

令和元年6月24日現在

機関番号：63801

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2018

課題番号：16K14779

研究課題名(和文)空間学習を担う神経ネットワークの解明

研究課題名(英文)Challenges to understand neural mechanism regulating spatial learning in zebrafish

研究代表者

田辺 英幸(Tanabe, Hideyuki)

国立遺伝学研究所・遺伝形質研究系・特任研究員

研究者番号：00623977

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：空間学習を担う重要な脳領域として海馬が知られているが、海馬が学習過程に他の脳領域とどのような神経回路を形成しているのかはあまりよく分かっていない。ゼブラフィッシュは脳サイズが数mmと小さく、脳全体を観察するのに適している。そこで、ゼブラフィッシュに空間学習をさせ、その際、どの領域の神経が活動するのかを明らかにしようと考えた。しかしながら、ゼブラフィッシュは比較的新しいモデル脊椎動物であり、どの程度の空間学習が可能かあまり分かっていなかった。そこでまず、その学習実験系の確立に取り組んだ。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ゼブラフィッシュは遺伝学的手法に優れた小型魚類である。そのため、モデル脊椎動物として、発生学をはじめ、様々な研究分野に用いられてきた。学習・記憶の研究分野においても、その基本的なシステムを検討できると注目されているが、空間学習を検討する実験系は不十分であった。今回、空間学習の実験系を整備したことで、ゼブラフィッシュがこの分野の研究においてもモデル生物として優れていることを示すことができた。

研究成果の概要(英文)：The hippocampus is an important brain part for spatial learning, however, how the hippocampus interacts with other brain regions in the learning process is not well understood. Here, I tried to identify the regions that are activated during the learning process in zebrafish. Zebrafish, a good model vertebrate has a very small brain (several mm), and is suitable to study the neural mechanism in the whole brain level. Unfortunately, the experimental systems for spatial learning were not well established in zebrafish research, so as a first step, I set up the behavior assay system to study the spatial learning in zebrafish.

研究分野：神経科学 動物行動

キーワード：ゼブラフィッシュ 学習 空間学習

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

空間学習など、学習・記憶に関わる哺乳類の脳領域として海馬が広く知られている。これまで、脊椎動物の学習・記憶に関する細胞基盤、分子基盤の研究はマウスやラットの海馬を中心に、限られた脳領域にて進められてきた。その一方で、空間学習の過程で、海馬が他の脳領域とどのような機能的な神経回路を形成しているのか？を明らかにする研究は、小脳や大脳皮質の一部と海馬の関係は示されているものの、あまり進んでいない。私は小型魚類、ゼブラフィッシュを用いてこの課題に取り組もうと考えた。ゼブラフィッシュの脳は全体で数ミリ程度であり、脳全体を観察するのに適している。また、遺伝学的方法論に優れており、エンハンサートラップ法、遺伝子トラップ法、Gal4-UAS 法などを組み合わせることで、器官、組織、細胞特異的 Gal4 遺伝子を発現するトランスジェニック系統が 1000 系統以上作成されてきた。この中には海馬に相応する魚類の領域、終脳背側野の外側部(DI)の神経細胞に Gal4 を発現する系統も含まれる。この DI-Gal4 系統に UAS:GFP を掛け合わせると、その特異的な神経を可視化することができる。また、UAS:Botulinum toxin(BoTX:神経毒素)系統を掛け合わせると、その神経活動を阻害でき、空間学習能力の低下したゼブラフィッシュが得られると期待できる。こうした利点の一方で、ゼブラフィッシュは比較的新しいモデル脊椎動物であり、十字迷路の実験系などが検討され、空間学習能力が示されているものの、場所記憶判定の最重要パラメータとされる一時選択が示されないなど、実験系が未熟なのか、ゼブラフィッシュの空間学習能力が低いのか不明瞭であった。そこで、1 つ目の挑戦として、ゼブラフィッシュの空間学習能力を十分に検討できる実験系の開発に取り組むこととした。

