

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 9 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25640006

研究課題名(和文)メダカを用いた個体認知に関わる脳領域の検索

研究課題名(英文)Searching for brain regions involved in individual recognition using medaka fish

研究代表者

竹内 秀明 (Takeuchi, Hideaki)

東京大学・理学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：00376534

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：メダカのメスは「見知らぬオス」を拒絶し、そばにいた「見つけたオス」を視覚認知して性的パートナーとして選択する傾向がある。本研究では、GnRH3ニューロンがメダカの性的パートナー選択において中心的な役割を果たすことを見出した。(Science, 2014)。さらにメダカ終脳において部分的にCre/loxP組換えを誘導する遺伝子操作法(PLoS One 2013)及び、個体認知を検定する新規な行動実験系を確立した(PLoS One 2013)

研究成果の概要(英文)：Medaka females can discriminate between socially-familiarized and unfamiliar males and prefer to mate with the former. Here we showed that GnRH3 neurons have a central role in the mate preference for the familiar males. In addition, we established a gene manipulation technique for site-specific Cre/loxP recombination in the telencephalon and a novel behavioral system to investigate an ability of individual recognition.

研究分野：分子生物学、行動生物学

キーワード：社会性 個体認知

1. 研究開始当初の背景

いくつかの魚類は同種の個体認知を介して社会性行動を示す。例えば、コンビクト・シクリッドはつがい(一夫一妻制)を形成し、配偶相手を個体記憶していると考えられている。魚類の個体認知能力は行動生態学分野では古くから注目されてきたが、脳の神経基盤は全く分かっていない。我々はメダカの社会性行動を定量化する実験系を確立した結果、メダカは集団内のメンバーを識別しながら、相手に応じた個体間関係を示すことを見出した。例えば、メダカのメスは個体記憶・識別を介して配偶者を選択する。メダカのメスは前の晩から見ていたオスを視覚記憶しており、「見知ったオス」と「見知らぬオス」を識別して、前者を配偶相手として選択する傾向が強い。

本研究では、メスの配偶者選択に異常を持つ変異体の解析を進めると共に、個体記憶に関わる神経細胞を分子遺伝学的手法で解析するため、メダカ成体脳を用いた条件的遺伝子操作法を開発することにした。本研究では、魚類の記憶・学習能力に関与し、ほ乳類の大脳に対応すると考えられている終脳に着目した。

さらに「個体記憶」を検定する別の社会性行動実験系を確立した。メスの配偶者選択では、「個体記憶」によって「異性の好み」が生じる。よって注目した遺伝子や神経系が「個体の記憶」に関わるのか?それとも「異性の好み」に関わるのかを当該行動検定によって区別することができないという問題があった。そこで、「個体記憶」に関わる神経機構を解析するためには、「個体記憶」を検定する別の行動実験系が必要であった。

2. 研究の目的

(1) 条件的遺伝子操作法の開発

本研究では、赤外線レーザー誘起遺伝子発現操作法(IR-LEGO法)とCre-loxPシステムを組合せ、メダカ神経胚の予定脳領域においてCre-loxP依存の遺伝子組換えを誘導することを目指している。本研究課題では、終脳に存在するHuC陽性細胞(HuC:神経マーカー遺伝子)の細胞系譜解析を行い、**終脳に存在する全HuC陽性細胞が何個の起源神経幹細胞から発生するかを解析した**。神経胚における起源神経幹細胞の配置と数を同定することで、IR-LEGO法により終脳の任意の神経細胞集団にCre-loxP遺伝子組換えを誘導できるようになる。

(2) **メダカの集団学習行動実験系の確立**
 カラスやグッピーにおいて集団学習(Social Learning)という学習の形態が知られている。集団学習とは、集団を形成すると単独にいる時よりも、見かけ上の学習効率が上昇する現象で、群れを形成する適応的意義のひとつとされている。**本研究ではメダカの集団学習が個体記憶を介して生じるか否かを検討した**。

③ **メスの配偶者選択行動の神経基盤の解析**

これまでに「見知ったオス」と「見知らぬオス」の両方をすぐに受け入れる変異体(*cxcr-4*, *cxcr7*)を同定している。当該変異体はGnRH3ニューロンの形態に異常を持っていたため、**配偶者選択行動におけるGnRH3ニューロンの役割を調べた**。

