

令和 3 年 6 月 24 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18H02479

研究課題名(和文)メダカの顔認知の分子神経基盤の解明

研究課題名(英文)Study on molecular/neural basis underlying face recognition in medaka fish

研究代表者

竹内 秀明 (TAKEUCHI, Hideaki)

東北大学・生命科学研究科・教授

研究者番号：00376534

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,300,000円

研究成果の概要(和文)：オキシトシンはメダカにおいて個体認知能力を介した「親密な異性」への好みをオス・メスの両方で制御することを発見した(PNAS 2020)。さらにオキシトシン作用部位候補として霊長類の「上丘」に対応する「視蓋」を同定した。霊長類の「上丘」ではメダカ同様にオキシトシン受容体が発現しており、先天的な顔認知にも関わっている。このことから、メダカでも当該脳領域が視覚的な社会認知(顔認知)に関わる可能性はある。これと併行して、最初期遺伝子による賦活化脳領域の検索から、パリウムDdの一つの脳区画が異性の視覚刺激によって活性化することを見出した。当該脳領域の遺伝子発現プロファイルを作成した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで顔認知に関わる神経機構は霊長類で固有に進化したと信じられており、魚類に着目した研究はなかった。霊長類研究では遺伝子操作が困難であることから、顔認知の分子神経基盤の解明は進んでいない。本研究課題では、メダカの顔認知に関わる脳領域候補を同定し、機能解析に必要なマーカー遺伝子の同定や遺伝子発現制御ツール(Tet-ON)システムの確立に成功した。これにより、世界に先駆けて動物の顔認知に関わる分子神経基盤をシンプルな実験動物を用いて解析できるようになった。また霊長類と比較可能な脳領域(視蓋・上丘)に着目することで、メダカの基礎研究がヒトの先天的な顔認知機構の原型の発見につながる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Medaka fish have visual ability to discriminate between familiar/unfamiliar mates. We found that the oxytocin signaling pathway (oxt-oxtr1) is required for the mate preference for familiar conspecifics in both sexes. This pathway is essential for eliciting female mate preference for familiar males, while it is also required for the unrestricted and indiscriminate preference of males. Next, we showed that oxtr1 (oxytocin receptor) was expressed in the primary visual center (optic tectum), which is a homolog to the mammalian superior colliculus (SC). Interestingly, primate oxtr is also expressed in the SC and the SC is involved in infant monkeys' rapid and innate face detection. Thus the optic tectum is one of the candidates for brain regions for face detection in medaka fish. In addition, we revealed that visual stimuli from conspecifics activated one brain region (Vd) in the pallium. To identify gene markers for this brain region, we conducted RNA-seq made a gene expression profile.

研究分野：分子生物学、行動生物学

キーワード：ソーシャルビジョン 上丘 顔認知 オキシトシン 視蓋

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

集団で生活するいくつかの動物は個体認知能力を介して社会適応する。例えば、鳥類では種の90%以上は一夫一婦制を営み、お互いにパートナーを認知している。またいくつかの魚類も個体認知能力を持つ。順位制を持つ熱帯魚の一種(シクリッド)は集団メンバーの順位を記憶して、上位個体からは逃避し、下位個体には接近する。仲間を見分ける上で、ヒトやサルにおいては視覚系が最も重要であり、顔認知に特化した脳領域(顔領域)が大脳皮質に存在する。研究代表者らはメダカを材料に行動実験を行ない、メダカは仲間を見分ける(個体認知)能力を持ち、個体認知を介して社会行動を示すことを発見した<sup>(1)</sup>。メスは「お見合い相手」を視覚記憶して性的パートナーとして積極的に選択し、「見知らぬオス」を拒絶する傾向があることを発見した。またメダカメスの個体認知能力は忌避連合学習によっても示すことができた。1匹のメスに2匹のオスを視覚的に提示し、一方のオスに近づいた時に電気ショックを与える訓練を繰り返し行うと、メスはそのオスを記憶して避けるようになる。さらに配偶者選択と嫌悪記憶という2つの行動パラダイムにおいて、メスがオスを見分ける際には「顔」の部分の視覚情報が特に重要であり、ヒトの心理学実験で有名な「倒立顔効果」がメダカでも生じることを発見した<sup>(2)</sup>。「倒立顔効果」とは顔が上下逆さになると識別能力が低下する現象である。ヒトでは「倒立顔」を顔領域だけでなく物体認識に関わる脳領域も反応してしまうため、顔の識別能力が低下すると考えられている。「倒立顔効果」が生じたことからメダカにも顔認知に特化した脳領域(顔領域)が存在する可能性がある。

