

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 6 月 21 日現在

機関番号：63801

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2022

課題番号：17K07494

研究課題名(和文)ゼブラフィッシュ視覚系における獲物認識の神経メカニズム

研究課題名(英文)Neuronal mechanisms of visual prey recognition in zebrafish

研究代表者

武藤 彩 (Akira, Muto)

国立遺伝学研究所・遺伝形質研究系・客員研究員

研究者番号：00525991

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：昼行性の動物の多くは、視覚情報に基づいて獲物を認識し捕獲行動を示す。視覚的な獲物の認識から捕獲行動に至るまでの機能的な神経回路の全貌を明らかにした例はない。そこで、ゼブラフィッシュ稚魚がゾウリムシを認識して捕獲行動を生じるまでの一連の行動を研究モデルとして、この過程における機能的神経回路をカルシウムイメージングの手法を用いて同定することを目指した。UAS:GCaMP系統と、複数の脳部位特異的なGal4系統とを用いて捕獲行動の過程で神経活動を生じる部位を探索した結果、中脳視蓋、前視蓋、視床下部下葉、迷走葉などの部位における神経活動を検出することに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

脳の働きをリアルタイムで可視化することは、脳がどのような仕組みで動作しているのかを調べるうえで非常に有効な手法である。稚魚の時期にはまだ体や脳が透明であるゼブラフィッシュと、タンパク質性の蛍光カルシウム指示薬GCaMPを利用して、脳活動の計測を行い、一つの動物行動がどのような神経回路により作り出されているのかを網羅的に示すことができた。脳活動が、感覚情報の処理から判断、運動という出力を作り出す過程を可視化することで、感覚情報処理と動機を伴う行動発現とがどのような神経回路の接続によりつながっているのかの一端を明らかにすることができた。

研究成果の概要(英文)：Many diurnal animals show prey capture behavior based on visual information of the prey. The entire functional neuronal circuits for this visual behavior is not characterized. We aimed to identify brain areas that are involved in the process of prey capture, from visual perception of the prey to capturing of the prey, utilizing calcium imaging. We screened zebrafish gal4 strains with specific brain expression for neuronal activity during prey capture, by crossing it with UAS:GCaMP line. In the screen we observed that midbrain optic tectum, pretectal area, inferior lobes of the hypothalamus, and vagal lobes are activated during prey capture in free swimming larval zebrafish.

研究分野：神経科学

キーワード：神経科学 視覚 捕獲行動 動物行動 カルシウムイメージング GCaMP ゼブラフィッシュ

1．研究開始当初の背景

ヒトや昼行性の動物は視覚が良く発達しており、目に入った周囲の物体を認識しときに、それが例えば食べもの（餌）か否かというような価値判断を絶え間なく下している。こうした認知過程は脳内のどのような神経活動により実現されているのであろうか？ゼブラフィッシュは昼行性の熱帯魚であり視覚がよく発達していて、種々の視覚依存的行動を仔魚の時期から示す（武藤 第7章 仔魚の行動、平田 編 2020「ゼブラフィッシュ実験ガイド」）。脳のサイズが適度に小さいゼブラフィッシュ仔魚を用いると、単一細胞レベルの空間解像度で脳全体の活動を解析することが可能であり、脳の認知過程を実現する機能的神経回路を明らかにするための優れた実験モデルである。カルシウム（Ca）プローブを用いた脳機能イメージングをゼブラフィッシュ仔魚で行うことにより動物行動を生ずる脳活動が同定可能で（Sumbre, Muto et al., 2008 *Nature*）、さらに、遺伝学的手法 Gal4/UAS システムを用いて、特定の神経細胞集団にタンパク質性 Ca プローブ GCaMP を発現させれば、機能的神経回路の可視化が実現できる（Muto et al., 2011 *PNAS*）。この実験アプローチにより、例えば、ゼブラフィッシュ仔魚が、餌となるゾウリムシを認識する際の脳活動がリアルタイムで可視化された（Muto et al., 2013 *Curr Biol*）。これは空間情報が脳内マップへと投影される様子を可視化したものであるが、餌や獲物の形状の認識に関しても、同様の実験アプローチによって、前視蓋(Pretectum)の神経核の一つである Nucleus pretectalis superficialis magnocellularis (PSm)が、「獲物検出器」の役割を担うものとして同定された（Muto et al., 2017 *Nature Commun*）。神経核 PSmニューロンは視床下部下葉へ投射しており、視床下部下葉は摂食行動の動機付けに関与するとされていることから、視覚的な獲物の認知と捕獲行動との動機付けが直接的な神経回路によって結び付けられていると考えられる（Muto et al., 2017 *Nature Commun*）。一方、他の研究グループからは、獲物の視覚認知に関わる脳部位として前視蓋領域にある別の神経核 Nucleus pretectalis superficialis parvocellularis (PSp)を報告された（Semmelhack et al., 2014 *eLife*）。獲物の視覚認知における PSm と PSp の役割分担や協同関係が不明であるほか、摂食行動後に味覚系の活動が視覚系へフィードバックするための神経回路についても明らかにならず、捕獲行動を司る機能的神経回路の全容は解明されていない。