3. 研究の方法

(1) 条件的遺伝子操作法の開発

メダカ神経胚において、Cre依存の組換えをランダムかつ低頻度に誘導すると、単一の起源神経幹細胞由来に発生した神経細胞群(細胞系譜単位)が、成体の終脳の様々な脳領域に対応して現れる(図1)。このため図2で示す遺伝子改変メダカ胚に弱いヒートショックを与えると、細胞系譜単位でラベルされた個体を大量に得る事が可能である(図2)。本研究では神経胚期にランダムかつ低頻度に遺伝子組換えを誘導した個体を100個体以上準備し、細胞系譜単位の形態を3次的に記録した。

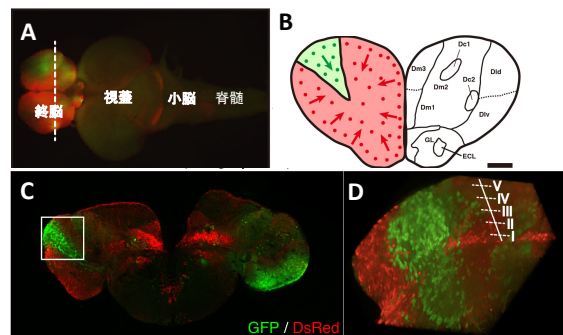


図1 ランダムにCre-LoxP組換えをメダカ胚に誘導した時の成体脳組換えが生じない細胞はRFP(赤)、生じた細胞は緑(GFP)で標識される。Aは脳全体、破線の切片(C)とその模式図(B) Dは白四角部分のピラトーム切片の3D像

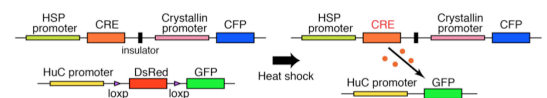


図2 ヒートショックによるメダカ脳の遺伝子組換え誘導
 ヒートショック依存にCre遺伝子が発現し、HuCプロモーター依存にGFPが発現する。

(2) **メダカの集団学習行動実験系の確立**

集団学習の成立機構を解明する目的で、メダカに動画と餌を同時に提示する訓練を繰り返すことで、動画を餌情報として学習させる報酬学習実験系を確立した。単独1匹または集団6匹で訓練した結果、集団の方が少ない訓練回数(3~4回)で学習が成立し、メダカにおいて集団学習が成立することを確認した(図3)。本研究では未学習メダカと学習済メダカの混成集団を作製して訓練を行うと、未学習メダカは学習済メダカを個体記憶・識別して追従するようになるか検定した。

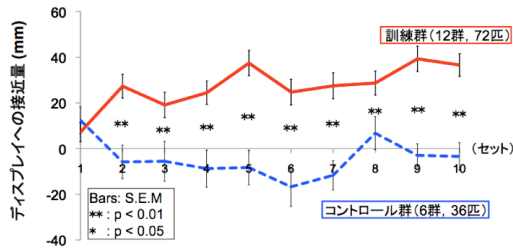


図3 視覚記憶を介した採餌学習実験系の結果

テスト(動画提示)と訓練(動画提示+給餌)を繰り返した結果、テストのみで、メダカは動画に接近するようになる。本実験はメダカが餌場を学習しないように、動画提示と給餌を水槽の左右から交互に行っており、左右2回の訓練で1セットと定義した。6匹集団で訓練した場合は2セット(4回訓練)で学習が成立した。

(3) メスの配偶者選択行動の神経基盤の解析

GnRH3 ニューロンで特異的に産生・分泌される GnRH3 ホルモンをコードする遺伝子 (*gnrh3*) の変異体を TILLING 法により同定し、変異体の行動検定及び GnRH3 ニューロンの電気生理学的解析を行った。

