

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 2 日現在

機関番号：15101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25840118

研究課題名(和文)両生魚トビハゼの空間学習を担う終脳領域の機能形態学的研究

研究課題名(英文)Functional and morphological identification of brain loci essential for spatial learning and memory in an amphibious teleost, mudskipper.

研究代表者

棕田 崇生 (Mukuda, Takao)

鳥取大学・医学部・講師

研究者番号：60346335

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、トビハゼの空間学習を担う終脳領域の同定を目指してトビハゼの水陸両生の生態を利用したモリス水迷路類似課題をデザインし、この空間学習課題によって活性化される終脳領域を神経活動依存的に発現するcFosタンパク質を免疫組織化学的に検出した。その結果、学習成立個体の終脳の背外側領域(DI)および背中央域(Dc)でcFos陽性ニューロンの増加を認めた。このことは、これらの領域がトビハゼの空間学習で重要な働きを担っていることを示唆している。一方で、空間学習に依存したニューロンの新生促進は認められなかった。現在、より効果的な空間学習を課すことができるように課題の改良を行いデータを蓄積しつつある。

研究成果の概要(英文)：To identify the brain loci essential for the spatial learning and memory in an amphibious teleost mudskipper by using immunostaining for cFos protein which is induced the expression following to neuronal activity, we designed a "Morris water maze-like task" for mudskipper, based on their amphibious property by improving a general task for rodents. The number of cFos-expressing neuron in the telencephalic dorsolateral (DI) and dorsocentral (DC) region of the brain was increased in the mudskippers acquiring spatial learning and memory through the task, suggesting that these regions may play an important role for the spatial learning and memory in mudskipper. However, an increase of newborn neurons in the concerned regions was not observed even after acquiring the spatial learning and memory. We are now trying to improve the task to obtain clear findings.

研究分野：解剖生理学

キーワード：魚類脳 空間学習 トビハゼ

1. 研究開始当初の背景

学習・記憶能は、哺乳類をはじめ多くの動物が保持している脳機能のひとつである。そのなかでも、視覚情報を手がかりにした空間学習能は哺乳類でも良く調べられており、前脳の海馬が必須であることが認知されている。魚類でもキンギョなどのモデル魚を用いた行動実験から、空間学習が成立し、それが終脳によって統御されていることが一般に受け入れられている。しかしながら、魚類の空間学習に必須な終脳領域（哺乳類の海馬相当領域）については、脳の破壊実験から、終脳背側正中領域 (Dm) (Saito & Watanabe, 2004, 2005) あるいは背外側領域 (Rodriguez et al., 2002) が候補に挙げられているが、いまだに決定的な解には至っていない。

その原因として、これまでの研究では、終脳の特定領域の破壊によって空間学習能が消失する否かを調べているが、このような手法では、破壊された領域のニューロン集団が重要なのか、あるいはそこを走行する神経線維が重要なのか究極的には決定できないことが挙げられる。さらに、魚類は水棲であるために学習課題も独特なものになるので、たとえ空間学習で必須な脳領域がわかったとしても、哺乳類の結果と直接比較することが困難であるように思われる。また、魚類の終脳の発生様式は哺乳類とは大きく異なるために、哺乳類の海馬に相当する領域の比較形態学的な対比が容易ではない。このため、魚類の空間学習能を担い、哺乳類の海馬に相当する領域を決定するためには、1) 非破壊的に空間学習能によって活性化される脳領域を同定すること、2) 基本的には哺乳類の空間学習課題を適応できモデル魚を用いることが望まれる。

2. 研究の目的

トビハゼは魚類でありながら陸上を好む両生魚である。彼らは一日の大半を陸上で過ごす。危険回避や水分・塩分補給のときには直ちに水に戻る。このように、トビハゼの行動は明瞭なので、他の魚類にくらべて行動を評価しやすい。そこで本研究では、こうしたトビハゼの独特な生態を利用することで、げっ歯類の空間学習評価に一般的に用いられるモリス水迷路課題に類似した課題をデザインし、トビハゼに空間学習をさせ、ニューロン活動に応じて一過性に発現する cFos タンパク質を免疫組織化学的に検出することで空間学習によって活性化される終脳領域を同定することを主たる目的とした。また、哺乳類の海馬との比較を試みるために、同定した領域の神経化学的特性と空間学習がこの領域の神経新生に与える影響についても検討することとした。

