

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 3 日現在

機関番号：82401

研究種目：新学術領域研究（研究領域提案型）

研究期間：2011～2015

課題番号：23120008

研究課題名（和文）意思決定神経回路の可視化と操作

研究課題名（英文）Imaging and manipulation of the neural circuits for decision making

研究代表者

岡本 仁（Okamoto, Hitoshi）

国立研究開発法人理化学研究所・脳科学総合研究センター・シニアチームリーダー

研究者番号：40183769

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 53,100,000円

研究成果の概要（和文）：本計画は、脊椎動物で最も簡単な構造の脳を持つゼブラフィッシュの成魚の終脳を使って、意思決定に関わる神経細胞の活動を可視化し、意思決定の神経メカニズムを究明することが目的である。「逃げるルール」と「とどまれルール」の2つのルールが、終脳外套部の2つの異なる神経細胞群の活動により別々に読み出されることを示した。腹側手綱核と、それに繋がる正中縫線核のセロトニン神経細胞が、条件刺激の提示に対して負の価値予測を反映していることを示した。さらに、ゼブラフィッシュ成魚で仮想現実空間システムを完成させて、視覚イメージの提示中に、成魚の全脳の神経活動を観察できるシステムの構築を行った。

研究成果の概要（英文）：The aim of this study was to image the activities of the neurons which regulate decision making and ultimately to elucidate the neural mechanisms of decision making by taking advantage of the minimum size of the telencephalon of the adult zebrafish. We revealed that two different neural ensembles in the telencephalic pallium encode the behavioral rules for escape and stay. We also showed that the activities of the neurons in the ventral habenula and their direct targets, the serotonergic neurons in the median raphe, encode the expectation value of the future negative reward. We further have succeeded in establishing the virtual reality environment in which the neural activities of the whole brain of live adult zebrafish can be observed.

研究分野：分子神経回路行動学

キーワード：意思決定 ゼブラフィッシュ イメージング トランスジェニック カルシウム標識蛍光タンパク オプトジェネティクス

1. 研究開始当初の背景

脳に与えられた最も重要な機能は、動物が与えられた状況ごとに、生存状況を最善にするための行動制御プログラムを作成し、その場で最適な行動プログラムを選択することである。哺乳類の脳では、扁桃核、大脳基底核、中脳や後脳のモノアミン細胞などの、行動制御プログラムの成立への関与は示されているが、これらの領域がプログラムの成立や選択においてどのように相互作用するのは、いまだ不明な点が多い。最近の研究から、硬骨魚類の終脳も、哺乳類の終脳の基本構造に相当する構造をもっていることが示された。

2. 研究の目的

本研究では、神経回路が簡略化されているゼブラフィッシュを実験材料として、遺伝子操作技術を駆使して、神経活動の可視化や人為的操作を行うことで、基底核を中心として、行動プログラムの形成と読み出しに関わる神経回路の、動作様式を細胞レベルで可視化し、その動作特性を明らかにする。

3. 研究の方法

1) 現在の高速高感度カメラを用いた観察システムで、終脳の活動を計測する。

2) 行動制御に関わる神経回路の、個々の神経細胞の振る舞いを2光子レーザー顕微鏡を用いることによって観察する。

3) 行動プログラムの形成と選択に関わる神経回路を、脳の部位ごとに操作するために、終脳の異なる部位ごとに、遺伝子操作を可能とするトランスジェニック・ゼブラフィッシュを、組み換え BAC クローンを使って作成する。

4) 上記観察システムと遺伝子発現制御システムを使うことによって、行動プログラムの形成と選択に関わる神経回路の動作特性を明らかにする。特に、行動ルールの変更の後で、どのような異なる細胞集団が、興奮するようになるのかや、行動ルールの変化に応じて細胞集団のスイッチングを引き起こす神経回路機構を明らかにする。

4. 研究成果

我々は、トランスジェニック魚 HuC::Inverse Pericam をつかって、遺伝学的にコードされたカルシウム感受性蛍光蛋白による神経活動の検出する観察システムを既に確立した。

