

令和 4 年 5 月 31 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K06767

研究課題名(和文) 情動性の条件付けと運動性の条件付けは小脳回路を共有するか

研究課題名(英文) Do emotional and motor conditionings share cerebellar circuit?

研究代表者

吉田 将之 (Yoshida, Masayuki)

広島大学・統合生命科学研究所(生)・准教授

研究者番号：70253119

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究課題は、恐怖学習と運動学習における小脳回路の使い分けを明らかにすることを目的として計画され、無条件刺激が下オリーブ核経由でプルキンエ細胞に入力すること、さらに下オリーブ核が恐怖条件付けに果たす役割について部分的に明らかにすることに成功した。しかしながら、感染症拡大に起因する実験材料の調達不調により更なる発展が達成できなかった。そこで、計画を修正して遂行された研究により、自由行動下における呼吸計測に基づく恐怖・不安情動の定量に成功した。またこれを応用して新奇環境におけるゼブラフィッシュの順化過程の記載に成功した。この成果は、魚類を用いた情動の神経基盤解明に貢献することが期待できる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

脊椎動物における小脳は運動学習に深く関与することが明らかになっているが、近年恐怖などの情動性の学習にも重要であることが示されつつある。本研究では、基本的な恐怖学習である古典的恐怖条件付けにおいて、延髄の下オリーブ核が重要な役割を果たすことをキンギョをモデルとして明らかにした。さらに、ゼブラフィッシュをモデルとして、自由行動下における呼吸計測に基づく恐怖・不安情動の定量に成功した。またこれを応用して新奇環境におけるゼブラフィッシュの順化過程の記載に成功した。これらの成果は、情動の基本的神経機構とその進化の解明に貢献することが期待できる。

研究成果の概要(英文)：The aim of this research project was to determine whether fear emotional and motor learnings share cerebellar circuit in teleost fish. It has been found that unconditioned aversive stimulus is conveyed to the cerebellum via the inferior olive in the medulla. Both ipsilateral and contralateral lesions of the olivo-cerebellar tract negatively affected the performance of the classical fear conditioning. However, due to covid-19 pandemic situation, it was unable to properly supply experimental animals and difficult to proceed the project as expected. Nevertheless, modified project aiming to develop a technique to monitor the emotional state of the fish by means of measuring ventilatory activities in freely swimming fish was successfully conducted. The developed technique to monitor bioelectric signals derived from the ventilation activity was applied to examine the habituation process of the zebrafish in a novel environment.

研究分野：生物学的心理学

キーワード：情動 小脳 キンギョ ゼブラフィッシュ 恐怖 不安 呼吸

1. 研究開始当初の背景

音(条件刺激)と眼瞼への空気流(無条件刺激)とを対にして何度も呈示すると、音に対してまばたき(条件反応)が起きようになる。この運動性の学習は小脳が担い、その仕組みは哺乳類と魚類でよく調べられている。一方、情動性の条件付けもよく似た手続きにより行われる。しかしながら反応の指向性が明瞭な運動学習と異なり、情動性の学習では、姿勢変化や心拍など、体全体的な防御反応が獲得される。これを、古典的恐怖条件付けとよぶ。運動性の学習がその獲得に 100 回程度の試行を必要とするのに対し、恐怖情動の学習はわずか数回の試行で条件反応が獲得される。そして、両者は学習の様相が全く異なるにもかかわらず、どちらも小脳の神経回路を必要とする。我々はこれまで、キンギョの恐怖条件付けの神経機構を研究する過程で、恐怖反応の獲得にともなって、条件刺激に対するプルキンエ細胞の反応が変化することを見出した。このことは、運動学習同様、情動性の学習においてもプルキンエ細胞の可塑的变化が学習のキーとなることを示唆する。

はたして、情動性の学習である恐怖学習と運動性の学習とは、プルキンエ細胞を中心とした小脳回路の可塑性を共有しているのだろうか？この系を用いれば、脳が限られた神経ネットワークを用いて、いかにしてマルチタスクを処理するかという、全く未解決の問題に挑戦できると考えた。

2. 研究の目的

運動性の条件付けと恐怖条件付けが同じ神経回路の可塑性を基盤とするなら、どのようにして両者が区別されているのだろうか。これを明らかにするには、運動性の条件付けの回路においてキーとなるプルキンエ細胞への 2 つの入力、すなわち運動性条件付けにおける条件刺激(音や光)の入力経路と無条件刺激(電気ショック)の入力経路が、恐怖の条件付けでも使われているかどうかを明らかにしなければならない。条件刺激の入力経路が共通であることは間違いない。また、無条件刺激の経路も共通であることを示唆する予備的データを得た。

そこで、本研究では、運動性の条件付けと情動性(恐怖)の条件付けとが同じ小脳神経回路とその可塑性を共有しているという作業仮説を立てた。この検証および原理解明を目的として計画された。