### 2. 研究の目的

本研究では、「霊長類以外の動物(魚類)も顔領域に相当する脳領域が存在するのか？」また「魚類の顔情報の脳の処理過程や分子基盤は何か？」という問いに世界に先駆けて答えることで、動物の社会認知機能の系統発生の理解に貢献し、分子遺伝学のモデル生物を対象にすることで、その分子基盤の原型を解明することを目的にした。

### 3. 研究の方法

#### (1) 最初期遺伝子を用いたメダカ顔領域の探索

オスを長時間見た後に、メスの脳内で神経活動が活性化する脳領域を最初期遺伝子の *in situ* hybridization 法にて検索した。また活性化するサブセットニューロン選択的に発現するマーカー遺伝子を検索する目的で次世代シーケンサーを用いた遺伝子発現解析を実施した。

#### (2) 賦活化ニューロンを時期特異的に遺伝的にラベルできるメダカ系統の作成

メダカ脳内で機能する Tet-On システムを構築した。また転写因子 rtTA を最初期遺伝子 (*egr-1*, *c-fos*) の遺伝子座にノックインした系統を作成した。

#### (3) メダカにおけるオキシトシン遺伝子の機能解析

ヒトやイヌなど視覚を介してコミュニケーションをする高等哺乳類はお互いの顔(目)を見た時に脳内ホルモンであるオキシトシンの分泌が活性化して、向社会性行動が賦活化する。そのためオキシトシン系は視覚を介した社会認知機能や行動選択にバイアスをかける可能性がある。本研究ではメダカにおいてオキシトシンシステムの機能を解明し、オキシトシンの標的となる遺伝子や候補脳領域の検索を行った。

### 4. 研究成果

#### (1) 最初期遺伝子を用いたメダカ顔領域の探索

本研究ではメダカのメスにオスの姿を長時間見せるとパリウム Dd の一つの脳区画で最初期遺伝子(*egr-1*)が強く発現することを *in situ* ハイブリダイゼーション法で見出した。ヒトでは顔領域は高次視覚中枢に顔領域が存在し、個体記憶に関わる海馬に近接している。メダカ Dd と近接する DI 領域は魚類の視覚高次中枢であり、ほ乳類の海馬に対応する脳領域(DI 領域)と近接しているため、大脳背側 Dd 領域はメダカ顔領域候補であると判断した(図1)。さらに熱依存性 Cre-loxP 組換えが誘導される遺伝子改変メダカを用いた細胞系譜解析から、当該脳領域はクローナルユニット(一つの幹細胞由来の細胞集団)であることを示唆した。次に当該脳領域の遺伝子マーカーを同定する目的で、遺伝的に蛍光ラベルしたクローナルユニットを抽出して、RNA-Seq を行って遺伝子発現プロファイルを作製した。

#### (2) 最初期遺伝子を用いたメダカ顔領域の探索

メダカ脳内で薬剤依存に外来遺伝子を発現する実験系(Tet-On システム)を構築した(論文投稿中)。神経マーカー遺伝子(HuC)プロモータ依存に転写因子 rtTA を発現するメダカ系統を作成した。転写因子 rtTA は、薬剤(ドキシサイクリン)が存在した時のみ TRE プロモータに結合して転写を活性化するが、メダカ脳内でもレポーター遺伝子が Dox 依存に発現することを確認した。次に最初期遺伝子座に rtTA を導入したノックイン系統(IEG:rtTA 系統)と、TRE プロモータ依存に蛍光タンパク質が発現する系統(TRE:GFP 系統)を作成した。これから両系統を掛け合わせることで、そのため薬剤添加条件下で行動実験をすれば、顔刺激によって賦活化したニューロンを全脳において蛍光タンパク質でマッピングできることが期待できる。

### (3)メダカの配偶者選択行動におけるオキシトシン機能の解明と顔領域候補脳領域の同定

オキシトシン(OXT)とオキシトシン受容体(OXTR1、OXTR2)をコードする遺伝子の変異体を作成して行動解析を行った結果、*oxt* または *oxtr1* のどちらかの遺伝子を欠損すると、メスは異性の好みを失い、「見知らぬオス」を「親密性の高いオス」と同じように受け入れることを発見した。よってオキシトシンもメダカメスの個体認知を介した配偶者選択に必要であることを新たに見出した。一方で、メダカはオスとメスで配偶戦略が異なっており、メスには異性の好みがあるが、オスは特に異性の好みを持たない。しかし、変異体オスは同じ水槽で育った「親密なメス」に対する異常な好みを持つことを見出した。よってメダカにおいてオキシトシンはメスとオスで逆の効果を持つことを発見した。