2．研究の目的

ゼブラフィッシュ仔魚をモデル動物に用いて、視覚による獲物の認知から捕獲行動の発現に至るまでの機能的神経回路の全容を明らかにする。

3．研究の方法

Gal4 遺伝子トラップ系統のコレクションと UAS:GCaMP 系統を用いて、様々な脳部位にカルシウム蛍光指示タンパク質 GCaMP を発現させ捕獲行動観察と Ca イメージングを同時に行うことにより、獲物の認知から捕獲行動、味覚系にいたる神経回路を探索的に同定する。

4．研究成果

捕獲行動の際に活動する脳部位を標識する Gal4 系統の同定

Gal4 遺伝子トラップ系統の発現パターンの解析と GCaMP イメージングとにより、捕獲行動時に関係する脳部位に特異的な Gal4 系統を、以下に述べるように複数系統見出した。

獲物検出器

獲物検出器として我々は既に前視蓋の神経核 PSm の Gal4 系統を見出していたが (Muto et al., 2017 *Nature Commun*)、獲物検出器の役割が提唱されているもう一つの神経核 PSp において発現する Gal4 系統#707 を本研究で見出した。また、Gal4:GCaMP 発現細胞がゾウリムシの存在に反応して活動することをカルシウムイメージングにより観察した。獲物検出器としての役割をもつ神経核として PSm だけでなく PSp に関しても遺伝学的に標識可能な系統が樹立されたことは、今後、両者の役割の共通性と相違点の解析に役立つ。

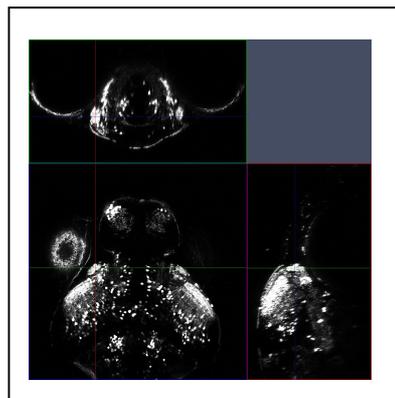


図1．前視蓋の神経核 PSp に Gal4 の発現を示す#707 系統の UAS:GFP レポーターの蛍光画像 (Z スタック画像)。

迷走葉

後脳に存在し、味覚系の第一次中枢である迷走葉 (vagal lobe) で発現する Gal4 系統を、以下に示すように複数見出した。さらに、ゾウリムシを捕獲して飲み込んだときに Gal4:GCaMP 発現細胞の細胞体もしくは軸索部分が活動することを Ca イメージングにより観察した。ただし観察された Ca シグナルが感覚系 (味覚) の神経活動か、運動系 (嚥下) の神経活動かその両方かに関して機能的な解析をするまでには至らなかった。

Gal4 系統#76

#76 系統は視床下部下葉で Gal4 を発現しており、捕獲行動における視床下部下葉の活動をすでに報告した (Muto et al., 2017 *Nature Commun*)。この系統をより詳細に解析したところ、視床下部下葉の中で異なる領域が捕獲行動の異なるタイミングで活性化することが明らかになった。

