

令和 4 年 6 月 2 日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K06894

研究課題名(和文) 嗅覚記憶と意欲行動の神経回路メカニズム

研究課題名(英文) Neural Circuit Mechanisms for Olfactory Memory and Motivated Behavior

研究代表者

宮坂 信彦 (Miyasaka, Nobuhiko)

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・副チームリーダー

研究者番号：70332335

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：ゼブラフィッシュにおける匂いとエサ報酬の連合学習系を用いて、目的行動への意欲を生み出す神経回路メカニズムを解析した。匂いの呈示後にエサ報酬を与えるトレーニングを行うと、魚は誘引行動を示すようになった。連合学習群の腹内側視床では、活性化されたニューロンが対照群より多く観察された。また、魚を新奇環境に暴露すると、連合学習群と同様に腹内側視床の活性化が観察された。さらに、両実験群で活性化する腹内側視床ニューロンは、同一の神経ペプチドおよび転写因子を発現する興奮性ニューロンの集団であった。このことから、腹内側視床の活性化と、探索や報酬獲得など意欲行動との関連が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

すべての動物の生存や種の維持にとって欠くことのできない摂食、危険回避、繁殖などの行動には、根源的な意志の力、すなわち意欲が重要な役割を果たしている。本研究では、ゼブラフィッシュの「匂い-エサ報酬連合学習系」を用いて、意欲行動にリンクして活性化する腹内側視床を同定した。魚類の腹内側視床は、これまでほとんど解析されていない未知の脳部位であるが、本研究によって遺伝子発現プロファイルの一端が明らかとなった。本研究成果は、脊椎動物の意欲を生み出す基本原理の解明に貢献することが期待される。

研究成果の概要(英文)：How learning enables odor cues to evoke goal-oriented behavior remains largely unknown. Here I use a simple behavioral paradigm for appetitive olfactory conditioning in adult zebrafish. Repeated pairings of odorant infusion with feeding result in odorant-evoked attraction of zebrafish prior to feeding. Following the probe trial, the number of c-fos-positive cells in a specific subnucleus of the thalamus is significantly greater in paired group than that in unpaired group. Furthermore, c-fos-positive cells increase in number in the thalamic subnucleus upon exposing naive zebrafish to a novel environment. The thalamic c-fos-positive cells in both the experimental groups are a specific population of excitatory neurons that co-express particular neuropeptide and transcription factor genes. These results suggest that activation of the thalamic neurons correlates with a brain state common to motivated behaviors.

研究分野：神経科学

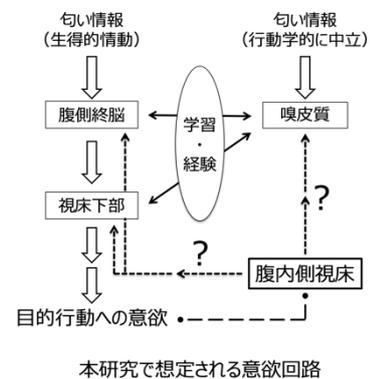
キーワード：匂い 神経回路 脳 行動 ゼブラフィッシュ 学習 記憶 モチベーション

## 1. 研究開始当初の背景

嗅覚系は外界の多種多様な匂い分子（化学物質）を受容し、対象物の認知、情動の誘起、内分泌系の変化、さらには記憶の形成や想起を介して「目的行動への意欲・モチベーション」を創造する神経システムである。これらの行動には、動物種特異的にプログラムされた「生得的な情動行動」と、過去の経験に依存して行動意欲の質が変化する「学習依存的行動」が含まれる。近年の遺伝子工学的な解析から、一次嗅覚中枢である嗅球の特定の糸球体群（匂い分子の構造に対応したユニット構造）から選択的に入力を受ける高次脳領域と、ランダムに入力を受ける脳領域が存在し、それぞれ生得的行動と学習依存的行動に関与することが示唆されている。しかしながら、それらの神経回路素子がどのように相互作用して目的行動への意欲・モチベーションを生み出すのか、その神経回路メカニズムはほとんど明らかになっていない。