3. 研究の方法

1) 下オリーブ核由来の EPSP をプルキンエ細胞より記録し、小脳皮質へ入力する登上線維のうち、無条件刺激を運ぶものの割合を推定する。

2) 恐怖条件付けに対する下オリーブ核からの入力遮断の影響を調べる。入力遮断は、通電による局所破壊、および 3-アセチルピリジンによる下オリーブ核ニューロンの選択的破壊である。

3) 自由遊泳中のゼブラフィッシュにおける呼吸運動の非侵襲的計測。

4) 新奇環境への順化過程の評価における呼吸運動の利用。

4. 研究成果

(1) 下オリブ核由来の EPSP により発生するコンプレックススパイクをプルキンエ細胞より記録し、体表への電撃に由来する情報が小脳に運ばれているかどうかを検証した。一部のプルキンエ細胞近傍から記録されたコンプレックススパイクの頻度は、無条件刺激提示により増大した。すなわち無条件刺激としての電撃は、ごく短時間(数ミリ秒)であるが、これに反応して発生したコンプレックススパイクの頻度増大は、数百ミリ秒程度持続するものだった(図1)。これらの結果より、平行線維経由の条件刺激と、登上線維経由の無条件刺激とがプルキンエ細胞に収束することが示唆された。しかしながら、両者が同一ニューロンで観察される例数が少なく、確証には至っていない。

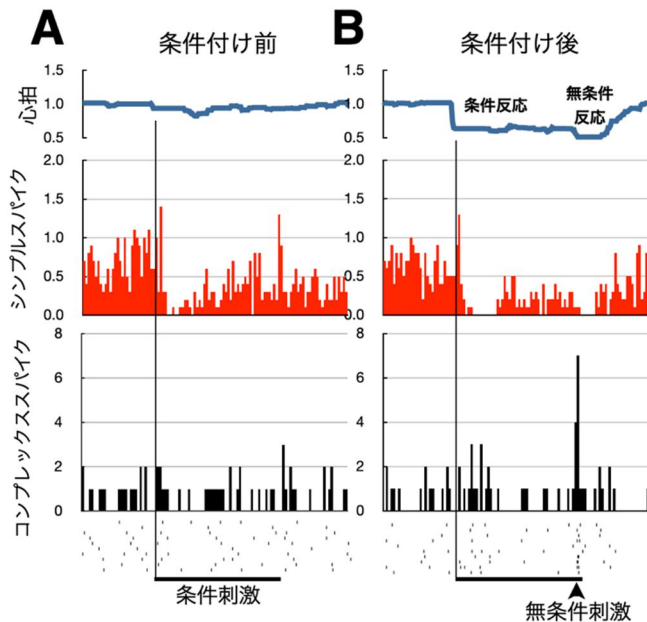


図1 古典的恐怖条件付けにおけるプルキンエ細胞の活動変化。A) 条件付け前 B) 条件付け後。

(2) 無条件刺激が下オリブ核から登上線維経由で小脳プルキンエ細胞に入力するかどうかを確認した。その結果、身体の右側あるいは左側に与えられた侵害刺激は、両側性に小脳皮質に運ばれることが明らかとなった(図2)。さらに、哺乳類において下オリブ核ニューロン特異的な障害誘発の有効性が報告されている3-アセチルピリジンの投与が効果を示さないことが明らかとなった。これは、哺乳類で有効性が確認されている薬物でも、魚類には無効であることの一例として重要な知見である。

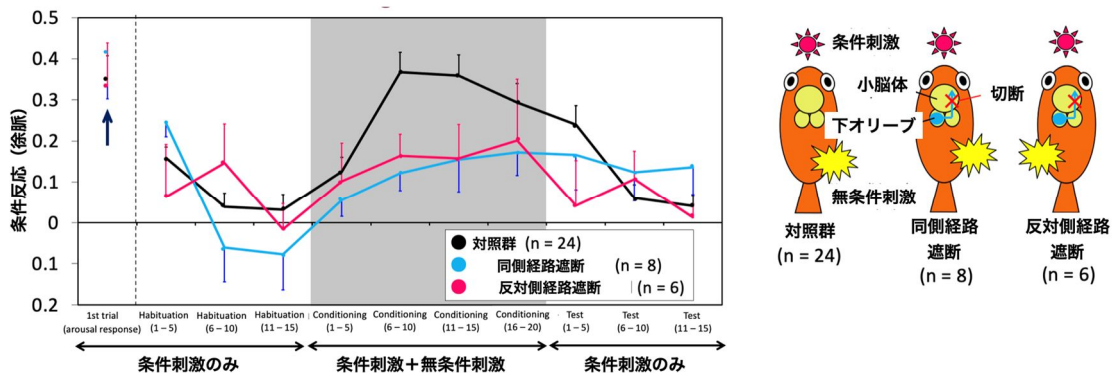


図2 古典的恐怖条件付けに対する下オリブ核 小脳経路の遮断の効果。同側性と反対側性の経路遮断はそれぞれ部分的に条件反応の獲得を阻害する。

2020年度より、Covid19感染症拡大を原因とする入構制限等のため、本研究を遂行するために適切な質を有する実験動物(キンギョ)の確保が困難となり、以後の研究が当初計画通りに遂行できなかった。さらに同理由により、2020年度における実験動物の採卵、育成の状況が極めて不良であったため、2021年度使用予定の動物を十分に確保できなかった。情動性の学習実験と微細な電気生理学実験を組合せた実験のためには、養魚業者から購入した成体では再現性の高い実験が見込めず、計画の大幅な変更を要した。

