

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 13 日現在

機関番号：63801

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2015

課題番号：25650120

研究課題名(和文)捕獲行動の神経メカニズム

研究課題名(英文)Neural mechanism of prey capture behavior

研究代表者

武藤 彩 (Muto, Akira)

国立遺伝学研究所・個体遺伝研究系・助教

研究者番号：00525991

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：ゼブラフィッシュ稚魚の捕獲行動に関する神経回路を明らかにするために、捕獲行動時に活動性を示す神経細胞集団の探索を行った。その結果、稚魚が視覚的に餌を認識した際に視床下部下葉が活動することを見出した。視床下部下葉の細胞集団に特異的に神経毒を発現させたところ、捕獲行動が抑制された。また視覚系から視床下部下葉への投射経路を探索した結果、前視蓋領域の神経細胞が軸索を投射していることを明らかにした。これらの結果から、餌を視覚的に認識しその情報が捕獲行動の動機付けに用いられるための神経回路の候補として、前視蓋-視床下部下葉という神経回路が重要な役割を果たすことが示唆された。

研究成果の概要(英文)：We explored neuronal activity in the zebrafish larval brain to identify neural cells that were involved in prey capture behavior. We observed neuronal activity in the inferior lobes of the hypothalamus (ILH) that was related to visual perception of prey. Suppression of the ILH activity by neurotoxin significantly reduced prey capture activity. Furthermore, we also found that the pretectal neurons, which was responsible for visual prey detection, projected their axons to the ILH. Thus, we demonstrated that pretectal-hypothalamic circuit has a crucial role in visual prey detection and feeding behavior in zebrafish.

研究分野：神経行動学

キーワード：ゼブラフィッシュ カルシウムイメージング 捕獲行動 視覚系 ゾウリムシ

1. 研究開始当初の背景

神経行動学の歴史は古く、その大半は現代の神経科学で多用されるモデル生物を利用していない。その理由は、神経行動学的研究においては研究対象となる行動を顕著に示す動物種を選ぶことが最も重要だからである。そのため、モデル動物を中心に開発された遺伝子・細胞操作技術の恩恵を受けることができず、脳部位の破壊実験や電気生理学、色素注入法による神経軸索投射の解析など、研究ツールが「古典的」なものに限られるという難点がある。一方、行動学的に個性豊かな非モデル動物たちに比べると、現代のモデル生物は操作技術が発展しているかわりに、興味深い行動を再現性良く示すかどうかという点でからすると、行動学における最適なモデルとは言い切れない。このため、伝統的な神経行動学と現代の神経科学の間には、人的にも方法論的にも小さからぬ「乖離」が存在するのが現状である。興味深い行動を再現性良く示し、かつ解析手段が豊富なモデル動物が行動学の研究対象として理想的である。

ゼブラフィッシュは 1996 年頃に大規模な突然変異体スクリーニングに用いられ、胚発生、形態形成などに関与する遺伝子群の同定に大きく貢献した。また、受精後数日の稚魚が種々の行動を示すことから、近年では神経行動学の分野でもよく利用されるようになってきた。このように、ゼブラフィッシュは遺伝学的な手法が適用できる脊椎動物モデルとして現代の生命科学で重要な位置を占める。ゼブラフィッシュにおいて、視機性眼振 (Optokinetic response) や視運動 (Optomotor response) などの反射運動を示すことはよく研究されてきたが、餌の認識や捕獲行動には高次な脳機能が関わると考えられることから、物体の視覚認知に関する研究モデルとしても有用と思われる。

2. 研究の目的

昼行性のヒトや動物において視覚情報は生存に必須の重要な感覚情報である。しかしながら、視覚情報がどのようにして脳内で処理され、それが動物行動の選択につながるののかに関してはあまり理解が進んでいない。そこで本研究では脊椎動物モデルであるゼブラフィッシュの摂食行動を対象とし、外界の物体がどのように視覚的に認知され捕獲行動へ至るのか、その細胞レベルでのメカニズムを

明らかにしたい。ゼブラフィッシュの視覚中枢は中脳視蓋であり、視蓋表層部は網膜からの入力を受ける。視蓋深部は運動系に連絡することから、視蓋の内部で感覚情報の処理から運動出力に至るまでの計算がなされていると予想される。また終脳や間脳、後脳なども認知過程を調節する可能性がある。そこで捕獲行動に関与する神経回路を全脳に渡って探索・同定する。