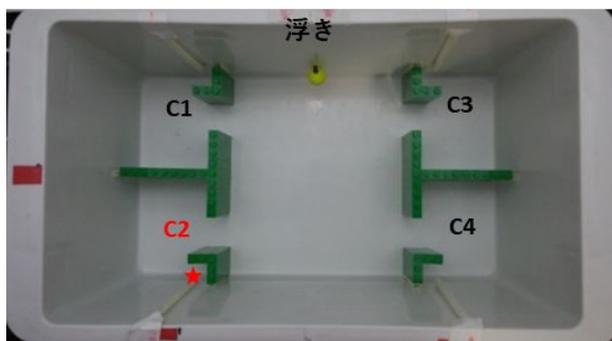
### 2. 研究の目的

ゼブラフィッシュの空間学習系を開発し、ゼブラフィッシュが空間学習の検討に適したモデル脊椎動物であることを示す。将来、短期記憶(学習後 30 分の記憶)や長期記憶(学習後 1 日の記憶)を検討することも視野に入れ、数時間で学習できる系を開発する。学習の程度を検討する指標として、一次選択を含めた複数のパラメータで学習の程度を検討できることが目標である。その後、この開発した系を用いてゼブラフィッシュに空間学習させ、その際の脳内の神経活動を検討し、海馬相同領域とともに活動が活性化する脳領域を明らかにする。

### 3. 研究の方法

#### 3-1. 空間学習系の開発

選択肢を 4 つにすると偶発的に目的地に到達する可能性は 25% となり、学習前後の差が見やすいと考えた。そこで、22 x 34 x 16 cm の白箱に左右に 2 つずつ(合計 4 つの)部屋をレゴブロックにて作成し、水深が 4 cm になるように水を入れた。左右対称な箱内に方向性を与えるため、浮きを 1 つ、半分が水につかる程度に配置した(図 1)。まず、学習前に飢餓状態にした魚をこのタンクで泳がせ、その泳ぎを観察した。それに引き続き、この 4 つの部屋のうち、1 つの部屋(C2)への進入時に、一定量(シュリンプ 10 匹程度)の自動給餌を行った。このトレーニングを 90 分間行った後、魚をホームタンクに戻し、その 30 分後に再び実験箱に魚を移し、魚が給餌場所を覚えているのか検討した。この時、一次選択、(テスト開始後 2 分間の)訪問頻度をパラメータとし、学習の前後で比較した。テストを行う際、浮きを除いて、タンクを 180° 回転させることで、匂いなどを追って目的地に到達する可能性を排除した。テストの過程では給餌は行わない。



(図1)

ゼブラフィッシュの空間学習実験系  
4 つの部屋をつくる。このなかの1つ、  
部屋2 (C2) にゼブラフィッシュが進入  
した際、一定量のエサを自動給餌する。

### 3-2. 応用1 (終脳背側野の外側部の神経はこの学習に必要なか?)

(3-1)で作成した実験系において、終脳背側野の外側部(DI)の神経細胞に神経毒素を発現させた系統が学習低下を示すか検討し、空間学習に必要な神経を明らかにした。

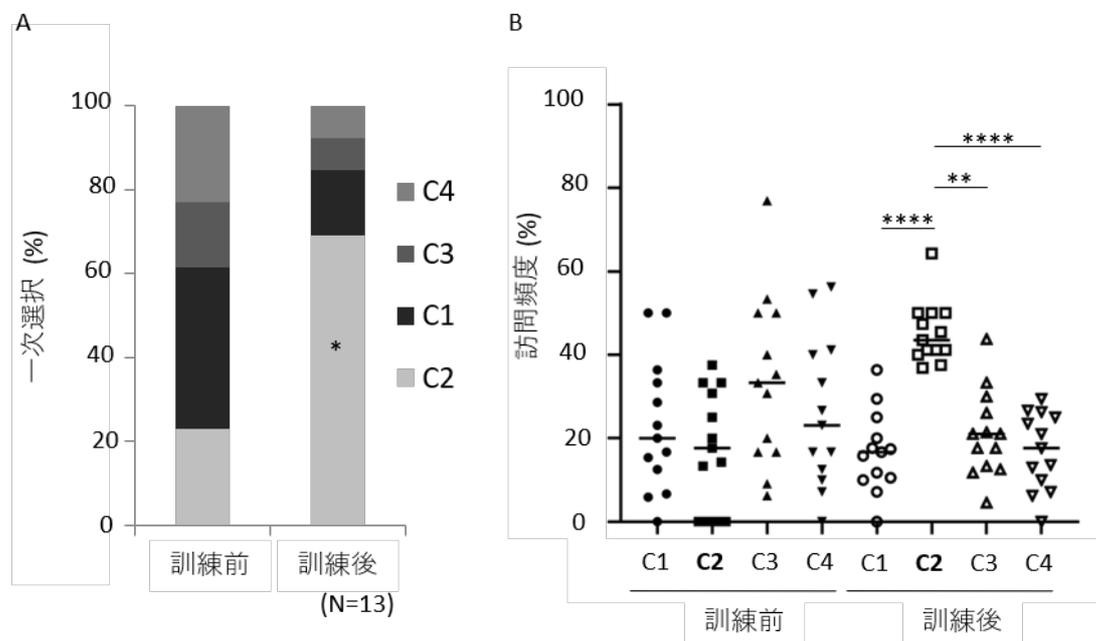
### 3-3. 応用2 (空間学習時に活性化する脳領域の同定)