多くの動物は自分自身の子孫を残すために性的パートナーを選択するが、その配偶戦略は性によって異なっている。メダカの場合も、野生型のメスは親密パートナーを選択する傾向があり、オスはできるだけ多くのメスと子孫を残そうとする傾向がある。しかしながら、配偶戦略の性差を生み出す神経基盤はこれまで不明であった。メダカを用いた基礎研究から、オキシトシンシステムが配偶戦略の性差発現機序に必須なシステムであることを世界に先駆けて示すことができた。さらにオキシトシンシステムの標的分子を検索する目的で、*oxt/oxtr1* の変異体において性差を問わず発現が変動する遺伝子を検索したところ、C1q 複合体を構成する3つのサブユニット鎖(C1qA、C1qB、C1qC)をコードする遺伝子の発現が共に顕著に低下することを発見した。C1q は脳発達期にプレシナプスから分泌され、ミクログリアを介したシナプスの刈り込みに働く。一方で、オキシトシンシステムが成体脳だけでなく、脳発達期に神経ネットワークの発達や性特異的な行動発達に重要な役割をもつことが既に報告されている。そこで脳発達期にオキシトシンシステムが C1q を活性化し、シナプスの刈り込みを介して顔認知に関わる神経ネットワークの発達を制御する可能性が考えられる。これらの研究成果は2020年2月18日に *Proceedings of the National Academy of Sciences* 誌に掲載された(研究分担者・横井が第一著者、研究代表者・竹内が最終著者・責任著者)。東北大、北大、基礎生物学研究から共同プレスリリースを行った結果、NHK ニュース(北海道版、全国版)等のメディア紹介された。

さらにオキシトシン作用部位を検索する目的で、メダカ脳においてオキシトシン受容体の発現解析を行った。その結果、本能行動中枢や情動中枢だけでなく、一次視覚中枢である視蓋(霊長類の上丘に対応)の一層に選択的に強く発現することを見出した(図1)。哺乳類ではオキシトシン受容体は社会認知・行動選択に関わる脳部位に発現している<sup>(3)</sup>。嗅覚情報を介して同種認知する齧歯類ではオキシトシン受容体は一次嗅覚中枢に発現しており、視覚情報を用いる霊長類では上丘(一次視覚中枢)に発現する<sup>(3)</sup>。これまで、霊長類では外界の視覚情報は網膜

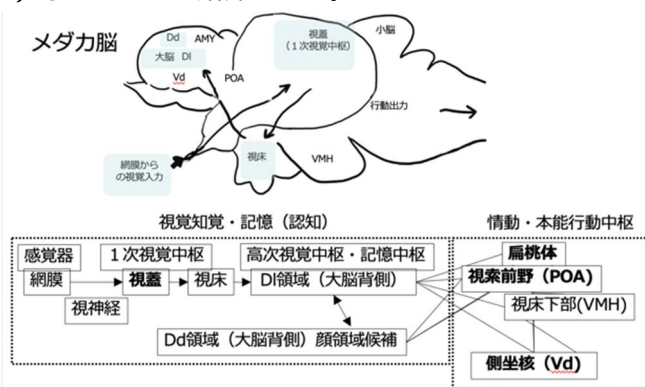


図1 メダカ脳における推定上の視覚情報処理経路 顔認知領域候補としてDd(中間からの視覚刺激により賦活化)と視蓋(オキシトシン受容体発現ニューロン)を同定した。太字はオキシトシン受容体発現を示す。

で受容され、膝状体視覚系を介して大脳皮質内の階層的なネットワーク(2次以上の視覚野)を介して「顔情報」が抽出されると考えられてきた。しかし、霊長類では膝状体視覚系を経由しない「上丘」を介した視覚情報処理経路(膝状体「外」視覚経路)も存在している。興味深いことに霊長類の「上丘」は本能的認知の役割を担っており、生後直後の新生児において先天的な顔認知に関わることが最近指摘されてた<sup>(4)</sup>。霊長類の「上丘」は魚類の「視蓋」に対応していることから、メダカ視蓋のオキシトシン受容体発現ニューロンは同種からの視覚情報を抽出する「顔認知」の機能を担うという仮説を今後検証する。齧歯類ではオキシトシンは一次嗅覚中枢で社会シグナルに対する感受性を制御する働きがあり、メダカオキシトシン受容体の変異体には「親密な異性」への好みに異常が生じることから、齧歯類の嗅覚系と同様にメダカの視覚系(上丘)でもオキシトシンは社会認知機能にバイアスをかける可能性がある。また霊長類でも上丘でオキシトシン受容体が発現することから<sup>(4)</sup>、メダカの基礎研究から上丘(膝状体「外」視覚経路)における「先天的(innate)な顔認知」の分子神経基盤を今後、分子遺伝学的手法で解明できると考えている。最終年度は視蓋オキシトシン受容体ニューロンの遺伝子発現プロファイルを作成する目的で、シングルセルトランスクリプトームを実施して、視蓋