3. 研究の方法

まず野生型のゼブラフィッシュ稚魚の捕食行動をビデオ記録し、画像処理技術を用いて行動を記述するためのパラメータ (各時刻における稚魚の位置、体軸の向き、眼球の角度、標的物体の位置) を抽出する。これらの数値を用いて、餌に対するアプローチから捕食に至るまでの行動を定量的に記載する。次に、Gal4 エンハンサー・遺伝子トラップ系統のコレクションを利用してシナプス伝達を阻害する神経毒など (UAS エフェクター) を稚魚に発現させ、定量的な行動学アッセイによるスクリーニングを行う。行動学的異常を示す Gal4 系統が同定された場合には、Gal4DNA のゲノム挿入部位をクローニングすることにより、近傍の遺伝子を同定する。このようにして、捕食行動に関与する神経回路を遺伝学的に同定することを試みる。また、光遺伝学ツールを利用して神経機能の制御を行い、同定された神経回路の捕獲行動における役割を解析する。

4. 研究成果

(1) ゼブラフィッシュ稚魚の捕獲行動を定量的に解析するために、行動学アッセイの確立を行った。ビデオカメラの制御ソフトウェアをナショナルインスツルメンツ社のプログラミング環境である LabVIEW を用いて自作し、これを用いてビデオカメラの制御を行った。また暗視野照明および明視野照明などの照明条件を工夫することにより、ゼブラフィッシュ稚魚の眼球運動や餌となるゾウリムシが高い信頼度と再現性をもって検出できる画像測定装置を開発した (図 1)。この装置を用いて餌となるゾウリムシ存在下のゼブラフィッシュ稚魚を観察し、LabVIEW や ImageJ による自動的な画像処理により稚魚の位置等のパラメータを検出し、捕獲行動を定量的に記載する実験系を確立した (図 2)。

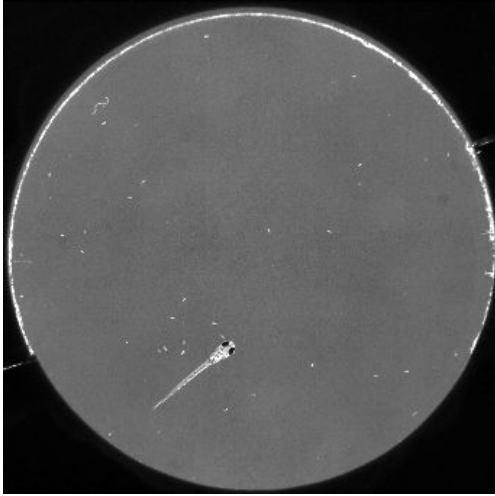


図 1. 直径 1.9cm の測定用チェンバー内のゼブラフィッシュ稚魚 (受精後 5 日目) とゾウリムシ (白い粒子状の物体)。

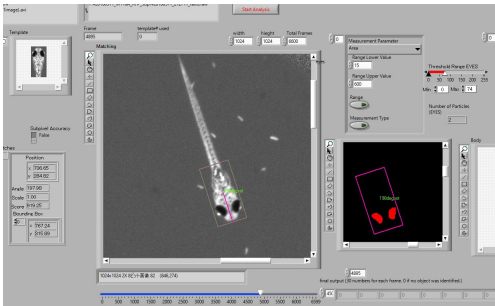


図 2. テンプレートマッチングによる稚魚の位置検出および眼球の検出のための自作ソフトウェアの操作画面。プログラミング環境 LabVIEW にて構築した。

(2) 上記の実験系を用いて脳部域特異的な Gal4 系統に UAS:神経毒の系統を掛け合わせて、特定の神経回路の機能を抑制した稚魚における捕獲行動能を解析した。その結果、神経毒の発現により捕獲行動能が低下する Gal4 系統を複数得ることに成功した。その中でもとくに、視床下部下葉 (ILH) に特異的な系統を同定した (図 3、4)。この Gal4 系統を利用した神経活動を神経毒で抑制した場合に、捕食行動が抑制されるのみならず、通常捕獲行動にともなう生じる輻輳眼球運動も抑制されることを見出した (図 5)。

(3) UAS:改良型 GCaMP の遺伝子導入ゼブラフィッシュを作製し、これを用いて捕獲行動時の視床下部下葉の神経活動イメージングを行なったところ、餌となるゾウリムシが至近距離にきたときに強い活動性を示すことを見出した。また、アガロースに包埋したゼブラフィッシュ稚魚でも同様の現象が観察された (図 6)。