ゼブラフィッシュの活動神経はpERK(リン酸化ERK)陽性であることが報告されている。そこで、(3-1)にて作成した空間学習実験系で野生型ゼブラフィッシュを学習させた後、脳をサンプリングした。これについて、ピラトーム切片を作成後、pERK抗体にて免疫染色を行った。

## 4. 研究成果

### 4-1. 空間学習系の開発

90分間の訓練により野生型ゼブラフィッシュはC2(給餌されていた場所)を一次選択(最初に訪問)するようになった(図2A)。また、2分間タンク内で泳がせた際のC2への訪問頻度も顕著に増加した(図2B)。このことは野生型ゼブラフィッシュがエサ場所を学習したことを示している。この系は90分の訓練で一次選択を含めた、複数のパラメータを検討できる空間学習実験系だ。実験効率、データの信頼性という点でも優れていると期待している。



(図2) 野生型ゼブラフィッシュはエサ場所を学習する

A 一次選択。学習後、C2を最初に訪問する頻度が顕著に増加した。B. 2分間泳がせた際の訪問頻度。学習後、C2への訪問頻度が顕著に増加した。

### 4-2. 終脳背側野の外側部の神経はこの学習に必要なである

哺乳類の海馬に相同するとされている、終脳背側野の外側部の神経に Gal4 を発現する系統と UAS:BoTX-GFP 系統を掛け合わせ、Gal4 発現細胞の神経活動を阻害したダブルトランスジェニックフィッシュを作成した。この魚を前述した空間学習実験系において訓練し、その空間学習が阻害されるのか検討した。その結果、終脳背側野の外側部の神経を阻害した魚では、C2を一次選択する割合、C2への訪問頻度に、学習前後において顕著な差は見られなかった(図3A,B)。これにより、この神経が魚類の空間学習を制御していることが明らかとなった。この神経がどのような神経であるのかは、引き続き検討中である。

### 4-3. 空間学習時に活性化する脳領域の同定

終脳背側野の外側部の神経がゼブラフィッシュの空間学習に必要なことが示唆されたので、空間学習時に活動する神経としてこの領域に注目した。そこで、活動神経のマーカーである pERK

について免疫組織染色を行い、この領域とともに活動する脳領域があるのか検討した。野生型ゼブラフィッシュを上記の空間学習系にて訓練し、学習後の魚と対照群(ホームタンクに維持していた魚)についてサンプリングを行い、ピラトームにて切片を作成後、免疫組織染色を行った。この際、サンプリング過程にノイズとなる神経活動が生じることをできる限り抑えるため、魚を氷水にて処理し、その頭部をザンボ二固定液にて固定した。しかしながら、pERK 陽性細胞の分布は学習後群、対照群ともに個体間でのばらつきが大きく、結論を得るには至らなかった。今後に向けて改善できる点として、神経活動の同定に“ cfos 発現 ”を用いることが挙げられる。pERK が活動直後の神経活動をモニターできる反面、ノイズが高くなりがちだったのに対して、cfos 発現は学習後 1~2 時間にタンパク質の発現上昇が観察される系で、時間解像度が下がるものの、魚をサンプリングする際のノイズは抑えられると期待できる。サンプリング方法が適切であったのか? も含め、今後も検討を継続していく予定だ。