(3) 上記経緯から、動物の不動化・拘束を伴わない情動評価系を開発し、これを適用することで本研究の推進を図った。呼吸運動は、心拍同様恐怖の条件付けの指標になることは既にわかっている。実験動物としてはキンギョの代替として、同じくコイ科魚類であるゼブラフィッシュを用いた。自由遊泳下のゼブラフィッシュの呼吸運動に伴う生体電気現象と、サカナの位置・姿勢変化情報とを統合することに成功した。これにより、長時間の呼吸モニタが可能となった。

(4) 呼吸計測による情動評価を新奇環境への順化過程解明に応用した。今後本研究を発展させるための基礎的段階として、新奇環境における不安情動とその順化過程について、

呼吸運動計測と行動計測とを組み合わせ評価することを試みた。その結果、新奇環境における順化過程は2段階に分けられることが明らかとなった(図3)。

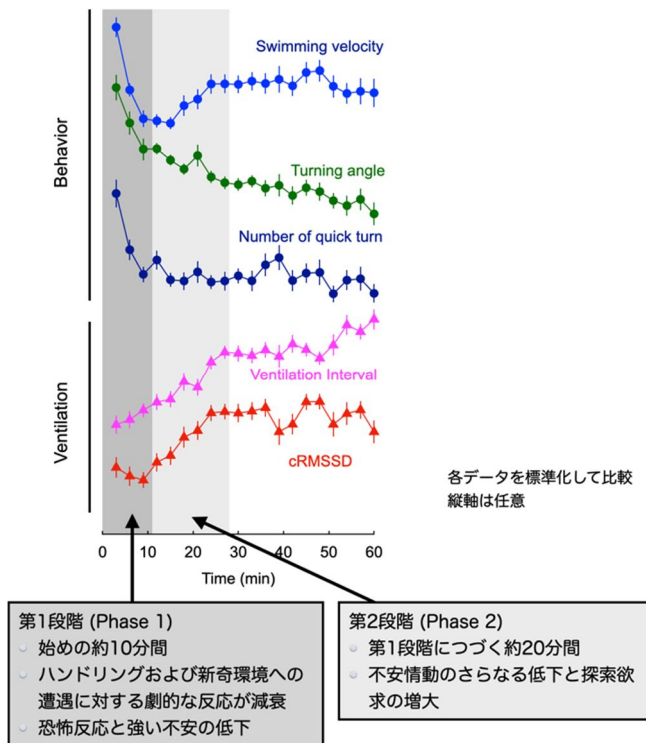


図3 行動と呼吸とから明らかになった新奇環境への2段階の順化過程。グラフ横軸は水槽への導入後の時間。cRMSSD, compensated root mean square of successive differences.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Sou, Z., Matsuno, M., Yoshida, M., Tsuji, T.	4. 巻 11
2. 論文標題 Measurement of emotional states of zebrafish through integrated analysis of motion and respiration using bioelectric signals	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 187
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-020-80578-6	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 -

1. 著者名 Yoshida, M., Tsuji, T., Mukuda, T.	4. 巻 37
2. 論文標題 Relationship between brain morphology and life history in four bottom-dwelling gobiids	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Zoological Science	6. 最初と最後の頁 1680176
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2108/zs190109	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 Yoshida, M.	4. 巻 244
2. 論文標題 Recording the ventilation activity of free-swimming zebrafish and its application to novel tank tests	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Physiology & Behavior	6. 最初と最後の頁 113665
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.physbeh.2021.113665	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 3件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 吉田将之
2. 発表標題 サカナの行動と心理の比較生物学
3. 学会等名 第21回 日本進化学会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 吉田将之
2. 発表標題 脳と行動から探るサカナの心理
3. 学会等名 同志社大学脳科学研究科リトリート（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yoshida Masayuki, Soh Zu
2. 発表標題 Monitoring the ventilation activity of free-swimming zebrafish and its application to novel tank tests
3. 学会等名 日本比較生理生化学会第43回大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 吉田将之
2. 発表標題 自由行動中のゼブラフィッシュからの呼吸計測と新奇場面テストへの応用
3. 学会等名 第92回日本動物学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yoshida Masayuki
2. 発表標題 Bold goldfish in behavioral neuroscience
3. 学会等名 The 2nd AsiaEvo Conference（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Sakai, M., Pfluter, HJ., Honma, A., Miyatake, T., Nakano, R., Takahashi, T., Nishono, H., Buschges, A., Namiki, S., Yoshida, M.	4. 発行年 2021年
2. 出版社 Springer	5. 総ページ数 181
3. 書名 Death-Feigning in Insects	

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

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