4. 研究成果

(1) 条件的遺伝子操作法の開発

終脳全体の HuC 陽性細胞は約 80 個の細胞系譜単位でカバーされることが分かった。

このことから、終脳の HuC 陽性細胞を生み出す起源神経幹細胞は神経胚のステージで約 80 個存在すること、さらに各神経幹細胞から発生した HuC 陽性細胞は成体脳で特定の解剖学的領域を占めることがわかった。これから赤外線レーザーを用いて神経胚の微小領域に存在する起源神経幹細胞に Cre/loxP 組換えを誘導することで、個々の起源神経幹細胞の配置を同定することができる。今後は、HuC プロモーター下流で人工リガンド依存に神経興奮を抑制する機能タンパク質を強制発現させる。将来的には、特定の細胞系譜単位で、機能タンパク質を発現させることで、どの細胞系譜単位が個体記憶に関わるのかを包括的に検定する。

(2) メダカの集団学習行動実験系の確立

① 追従行動を誘導する遊泳条件の検索

メダカ集団を観察すると、他個体へ追従するときとしない時があるため、「メダカがある個体を識別して追従する傾向を検定する」ためには、他個体の追従行動を誘導する遊泳条件を同定する必要があった。メダカが他個体へ追従行動を示す際には各個体の遊泳方向が揃う傾向がある。そこで自由遊泳するメダカ集団(6匹)において、ある2個体の遊泳方向が揃うような遊泳条件を検索することにした。本研究では、メダカ集団の任意の2個体の遊泳方向差(Orientation Difference, OD)に影響を与える遊泳条件を検索するデータマイニング法を確立した。まず、自由遊泳条件下の6匹集団内の任意の2個体の全ての組み合わせについてについて各々の水槽内での位置、速度や遊泳方向、2個体間の距離などに関する48個の条件を設定し、ODが小さくなる]要因を検索した。OD

を計算して、ヒストグラム U(OD) (Uは全集合)を作製した。ヒストグラムの形は平坦になったことから、平均的にみると各個体の遊泳方向はランダムであると考えられる。次に計48種類の遊泳条件を設定し、各遊泳条件にあてはまる OD についてヒストグラム Qi(OD) [$Q_i(OD) \subset U(OD)$, Qは部分集合]を作製した。ある遊泳条件が遊泳方向差に影響を与える時には、U(OD)と Qi(OD)のヒストグラムの形状が異なるはずである。そこで U(OD)と Qi(OD)の距離をカルバック・ライブラー量 KLD(U, Q) で定量化した結果、「一方の個体が高速度(上位1/6)で遊泳する」条件では KLD(U, Q)の値は全ての遊泳条件の中で最大になった。この遊泳条件ではヒストグラムは左に偏った分布を示したことから、「ある個体が高速度で遊泳すると他個体が遊泳方向を揃える傾向がある」ことが示された。

② 集団採餌行動において、追従行動を誘導する遊泳条件

① で見いだされた行動法則が、集団採餌行動でも検出されるか検討した。その結果、学習済個体は未学習個体より高速で動画提示時に動画方向に移動し、周囲の個体は高速遊泳個体に1/3秒遅延して追従することが判明した。

③ 個体識別を介した集団学習

未学習個体が学習済個体を個体識別して追従するか調べた。先ず学習済個体1匹と、未学習個体3匹を1つの水槽に入れ、動画提示と給餌を連合させる訓練を行った。この訓練後に未学習個体が学習済個体へ追従する傾向があるか調べた。その結果、未学習個体は、高速遊泳している他未学習個体より、高速遊泳している学習済個体へ追従する傾向が強いことが示された。この傾向は高速遊泳していないときには見られなかった。

(3) メスの配偶者選択行動の神経基盤の解析

*gnrh3*変異体の表現型の解析及び平成25年度以前に実施した GnRH3 ニューロンの破壊実験の結果を統合して具体的に以下の4点が明らかになった。(1) デフォルト状態の GnRH3 ニューロンの自発的発火頻度は低く(2-3Hz)、この状態では GnRH3 ニューロンは全てのオスの求愛を拒絶する働きがある。(2) メスが特定のオスを長時間見ると GnRH3 ニューロンの神経活動が活性化して、自発的発火頻度が高くなる(4-5Hz)。(3) GnRH3 ニューロンが活性化した状態のメスは、それまでに見ていた「見知ったオス」を配偶相手として選択的に受け入れる。(4) GnRH3 ニューロンが合成・分泌する GnRH3 脳内ホルモンは GnRH3 ニューロン自身の神経活動を促進する働きがあり、性的パートナーを受け入れる意思決定のスイッチとして働く。このようにメダカを対象にすることで、異性を視覚的に記憶し、性的

