

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 13 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23300115

研究課題名(和文)メダカの社会性行動を生み出す脳の分子神経基盤の解明

研究課題名(英文)Study on the molecular/neural basis underlying social behavior in medaka fish

研究代表者

竹内 秀明 (Takeuchi, Hideaki)

東京大学・理学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：00376534

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 15,300,000円、(間接経費) 4,590,000円

研究成果の概要(和文)：メダカのメスがそばにいた異性を目で見えて記憶し、性的パートナーとして積極的に受け入れることを発見した。オスとメスを透明なガラスで仕切ってお見合いさせておくと、メスは目で見えていた「そばにいたオス」の求愛をすぐに受け入れ、他の恋敵のオスはメスをめぐる闘いに敗北する。さらに、性的パートナーを受け入れる際に、拒絶から受け入れへとモードを切り替えるための神経細胞を同定した。お見合いをすると、メスの脳では終神経 GnRH3ニューロンの電氣的活動が活性化し、この神経細胞がメスの「恋ごころスイッチ」として機能することが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：Medaka females recognize familiar males following prior visual exposure, and prefer to mate with the familiarized males. A subpopulation of gonadotropin-releasing hormone-producing neurons (GnRH3 neurons) is essential for the decision-making switch in the mating choice.

研究分野：神経科学一般

科研費の分科・細目：行動神経科学

キーワード：社会脳

1. 研究開始当初の背景

2005年から申請者は社会行動を分子遺伝学的手法を用いて解析する新規研究モデルを確立する目的で、分子遺伝学のモデル生物であるメダカ(魚類)に着目した。行動生態学の分野では魚類の社会行動は古くから研究対象になっていた。しかしながらこれまでの研究は遺伝子レベルでの解析が困難である魚種(イトヨ、グッピー、シクリッド、金魚、ベラなど)から行動データが収集されているため、その脳機能を分子遺伝学的手法で解析することは難しかった。また無脊椎動物(線虫、ショウジョウバエ)からは乳類までいくつかの神経ペプチドは脳において神経修飾作用を持ち社会行動に影響を与えることが分かっている。金魚やシクリッドではバソトシン、ソマトスタチン、サブスタンス P等の神経ペプチドを直接脳内へ投与すると、仲間への追尾行動、配偶行動、攻撃行動などの様々な行動様式が変化する。しかしながら、多くの神経ペプチドは脳内の広範な領域で作用するので、魚類の社会性行動を制御する詳細な神経回路は全く不明であった。

メダカでは Tilling ライブラリーが構築されており、目的遺伝子のゲノム領域に変異の入った精子を検索し、人工授精によって変異体を作成することが可能である。これまでに魚類において神経ペプチドをコードする遺伝子の変異体を用いた社会行動の解析は行われた例はなかった。

2. 研究の目的

本研究では Tilling (Targeting Induced Local Lesions In Genomes) 法によって、魚類の社会性行動の制御に関わると予想される神経ペプチドをコードする遺伝子に変異を持つメダカを同定し、社会行動との関連を検定することを目的とした。さらに同定した変異体を用いて、社会行動に関わる神経回路を同定するために、(1) 条件的遺伝子操作法の開発、(2) 神経興奮マーカーの同定も同時に行った。当初の目的に加えて、(3) 生後脳発達に異常が生じる変異体の検索、(4) 社会的学習行動実験系の確立も行った。

3. 研究の方法

メダカ脳において神経修飾作用が予想される神経ペプチドをコードする遺伝子に変異の入った個体を Tilling 法にて作出し、社会行動[配偶者選択、群れ行動、オス間競争]の検定を行った。またメダカの社会行動は生後に発達するため、生後の神経新生に異常が生じる変異体を検索した。さらに IR-LEGO (赤外線レーザー誘起遺伝子発現操作法) 法を用いた条件的遺伝子操作法の開発も行った。

4. 研究成果

(1) メスの配偶者選択の神経基盤の解析

本研究ではゴナドトロピン放出ホルモンをコードする遺伝子の 1 つ (GnRH3) に異常が

生じると、メダカのメスの配偶者選択に異常が生じることを発見した。メスメダカは配偶前に長時間見ていたオスを視覚記憶し、個体認知を介して「見知ったオス」を配偶相手として選択し、「見知らぬオス」を拒絶する傾向がある。このことから、メスメダカの配偶者選択において、オスとの社会関係(相手を視覚記憶しているか否か)が、メスのオスの受入れ・拒絶の意思決定に影響を与えることを見いだした。

