

## 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24年5月14日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22770056

研究課題名（和文） トビハゼを用いた魚類海馬の行動学的・形態学的探索

研究課題名（英文） Behavioral and morphological identification of the teleost hippocampus using mudskipper.

研究代表者

棕田 崇生 (MUKUDA TAKAO)

広島大学・大学院総合科学研究科・助教

研究者番号：60346335

研究成果の概要（和文）：

トビハゼに物体識別課題を課し、学習成立群で cFos タンパク質が特異的に発現する脳領域を免疫組織化学的に検出した。非学習群と比較すると、終脳背外側領域で顕著な cFos 陽性細胞の増加が認められた。物体識別は空間認知学習では欠かせない機能の一つであり、哺乳類では海馬やその周囲部が関与することが知られている。このことから、この領域は魚類の空間認知を担う脳領域であると考えられる。

研究成果の概要（英文）：

In this study, we found that neurons showing cFos immunoreactivity were localized in the lateral part of the dorsal telencephalon in the mudskipper following the object discrimination learning. Since object discrimination is one of the most important abilities for spatial learning and since the function is undertaken in the hippocampus and the adjacent region in mammals, the lateral region of the dorsal telencephalon in fish may be comparable to the mammalian hippocampus.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,100,000	630,000	2,730,000

研究分野：解剖学、生理学

科研費の分科・細目：基礎生物学・形態・構造

キーワード：魚類、海馬、空間認知

## 1. 研究開始当初の背景

学習と記憶は軟体動物から哺乳類にいたるまで、すべての動物に備わっている脳機能である。脊椎動物では海馬がその主要な機能を担い、そのなかでも鳥類と哺乳類では海馬が同一の起源を持つ組織であることが、発生学的、神経解剖学のおよび行動学的に認められている。しかし魚類脳では、前脳の発生機

序がその他の脊椎動物とは大きく異なるため、哺乳類等と相同な海馬機能を担う脳領域（海馬相当領域）を比較発生学のおよび比較解剖学的に対比することが困難である。

魚類では、終脳の一部を破壊することで学習・記憶の機能低下を招くことから、魚類の海馬相当領域は、終脳にある可能性が示唆されている（e.g., Rodriguez et al., 2002; Saito &

Watanabe, 2004, 2005)。しかしながら、脳の破壊の実験は“その領域がないときの脳の機能”を調べているので、その領域に局在する神経核が重要なのか、それともそこを走行する神経線維が重要なのか、直接的な証拠を得ることができない。一方で、神経連絡と神経伝達物質の分布に注目した研究例もあるが(e.g., 山本, 2008)、終脳のなかでどこが海馬相当領域なのかについて様々な見解があり、いまだに決着を見ていない。これらを解決するためには、魚類の脳内で学習・記憶によって実際に活性化されている脳領域を見つけだし、その特性を調べる必要があった。

## 2. 研究の目的

上述のような背景から、本研究は、トビハゼをモデル動物に用いて、非破壊的な方法で魚類の海馬相当領域を見つけ出すことを目指した。トビハゼは魚類であるが、海水飼育の場合、上陸嗜好性が極めて高く、一日の大半を陸上で過ごしている。トビハゼは発達した胸鰭を前肢のように動かして陸域を這いずり回るので、魚類でありながら陸上脊椎動物に通じる点が多く、哺乳類の学習・記憶評価に用いられる実験課題を大きく変えることなく応用できる。また、その行動指標として、陸域から水域への移動あるいはその逆を用いることで、他の魚種にくらべ明瞭な評価が可能であるので、トビハゼは魚類の学習・記憶に関する研究を遂行するのに格好のモデル動物である。これらトビハゼの利点を生かし、本研究では、げっ歯類の主要な学習評価法である水探索課題とモリス水迷路課題とを合わせた課題として、モリス水迷路類似テストをトビハゼに課して学習を成立させ、そのときに活性化しているニューロンを免疫組織化学的方法により検出することで非破壊的に海馬相当領域を見つけることを目的とした。

## 3. 研究の方法

トビハゼは汽水域に生息するので、彼らを取り巻く環境水の塩濃度は、完全な海水の塩濃度の 15-30%程度である。そこで、まずはトビハゼが淡水 (FW) にくらべて汽水 (30%濃度海水, BW) のような塩環境を好むか否かを調べた (塩嗜好性テスト)。