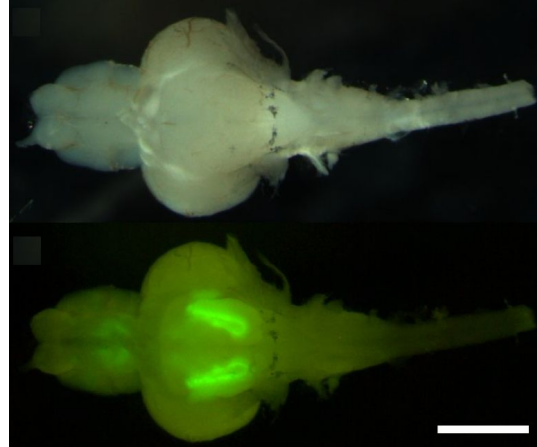


図 3. 視床下部下葉で発現する Gal4 系統のゼブラフィッシュ成魚脳における UAS:GFP レポーター遺伝子の発現パターン。上: 取り出した脳の腹側から観察した明視野像。下: 同じ脳の GFP 蛍光像。スケールバー: 1mm

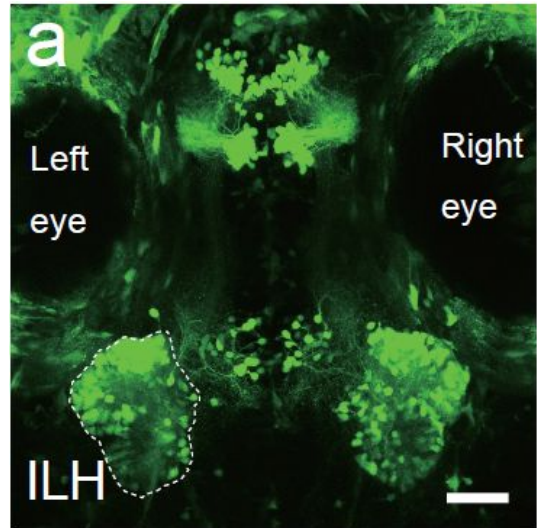


図 4. 同じ Gal4 系統の稚魚の時期の発現パターン。成魚と同様に視床下部下葉 (ILH) で発現が観察される。スケールバー: 50 μ m

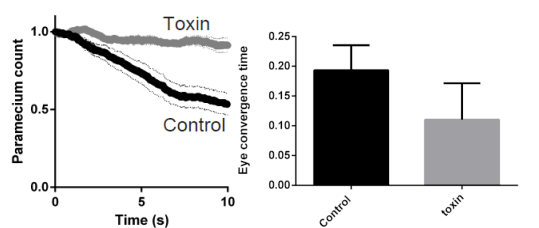


図 5. 視床下部下葉で神経毒 (Toxin) を発現させた稚魚でゾウリムシ捕獲量が低下し (左)、輻輳眼球運動量も低下する。(右)

(4) 視床下部下葉へ入力する神経細胞を探索した結果、前視蓋領域の神経細胞からの軸索が視床下部下葉領域へ侵入していることが単一細胞標識によって明らかになった (図 7)。

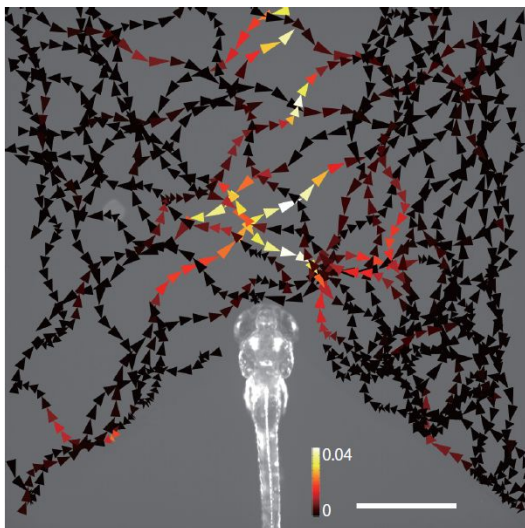


図 6. アガロースに固定したゼブラフィッシュ稚魚の周囲を一匹のゾウリムシを泳がせたときの視床下部下葉の神経活動(左右の平均)。前視蓋 GCaMP6s の蛍光強度の変化をカラーコード化して、ゾウリムシの軌跡を重ねて描いたもの。ゾウリムシが前方のある範囲に存在したときに、ゾウリムシの方向に依存せずに強く反応したことがわかる。スケールバー：1000 μm

