

令和 2 年 6 月 1 日現在

機関番号：12601
研究種目：挑戦的研究(萌芽)
研究期間：2017～2019
課題番号：17K19379
研究課題名(和文)知らない者同士のメダカはどのようにして仲間になるのか

研究課題名(英文)A Study of School of Medaka

研究代表者

尾田 正二(Oda, Shoji)

東京大学・大学院新領域創成科学研究科・准教授

研究者番号：50266714

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,800,000円

研究成果の概要(和文)：メダカは群れ(school)を形成する。お互いに初対面となるHd-rRメダカ(野生型)の成魚を一つの水槽に入れてその遊泳行動を観察すると、同居開始直後は各個体が別々に遊泳し群れ行動は認められないが、同居開始後3日目以降には明瞭な群れ行動を示すように変化した。一方、ソマトラクチンを欠損するciメダカは同居開始後3日目以降に至っても個々の遊泳行動がシンクロすることがなく、群れを形成しない。本研究ではメダカが群れを形成する過程を解明するために、メダカの遊泳行動の時系列解析のための数値化、メダカ組織の連続切片像の3D再構築、およびメダカでのトランスクリプトーム解析を行う技術開発を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

動物の群れが形成される機構は古くより多くの研究がなされてきた生物学の課題である。メダカの群れは、考えられてきたよりもはるかにフレキシブルであり、3日間別離しただけで解消された。しかし、その特性はメダカが種として生残してくるために必要な特性であったと推測できる。魚類特有のホルモンであるソマトラクチンを欠損する突然変異系統のciメダカは群れを形成せず、個体の距離感が違うことが原因である可能性が示唆された。ヒトにおいても人間関係の距離感の重要性が唱えられているが、経験的な分析にとどまっており、メダカの群れの研究を進めることによって実験科学的な解決策につなげられる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Medaka (*Oryzias latipes*) is a schooling fish. When Hd-rR strain medaka (wild type), that face each other for the first time, were placed in one aquarium, each individual swam independently and no schooling was observed immediately after the start of living-together and they showed beautiful schooling after the 3rd day. In contrast, ci medaka deficient in somatolactin does not school. To investigate the machineries underlying the start of schooling, this study has done three technical developments: digital tracking and time series analysis of swimming pattern of each individuals in schooling, 3D reconstruction of serial histological sections of medaka adults, and transcriptome analysis in medaka.

研究分野：生理学

キーワード：メダカ 群れ トラッキング RNAseq 3D再構築

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ヒトを含めて多くの動物は群れを形成して生活しています。お互いが同じ群れに属するか属さないかは群れを形成する動物にとって行動の判断基準となる重要な情報であって、ヒトでは戦いの原因ともなっています。「めだかの学校」という童謡で広く知られているように、メダカも群れを形成して生活しています。群れ社会を形成して生活するためには、相手が自分と同じ群れに属する「知りあい」なのか、自分の知らない個体であるのかは各個体の行動決定にとって非常に重要となります。

メダカもお互いに個体識別をしています。2013年に研究代表者は *ci* メダカが群れを形成しないことを見つめました。Color interference (*ci*) メダカは魚類特有のペプチドホルモンであるソマトラクチンの欠損変異体系統です。ソマトラクチンは哺乳類の成長ホルモンであるソマトロピンと、性行動など生殖活動に関与するプロラクチンの特徴を兼ね備えており、*ci* メダカは背光反射を示さず体躯体色が白色を呈します。また、脂質代謝に異常があるとの報告があるほか、野生型メダカと異なる性的嗜好を示すなど行動レベルにおいても野生型メダカとの違いがあります。*ci* メダカにソマトラクチン遺伝子を導入した遺伝子回復型のトランスジェニックメダカ SLTG は野生型と同様に群れを形成することから、ソマトラクチンというホルモンの機能が欠損するとメダカは「群れなくなる」と考えられます。しかし、ソマトラクチンの生理機能が多岐にわたることから、群れなくなる原因の追及は手つかずでした。

そのような研究の過程において、研究代表者らはメダカがお互いに個体識別をしていることを見出しました。さらに、別々の水槽で飼育されていた2群のメダカを1つの大きな水槽に移すと、当初の3日間はそれぞれが個別に小さな群れを形成するが、4日目以降は1つの大きな群れを形成することを見出しました。知らない者同士であったメダカが3日間のうちに知り合い = 仲間になるものと解釈できます。

これらの知見、状況を踏まえて、研究代表者は、野生型 Hd-rR メダカが群れるようになるプロセスにおいての行動的、神経組織的、遺伝子発現での変容を *ci* メダカのそれと比較することによって、メダカが「群れ」になるプロセスを明らかにできると同時に、*ci* が群れなくなる理由、すなわちメダカが群れるために必要な条件を明らかにすることができるとの着想に至り、本研究を実施しました。

