

令和 2 年 6 月 1 1 日現在

機関番号：8 2 4 0 1

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：1 8 K 1 4 8 5 8

研究課題名（和文）ゼブラフィッシュ成魚の意思決定における終脳神経アンサンブルの動的局面の解明

研究課題名（英文）Elucidation of representation of telencephalic neural ensemble during decision making in adult zebrafish

研究代表者

鳥越 万紀夫（TORIGOE, MAKIO）

国立研究開発法人理化学研究所・脳神経科学研究センター・基礎科学特別研究員

研究者番号：4 0 6 3 5 2 2 3

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,300,000 円

研究成果の概要（和文）：本研究の目的は哺乳類の終脳に相当し、簡単な脳構造を持つゼブラフィッシュ成魚の意思決定機構を明らかにすることである。そのため能動的、受動的回避行動をトレーニング中の魚の終脳の神経活動を観察することが可能な仮想空間-2光子イメージングシステムを確立した。解析の結果、魚が見るもの、つまり周囲の壁の色（青、赤など）、または見るものの状態（景色が動いているか静止しているか）にルール（安全または危険）を付加する複数の神経アンサンブルが生成されることが明らかになった。さらにアンサンブルの組み合わせによって、同じ目標（安全な領域に逃げる）を達成するにもかかわらず魚毎に多様な行動戦略を取ることも明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により学習によって生物が知覚した複数の環境情報（色や景色の動きの状態）に対しそれぞれルールを付加することが明らかになった。さらにルールが付加される知覚情報は魚毎に異なり、その違いが行動の多様性を生み出している可能性が示唆された。以上のことは価値を付加された複数の知覚情報も行動選択の基準となる可能性を示唆している。さらにはその組み合わせにより行動に多様性が生じる可能性も示唆しており、生物の行動選択機構における行動の多様性という新たな機構を見出した。将来的にはAIのアルゴリズムに対して多様性を持たせ発展させる時に役立つ可能性を含んでいる。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this study was the elucidation of the neural mechanisms of decision making using adult zebrafish. For this, we established the closed-loop virtual reality system to observe the neural activity of the broad area of the dorsal pallium in adult zebrafish during training for active and passive avoidance. Observation of neural activity revealed that training generates multiple neural ensembles that attach rules/values (safe or danger) to what fish see, i.e. the colors of the surrounding walls (blue, red, etc.), or to the states of what they see, i.e. whether the scenery is moving or stationary. Variation in the combination of these ensembles generated in each fish during trials highly correlated with the diverse approaches the fish took to achieve the same goal (i.e. escaping to the safe area), indicating that individual difference in the behavioral strategies was caused by diversity in the methods of cognitive value assignments that each fish acquired during training.

研究分野：神経科学

キーワード：意思決定 仮想空間 ゼブラフィッシュ 神経アンサンブル 能動的回避行動

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

生物にとって状況に応じた適切な行動を選択する、いわゆる意思決定は生存において重要な機能である。これまでの研究から意思決定において皮質-基底核回路および扁桃体、海馬が重要な役割を果たしていることが示唆されている。それぞれの領域での情報は特定の神経細胞群（神経アンサンブル）の活動によって表現されることで状況に応じた行動に寄与すると考えられている。しかしながら実際にそれぞれの情報をコードする神経アンサンブルがどのような動態によって意思決定に寄与しているのかは依然として不明である。ゼブラフィッシュ成魚は比較的単純な神経回路であるが、ほ乳類の皮質-基底核回路・海馬・扁桃体に相当する領域、機能を終脳に有し、行動学習をすることが出来る。また、哺乳類では脳の深い領域にある海馬・扁桃体相当部位が表層にあること、脳が小さいことから複数の脳領域を同時にイメージングする事が出来ること、さらには色素欠損の突然変異体が存在しており頭蓋骨を開かずにイメージングが可能である。仮想空間（VR）は現実空間のエッセンスのみを反映した空間であり、対象に必要な最小限の情報かつばらつきのない視覚情報を提示することが出来る。さらには顕微鏡観察と組み合わせることで対象動物の状態と神経活動を同時計測することが可能である。