本研究では配偶者選択の意思決定において、中枢神経モジュレーターである GnRH3 を合成するニューロン(終神経 GnRH3 ニューロン)が中心的な役割を持つことを見出した。具体的には以下の 3 点を示した。(1) デフォルト状態では GnRH3 ニューロンの自発的発火頻度は低い(2-3Hz)。この状態のメスは全てのオスの求愛を拒絶する。(2) メスが特定のオスを長時間見ると GnRH3 ニューロンの神経活動が活性化して、自発的発火頻度が高くなる(4-5Hz)。(3) GnRH3 ニューロンが活性化した状態のメスは、それまでに見ていた「見知ったオス」を配偶相手として選択的に受け入れる。Tilling 法で同定した GnRH3 変異体は(1)から(3)への変換ができなくなっていた。このことから、GnRH3 ペプチドはデフォルト状態から活性化状態へのモードスイッチングに必須であることが示された。GnRH3 ペプチドは終神経 GnRH3 ニューロン自身に働きかけて、自己活性化に働くと予想される(Science, 343, 91-94)。

(2) メダカ脳の条件的遺伝子操作法の確立

メダカの脳機能を遺伝学的手法を用いて解析するためには、「特定の脳・神経回路」で「任意の時期」に遺伝子発現を制御する条件的遺伝子操作法を確立する必要がある。本研究では、アデノウイルス (FEBS Lett. 584, 3545-3549, 2010) 及び赤外線レーザー誘起遺伝子発現操作法 (PLoS ONE 8, e66597, 2013) を用いて、脳の任意の領域で Cre/loxP 組み換えを誘導する手法を確立した。当該手法が確立されたことで、特定神経細胞群において、遺伝子機能を欠損及びレスキューすることが可能になり、メダカ「社会脳」の機能地図を作製できるようになった。

(3) メダカの幼魚脳において神経新生が抑制された変異体の同定

メダカの成長期において神経新生が脳発達や行動発達に必要であるか否か検定する目的で、若い個体(性的未成熟)個体において神経新生が抑制されているメダカ変異体を検索した。その結果、p53 変異体では分化した神経前駆細胞の細胞分裂が抑制されており、神経新生した細胞数が、野生型の半分程度になっていることを見出した。p53 はマウスで神経幹細胞の増殖を抑制する機能があることが報告されているが、p53 が神経新生に促進的に機能することを示したのは初めてである。(Biochem. Biophys. Res. Commun. 404 453-457, 2012)

(4) メダカの神経興奮マーカー遺伝子の同定

初期応答遺伝子は神経興奮依存に発現する性質をもっており、当該遺伝子の発現解析によって、行動依存に活動する脳領域や神経細胞をマッピングする手法がマウスや鳥類で確立されている。本研究ではメダカ c-fos が初期応答遺伝子の性質を持つことを示し、イントロンプローブを用いた *in situ* hybridization 法を行うことで、行動依存の神経興奮を高い時間解像度で検出する手法を確立し、配偶行動依存に興奮する脳領域を同定した。(Biochem. Biophys. Res. Commun. 404, 453-457, 2011)

(5) 個体認知を介した社会的学習の発見

メダカを用いて餌報酬学習を介した集団採餌行動実験系を確立した結果、集団を形成すると単独でいる場合よりも外界の視覚情報を効率的に学習・利用できる現象(社会的学習)を見出した。さらにカルバック・ライブラー情報量を用いて個体間相互作用(同調)に影響を与える行動パラメーターを網羅的に検索する新規データマイニング手法を開発した。その結果、ある個体が高い遊泳速度を出したときに他個体が同調して遊泳方向を揃える傾向があることを見出した。さらに自由遊泳時において未学習個体は「餌情報を学習した個体」が高い遊泳速度を出した時に、より強く同調する傾向があることを見出した。よって未学習個体が集団内で「学習個体」を識別し、普段から「学習個体」の動きに同調することで、採餌効率を上げていることを示唆した。(PLoS ONE 8, e71685, 2013)

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計5件) 査読あり原著論文

(1) Okuyama T, Suehiro Y, Imada H, Shimada A, Naruse K, Takeda H, Kubo T, and Takeuchi H† (2011)

Induction of c-fos transcription in the medaka brain (*Oryzias latipes*) in response to mating stimuli.

