に活動した脳領域を探索する。
- (7) 脳領域の判定に必要な精密なアユ脳地図を作成するとともに、脳から脊髄に軸索を伸ばすニューロンの同定。
- (8) 産卵活動の誘発に関わったと考えられるアユの脳領域に微小電気刺激を加える事により産卵時と同じ体側筋活動を人為的に誘起させる。
- (9) 以上の結果を総合することにより、アユの産卵時体側筋活動を制御する脳内中枢を解明した上で「使い回し仮説」を証明すること。

## 3. 研究の方法

- (1) アユ *c-fos* 遺伝子の全塩基配列を決定
- ①アユ脳において *c-fos* 遺伝子の mRNA 発現を誘導するために、脳内ニューロンを網羅的に興奮させるカイニン酸をアユに腹腔内投与した。注射後 30 分にアユから脳を摘出し凍結保存した。
- ②1 尾分の脳から全 RNA を抽出し、cDNA を合成した。特異的プライマーを用いて PCR を行い、アユ *c-fos* の cDNA 断片を得た。明らかにした配列を基に 3' および 5' RACE 法を行い、アユ *c-fos* の cDNA の全配列を決定した。

### (2) *c-fos* 遺伝子の発現後の推移の検証

アユの *c-fos* 遺伝子の 877-982 番目の塩基配列を増幅させる特異的プライマー・セットを用いて、カイニン酸注射後の *c-fos* の脳内 mRNA 発現量を定量的 RT-PCR 法により経時的に調べた

### (3) アユ脳地図の作成と脊髄下降ニューロンの同定

- ①ブアン液で固定したアユ脳の完全連続切片を作製し、ニッスル染色を施し、嗅球から脊髄前端までの 32 枚の脳地図を作成し、各脳領域の名称を特定した。
- ②アユの脊髄に神経トレーサー BDA を注入し、脊髄に軸索を伸ばす脳内ニューロンを逆行性に標識した。

### (4) 市販の抗体を用いた *c-Fos* タンパク質の発現過程の予備検討

- ①ヒト *c-Fos* タンパク質を抗原として作成された市販抗体を用いて、カイニン酸投与後のアユ *c-Fos* タンパク質の発現過程をウェスタンブロットティング法と脳切片の免疫染色で調べた。

### (5) 発現した *c-fos* 遺伝子のノザンブロットティング解析と *in situ* ハイブリダイゼーション解析

- ①アユの *c-fos* 遺伝子の 1,316-1,611 番目の塩基配列に対する DIG 標識 cRNA プローブを作成した。
- ②このプローブを用いて、カイニン酸を投与したアユの脳抽出物でノザンブロットティングを行ったが、発色はなかった。
- ③そこで *in situ* ハイブリダイゼーション解析は行わなかった。

### (6) アユ *c-Fos* 組換えタンパク質と特異抗体の作成

- ①アユ *c-Fos* 組換えタンパク質の発現のために、アユ *c-Fos* の塩基配列を大腸菌のコードン使用頻度に最適化した。
- ②大腸菌 *E. coli* BL21 (DE3) を用いて His タグ融合タンパク質として発現させたアユ *c-Fos* を精製し、ウサギに免疫した。
- ③得られたアユ *c-Fos* 抗血清 Anti-PgFos2 の特異性を、アユ脳のタンパク質抽出液を用いてウェスタンブロット法で評価した。

### (7) アユの産卵誘発と産卵アユ脳の免疫組織学的観察

- ①アユの産卵誘発に必要な水流や底砂などの環境を再現した 6 個の水槽に、それぞれ成熟したメス 2 尾、オス 4 尾を入れて一晩放置した。
- ②翌朝、産卵した個体および対照個体の脳を