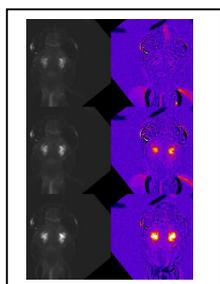


図2. ゾウリムシ捕獲時の視床下部下葉

の神経活動 (系統#76)。左図: GCaMP 蛍光画像 右図: 蛍光強度を Ca 上昇前の平均値画像で除算した画像の疑似カラー表示。上段: ゾウリムシを捕獲する直前 (ゾウリムシが口腔内に入りかけている) 中段: ゾウリムシが口腔内に取り込まれた時点の像 下段: ゾウリムシが口腔内から腸管内へと取り込まれた直後のフレーム。Ca シグナルの上昇部位は視床下部下葉の後部から前部へと伝播すると同時に、迷走葉を走行する軸索部分での Ca シグナルも認められた。

Gal4 系統#1825

Gal4 系統#1825 は、迷走葉、小脳などでの Gal4 発現パターンを示す。UAS:GCaMP と掛け合わせた稚魚を用いた Ca イメージングにより、ゾウリムシを捕獲し飲み込んだ直後に迷走葉で一過的な Ca シグナルの上昇が認められた。

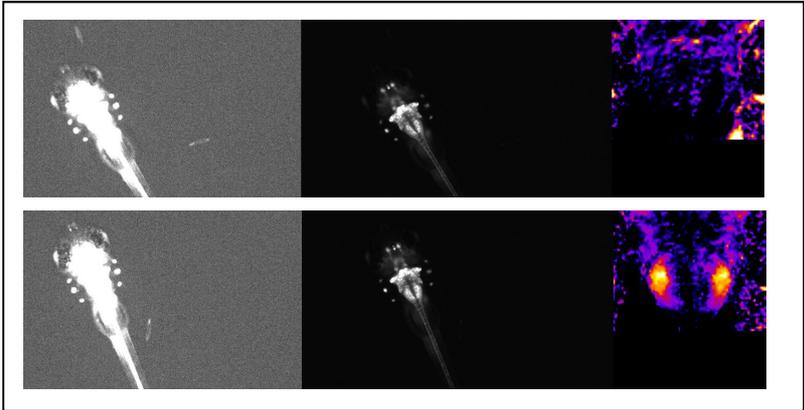


図3. ゾウリムシ捕獲時の迷走葉での神経活動の亢進。

上段：ゾウリムシ（右目の前に存在する方）捕獲前。下段：捕獲直後。左図はGCaMP 蛍光の強調画像。真ん中の図は、GCaMP 蛍光画像。右図は迷走葉の拡大画像で、Ca シグナルの上昇の疑似カラー表示。

Gal4 系統#71

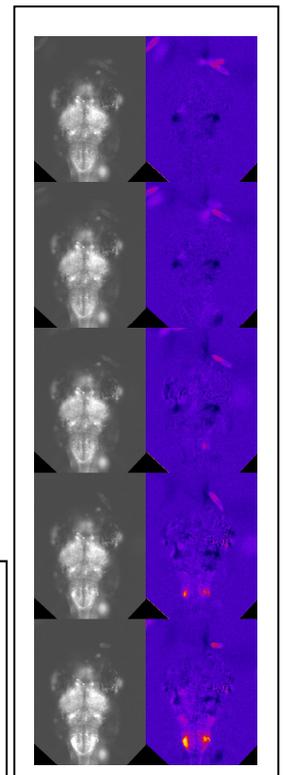
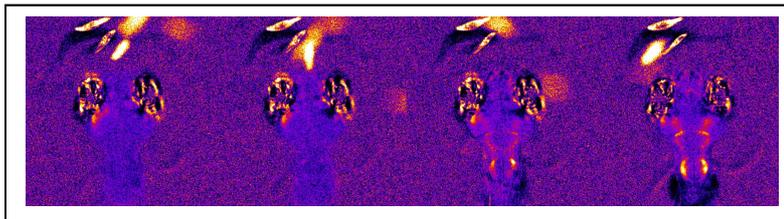
Gal4 系統#71 の発現は脳部位の特異性は高くなく、前視蓋、視蓋、小脳、迷走葉などの領域が標識された。