このトランスジェニック魚に、赤ランプが点灯後15秒以内に、水槽のしきりの反対側に逃げなければ、ショックを受けるという、能動的回避恐怖学習を行わせたところ、野生型のゼブラフィッシュと同じように連合学習による恐怖記憶が形成された。

このように学習させたトランスジェニック魚を観察システムに移し、右眼から入った条件刺激(赤い光)を与え、終脳と視覚中枢である視蓋における反応を、高速高感度カメラを用いて観察した。能動的回避学習を習得してから24時間後に、条件刺激を提示した場合には、終脳の背側の大脳皮質に相当する領域にスポット状の神経活動パターンが観察された。しかし、学習成立の30分後に条件刺激を提示し、回避行動を思い出した場合は終脳には目立った活動はみられなかった。これは、ゼブラフィッシュの外殻部(大脳皮質相当領域)で、我々が観察したシグナルは、長期的に記憶された(長期記憶)能動的回避行動のプログラムが読み出される際に、特定の神経細胞群が興奮する過程を可視化するのに成功したことを示唆していた。

この仮説を更に検証するために、能動的回避学習の前にこの大脳皮質相当領域を破壊し、行動学習に及ぼす影響を調べた。このようなゼブラフィッシュでは、能動的回避行動を学習する能力そのものや、学習してから短時間(30分)の後に、思い出す能力には影響がないにも関わらず、学習成立後に長時間(24時間)が経過すると、学習した能動的回避行動を思い出せなくなることが示された。このことから、能動的回避学習の成立後に、条件刺激の提示によって興奮が見られる終脳外殻部の領域に、行動プログラムの長期記憶が選択的に書き込まれ、それが正しく読み出されることで、魚は最適な行動の選択を行っていることが明らかになった。

我々は更に、ゼブラフィッシュに、赤、青の2色のランプを条件刺激として示し、2つ

の正反対のルールを学習させることを試みた。すなわち、ゼブラフィッシュに、赤色ランプが点灯してから 15 秒間のうちに反対側の部屋に逃げないと電気ショックを与える「逃げるルール」と、青色ランプが点灯している 15 秒間は同じ部屋に居続けないと電気ショックが与えられる「とどまれルール」の 2 つのルールを同時に学習するような訓練を行った。

このように 2 色で異なるルールを学習すると、それぞれのルールにおいて最適な行動のプログラムは、2 つの異なる神経細胞群の活動により別々に読み出されることが分かった。特に「とどまれルール」で学習した行動プログラムを読み出している時の脳の神経活動パターンは、「逃げるルール」で学習した行動プログラムを読み出している時より広がっていた。この実験結果により、異なる行動のプログラムは異なる神経細胞群の活動パターンによって読みだされることが明らかになった。

以上の成果をまとめて、*Neuron* 誌に発表した。(Aoki et al., *Neuron* 78:881-94, 2013)

さらに、世界で始めて、自由遊泳のゼブラフィッシュの成魚の脳の神経活動を、オプトジェネティクスを用いて制御できる実験法を確立した。これを使って、腹側の手綱核の神経細胞を、任意の条件の時のみにオプトジェネティクスを用いて興奮させることによって、その条件に対する忌避行動が誘起されることを示した。これ以前に得られた、腹側手綱核のみで特異的に破傷風毒素を発現するトランスジェニック系統では、古典的恐怖学習は出来るが、能動的回避学習が出来なくなるという結果と合わせて、腹側手綱核と、それに繋がる正中縫線核のセロトニン神経細胞は、条件刺激の提示に対して負の価値予測を反映して興奮し、能動的回避学習を可能とするという仮説を立てた。この仮説を更に検証するために、能動的回避学習の途中と成立後のゼブラフィッシュで、腹側手綱核神経細胞が、条件刺激の提示に対してどの様に反応するのかを調べた。これらの神経細胞が、負の価値予測をコードする場合に理論的に予測されるように、学習の途中では興奮頻度の上昇が見られ、学習成立後には、通常レベルに回帰す