4%パラホルムアルデヒドで固定した。その後、常法によりパラフィンに包埋して脳の連続横断切片(10 μm)を作製した。

③この切片にアユ c-Fos 抗血清 Anti-PgFos2 を用いた ABC 法による免疫染色を施して、脳内の免疫陽性ニューロンを探索した。

(8) その他

①アユの脳に電気刺激を加える実験は期間内に実施することができなかった。

#### 4. 研究成果

(1) アユの c-fos 遺伝子

①アユの c-fos 遺伝子は 1,104 bp の翻訳領域からなり、一次構造は 368 アミノ酸残基からなることが推定された。また、同配列には c-fos 遺伝子の特徴である basic region と leucine zipper の両配列を含んでいることからアユの c-fos 遺伝子であることが確認された。

②アユの c-fos 遺伝子の 877~982 番目の塩基配列を増幅させる特異的プライマー・セットを用いて、神経細胞を網羅的に興奮させるカイニン酸注射後の c-fos の脳内 mRNA 発現量を定量的 RT-PCR 法により経時的に調べたところ、注射後 30~60 分に発現量が極大値を示し、その後減少することが明らかとなった。(図 1)

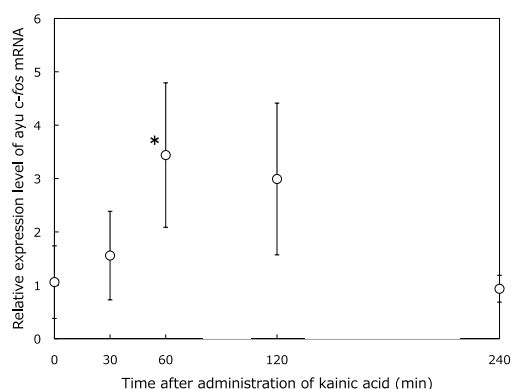


図 1 c-fos 遺伝子の脳内発現量 (縦軸) と経過時間 (横軸)

③この実験の過程でアユのカイニン酸に対する感受性がこれまで知られているキンギョに比べて非常に低いことが分かった。血液脳関門の仕組みに違いがあることが示唆される。

(2) アユ脳地図の作成と脊髄投射ニューロンの同定

①脳の構造は比較的近縁のヒメマスによく似ていることが確認された。

②後脳部に多くの脊髄投射ニューロンが標識された。しかしながら、実験の遅れで中脳

部のニューロンを標識するには至らなかった。

(3) 市販抗体を用いた c-Fos タンパク質の発現過程の予備検討

①市販抗体を用いたウエスタンブロッティング法では脳内の c-Fos タンパク質の発現量はカイニン酸投与後 120 分を経過しても高いレベルを維持していることが分かった。

②同じ抗体を用いて、カイニン酸投与したアユ脳の切片を免疫染色した結果、対照群よりも多くの脳ニューロンがより濃く染め出されていることが分かった。

(4) 作成した特異抗体による c-Fos タンパク質の発現過程の検討

①得られたアユ c-Fos 抗血清 Anti-PgFos2 の特異性を、アユ脳のタンパク質抽出液を用いてウエスタンブロット法で評価したところ、アユ c-Fos の推定分子量付近に単一のバンドが認められた。

②神経興奮薬であるカイニン酸をアユ腹腔内に投与してから 60 分後に c-fos mRNA 発現の有意な増加が見られたものの、c-Fos タンパク質の発現量に変動はなかった。これはアユのカイニン酸への感受性が他の魚種よりも低いため、カイニン酸による神経興奮が不十分であった可能性が考えられるが、原因は不明である。