パートナーとして積極的に受け入れる神経機構を世界で初めて解明することができた。これまで GnRH は、脳下垂体において生殖腺刺激ホルモンの分泌を促進し、生殖腺の機能を活性化する GnRH1 としての働きのみが注目され、精力的に研究されてきたが、本研究では GnRH3 が脳内ホルモンとして性的パートナーの選択に関わることを初めて証明した。

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 5 件)

1) (査読有り) An Essential Role of the Arginine Vasotocin System in Mate-Guarding Behaviors in Triadic Relationships of Medaka Fish (*Oryzias latipes*).

Yokoi S, Okuyama T, Kamei Y, Naruse K, Taniguchi Y, Ansai S, Kinoshita M, Young LJ, Takemori N, Kubo T, Takeuchi H†
PLOS Genetics 11, e1005009. (2015)

2) (査読有り) A neural mechanism underlying mating preferences for familiar individuals in medaka fish

Okuyama T, Yokoi S, Abe H, Suehiro Y, Imada H, Tanaka M, Kawasaki T, Yuba S, Taniguchi Y, Kamei Y, Okubo K, Shimada A, Naruse K, Takeda H, Oka Y, Kubo T, and Takeuchi H†
Science 343, 91-94. (2014)

3) (査読有り) 「メダカを用いた分子遺伝学的手法による魚類「社会脳」の分子神経基盤の解明」奥山輝大、竹内秀明、比較生理生化学 31, 106-112 (表紙). 日本比較生理生化学会 (2014)

4) (査読有り) Controlled Cre/loxP site-specific Recombination in the Developing Brain in Medaka fish, *Oryzias latipes*.

Okuyama T, Isoe Y, Hoki M, Suehiro Y, Yamagishi G, Naruse K, Kinoshita M, Kamei Y, Shimizu A, Kubo T, and Takeuchi H†
PLOS ONE, 8 e66597. (2013)

5) (査読有り) A New Data-Mining Method to Search for Behavioral Properties that Induce Alignment and their Ochiai T, Suehiro Y, Nishinari K, Kubo T, Takeuchi H†

Involvement in Social Learning in Medaka fish (*Oryzias Latipes*).

PLOS ONE 8, e71685. (2013)

[学会発表] (計 12 件)

(1) Isoe Y., Okuyama T., Hoki M., Suehiro Y., Yamagishi G., Naruse K., Kinoshita M., Kamei Y., Nonaka S., Shimizu A., Kubo T.,

Takeuchi H. Analysis of mechanism underlying brain growth accompanied by neurogenesis using medaka fish (*Oryzias latipes*), Neuroscience 2014/ SfN(北米神経学会), アメリカ・ワシントン D.C., 2014 年 11 月 16 日

(2) Isoe Y., Okuyama T., Hoki M., Suehiro Y., Yamagishi G., Naruse K., Kinoshita M., Kamei Y., Nonaka S., Shimizu A., Kubo T., Takeuchi H. Clonal analysis of young neurons in telencephalon by using Japanese small fish, medaka fish. Massachusetts General Hospital & The University of Tokyo Joint Symposium 2014 "Frontiers in Biomedical Engineering", アメリカ・ボストン、2014 年 9 月 24 日

(3) Isoe Y., Okuyama T., Hoki M., Suehiro Y., Yamagishi G., Naruse K., Kinoshita M., Kamei Y., Nonaka S., Shimizu A., Kubo T., Takeuchi H. Analysis of mechanism underlying brain growth accompanied by neurogenesis using medaka fish (*Oryzias latipes*). Neuro2014 / The 36th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society, パシフィコ横浜・神奈川県、2014 年 9 月 13 日

(4) Isoe Y., Okuyama T., Hoki M., Suehiro Y., Yamagishi G., Naruse K., Kinoshita M., Kamei Y., Nonaka S., Shimizu A., Kubo T., Takeuchi H. Analysis of mechanism underlying brain growth accompanied by neurogenesis using medaka fish (*Oryzias latipes*). 名古屋大学神経回路国際シンポジウム, ポスター, 名古屋大学・愛知県, 2014 年 9 月 9 日