2. 研究の目的

知らない者同士が群れになる過程におけるメダカの挙動を丸ごと全て記録して数値化し、群れにならないメダカの挙動と比較することによって、「群れ」になるために必要な条件を明らかにすることを本研究は目的としました。ヒトが「群れ」になることは、対人関係を構築することです。動物が知らない相手と仲間になる素過程を明らかにすることにより、うつ、引きこもりの状態を脱する際のヒントが提供できると期待しました。

3. 研究の方法

本研究では、野生型の純系メダカである Hd-rR 系統のメダカ成魚とソマトラクチン遺伝子を欠損する突然変異メダカ (*ci* 系統) を使用しました。いずれも東京大学柏キャンパスの実験施設で系統維持しているメダカ系統です。

別々に飼育していて初対面となるメダカ成魚 8 匹 (雌雄各 4 匹) をドーナツ型水槽 (右図) に入れて 30 分間慣らした後、12 分間の遊泳行動をデジタル撮影しました。UMATracker というフリーのトラッキングソフトウェア

(<https://ymnk13.github.io/UMATracker/>)



を使用して、動画ファイルの個々のメダカの遊泳軌跡をトレースして数値化しました。数値化した遊泳軌跡のデータを様々な解析して、群れとしての遊泳行動の指標を開発しました。

メダカが群れになるプロセスにおいて、メダカに起こっている変化を、行動、遺伝子発現、脳神経核構造の3つの切り口にて解明するために、以下の3つの技術開発を行いました。技術開発に多くの時間とエフォートを必要としたため、本研究では要素技術の開発までが成果となりました。

3 - 1. 群れ化の全プロセスの超長時間記録

メダカの全遊泳行動をビデオ映像として記録するために、TimeViewer264 を使用しました。TimeViewer264 はアチックラボ社 (<https://aticlab.com/>) が開発した超長時間デジタル録画システムであり、通常のビデオレート(30 フレーム/秒)で最大 30 日間の連続録画が可能です。ただし、実際にシステムを稼働させるためにはシステムのアップデート設定をオフにするなどパソコンの設定を工夫する必要がありました。本研究における技術開発により、7日間連続でメダカの行動をビデオ撮影する手順を確立できました。

3 - 2. 連続組織切片による脳の神経核の組織構造変化

メダカを安楽死させた後、Davidson 氏固定液に7日間浸漬して化学固定し丸ごとパラフィンに包埋しました。その後、メダカの全身を連続組織切片にして、一般的なヘマトキシレン・エオジン染色をした後、顕微鏡でデジタル撮影しました。得られた画像をフリーソフトウェアである Reconstruct (<https://synapseweb.clm.utexas.edu/software-0>)を使用して 3D 再構築する方法を開発しました。体が小さなメダカは全身をスライドガラスの上の組織切片にして顕微鏡で体の隅から隅まで細胞レベルで観察することが出来ます。様々な疾患は現実には全身性の生理現象であり、従来のように臓器ごと、組織ごとでの研究では疾患の真の様相を知ることはできません。新型コロナウイルス感染によって発症する COVID-19 ではサイトカインストームと呼ばれるような劇症化する炎症が誘導されますが、そのような全身性の疾患の解明をするためにも、全身をシームレスに調べるメダカやゼブラフィッシュのようなモデル生物を対象とした基礎研究が有効になると期待しています。

3 - 3. トランスクリプトーム解析による遺伝子発現の変化

本研究では群れになる前後でのメダカの脳において 次世代シーケンサーを用いた RNA-Seq 解析を行う計画でした。得られたデータを解析し・比較し、群れになる過程での遺伝子発現プロファイルの変化を解明するためのデータ処理をメダカにおいて実施できるように手順を確立しました。マクロジェン社から納入された RNA-Seq 解析結果から 1.5 倍以上発現が増加あるいは減少したメダカの遺伝子を抽出し、KEGG パスウェイ (https://www.genome.jp/kegg/kegg1a_ja.html) 解析が可能となるようにデータ変換して KEGG パスウェイの様々な生理機能経路を使用して活性化している経路、抑制されている経路を割り出すことを可能にしました。残念ながら本研究の実施期間が終了し、群れになる前後で遺伝子発現プロファイルを比較することまでには至れませんでした。本研究での技術開発によってメダカにおけるトランスクリプトーム解析がより容易に実施可能となり、今後の様々な研究の基盤となります。

4. 研究成果

群れ形成試験において初めて出会うことになる成魚メダカ(Hd-rR)8 匹(オスメス各 4 匹)をドーナツ型水槽に入れると、初日は8匹それぞれがバラバラに遊泳して群れと思える行動はみられませんでした。3日目には目で見ても明らかに群れと思えるように挙動するよう変化しました。メダカの遊泳行動のどの特徴がどのように変化したことによって、我々が「メダカが群れている」と考えているのかその原因を探