2. 研究の目的

本研究の目的は行動学習過程において形成される終脳の神経アンサンブルがどのような演算を行うことで意思決定がなされるのかを明らかにすることである。具体的にはVR内において課題を行っているゼブラフィッシュ成魚の終脳神経細胞の活動をカルシウムイメージングし、観察された神経アンサンブルがそれぞれどのような役割を果たしているのかを明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 行動選択課題遂行中において刻一刻と変化する神経アンサンブル活動と魚の行動を同時に観察できる実験系としてVR-2光子カルシウムイメージングシステムを構築した。
(2) 神経アンサンブルの動態を明らかにし、それぞれのアンサンブルがコードしている情報を同定するため、得られた神経細胞活動データに非負値行列因子分解 (Nonnegative Matrix Factorization, NMF) (研究協力者：沖縄科学技術大学院大学 Fung Alan Chi Chung 博士、深井朋樹博士) を行い、魚の行動と環境との関連を検証した。
(3) 得られた神経アンサンブルの結果と行動データの比較から示唆される神経回路機構を推定し、推定されたモデル作成とシミュレーションを行い、実験データとの一致を検証した。(研究協力者：理研 CBS 磯村拓哉)

4. 研究成果

上記の目的を達成するため、図1のようなVR-2光子イメージング系を確立した。VR内における移動は尾の振幅周波数に対応して提示画像が動くように設計した(灰色矢印)。本固定法によりブレの生じない多面終脳イメージングに世界で初めて成功している。このVR内で終脳の興奮細胞がカルシウムセンサータンパクであるG-CaMP7を発現しているトランスジェニックゼブラフィッシュ成魚(*TgBAC(camk2a:GAL4VP16; TgBAC(vglut2a:Gal4); Tg(UAS:G-CaMP7)* zebrafish)に対し、GO課題(能動的回避行動)とNOGO課題(受動的回避行動)をランダムに提示した(図2)。GO課題では手前が青、向こう側が赤になり、10秒以内に赤に逃げなければならない。NOGO課題(能動的回避行動)では手前が赤、向こう側が青になり、10秒間赤色に止まらなければならない。この条件を満たさない場合は電気ショックを受ける(図2)。その結果、課題を経験するにつれ成功率が上がり行動学習が形成された。適切な行動学習が形成された魚のイメージングデータに対しNMFを用いることで個々の神経細胞のデータを神経アンサンブルレベルでの活動に変換し、魚の行動と環境(壁の色、景色の動きなど)との関係性を比較することでそれぞれの神経アンサンブルがコードする情報を同定した。昨年度までに得られた結果をbioRxivに報告し、この報告以降に実施した実験によりそれぞれのアンサンブルが以下の情報をコードしていることを見出した。

(1) 青色をコードするアンサンブル

このアンサンブルは行動学習に依存せず青色を見ると活動していた。

(2) 青色は危険である、赤色は安全であるというルールをコードするアンサンブル

これらのアンサンブルは魚が課題を繰り返すにつれて青、もしくは赤を見ると活動し始めた。さらに、上記の条件(青、危険; 赤、安全)において行動学習を形成した魚において、電気ショックと対呈示していた色を青から赤に逆転させた条件(青、安全; 赤、危険)も提示した。逆転条件も学習した魚において元の条件で行動学習後に青に反応して活動していたアンサンブル、赤に反応して活動していたアンサンブル両方の活動は消失した。さらに逆転条件も学習した魚において新たに赤に反応して活動し始めるアンサンブルを同定した。