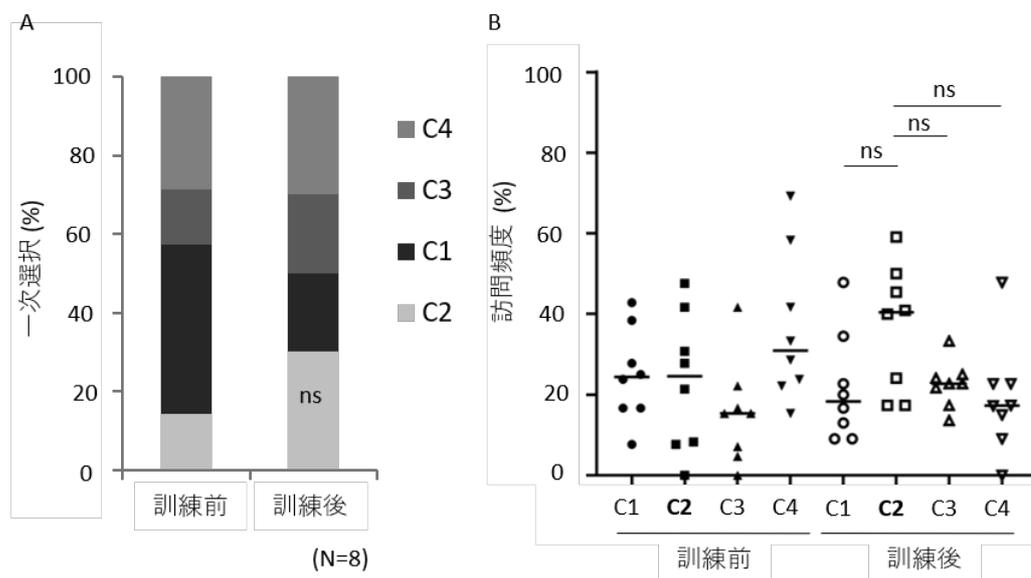


図3. 終脳背側野の外側部の神経は空間学習に必要なである  
終脳背側野の外側部の神経に神経毒素を発現させたゼブラフィッシュにおける空間学習前後の比較。A. 一次選択。学習前後で、C2を最初に訪問する頻度に顕著な差は観察できなかった。B. 2分間泳がせた際の訪問頻度。学習前後を比較して、C2への訪問頻度に顕著な差は観察できなかった。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 7 件)

(1) Hideyuki Tanabe, Pradeep Lal, Miki Iwasaki, Akira Muto, Koichi Kawakami  
The study of hippocampal functions in zebrafish  
日本分子生物学会年会 2018 年 11 月 28 日、横浜

(2) Hideyuki Tanabe, Pradeep Lal, Miki Iwasaki, Akira Muto, Koichi Kawakami  
The study of hippocampal functions in zebrafish  
小型魚類研究会 2017 年 8 月 30 日、甲府

(3) Hideyuki Tanabe, Pradeep Lal, Miki Iwasaki, Akira Muto, Koichi Kawakami  
The study of hippocampal functions in zebrafish  
日本神経科学大会, 2017 年 7 月 22 日、千葉

(4) Hideyuki Tanabe, Pradeep Lal, Miki Iwasaki, Akira Muto, Koichi Kawakami  
The study of hippocampal functions in zebrafish  
Neurotuscany, 2017 年 6 月 22 日 Montecastelli, Italy

(5) Hideyuki Tanabe, Pradeep Lal, Miki Iwasaki, Akira Muto, Koichi Kawakami  
The study of hippocampal functions in zebrafish  
Imaging Structure and Function of the Zebrafish Brain, 2016年12月1日, Munich, Germany

(6) Hideyuki Tanabe, Pradeep Lal, Miki Iwasaki, Akira Muto, Koichi Kawakami  
The study of hippocampal functions in zebrafish  
小型魚類研究会 2016年8月21日 岡崎

(7) Hideyuki Tanabe, Pradeep Lal, Miki Iwasaki, Akira Muto, Koichi Kawakami  
The study of hippocampal functions in zebrafish  
Neurotuscan, 2016年6月22日 Montecastelli, Italy

〔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：  
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：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号(8桁)：

### (2) 研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。