Biochem. Biophys. Res. Commun. 404, 453-457. 査読あり

(2) Isoe Y, Okuyama T, Taniguchi Y, Kubo T, and Takeuchi H† (2012)

p53 mutation suppresses adult neurogenesis in medaka fish (*Oryzias latipes*).

Biochem. Biophys. Res. Commun. 423, 627-631. 査読あり

(3) Ochiai T, Suehiro Y, Nishinari K, Kubo T, and Takeuchi H† (2013)

A new data-mining method to search for behavioral properties that induce coordinated movements and their

involvement in social learning in medaka fish (*Oryzias latipes*).

PLoS ONE 8, e71685. 査読あり

(4) Okuyama T, Isoe Y, Hoki M, Suehiro Y, Yamagishi G, Tanaka M, Naruse K, Kinoshita M, Kamei Y, Shimizu A, Kubo T, and Takeuchi H† (2013)

Controlled Cre/loxP site-specific recombination in the developing brain in medaka fish, *Oryzias latipes*.

PLoS ONE 8, e66597. 査読あり

(5) Okuyama T, Yokoi S, Abe H, Suehiro Y, Imada H, Tanaka M, Kawasaki T, Yuba S, Taniguchi Y, Kamei Y, Okubo K, Shimada A, Naruse K, Takeda H, Oka Y, Kubo T, and Takeuchi H† (2014)

A neural mechanism underlying mating preferences for familiar individuals in medaka fish

Science, 343, 91-94. 査読あり

[学会発表] (計32件)

(1) 横井佐織、奥山輝大、亀井保博、谷口善仁、安齋賢、木下政人、久保健雄、竹内秀明”メダカを用いた配偶者防衛行動の神経基盤解析”第36回日本分子生物学会年会、神戸市、神戸ポートピア(2013年12月3日)

(2) Isoe, Y., Okuyama, T., Hoki, M., Suehiro, Y., Yamagishi, G., Naruse, K., Kinoshita, M., Kamei, Y., Shimizu, A., Kubo, T., Takeuchi, H.

“A heat-inducible cre/loxP recombination in the brain of medaka fish (*Oryzias latipes*)”第36回日本分子生物学会年会、神戸市、神戸ポートピア(2013年12月3日)

(3) Teruhiro Okuyama, Saori Yokoi, Hideki Abe, Yasuko Isoe, Yuji Suehiro, Haruka Imada, Minoru Tanaka, Takashi Kawasaki, Shunsuke Yuba, Yoshihito Taniguchi, Yasuhiro Kamei, Kataaki Okubo, Atsuko Shimada, Kiyoshi Naruse, Hiroyuki Takeda, Yoshitaka Oka, Takeo Kubo, Hideaki Takeuchi

“Neural mechanism underlying socially-regulated female mating receptivity in medaka fish”第36回日本分子生物学会年会、神戸ポートピア(2013年12月3日)

(4) Isoe, Y., Okuyama, T., Hoki, M., Suehiro, Y., Yamagishi, G., Naruse, K., Kinoshita, M., Kamei, Y., Shimizu, A., Kubo, T., Takeuchi, H. “A heat-inducible cre/loxP recombination in the brain of medaka fish (*Oryzias latipes*)”, The 42nd annual meeting of the Society for Neuroscience meeting 2013, San Diego, (2013年11月12日)

(5) Saori Yokoi, Teruhiro Okuyama, Yasuhiro Kamei, Yoshihito Taniguchi,

Takeo Kubo, Hideaki Takeuchi “Analysis of neural basis of mate-guarding behavior in small fish, medaka” Saori Yokoi, Teruhiro Okuyama, Yasuhiro Kamei, Yoshihito Taniguchi, Takeo Kubo, Hideaki Takeuchi

The 42th annual meeting of the Society for Neuroscience meeting 2013, San Diego, (2013年11月12日)

(6) 坪子理美、木村哲晃、新屋みのり、末廣勇司、奥山輝大、島田敦子、武田洋幸、成瀬清、久保健雄、竹内秀明

“メダカ近交系を用いた視覚刺激依存の驚愕反応特性に影響する遺伝子の探索”、第84回日本動物学会岡山大会、岡山市、岡山大学津島キャンパス (2013年9月26日)

(7) Isoe, Y., Okuyama, T., Hoki, M., Suehiro, Y., Yamagishi, G., Naruse, K., Kinoshita, M., Kamei, Y., Shimizu, A., Kubo, T., Takeuchi, H.