(5) 人工的環境下におけるアユの産卵行動の誘起

①滋賀県水産試験場の屋外水槽に設けた人工産卵場にアユ成熟親魚雌雄を放ち産卵行動の誘起を試みた。試行錯誤の末、数時間にわたる産卵行動を観察できた。

②しかし、魚の取り上げに手間取ることが分かり、次回はより小規模での実験を行うこととした。

③小型水槽に少数尾収容したアユが翌朝産卵していた。

(6) 産卵したアユ脳切片の免疫組織学的観察

①ABC 法による免疫染色を施し、顕微鏡下で観察したところ、産卵後アユの終脳から延髄までの広範囲にわたって陽性細胞が観察された。

②特に遊泳の開始に深く関係する内側縦束核には、対照個体よりも産卵個体により多くの陽性ニューロンが観察され、その染色態度もより強かった(図 2、3)。一方、逃避行動に関わるマウスナー細胞はどちらの個体においても免疫反応は陰性であった。

③以上より、アユでは左右の体側筋を使った通常の波状運動による遊泳を制御する中脳の内側縦束核ニューロンが、産卵時には高頻

度でより強く発火することにより体側筋を強縮状態に至らしめる結果、腹腔内圧が高まることで卵を体外へ放出する可能性が示唆された。

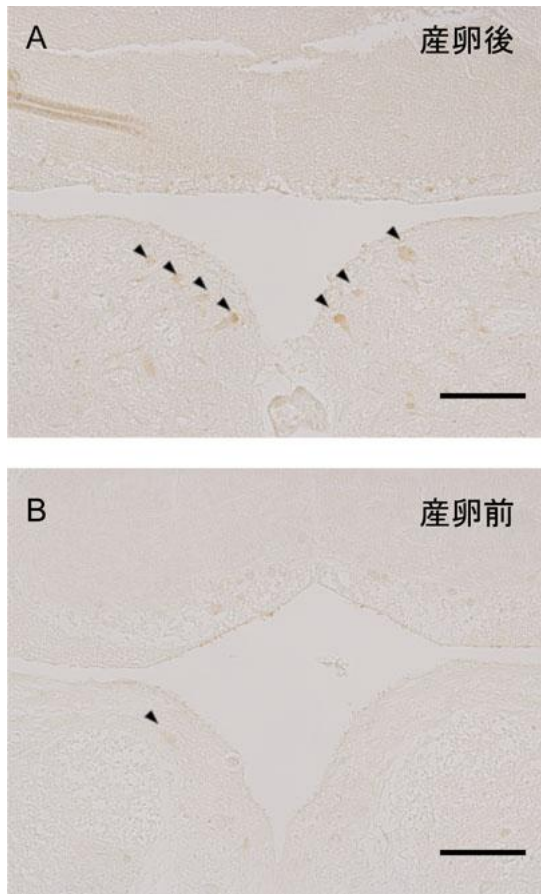


図2 作成した特異抗体で免疫染色した産卵後 (A) と産卵前の (B) のアユの内側縦束核ニューロン (横断切片、スケールバーは 100 μm)

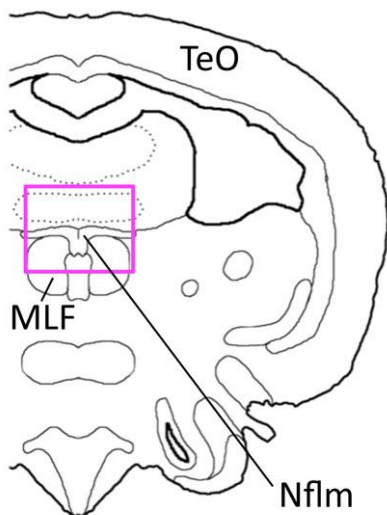


図3 内側縦束核 (MLF) をアユ脳の当該部位の横断面 (TeO は視蓋、Nflm は内側縦束)

### 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 0 件)

[学会発表] (計 0 件)

[その他]  
ホームページ等

### 6. 研究組織

#### (1) 研究代表者

植松 一真 (UEMATSU KAZUMASA)

広島大学・大学院生物圏科学研究科・教授  
研究者番号：00116542

#### (2) 研究分担者

藤川 愉吉 (FUJIKAWA YUKICHI)

広島大学・大学院生物圏科学研究科・講師  
研究者番号：10506687

#### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：