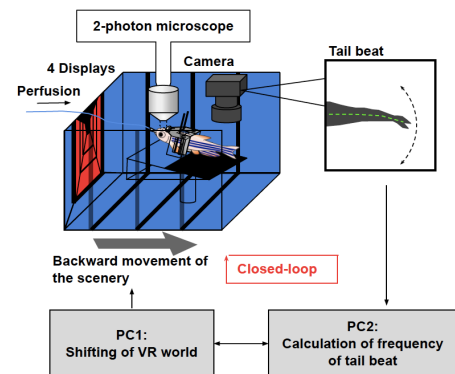


図1. 仮想空間-2光子カルシウムイメージングシステム

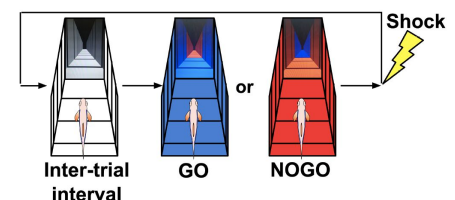


図2. GO/NOGO 課題

以上のことはルールの逆転に応じて活動するアンサンブルが変化することを示唆しており、色に対するルールをコードしているという考えを支持するものである。

(3) 青色領域において景色が後ろに動かないことは危険であるというルールをコードするアンサンブル

このアンサンブルは魚が行動学習後、GO 課題成功時には活動しないが GO 課題失敗時活動していた。また行動学習後に魚の行動を VR に反映しないオープンループ条件下で GO/NOGO 課題を行うと、魚が尻尾を振っているにもかかわらず景色が動かない GO 課題において活動していた。よってこのアンサンブルは魚の尻尾の動きに関係なく、学習後に青を見ている時に景色が後ろに動かないときに活動する。よって、このアンサンブルは青色において後ろに景色が動かないことが危険であるというルールをコードしていると解釈した。

(4) 元のゴール色 (赤) とは異なるゴール色 (緑、白) に到達すると活動するアンサンブル
元来の条件 (ゴール色、赤) で行動学習を形成した後、GO 課題において魚がゴールした直後にゴール色を赤から緑もしくは白に変える実験も行った。その結果、変更されたゴール色である緑、白両方を見ている時のみに活動するアンサンブルを観察した。以上よりこのアンサンブルは赤色以外のゴール色は危険であるというルールをコードしている可能性を示唆している。

(5) ゴールの場所と関連して活動するアンサンブル

このアンサンブルは失敗した GO 課題のうちゴールまでの途中で止まったトライアルと GO 課題成功時に活動し、前者ではトライアル終了まで高い活動を示し、後者ではゴール付近でピークを持つように活動しゴール到達後は活動が下がった。このことからこのアンサンブルがゴールの位置をコードしていると解釈した。

(2) のアンサンブルはほぼ全ての魚が持っていたが、(3) に関しては一部の魚のみにおいて観察された。両方のアンサンブルを持つ魚と (2) のみを持つ魚の泳ぎの詳細を観察すると前者は後者より少ない休憩でゴールに到達することが明らかになった。すなわち前者は後者より効率的にゴールに到達していた。

以上のことより、魚は学習することによって見ている景色の色と動きに対し安全か危険かのルールを付与することで行動を決定していることが明らかになり、ルールを付加された対象の組み合わせによって行動に多様性が生じることが明らかになった。

さらにこれらの組み合わせが異なる行動を引き起こすために必要な神経回路機構を推定し、モデルを作成、シミュレーションを試みた (研究協力者:RIKEN CBS、磯村拓哉博士)。その結果、推定されたモデルからのシミュレーションと実際の行動データは同様の傾向を示し、この神経回路機構が寄与している可能性を示唆している。