他魚種でこれまで蓄積されてきた行動実験のデータと本研究結果を合わせて検討することで、魚類の空間学習を担う脳領域の決定に至ることが期待できるとともに、海馬の系

統発生を議論するための基盤を構築できるものと考えている。

3. 研究の方法

トビハゼは両生魚であり上陸嗜好性を示す一方、危険回避や水電解質の補給のために水域に戻る。本研究の中核となる行動実験は、トビハゼのこうした行動を利用したモリス水迷路類似課題をデザインし、これをトビハゼに課すことである。円形の透明水槽の底にスポンジを敷き、四分円の中央にシャーレを埋め込み、4つのうちの3つのシャーレには海水 (BW) を、残りのひとつには希釈海水 (BW) を注いだ。予備実験からトビハゼは SW を嫌い、圧倒的に BW を好むことを見ているので、水槽に放たれたトビハゼは水槽内の探索を進める過程で、BW の入ったシャーレを見つけ、選択的にこのシャーレに訪問することが期待できる。水槽の周囲には形状色彩の異なる物体をいくつか配して視覚の手がかりとした。トビハゼを水槽に放って探索させ、周囲の視覚の手がかりをもとに BW のシャーレの位置を学習させた (空間学習)。この学習を1日2回、4日間連続で実施し、その後、すべてのシャーレを空にした状態で空間学習が成立しているか否かをテストした。空間学習が成立していれば、BW の入っていたシャーレに到達する時間や距離が短縮されるとともに、誤ってほかのシャーレに入る回数が減少することが考えられる。これらのパラメーターをもとに、空間学習が成立しているか否かを評価した。学習成立個体の脳を摘出・固定してパラフィン切片を作製し、cFos の抗体を用いて終脳を染色した。cFos 免疫陽性細胞数をカウントし、空間学習未経験の個体 (ナイーブ) と比較した。

空間学習依存的にニューロンの新生が影響を受けるか否かを調べるために、上述の空間学習7回目の試行後にトビハゼにプロモデオキシウリジン (BrdU) を与え、増殖細胞を標識した。その後、凍結脳切片を作製し、新生細胞を BrdU の免疫染色によって検出した。

4. 研究成果

学習が成立したトビハゼの行動を解析したところ、BW が入ったシャーレに到達するまでの時間は、試行を重ねるにつれて次第に短縮されていった (図1)。さらにこれらの個体は、すべてのシャーレを空にしたテスト試行においても、もともと BW の入っていたシャーレに短時間で到達した (図1)。

また、これらの個体は、BW シャーレに到達するまでの間に他のシャーレを訪問する回数も学習試行を重ねるにつれて減少した。とりわけ、BW シャーレの真反対に置かれた SW シャーレを訪問する回数は学習試行の初期段階から急速に減少した。これは、BW シ

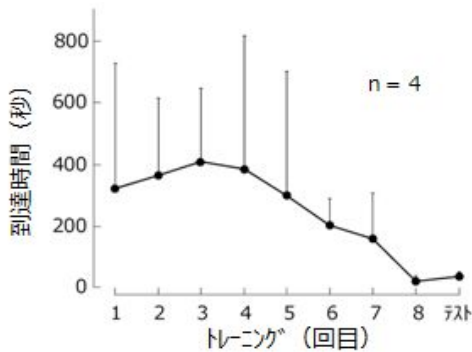


図1 BW シャーレに到達するまでの時間

シャーレの置かれた大まかな方向を学習試行の早い段階で認識し、試行を重ねるにつれて、BW シャーレの正確な空間配置を学習している可能性を示唆している。これら空間学習が成立したトビハゼの終脳を用いて cFos タンパク質の免疫染色を行い、領域ごとにナイーブ群と比較した(図2)。学習成立群では、背外側(DI)および背中央(Dc)領域の cFos

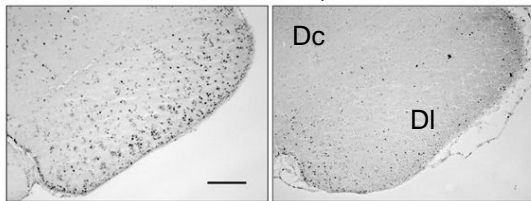


図2 終脳背外側(DI)および背中央(Dc)領域 cFos 免疫陽性反応
スケールバーは 100 μ m

免疫陽性細胞数がナイーブ群の2倍程度まで増加した(図3)。背内側領域(Dm)を含めてその他の領域では学習成立群に特徴的な cFos 免疫陽性細胞数の増加は認められなかった。これらのことは、トビハゼ終脳の DI および Dc が空間学習において重要な領域であることを示唆している。