るといふ振る舞いが見られた。以上全ての結果をまとめて *Neuron* 誌に発表した。(Amo et al., *Neuron* 84:1034-1048, 2014)

我々は更に、終脳全域の興奮性神経細胞で、カルシウム表示タンパクを高レベルで発現させるために、camk2a プロモータの下流に gal4vp16(GVP)を繋いだBAC によるドライバーラインとUAS の下流に遺伝工学的カルシウム表示タンパクであるG-CaMP7 とを組み合わせることにより、camk2a-GVP ;UAS-G-CaMP7 トランスジェニックフィッシュを作成し(研究協力者: 国立遺伝学研究所 東島眞一、埼玉大学 中井淳一)、成魚終脳においてカルシウム表示タンパクが高発現することを確認した。同様に抑制性神経細胞特異的系統(GAD67-GVP ;UAS-G-CaMP7)や、終脳の基底核の直接経路(pptac1--GVP ;UAS-G-CaMP7)や間接経路(penk1-GVP ;UAS-G-CaMP7)に特異的な系統も作成している。

このcamk2a-GVP ;UAS-G-CaMP7系統を用いて、能動的回避行動修得から24 時間後のカルシウムイメージングにより、終脳内の 3 つの領域に条件刺激提示に応答する神経活動を見出すことに成功している。興味深いことにこれら 3 つの領域はそれぞれ連続的(1>2>3)に活動していくことが観察された。能動的回避学習成立24時間後の条件刺激提示により活動した領域 1、2 および 3 はそれぞれ哺乳類における海馬、扁桃核、大脳皮質に相当することが、相同性分子の発現パターンの一致から想定された。

さらに、ゼブラフィッシュ成魚で仮想現実空間システムを完成させて、視覚イメージの提示中に、成魚の全脳の神経活動を観察できるシステムの構築を進めた。

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 12 件)

Mieda M, Ono D, Hasegawa E, Okamoto H, Honma K, Honma S, Sakurai T. Cellular clocks in AVP neurons of the SCN are critical for interneuronal coupling regulating circadian behavior rhythm. *Neuron*. 85:1103-1116. (2015) (査読有り)

Elbaz I, Lerer-Goldshtein T, Okamoto H, Appelbaum L.

Reduced synaptic density and deficient locomotor response in neuronal activity-regulated pentraxin 2a mutant zebrafish. **FASEB J.** 2015 29:1220-1234. (2015) (査読有り)

Hisano Y, Sakuma T, Nakade S, Ohga R, Ota S, **Okamoto H.** Yamamoto T, Kawahara A. Precise in-frame integration of exogenous DNA mediated by CRISPR/Cas9 system in zebrafish. **Sci Rep.** 5:8841. (2015) (査読有り)

Amo R, Fredes F, Kinoshita M, Aoki R, Aizawa H, Agetsuma M, Aoki T, Shiraki T, Kakinuma H, Matsuda M, Yamazaki M, Takahoko M, Tsuboi T, Higashijima S, Miyasaka N, Koide T, Yabuki Y, Yoshihara Y, Fukai T and **Okamoto H.** The habenulo-raphe serotonergic circuit encodes an aversive expectation value essential for adaptive active avoidance of danger. **Neuron.** 84:1034-1048. (2014) (査読有り)

Okamoto H. Minicerebellum, now available for reductionists' functional study. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 111(32):11580-11581. (2014) (査読無し)

Okamoto H. Neurobiology: sensory lateralization in the fish brain. **Curr Biol.** 24:R285-287. (2014) (査読無し)

Aoki T, Kinoshita M, Aoki R, Agetsuma M, Aizawa H, Yamazaki M, Takahoko M, Amo R, Arata A, Higashijima S, Tsuboi T, **Okamoto H.** Imaging of Neural Ensemble for the Retrieval of a Learned Behavioral Program. **Neuron** 78:881-894. (2013) (査読有り)