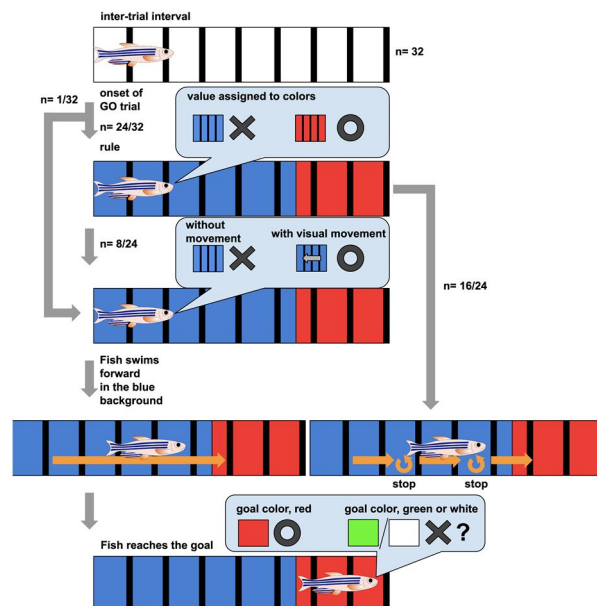


図 3. 本研究のまとめ

以上の結果から、ゼブラフィッシュ成魚終脳において神経アンサンブルは知覚した環境情報に対して価値を付加したルールを表現していること、そのルールが付加される知覚環境情報は複数あること、そのアンサンブルの組み合わせによって行動に多様性が生じることを見出した。

一方で、これらのアンサンブルが行動に対し因果性を持っているのかは依然として不明である。この点を明らかにするため、機能消失実験であるレーザー用いた細胞破壊システムも立案し、構築を進めた。

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Makio Torigoe, Tanvir Islam, Hisaya Kakinuma, Chi Chung Alan Fung, Takuya Isomura, Hideaki Shimazaki, Tazu Aoki, Tomoki Fukai and Hitoshi Okamoto	4. 巻 -
2. 論文標題 Future state prediction errors guide active avoidance behavior by adult zebrafish.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 bioRxiv	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） https://doi.org/10.1101/546440	査読の有無 無
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 -

1. 著者名 Okamoto Hitoshi, Torigoe Makio	4. 巻 6
2. 論文標題 In-vivo imaging of the telencephalic neural activities in the closed-loop virtual reality environment revealed active inference in decision making	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 IBRO Reports	6. 最初と最後の頁 S48 ~ S48
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ibror.2019.07.148	査読の有無 無
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 -

〔学会発表〕 計10件（うち招待講演 0件／うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Makio Torigoe, Tanvir Islam, Hisaya Kakinuma, Chi Chung Alan Fung, Takuya Isomura, Hideaki Shimazaki, Tazu Aoki, Taro Toyozumi, Tomoki Fukai and Hitoshi Okamoto
2. 発表標題 The active inference in decision making by adult zebrafish revealed by in-vivo imaging of the telencephalic neural activities in the closed-loop virtual reality environment
3. 学会等名 第24回小型魚類研究会, 名古屋大学
4. 発表年 2018年 ~ 2019年

1. 発表者名 Makio Torigoe, Tanvir Islam, Hisaya Kakinuma, Chi Chung Alan Fung, Takuya Isomura, Hideaki Shimazaki, Tazu Aoki, Taro Toyozumi, Tomoki Fukai and Hitoshi Okamoto
2. 発表標題 The active inference in decision making by adult zebrafish revealed by in-vivo imaging of the telencephalic neural activities in the closed-loop virtual reality environment
3. 学会等名 Joint symposium of 10th optogenetics research conference and second international symposium on brain information dynamics
4. 発表年 2018年 ~ 2019年

1. 発表者名
Makio Torigoe, Tanvir Islam, Hisaya Kakinuma, Chi Chung Alan Fung, Takuya Isomura, Hideaki Shimazaki, Tazu Aoki, Taro Toyoizumi, Tomoki Fukai and Hitoshi Okamoto
2. 発表標題
The active inference in decision making by adult zebrafish revealed by in-vivo imaging of the telencephalic neural activities in the closed-loop virtual reality environment
3. 学会等名
記憶研究会『記憶・学習の基盤機構と回路研究の新展開へのアプローチ』
4. 発表年
2018年～2019年

1. 発表者名
Makio Torigoe, Tanvir Islam, Hisaya Kakinuma, Chi Chung Alan Fung, Takuya Isomura, Hideaki Shimazaki, Tazu Aoki, Taro Toyoizumi, Tomoki Fukai and Hitoshi Okamoto
2. 発表標題
The active inference in decision making by adult zebrafish revealed by in-vivo imaging of the telencephalic neural activities in the closed-loop virtual reality environment
3. 学会等名
The 5th Zebrafish imaging conference
4. 発表年
2018年～2019年