## 2. 研究の目的

研究代表者らは、ゼブラフィッシュにおける匂いとエサ報酬連合学習実験において、非連合学習群より連合学習群で多くの *c-fos* 陽性細胞が検出される脳領域として、腹内側視床を同定している。さらに、トレーニングをしていないゼブラフィッシュを常飼育環境から新奇環境へ移すことによっても、腹内側視床で *c-fos* 陽性細胞数が増加することを見いだしている。これらの実験結果は、匂いによって動機付けされた誘引行動や新奇環境での探索行動など、腹内側視床の活性化が目的行動への意欲（覚醒、興味、集中など）と関連する可能性を示唆している。また、腹内側視床ニューロンが高次嗅覚中枢における情報処理を修飾し、目的行動への意欲創出に寄与している可能性も考えられる。そこで本研究では、腹内側視床の神経接続と機能を解析し、腹内側視床が嗅覚記憶および意欲行動に果たす役割を明らかにする。



## 3. 研究の方法

### (1) ゼブラフィッシュの匂い-エサ報酬連合学習実験

ゼブラフィッシュを行動実験用の細長い水槽に 1 個体ずつ馴化する。学習前には行動変化を起こさない中立な匂い物質を水槽の片側の隅からゆっくりと注入し、匂いの投与から 30 秒後に水槽の同側よりエサ報酬を与える。1 日 3 回の反復学習を行い、匂いの投与から給餌までの 30 秒間の魚の行動を定量解析して学習度を評価する。4 日間の反復学習後の 5 日目に、匂いのみを投与して（プローブテスト）、投与前後それぞれ 5 分間の魚の行動を定量的に比較解析する。

### (2) 神経活動履歴の解析

匂いとエサ報酬の連合学習実験や新奇環境への魚の暴露において、刺激による行動の誘起後 30 分で脳を固定する。固定した脳をパラフィン包埋して薄切し、神経活動マーカーである *c-fos* mRNA の発現を *in situ hybridization* によって検出する。また、種々のニューロンタイプ特異的マーカー遺伝子と *c-fos* の多重 *in situ hybridization* によって活動するニューロンタイプを特定し、その分子発現プロフィールを解析する。

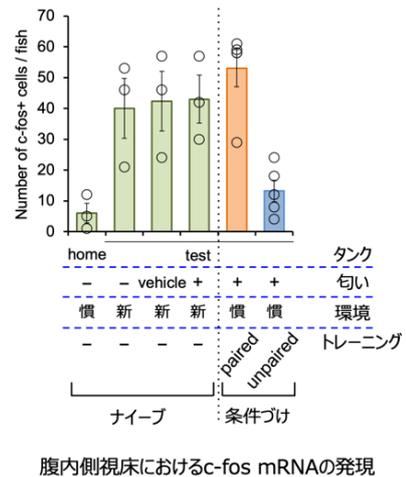
### (3) 腹内側視床ニューロンの遺伝子工学的可視化と機能操作

Cre/loxP システムを用いて腹内側視床の特定のニューロンを遺伝子工学的に操作するために、腹内側視床ニューロンが発現する種々の遺伝子に対して Cre recombinase 遺伝子のノックインシステムを作製する。CRISPR/Cas 法を用いて目的遺伝子の転写開始点上流を切断し、Cre 発現カセットを挿入する。loxP リポーターシステムとの交配により特異的発現を示す固体をスクリーニングして、Cre 発現ノックインシステムを樹立する。

#### 4. 研究成果

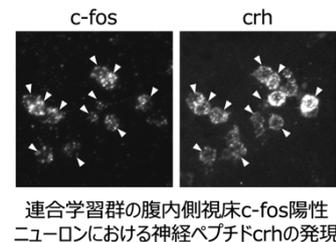
##### (1) 匂い-エサ報酬連合学習で活性化する腹内側視床ニューロンの同定

研究代表者らは、匂いとエサ報酬連合学習実験において、連合学習群 (paired) で非連合学習群 (unpaired) より多くの c-fos 陽性細胞が検出される脳領域として、腹内側視床を同定している。さらに、トレーニングをしていないゼブラフィッシュを常飼育環境から新奇環境へ移すことによっても、腹内側視床で c-fos 陽性細胞数が増加することを見いだしている。連合学習群および新奇環境群の c-fos 陽性ニューロンが同じタイプのニューロンか、それとも異なるタイプのニューロンかを調べるために、神経機能と深く関連する神経ペプチド遺伝子の発現を解析した。研究代表者らの研究室で進めている神経ペプチド遺伝子群の網羅的発現解析のデータから、腹内側視床に発現する遺伝子を 3 つに絞り込み、c-fos との二重 in situ hybridization を行った。その結果、連合学習群および新奇環境群の両者において、c-fos 陽性ニューロンは副腎皮質刺激ホルモン放出ホルモン (crh) を発現する特定のニューロン集団であることが明らかとなった。これらの実験結果から、腹内側視床ニューロンの活性化は両実験群に共通した脳の状態を反映すると考えられる。すなわち、匂いによって動機づけされた誘引行動や新奇環境での探索行動など、目的行動への意欲 (覚醒、興味、集中など) と関連することが示唆された。