Aizawa H, Yanagihara S, Kobayashi M, Niisato K, Takekawa T, Harukuni R, McHugh TJ, Fukai T, Isomura Y, **Okamoto H.** The synchronous activity of lateral habenular neurons is essential for regulating hippocampal theta oscillation. **J Neurosci.** 33:8909-8921. (2013) (査読有り)

Campbell DS, **Okamoto H.** Local caspase activation interacts with Slit-Robo signaling to restrict axonal arborization. **J Cell Biol.** 203:657-672. (2013) (査読有り)

Okamoto H. Aizawa H. Fear and anxiety regulation by conserved affective circuits. **Neuron** 78:411-413. (2013)

Okamoto H. Agetsuma M, Aizawa H. Genetic dissection of the zebrafish habenula, a possible switching board for selection of behavioral strategy to cope with fear and anxiety. **Dev Neurobiol.** 72:386-394. (2012) (査読有り)

Ohata S, Aoki R, Kinoshita S, Yamaguchi M, Tsuruoka-Kinoshita S, Tanaka H, Wada H, Watabe S, Tsuboi T, Masai I, **Okamoto H.** Dual Roles of Notch in Regulation of Apically Restricted Mitosis and Apicobasal Polarity of Neuroepithelial Cells. **Neuron.** 69:215-230. (2011) (査読有り)

[学会発表] (計 31 件)

Okamoto H. Control of social aggression by the habenula. The 6th FAONS Congress and the 11th Biennial Conference of CNS, Wuzhen, China, 2015/09/21.

Okamoto H. Study of the neural circuits for emotion using evolutionary conservation. Cold Spring Harbor Asia Conference on International Brain Projects, Dushu, China, 2015/06/21.

Okamoto H. Control of social aggression by the habenula. Zebrafish Systems Biology Workshop, Ashburn, USA, 2015/04/24.

Okamoto H. Evolutionarily conserved role of the habenula in control of fear and self-confidence in aggression. UCSF Neuroscience Seminar, San

Francisco, USA, 2015/01/22.

Okamoto H. Control of social aggression by the habenula. 6th Strategic Conference of Zebrafish Investigators, Pacific Grove, USA, 2015/01/20.

Okamoto H. The habenulo-raphe serotonergic circuit encodes an aversive expectation value essential for adaptive active avoidance of danger. The 3rd Imaging Structure & Function in the Zebrafish Brain Symposium, Paris, France, 2014/12/06.

Okamoto H. Evolutionarily conserved role of the habenula in control of fear and self-confidence in aggression. SERB School in Neuroscience VIII "Brain Circuits", Pune, India, 2014/12/18.

Okamoto H. Genetic Analysis of Neural Circuits that Regulate Fear and Aggression. MCDB Department Seminar, Ann Arbor, USA, 2014/11/21.

Okamoto H. Evolutionarily conserved role of the habenula in control of self-confidence in aggression. KBRI 2nd Anniversary International Symposium, Daegu, Korea, 2014/11/10.

Okamoto H. Habenula as a switch board for emotion. 9th FENS forum of Neuroscience, Miran, Italy, 2014/07/06.

Okamoto H. The ventral habenula in zebrafish assigns the negative prediction value to the conditional stimulus in the active avoidance learning. The 3rd European Zebrafish Principle Investigator Meeting(EZPM), Ein-Gedi, Israel, 2014/04/02.

Okamoto H. The optogenetic manipulation of the ventral habenula in zebrafish reveals its roles in the assignment of the negative prediction value to the aversive cue in the active avoidance learning. 6th Asia Oceania Zebrafish Meeting, Hong Kong, China, 2014/01/20.

Okamoto H. The habenula acts as the switchboard in fear response and aggression. Zhejiang University Neuroscience Mini-symposium, Hangzhou, China, 2013/10/26.