1. 発表者名
Makio Torigoe, Tanvir Islam, Hisaya Kakinuma, Chi Chung Alan Fung, Takuya Isomura, Hideaki Shimazaki, Tazu Aoki, Taro Toyoizumi, Tomoki Fukai and Hitoshi Okamoto
2. 発表標題
The active inference in decision making by adult zebrafish revealed by in-vivo imaging of the telencephalic neural activities in the closed-loop virtual reality environment
3. 学会等名
The 41st Annual Meeting of The Japan Neuroscience Society (国際学会)
4. 発表年
2018年～2019年

1. 発表者名
Makio Torigoe, Tanvir Islam, Hisaya Kakinuma, Chi Chung Alan Fung, Takuya Isomura, Hideaki Shimazaki, Tazu Aoki, Taro Toyoizumi, Tomoki Fukai and Hitoshi Okamoto
2. 発表標題
In-vivo imaging of telencephalic neural activities in adult zebrafish during decision making task in the closed-loop virtual reality environment
3. 学会等名
Cold spring harbor lab meeting “Neuronal Circuits”
4. 発表年
2018年～2019年

1 . 発表者名 Torigoe Makio、Islam Tanvir、Kakinuma Hisaya、Fung Chi Chung Alan、Isomura Takuya、Shimazaki Hideaki、Aoki Tazu、Fukai Tomoki、Okamoto Hitoshi
2 . 発表標題 In-vivo imaging of the telencephalic neural activities of the adult zebrafish in the closed-loop virtual reality environment revealed that the perceptual value assignment and perceptual prediction underlie correct behavior
3 . 学会等名 CSHL meeting 'Neuronal circuits' , 2020, Virtual conference (国際学会)
4 . 発表年 2019年 ~ 2020年

1 . 発表者名 Torigoe Makio、Islam Tanvir、Kakinuma Hisaya、Fung Chi Chung Alan、Isomura Takuya、Shimazaki Hideaki、Aoki Tazu、Fukai Tomoki、Okamoto Hitoshi
2 . 発表標題 Future state prediction errors guide active avoidance behavior by adult zebrafish
3 . 学会等名 The 14th International zebrafish Conference, 2019, China (国際学会)
4 . 発表年 2019年 ~ 2020年

1 . 発表者名 Torigoe Makio、Islam Tanvir、Kakinuma Hisaya、Fung Chi Chung Alan、Isomura Takuya、Shimazaki Hideaki、Aoki Tazu、Fukai Tomoki、Okamoto Hitoshi
2 . 発表標題 Neural ensemble analysis under virtual reality reveals that zebrafish use different behavioral tactics to escape to the safe region depending on the use of different sensory cues
3 . 学会等名 The 43th Annual Meeting of The Japan Neuroscience Society, Kobe, Japan, July (2020)
4 . 発表年 2020年 ~ 2021年

1 . 発表者名 Torigoe Makio、Islam Tanvir、Kakinuma Hisaya、Fung Chi Chung Alan、Isomura Takuya、Shimazaki Hideaki、Aoki Tazu、Fukai Tomoki、Okamoto Hitoshi
2 . 発表標題 Future state prediction errors guide active avoidance behavior by adult zebrafish
3 . 学会等名 The 42th Annual Meeting of The Japan Neuroscience Society, Niigata, Japan, July (2019)
4 . 発表年 2019年 ~ 2020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
研究協力者	イスラム タンヴィル (Islam Tanvir)		
研究協力者	柿沼 久哉 (Kakinuma Hisaya)		
研究協力者	ファン チーチン (Fung Chi Chung)		
研究協力者	磯村 拓哉 (Isomura Takuya)		
研究協力者	島崎 秀昭 (Shimazaki Hideaki)		
研究協力者	青木 田鶴 (Aoki Tazu)		
研究協力者	深井 朋樹 (Fukai Tomoki)		

6 . 研究組織（つづき）

	氏名 （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考
研究協力者	岡本 仁 (Okamoto Hitoshi)		