図4. ゾウリムシ捕獲後の迷走葉におけるカルシウムシグナルの上昇。1 段目：吸い込まれる前のゾウリムシが口の近傍に存在する。2 段目：吸い込まれつつあるゾウリムシ（ピンクが合っていないほう）。3 段目：飲み込まれた直後に迷走葉の前部で Ca シグナルが上昇。4 段目：迷走葉の前部の両側で Ca シグナルが上昇。5 段目：迷走葉の後方にむかって Ca シグナル上昇部位が伝播。

HuC

HuC は広い脳部位で発現する。そこで HuC-GCaMP5 の系統を用いてゾウリムシ捕獲時の Ca イメージングを行った。

図5. ゾウリムシ捕獲時の小脳から迷走葉にかけて観察されるカルシウムシグナル。1：飲み込まれる前のゾウリムシが口先に存在。2：ゼブラフィッシュ稚魚の吸い込みの動作によって吸い込まれつつあるゾウリムシ。3：ゾウリムシが飲み込まれた直後に観察された小脳から後脳にかけての Ca シグナル。4：迷走葉の後方部分にまでカルシウムシグナル上昇部位が伝播。



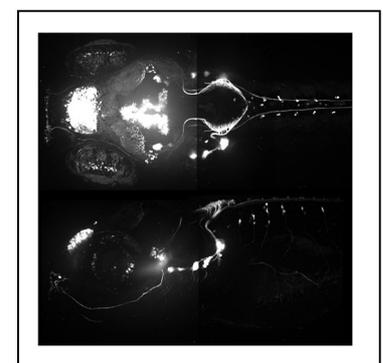
Gal4 系統#2146

Gal4 系統#2146 において、迷走神経などが標識された。

図4. Gal4 系統 2146 で発現する UAS:GFP の 2 光子励起顕微鏡画像。Z-スタックを平面に投射したもの（上段）および、その再構成による側面の像（下段）

捕獲行動の馴化

疑似餌（(気泡)）に対する捕獲行動を長時間（3 時間）測定したところ、捕獲行動の頻度が減少すること（馴化）を見出した。この結果は、視覚的な獲物の認知過程で、獲物が獲物でないかという認知・判断、物体の形状の視覚的な記憶が存在することを示唆する。