Okamoto H. The habenula acts as the switchboard in fear response and aggression. Cold Spring Harbor ASIA CONFERENCES "Development, Function and Disease of Neural Circuits", Suzhou, China, 2013/10/23.

Okamoto H. The optogenetic manipulation of the ventral habenula in zebrafish reveals its roles in the assignment of the negative prediction value to the aversive cue in the active avoidance learning. Annual meeting of the research group 1279 of the German Research Foundation "Protein-based Photoswitches as Optogenetic Tools", Heidelberg, Germany, 2013/10/11.

Okamoto H. The habenula acts as the switchboard in fear response and aggression. Invited talk at The Life & Medical Sciences Institute (LIMES), the University of Bonn, Bonn, Germany, 2013/10/09.

Okamoto H. The roles of the habenula in escape and aggression Champsalimaud Neuroscience Symposium, Lisbon, Portugal, 2013/09/28.

Okamoto H. Zebrafish as a model system for study of fear. Summer school Utrecht 2013 "Neural Circuit Development and Plasticity", Utrecht, The Netherlands, 2013/08/05.

Okamoto H. Habenula as a gate switch of emotion Francis Crick symposium on neuroscience. The changing brain, Suzhou, China, 2013/05/07.

Okamoto H. The roles of the habenula in aversive learning and gain of self-confidence in aggressive behavior. Imaging structure and function in the zebrafish brain, London, UK, 2012/12/07.

Okamoto H. The roles of the habenula in aversive learning and gain of self-confidence in aggressive

behavior. NEUREX workshop "If only descartes had known about the habenula", Strasbourg, France, 2012/11/20.

Okamoto H. The roles of the habenula in aversive learning and gain of self-confidence in aggressive behavior. The neurobiology of emotion, Stresa, Italy, 2012/11/14.

Okamoto H. The roles of the habenula in aversive learning and gain of self-confidence in aggressive behavior. Cold Spring Harbor Conferences Asia: Neural Circuit Basis of Behavior and its Disorders, Suzhou, China, 2012/11/08.

Okamoto H. The roles of the habenula in aversive learning and gain of self-confidence in aggressive behavior. Jenelia workshop on zebrafish genetics, transgenesis, and systems biology, Ashburn, USA, 2012/11/02.

Okamoto H. The roles of habenula in aversive learning and gain of self-confidence in aggressive behaviour. XXX annual conference of Indian Academy of Neurosciences (IAN) and international symposium on translational neurosciences: Unraveling mysteries of brain in health and disease, Amritsar, India, 2012/10/29.

Okamoto H. The roles of the habenula in aversive learning and gain of self-confidence in aggressive behavior. Central neuroplasticity in sensory-emotional Link, Okazaki, Japan, 2012/09/15.

Okamoto H. Study of neural circuits for fear-motivated behavior in zebrafish. ISDN2012, Mumbai, India, 2012/01/12.

Okamoto H. Habenula as the multimodal switching board for controlling behaviours. 8th international Congress of Comparative Physiology and Biochemistry (ICCPB2011), Nagoya, Japan, 2011/06/03.

Okamoto H. Dual roles of Notch in regulation of apically restricted mitosis and apicobasal polarity of neuroepithelial cells. SFB 488 Symposium 2011: '12 years of nervous excitation', Heidelberg, Germany, 2011/02/26.

Okamoto H. Cross-species approach for the study of the neural circuits controlling emotion, The 4th strategic conference of zebrafish investigators, Pacific Grove, USA, 2011/01/31.

Okamoto H. Cross-species approach for the study of the neural circuits controlling emotion, Educational workshop for students in the medical and dental scientist training program, Naju, Korea, 2011/01/24.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：

権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ
<http://www.brain.riken.jp/jp/faculty/details/37>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岡本 仁 (OKAMOTO, Hitoshi)

国立研究開発法人理化学研究所・脳科学総合研究センター・シニアチームリーダー
研究者番号：40183769