塩嗜好性テストでは、外界を遮蔽した四角形水槽を実験アリーナとした。底にしいたスポンジにシャーレを2つ埋め込み、一方にFW、もう一方にBWを入れた (図1)。1セッションを1時間とし、5分間のインターバルを設けて連続して3セッション行った。セッションごとにシャーレに入れる水の組み合わせを毎回変えた。

塩嗜好性テストでは、トビハゼがFWよりもBWを好むことを見出したので、BW入り

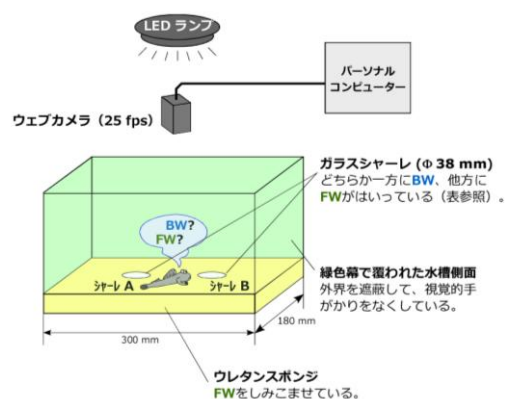


図 1: 塩嗜好性テストに用いた実験装置の模式図

シャーレと視覚的手がかりをリンクさせるような実験装置を用いて空間認知テストをおこなった。底をスポンジで覆った円形実験アリーナを用意し、各四分円領域にシャーレを埋め込み、シャーレに直面するようにアリーナ外に目印 (樹木、箱、草、ブロック) を設置した (図 2)。トレーニングは連続した4セッションとし、1セッションを45分とした。どのセッションでも「樹木」に直面するシャーレをBWとし、それ以外をFWとした。各セッション終了後、アリーナ中央にケースでトビハゼを確保し、すべてのシャーレを十分洗浄した。洗浄後、アリーナを時計回りに45°回転させ、新たに「樹木」の位置に来たシャーレにBWをいれた。同様に、次のセッションを開始する前にアリーナを回転させるので、4回のセッションを終えるときには、すべてのシャーレは一度はBWが入っていた履歴を持つことになる。

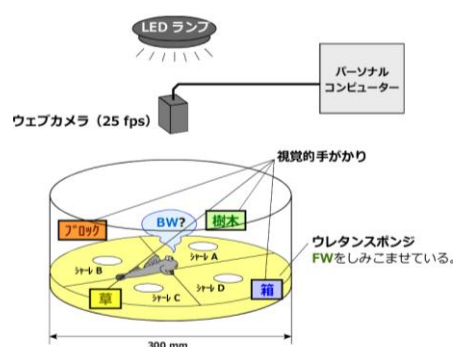


図 2: 空間認知テストに用いた実験装置の模式図

連続した4回のトレーニングセッション終了後、シャーレを十分洗浄し、アリーナを任意に回転させた。すべてのシャーレを空のままにして、トビハゼを放ち、15分間アリーナ内を探索させた。テストでも「樹木」の位置

のシャーレあるいは区画に長く滞在した場合、その個体は学習が成立したとした。

学習成立個体をただちに断頭し、cFos タンパク質が特異的に発現する脳領域を免疫組織化学的に検出した。

#### 4. 研究成果

実験に用いたトビハゼは、すべて BW を好んだ (n=15) (図 3)。

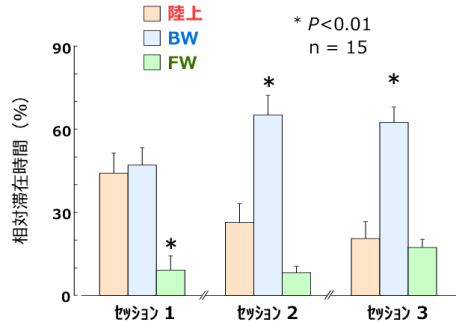


図 3: 塩嗜好性テストにおける相対滞在時間の比較

塩嗜好性を示すすべての個体で空間認知テストを行ったところ、およそ半数の個体 (n=8) が空間認知テストで学習を成立させた (図 4, 5)。

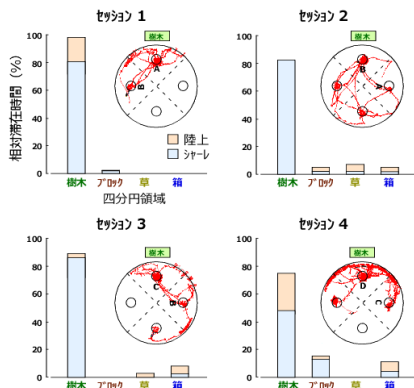


図 4: トレーニングセッションのトラッキングとシャーレおよび区画での滞在時間 (1 例)