(5) Isoe Y., Okuyama T., Hoki M., Suehiro Y., Yamagishi G., Naruse K., Kinoshita M., Kamei Y., Nonaka S., Shimizu A., Kubo T., Takeuchi H. Analysis of mechanism underlying brain growth accompanied by

neurogenesis using medaka fish (*Oryzias latipes*). 2014 International Congress of Neuroethology/ The Japanese Society for comparative Physiology and Biochemistry, 札幌コンベンションセンター・北海道, 2014年7月29日

(6) Isoe Y., Okuyama T., Hoki M., Suehiro Y., Yamagishi G., Naruse K., Kinoshita M., Kamei Y., Nonaka S., Shimizu A., Kubo T., Takeuchi H. Analysis of mechanism underlying brain growth accompanied by neurogenesis using medaka fish (*Oryzias latipes*). 2nd Strategic Meeting for Medaka Research, ポスター、スペイン・セビリア, 2014年4月11日

(7) Saori Yokoi, Teruhiro Okuyama, Yasuhiro Kamei, Yoshihito Taniguchi, Satoshi Ansai, Masato Kinoshita, Takeo Kubo, Hideaki Takeuchi. Analysis of the neural/molecular basis of mate-guarding behavior in small fish, medaka. 2nd Strategic Meeting for Medaka Research, スペイン・セビリア, 2014年4月11日

(8) Isoe Y., Okuyama T., Hoki M., Suehiro Y., Yamagishi G., Naruse K., Kinoshita M., Kamei Y., Shimizu A., Kubo T., Takeuchi H. Analysis of mechanism underlying brain growth accompanied by neurogenesis using medaka fish (*Oryzias latipes*). 第36回日本分子生物学会, 第36回日本分子生物学会, 神戸ポートアイランド・兵庫県, 2013年12月4日

(9) 横井佐織, 奥山輝大, 亀井保博, 谷口善仁, 安齋賢, 木下政人, 久保健雄, 竹内秀明. メダカを用いた配偶者防衛行動の神経基盤解析, 第36回日本分子生物学会年会, 神戸ポートアイランド・兵庫県, 2013年12月3日

(10) Isoe Y., Okuyama T., Hoki M., Suehiro Y., Yamagishi G., Naruse K., Kinoshita M.,

Kamei Y., Shimizu A., Kubo T., Takeuchi H. Analysis of mechanism underlying brain growth accompanied by neurogenesis using medaka fish (*Oryzias latipes*). 19th Japanese Medaka and Zebrafish Meeting, 口頭発表, 仙台市情報・産業プラザ・宮城県, 2013年9月20日

(11) Saori Yokoi, Teruhiro Okuyama, Yasuhiro Kamei, Yoshihito Taniguchi, Satoshi Ansai, Masato Kinoshita, Takeo Kubo, Hideaki Takeuchi. Analysis of the neural/molecular basis of mate-guarding behavior in small fish, medaka. 19th Japanese Medaka and Zebrafish Meeting. 仙台市情報・産業プラザ・宮城県, 2013年9月20日

(12) Isoe Y., Okuyama T., Hoki M., Suehiro Y., Yamagishi G., Naruse K., Kinoshita M., Kamei Y., Shimizu A., Kubo T., Takeuchi H. Analysis of mechanism underlying brain growth accompanied by neurogenesis using medaka fish (*Oryzias latipes*). Neuro2013 / The 36th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society, 神戸ポートアイランド・兵庫県, 2013年6月22日

〔図書〕(計1件)

「第4章 小型魚類(ゼブラフィッシュとメダカ)の行動分子遺伝学」

竹内秀明

新・生命科学シリーズ 動物行動の分子生物学、裳華房 p.65-92 (2014)

〔その他〕プレスリリース

(1)<http://www.s.u-tokyo.ac.jp/ja/press/4416/>

(2)<http://www.s.u-tokyo.ac.jp/ja/press/4154/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

竹内 秀明 (TAKEUCHI HIDEAKI)

東京大学・大学院理学系研究科・助教

研究者番号: 00376534

(2) 連携研究

亀井 保博 (KAMEI YASUHIRO)

基礎生物学研究所・光学解析室・特任准教授

研究者番号: 70372563