##### (2) 腹内側視床ニューロンの遺伝子発現プロフィールの解明

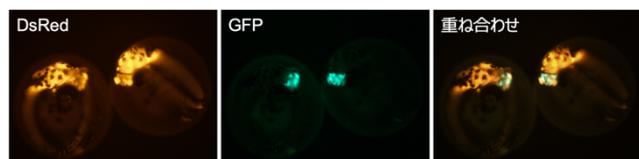
腹内側視床ニューロンが意欲行動とリンクして活性化することから、高次嗅覚中枢における情報処理を修飾し、匂い刺激に伴う目的行動への意欲創出に寄与している可能性が考えられる。しかしながら魚類の腹内側視床は、その機能はもとより遺伝子発現や神経接続について、これまで全く解析されていない未知の脳部位である。そこで、活性化されるニューロンタイプの特徴を明らかにするために、ゼブラフィッシュ腹内側視床 crh ニューロンの遺伝子発現プロフィールを解析した。主要神経伝達物質関連遺伝子の発現を解析したところ、腹内側視床 crh ニューロンはグルタミン酸作動性ニューロンのマーカーである vglut2 遺伝子を発現していた。さらに、前脳領域に発現する種々の転写因子の発現を解析したところ、終脳のマーカー遺伝子として知られる T-box 型転写因子を発現することが明らかとなった。ゼブラフィッシュ腹内側視床は終脳と視床の境界領域に位置し、視床でありながら終脳のマーカー遺伝子を発現することから、発達期の脊椎動物に共通して見られる視床隆起に由来する細胞集団であることが示唆された。



連合学習群の腹内側視床c-fos陽性ニューロンにおける神経ペプチドcrhの発現

##### (3) 腹内側視床ニューロンを遺伝子操作するためのトランスジェニック系統の樹立

上述の遺伝子発現プロフィールの解析から、腹内側視床 crh ニューロンは vglut2 および T-box 型転写因子を発現することが明らかとなった。一方、視索前野や視床下部の crh ニューロンは、これらの遺伝子を発現していなかった。そこで、全 crh ニューロンのうち腹内側視床 crh ニューロンを特異的に可視化・機能操作することを目的として、vglut2 および T-box 型転写因子の遺伝子座に Cre recombinase 遺伝子を挿入したトランスジェニック系統の作製を行った。loxP リポーター系統を用いたスクリーニングにより、内在性の vglut2 および T-box 型転写因子の発現を再現できる Cre 系統を樹立した。これらの Cre 系統は、腹内側視床 crh ニューロンの神経接続や機能を特異的に解析するためのよい遺伝子工学的ツールとなる。



T-box転写因子遺伝子座のCreを介したGFPの限定的な発現 (受精後2日の稚魚)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 3件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Miyasaka N, Yoshihara Y
2. 発表標題 A neural substrate for motivated behavior in zebrafish
3. 学会等名 Neuro2022
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 宮坂信彦
2. 発表標題 ゼブラフィッシュで探る意欲の神経メカニズム
3. 学会等名 Chemosensation and Behavior Workshop 2021
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Miyasaka N, Yoshihara Y
2. 発表標題 A neural substrate for motivated behavior following appetitive olfactory learning in zebrafish
3. 学会等名 第43回日本神経科学大会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Miyasaka N, Yoshihara Y
2. 発表標題 Olfaction and motivated behavior in zebrafish
3. 学会等名 18th International Symposium on Olfaction and Taste (ISOT)（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Miyasaka N, Yoshihara Y
2. 発表標題 Neural circuit mechanisms underlying olfactory memory and motivated behavior in zebrafish
3. 学会等名 Neuro2019 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 宮坂信彦, 吉原良浩
2. 発表標題 嗅覚記憶と意欲行動の神経回路メカニズム
3. 学会等名 日本味と匂学会第53回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Miyasaka N, Yoshihara Y
2. 発表標題 Olfactory memory and motivated behavior in zebrafish
3. 学会等名 The 48th Naito Conference on Integrated Sensory Sciences - Pain, Itch, Smell and Taste (国際学会)
4. 発表年 2019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	吉原 良浩  (Yoshihara Yoshihiro)		

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