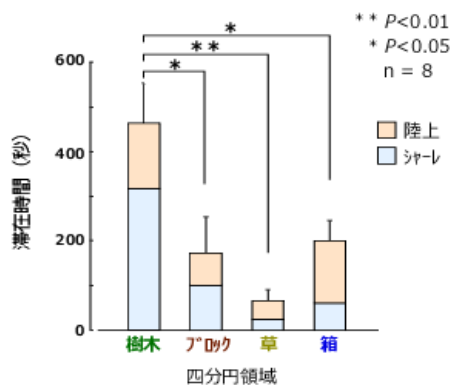


図 5: ト学習成立群のテスト時の滞在時間

学習成立群の脳切片を用いて cFos タンパク質を染色出したところ、非学習群と比較すると、学習成立群の終脳背外側領域で顕著な cFos 陽性細胞の増加が認められた (図 6)。このことは、トビハゼは高度な空間認知能力を持ち、物体を記憶・想起するときには、終脳背側領域外側領域が活性化される可能性があることを示唆している。

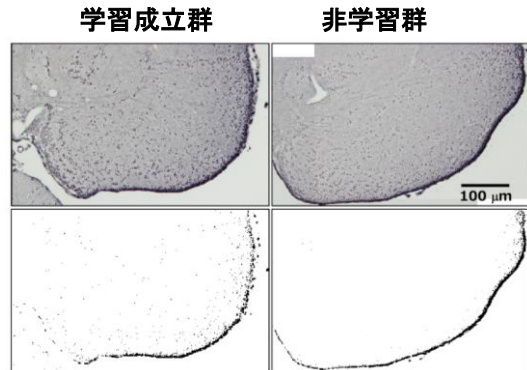


図 6: 終脳背外側領域の cFos 免疫陽性反応 (上: 免疫組織化学像、下: 二値化像)

本研究では、シャーレに直面する位置にシャーレを設置したために、他の視覚的手がかりとは区別して、直面する物体と BW 入りシャーレの位置のみを関連付けて学習 (物体識別) している可能性も排除できない。物体識別は空間認知学習では欠かせない機能の一つであり、哺乳類では海馬やその周囲部が関与することが知られているので、本研究の結果は、少なくとも、終脳背側領域外側領域が空間学習に特化した領域を含む魚類の海馬相当領域であると考えられる。

今後は、空間認知に特化して働く脳領域を同定するために、より一層、空間認知を必要とする課題をトビハゼに課し、それによって活性化される脳領域の絞込みを進める予定である。

#### 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)

[論文発表] (計 0 件)

[学会発表] (計 7 件)

① Yasuo Furukawa, Tomoko Hayase, Takao Mukuda, Spatial learning and object recognition task in mudskipper. Neuroscience 2011. Nov 12, 2011, Washington DC, USA.

② 椋田崇生, 小山友香, 古川康雄. トビハゼの空間学習—視覚的空間認知. 日本動物学会第82回大会, 2011年9月22日, 旭川市

③ 早瀬智子, 椋田崇生, 古川康雄. トビハゼ

の空間学習－左右の弁別. 日本動物学会第82回大会, 2011年9月21日, 旭川市

④ Takao Mukuda, Yuka Koyama, Yasuo Furukawa. Brain loci involved in object discrimination learning in mudskipper. 8th International Congress of Comparative Physiology and Biochemistry. June 2-3, 2011. Nagoya.

⑤ Tomoko Hayase, Takao Mukuda, Yasuo Furukawa. Do mudskippers tell they are right from left? 8th International Congress of Comparative Physiology and Biochemistry. June 2-3, 2011. Nagoya.

⑥ 早瀬智子, 椋田崇生, 古川康雄. トビハゼは自己の左右を認識できるのか? 日本動物学会中国四国支部第63回大会. 2011年5月14日, 高松.

⑦ Takao Mukuda. Immunohistochemical identification of telencephalic neurons expressing c-Fos protein during learning and memory in the mudskipper. 15th Biennial scientific meeting of the international society for comparative psychology, May 21, 2010, Awaji.

〔図書〕 (計1件)

椋田崇生 (分担執筆), 共立出版, 研究者が教える動物飼育 (全3巻) 「トビハゼ」, 印刷中.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

椋田 崇生 (MUKUDA TAKAO)  
広島大学・大学院総合科学研究科・助教  
研究者番号: 60346335