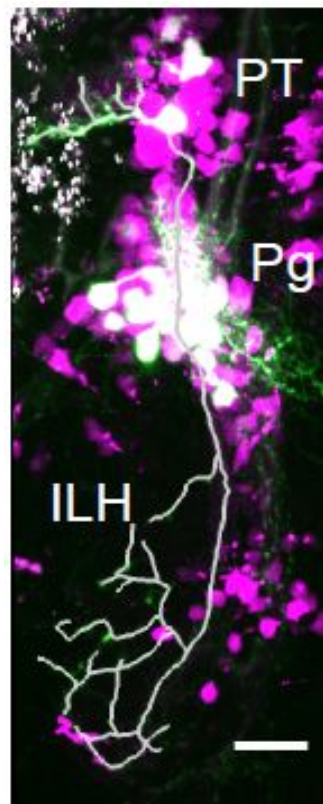


図 7. 前視蓋 (PT) 領域の単一細胞を GFP (緑色) で標識し二光子励起レーザー顕微鏡で観察した画像。PT の神経細胞の軸索が視床下部下葉 (ILH) へ進入し枝分かれしている様子がわかる。画像解析ソフトウェア IMARIS で軸索を半自動的にトレースした。PT, Pg (Preglomerular nuclei) などの細胞を標識する Gal4 系統を用いて UAS:RFP レポーター (マゼンタ) を発現させた。RFP (マゼンタ) と GFP (緑) を共発現する細胞は白く見えている。スケールバー：20 μm

これらの結果をまとめると、前視蓋-視床下部下葉という神経回路が捕獲行動時の獲物認識に非常に重要な役割を担っていることが示唆された。視床下部下葉は魚類において摂食行動を制御する中枢であることが古くから知られている。私は前視蓋が「獲物検出器」として機能することを他の研究課題において見出しており、本研究と合わせると、視覚的な「獲物検出」が摂食行動の動機付けに寄与する可能性を示唆するものであり興味深い。

以上述べた成果は現在論文投稿中 (in revision) 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)

[雑誌論文](計 3 件)

1. Ogino K, Low SE, Yamada K, Saint-Amant L, Zhou W, Muto A, Asakawa K, Nakai J, Kawakami K, Kuwada JY, Hirata H. RING finger protein 121 facilitates the degradation and membrane localization of voltage-gated sodium channels. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015 Mar 3;112(9):2859-64. doi: 10.1073/pnas.1414002112. 査読有
2. Yokota Y, Nakajima H, Wakayama Y, Muto A, Kawakami K, Fukuhara S, Mochizuki N. Endothelial Ca²⁺ oscillations reflect VEGFR signaling-regulated angiogenic capacity in vivo. *Elife* 5 Nov 2014. pii: e08817. doi: 10.7554/eLife.08817. 査読有
3. Muto A, Kawakami K. Prey capture in zebrafish larvae serves as a model to study cognitive functions. *Front Neural Circuits*. 2013 Jun 11;7:110. doi: 10.3389/fncir.2013.00110. 査読無し

〔学会発表〕(計 6 件)

1. 武藤 彩 ゼブラフィッシュ捕獲行動における前視蓋-視床下部の神経回路の役割 第 11 回水生動物の神経系と行動シンポジウム 2015 年 12 月 5 - 6 日 (横浜市立大学医学部)
2. Muto A. and Kawakami K. Genetic identification of a neural circuit for prey perception in zebrafish. 45th Annual Meeting of the Society for Neuroscience, Oct 17-21, 2015. Chicago.
3. Muto A. and Kawakami K.. Genetic identification of a prey detector circuit in zebrafish. The 38th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society July 28-31, 2015 (Kobe) (第 38 回 日本神経科学大会)
4. Muto A. Genetic identification of prey detector neurons in zebrafish. . 6th Strategic Conference of Zebrafish Investigators, January 17-21, 2015, Pacific Grove, CA
5. Muto A. Prey perception in zebrafish larvae. 2014 小型魚類研究会 2014 年 9 月 21 日 東京都港区 慶應大学
6. 武藤 彩 カルシウムイメージングでゼブラフィッシュの視覚認知機構に迫る 顕微鏡学会分子・細胞動態イメージング研究部会 2013 年 10 月 5 日(東京大学)

〔図書〕(計 2 件)

1. Akira Muto and Koichi Kawakami Zebrafish: Methods and Protocols, Second Edition Editors: Koichi Kawakami, Michael Orger and Elizabeth Patton. Springer 2016 (in press). Chapter: Calcium Imaging of Neuronal Activity in Free-Swimming Larval Zebrafish

2. K.Kawakami, K.Asakawa, M.Hibi, M.Itoh, A.Muto and H.Wada. Genetics, Genomics and Phenomics of Fish. Chapter:Gal4 driver transgenic zebrafish: Powerful tools to study developmental biology, organogenesis and neuroscience. Elsevier 2016 (in press)

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

武藤 彩 (Akira Muto) 国立遺伝学研究所 個体遺伝研究系 助教

研究者番号 : 00525991