りました。まず、メダカの集団行動の指標として、各個体間のユークリッド距離を算出して、群れ形成開始1日目と3日目を比較したところ、予想された通りに群れを形成している個体群の個体間距離は短くなりました。ところで、ドーナツ型水槽では水路が円形であるために、メダカの遊泳軌跡も基本的に円弧を描きます。従って、直線距離ではメダカ個体間の距離を正確に評価することはできません。角度を統計的に評価するには通常の統計とは異なる角度統計(circular statistics)の手法が必要となります。例えば角度において0度と360度は等価であり、すなわち180度は2度と358度の平均とはなりません。角度統計では、メダカの位置を原点からのベクトルで表して、8匹のベクトルの合成ベクトルの大きさ(r)がメダカの集合の程度の指標となります。野生型 Hd-rR の集団では初日には小さかった r 値が群れ形成試験3日目にはほぼ最大値である 1 に増大して安定し、Hd-rR 集団が疎な状態から3日間で安定した密な状態に移行したことがはっきり示されました。一方、 ci の集団では初日から3日目まで一貫して小さい数値となり、 ci の集団が3日たっても集合せず疎なままだということが示されました。

さらに、メダカの群れは動的な存在です。我々がメダカの群れを見て、群れだと認める際には、メダカ集団の動的な何かを我々が評価しているはずで、そこで、撮影した映像を繰り返し観察し、メダカのような動きを群れとみなす根拠にしているのか再検討した結果、自分たちは、各々のメダカの進行方向が一致し、かつメダカの個体間の距離が変化しないで安定している際に、彼らが群れていると認めることがわかりました。すなわち、各々のメダカの動きが(ほぼ)同じであるのが「メダカの群れ」でありました。すなわち、個々のメダカの遊泳方向の一致性が群れの指標の一つとなります。また、2匹のメダカ m, n のその瞬間の遊泳速度を v_m, v_n とした時に以下の式で計算される遊泳速度の分散(ばらつき度) $d_{n,m}^t$

$$d_{n,m}^t = \frac{|v_n^t - v_m^t|}{(v_n^t + v_m^t)/2}$$

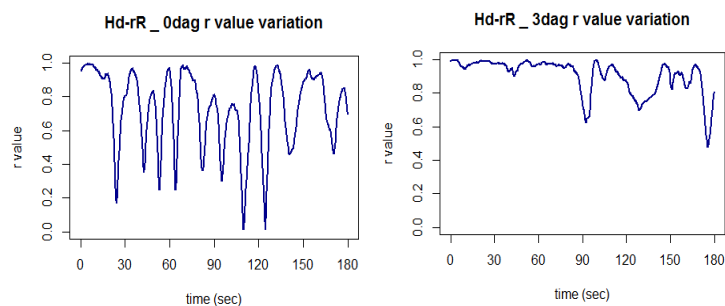
をもとに以下の式で $S_{n,m}^t$ を定義し、これをシンクロ率と呼ぶことにしました。

$$S_{n,m}^t = \frac{e^{-d_{n,m}^t} - e^{-2}}{1 - e^{-2}}$$

$S_{n,m}^t$ はある瞬間 t における2匹の遊泳速度が同じであれば1となり、シンクロ率100%となります。逆に2匹の遊泳速度が違えば違うほどシンクロ率は小さくなります。実際の数値解析ではビデオレート(1/30秒)ごとに計算するので、シンクロ率を求めるために使っている遊泳速度は時間微分したものと同一意味となり、加速度、すなわちその瞬間瞬間にメダカが遊泳するために費やしている力を反映していることとなります。各々のメダカが動きがシンクロするように動いている場合に、我々はメダカが群れていると認めていることがわかりました。

野生型メダカである Hd-rR 8匹が群れを形成するようになる過程では、遊泳方向の一致性とシンクロ率を使って各々のメダカが同じ方向に同じ遊泳速度で遊泳する行動をとるようになることが示されました。

また、8匹の中で他個体との距離感にばらつき(個体差)があることもわかりました。8匹のメダカは全て同じ挙動を見せるのではなく、いつも一緒に群れているメダカ同士がいるなどその挙動には個性がありました。一方、 ci メダカの集団では、3日たっても遊泳方向の一致性もシンクロ率も変化せず、初顔合わせのとき