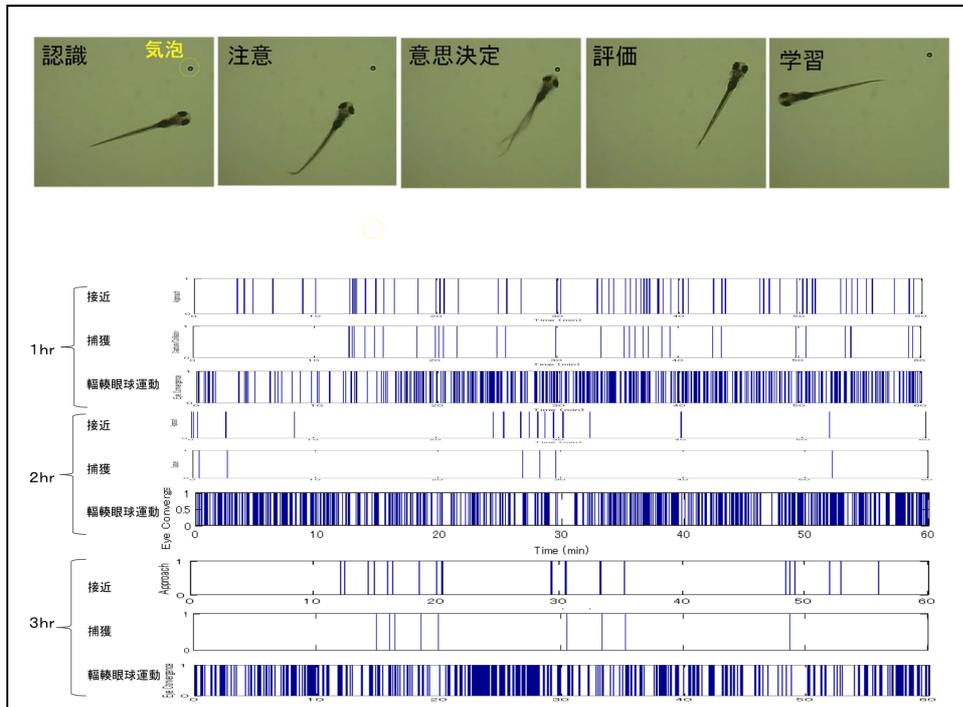


図5 .疑似餌(気泡)に対する捕獲行動の馴化。上段：気泡に対する捕獲行動の過程。視野に入った小物体を認識し、輻輳眼球運動を生じ(注意) 接近し(意思決定) 捕獲する(評価)。食べられないものは吐き出す(学習)。3 時間にわたって観察・測定した場合(下段) 接近行動や捕獲行動の頻度が減

少した。摂食行動中は、輻輳眼球運動が気泡以外の微小な物体に対しても生じており、測定時間にわたって頻度が減少しない。

捕獲行動の有無と視床下部下葉の活動性との相関

視野の中に獲物が入った場合、その後に捕獲行動が生じるか否かによらず、中脳視蓋において視覚認知の神経活動が生じる。それに対して、視床下部下葉の神経活動は捕獲行動の有無に相関した。PSm の神経活動に関しては、部位が小さいため低倍率での行動学・Ca シグナル同時測定が困難であり明らかにできなかった。

ゼブラフィッシュ Gal4 系統の脳機能・構造データベース FunBrain の構築

これまで測定記録してきた多数の Gal4 系統の構造(主として二光子励起レーザー顕微鏡による Z スタック画像)と機能(Ca イメージング)のデータを集積したデータベースを構築した。

捕獲行動に馴化が観察されたことから、摂食経験、すなわち味覚系の活動は、獲物の視覚認知にフィードバックされると考えられる。しかしながら、味覚系から視覚系への認知の修飾を司る神経回路はいまだに同定されていない。本研究で同定されたさまざまな Gal4 系統の神経軸索投射を調べることにより、味覚系から視覚系へのフィードバック回路が明らかにできると考える。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Ogawa Y, Shiraki T, Asano Y, Muto A, Kawakami K, Suzuki Y, Kojima D, Fukada Y.	4. 巻 116 (10)
2. 論文標題 Six6 and Six7 coordinately regulate expression of middle-wavelength opsins in zebrafish	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Proc Natl Acad Sci U S A.	6. 最初と最後の頁 4651-4660
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.1812884116	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Muto A, Kawakami K.	4. 巻 136
2. 論文標題 Ablation of a Neuronal Population Using a Two-photon Laser and Its Assessment Using Calcium Imaging and Behavioral Recording in Zebrafish Larvae	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J Vis Exp.	6. 最初と最後の頁 e57485
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3791/57485	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 Lal P, Tanabe H, Suster ML, Ailani D, Kotani Y, Muto A, Itoh M, Iwasaki M, Wada H, Yaksi E, Kawakami K.	4. 巻 16(1)
2. 論文標題 Identification of a neuronal population in the telencephalon essential for fear conditioning in zebrafish	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 BMC Biol.	6. 最初と最後の頁 45
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12915-018-0502-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Akira Muto and Koichi Kawakami	4. 巻 印刷中
2. 論文標題 Ablation of a Neuronal Population Using a Two-photon Laser and Its Assessment Using Calcium Imaging and Behavioral Recording in Zebrafish Larvae	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 JoVE	6. 最初と最後の頁 印刷中
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Akira Muto
2. 発表標題 Visualization of neuronal activity during prey capture behavior in zebrafish larvae
3. 学会等名 The 12th domestic Symposium on Behavior and Nervous System in Aquatic Animals (国際学会)
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 武藤彩	4. 発行年 2020年
2. 出版社 朝倉書店	5. 総ページ数 148
3. 書名 ゼブラフィッシュ実験ガイド 第7章 仔魚の行動	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
連携研究者	川上 浩一 (Kawakami Koichi) (70195048)	国立遺伝学研究所・個体遺伝研究系・教授 (63801)	

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
---------	---------