オキシトシン受容体ニューロンのマーカー遺伝子を同定することを目指した。シングルセルトランスクリプトームを実施するための予備実験(メダカ脳の細胞分離条件の検討)を行い、細胞の生存率を維持した上で、シングルセルに分離する条件を見いだした。

<参考文献>

- (1) Wang and Takeuchi, Individual recognition and the 'face inversion effect' in medaka fish (*Oryzias latipes*). *eLife*, 6, 24728 (2017)
- (2) Okuyama et al., A neural mechanism underlying mating preferences for familiar individuals in medaka fish. *Science* 343, 91-94 (2014)。
- (3) Freeman and Young, Comparative perspectives on oxytocin and vasopressin receptor research in rodents and primates: translational implications. *Journal of Endocrinology* 28 (2016)
- (4) Le et al., A prototypical template for rapid face detection is embedded in the monkey superior colliculus. *Frontiers in systems neuroscience* 14, 5 (2020)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Erina Abe, Masaki Yasugi, Hideaki Takeuchi, Eiji Watanabe, Yasuhiro Kamei & Hirotsugu Yamamoto	4. 巻 9
2. 論文標題 Development of omnidirectional aerial display with aerial imaging by retro-reflection (AIRR) for behavioral biology experiments	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Optical Review	6. 最初と最後の頁 221-229
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10043-019-00502-w	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Saori Yokoi, Kiyoshi Naruse, Yasuhiro Kamei, Satoshi Ansai, Masato Kinoshita, Mari Mito, Shintaro Iwasaki, Shuntaro Inoue, Teruhiro Okuyama, Shinichi Nakagawa, Larry J Young, Hideaki Takeuchi	4. 巻 117
2. 論文標題 Sexually dimorphic role of oxytocin in medaka mate choice.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America	6. 最初と最後の頁 4802 - 4808
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.1921446117	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 5件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 竹内 秀明
2. 発表標題 メダカの個体認知を介した配偶者選択に関わる脳の分子神経基盤
3. 学会等名 日本化学会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 竹内秀明
2. 発表標題 脳行動状態系が社会行動選択にバイアスを与える分子神経機構の解明-メダカを動物モデルとして-
3. 学会等名 NPBPPP（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 竹内秀明
2. 発表標題 性的パートナー選択にバイアスを与える脳の内部状態の神経基盤
3. 学会等名 日本認知学会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hideaki Takeuchi
2. 発表標題 Individual recognition in medaka fish
3. 学会等名 4rd Medaka Strategic Meeting, Heidelberg, Germany（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Hideaki Takeuchi
2. 発表標題 Social peptides in medaka fish
3. 学会等名 International workshop on “UNDERSTANDING THE NEUROREGULATORY ACTIONS OF OXYTOCIN AND ITS POTENTIAL CLINICAL APPLICATIONS”, ERICE, Italy（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計3件

1. 著者名 王牧芸、横井佐織、奥山輝大、竹内秀明	4. 発行年 2018年
2. 出版社 エヌ・ティー・エス	5. 総ページ数 7
3. 書名 生物の科学「遺伝」メダカの個体認知能力と配偶者選択	

1. 著者名 竹内秀明、深町昌司、亀井保博、成瀬清	4. 発行年 2018年
2. 出版社 エヌ・ティー・エス	5. 総ページ数 3
3. 書名 生物の科学「遺伝」メダカの行動学研究の最先端～メダカはなぜ豊かな色彩を持つのか？	

1. 著者名 竹内秀明	4. 発行年 2018年
2. 出版社 エヌ・ティー・エス	5. 総ページ数 7
3. 書名 生物の科学[遺伝]「約100年継承された伝統系統メダカ」	

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>東北大学大学院生命科学研究科脳生命統御学専攻分子行動分野  <a href="https://sites.google.com/view/molecular-ethology-laboratory">https://sites.google.com/view/molecular-ethology-laboratory</a></p>
--

6. 研究組織			
	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	王 牧芸  (WANG Mu-Yun)  (70781152)	東京大学・大学院総合文化研究科・特任研究員    (12601)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	横井 佐織  (YOKOI SAORI)  (10772048)	北海道大学・薬学研究院・助教    (10101)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関