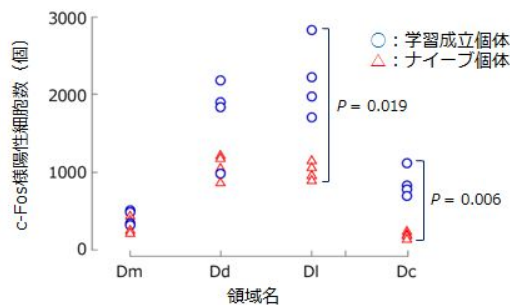


図3 脳領域ごとの cFos 陽性細胞数の比較

BrdU を取り込ませたトビハゼの終脳を免疫染色すると、ナイーブ群および学習成立群ともに、終脳の皮質(Dm, Dd, DI)で多くの BrdU 免疫陽性反応を認めた。一方で、Dc ではほとんど BrdU 陽性細胞は観察されなかった。学習成立群とナイーブ群において領域ごとの BrdU 陽性細胞数を比較したところ、いずれの領域でも両群の間に差は認められなかった。

魚類の空間学習を担う脳領域を同定する

ために、これまで、終脳の特定領域を破壊することでその学習能が影響を受けるか否かを指標として解析が試みられてきた。こうした研究から、魚類の空間学習に関する脳領域として、Dm(Saito & Watanabe, 2004, 2005) および DI(Rodriguez et al., 2002) の2つの領域が候補とされていたが、破壊実験はその領域のニューロン集団だけでなくそこを走行する神経線維(神経連絡)も断ち切ってしまうために、空間学習を担う脳領域を決定には至っていなかった。本研究では、空間学習によって活性化される終脳領域を cFos 免疫組織化学によって非破壊的に検出し、これまでの候補領域の範囲においては、DmではなくDIで cFos 免疫陽性細胞数の増加を認めた。この結果は、Rodriguez らの見解を支持するものである。また、発生学的にもDIは哺乳類の海馬に対比可能であることが知られているので、DIが空間学習能を担う領域として機能している可能性は非常に高いと思われる。しかしながら一方で、哺乳類の海馬は空間学習依存的に神経新生が促進されることが知られているが、トビハゼではそうした所見は得られなかった。トビハゼの場合、終脳における神経新生は定常的に盛んに生じているので、神経新生は空間学習も含めて刺激依存性は低いものと思われる。

本研究では、Dcにおいても空間学習依存的に cFos 免疫陽性細胞数の増加を認めた。これは、魚類の空間学習に関する研究においても新たな所見である。Dcは視覚情報を終脳の各領域にリレーする場であることが知られているので、この領域の活性化は、トビハゼの空間学習が視覚情報に基づいてなされていることを裏付ける証拠のひとつであると評価できる。

本研究はトビハゼの上陸嗜好性を利用して、一般的な哺乳類の空間学習課題であるモリス水迷路課題の類似課題をデザインし、改良しつつ実験に望んだ。しかしながら、安定して多くのトビハゼが空間学習を成立させるまでには至らなかった。現在、学習課題の基本はそのままに、トビハゼの飼育環境の改良も含めて、安定した実験条件の確立に取り組んでいる。

本研究はトビハゼの生態を生かし、哺乳類の空間学習課題に則した課題を用いて、非破壊的に魚類の空間学習能を担う脳領域を見つけ出した。こうした成果は、魚類の空間学習能に関する脳生理学的研究を進めるための基盤となり、魚類の高次脳機能の解明に寄与すると思われる。また、本研究結果が哺乳類の課題と共通した課題で得られたことから、脊椎動物の空間学習能の系統進化を議論するための立脚点になると思われる。

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0件)

〔学会発表〕(計3件)

1. 椋田崇生, 小山友香, 濱崎佐和子, 古川康雄トビハゼの空間学習とそれにより活性化される終脳領域, 第85回日本動物学会大会2014年9月13日, 東北大学(仙台市).

2. 濱崎佐和子, 松浦真理絵, 植松一眞, 古川康雄, 椋田崇生, トビハゼの視索前野で見出された終板器官様領域, 第85回日本動物学会大会2014年9月13日, 東北大学(仙台市).

3. 椋田崇生, 小山友香, 濱崎佐和子, 早瀬智子, 古川康雄, 富川光, 広塩性魚トビハゼの空間学習, 中四国生物系三学会合同大会・動物学会中国四国支部大会, 2013年5月11日, 徳島大学(徳島市).

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

椋田 崇生(MUKUDA TAKAO)

鳥取大学・医学部・講師

研究者番号: 60346335