群れ形成開始後1日目の Hd-rR 集団の3分間の r 値の変化
 r の平均値 = 0.731

群れ形成開始後3日目の Hd-rR 集団の3分間の r 値の変化
 r の平均値 = 0.902

と同じ挙動でした。つまり、*ci* メダカは群れるつもりをみせないメダカでした。

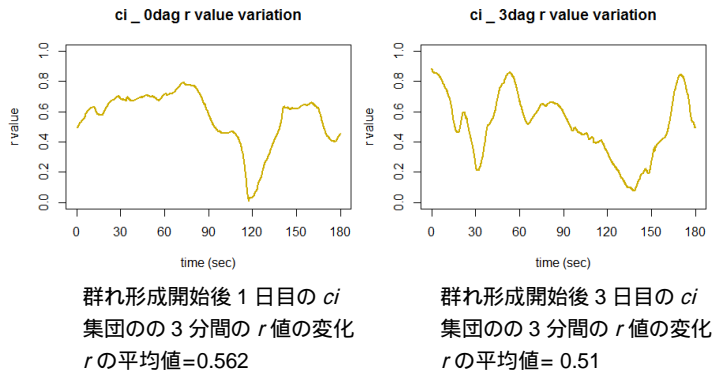
r 値は集合の程度を示す指標です。群れ形成の過程で Hd-rR メダカの *r* 値が興味深い変化をみせました。群れ形成の開始直後では、Hd-rR 集団の *r* 値が非常に頻繁に増減を繰り返しました(前ページ図)。メダカ個体が集まっては離散することを繰り返していることを意味します。それが3日目には高値に安定していつも集まっている状態、すなわち安定した群れの状態に移行しました。つまり、顔合わせ

初日にはお互い知らないメダカ同士なのですが同時にお互いに関心もあって、近寄っては離れて、を繰り返して慣れていくようです。対して、*ci* メダカの場合には *r* 値はそのような変化はみせず、最初から隣人に関心がないかのようでした(右図)。

以上をまとめると、野生型の Hd-rR メダカは知らない同士が出会うと、お互いに

興味を持ちます。近づいては離れて、を繰り返して、出会って2日目には同じ方向に同じ速度でシンクロして動くようになります。これが群れになった状態です。群れの解消試験の結果からも、知り合いであるとの認識は2日しか維持されませんでした。メダカは群れているのが生活の基本の魚ですが、群れは簡単に形成され、また解除されることがわかりました。メダカが生息している水環境は平野部の水田、小川、浅い沼、湿原など水深が浅くて大型魚が生息しない環境です。大型魚が生息しないということは、不安定な環境であることを意味します。毎年の洪水によって、メダカ集団は簡単に流されて離散します。干ばつでは集団が絶滅の危機に瀕します。そのような環境においてメダカが種として生き残るためには、洪水に流されて流れ着いた先で出会ったメダカ同士が人見知りせずにとり前のよう子孫を残すことが個体群を維持するために必要な特性となります。「めだかの学校」として広く知られるようにメダカの群れは強固で安定な個体関係であるように考えられてきましたが、実際には非常にフレキシブルであることが示唆されました。そして、その意外な特性こそが、実は不安定な厳しい環境でメダカが命をつないでくることが可能にしたと考えられます。

また、*ci* メダカは上記のような群れを形成する挙動を示しませんでした。本研究の結果では、*ci* メダカが他の個体と関係を持つとしないことが強く示唆されました。撮影された映像を観察すると、*ci* メダカが他の *ci* 個体に追従して遊泳して、群れているように見える挙動も観察できました。野生型の Hd-rR メダカではその状態が安定して持続するのですが、*ci* メダカの場合には、追従された個体が他の個体に後から追従されるのをいやがってすぐに方向転換してしまって群れ遊泳が持続しないことが観察されました。メダカの群れが安定して維持されるためには、先行する個体に後続の個体が追従することと同時に、先行する個体が追従されることを許容する必要があります。両者が想定する個体間の距離が同程度でないと、例えば追従する個体が想定している距離が追従される個体が想定している距離よりも短い場合には、追従される個体が追従されることを許容しないので安定した群れが維持されません。本研究での解析では、個々のメダカの挙動を細かく意義付けするところまでは至ることができませんでしたが、そのような解析を行うための方法論を創ることが出来たことに加えて、そのような解析を行うことに意味があることが示されました。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Lee Duolin, Hiroshi Mirani and Shoji Oda
2. 発表標題 The kinetics and morphology analysis of undulatory body movement during steady swimming among 3 medaka (<i>Oryzias latipes</i>) strains
3. 学会等名 第25回小型魚類研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takuya Nakazawa, Kento Nagata, Junya Kobayashi, Hiroshi Mitani and Shoji Oda
2. 発表標題 Biological effects of low-dose-rate chronic irradiation of 100 mGy gamma-rays on medaka fish (<i>Oryzias latipes</i>)
3. 学会等名 第25回小型魚類研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yiwen Lu, Shoji Fukamachi, Hiroshi Mitani, Shoji Oda
2. 発表標題 Collective behavior evaluation of color interfere medaka
3. 学会等名 小型魚類研究会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔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
---------------------------	-----------------------	----