“A heat-inducible cre/loxP recombination in the brain of medaka fish (*Oryzias latipes*)”, 第19回小型魚類研究会、仙台市、仙台市情報・産業プラザ (2013年9月20日)

(8) Saori Yokoi, Teruhiro Okuyama, Yasuhiro Kamei, Yoshihito Taniguchi, Satoshi Ansai, Masato Kinoshita, Takeo Kubo, Hideaki Takeuchi

“Analysis of neural/molecular mechanisms of mate-guarding behavior in small fish, medaka” 第19回小型魚類研究会、仙台市、仙台市情報・産業プラザ (2013年9月20日)

(9) Satomi Tsuboko, Tetsuaki Kimura, Minori Shinya, Yuji Suehiro, Teruhiro Okuyama, Atsuko Shimada, Hiroyuki Takeda, Kiyoshi Naruse, Takeo Kubo, Hideaki Takeuchi

“Searching for genes affecting visually-evoked startle response properties with medaka inbred strains” 第19回小型魚類研究会、仙台市、仙台市情報・産業プラザ (2013年9月20日)

(10) Hideaki Takeuchi (2013年7月13日) Invited

“Socially-regulated mating preference in medaka fish and its neural mechanism” 日本比較生理生化学会 2013年大会 (姫路)

(11) Hideaki Takeuchi (2012年11月23日) Invited

“Integrative analysis of sexual behaviors in medaka fish: From neurons to behavioral evolution”

Workshop “Evolution of the Brain” supported by CPIS, SOKENDAI (葉山)

(12) Yokoi, S., Okuyama, T., Kamei, Y., Taniguchi, Y., Kubo, T. and Takeuchi, H.

“Analysis of the neural basis of mate-guarding behavior in small fish, medaka” The 42th annual meeting of the

Society for Neuroscience meeting 2012, New Orleans, 2012 (2012年10月15日)

(13) Isoe, Y., Okuyama, T., Houki, M., Suehiro, Y., Taniguchi, Y., Kubo, T. and Takeuchi, H. “Analysis of mechanism underlying brain growth accompanied by neurogenesis using young medaka fish (*Oryzias latipes*)” The 42th annual meeting of the Society for Neuroscience meeting 2012, New Orleans, 2012 (2012年10月15日)

(14) Okuyama, T., Yokoi, T., Abe, T., Taniguchi, Y., Okubo, T., Kamei, Y., Shimada, A., Naruse, K., Takeda, H., Oka, Y., Kubo, T. and Takeuchi, H. Neural mechanisms of female sexual preference in medaka. The 42th annual meeting of the Society for Neuroscience meeting 2012, New Orleans, 2012 (2012年10月15日)

(15) 奥山輝大、横井佐織、阿部秀樹、末廣勇司、今田はるか、田中実、川崎隆史、谷口善仁、亀井保博、島田敦子、成瀬清、武田洋幸、岡良隆、久保健雄、竹内秀明

“メダカにおける、メスの配偶者選択行動の神経機構” 第35回日本神経科学大会、名古屋 (平成24年9月) (2012年9月20日)

(16) 坪子理美、木村哲晃、新屋みのり、末廣勇司、奥山輝大、島田敦子、武田洋幸、成瀬清、久保健雄、竹内秀明

“メダカ近交系を用いた視覚刺激依存の驚愕反応特性に影響する遺伝子の探索” 第35回日本神経科学大会、名古屋 (2012年9月20日)

(17) 横井佐織、奥山輝大、亀井保博、谷口善仁、久保健雄、竹内秀明

“メダカを用いた配偶者防衛行動の神経基盤解析” 第35回日本神経科学大会、名古屋 (2012年9月20日)

(18) 磯江泰子、奥山輝大、谷口善仁、久保健雄、竹内秀明

“メダカ幼魚を用いた神経新生を伴う脳成長機構の解析” 第35回日本神経科学大会、名古屋 (2012年9月20日)

(19) 奥山輝大、阿部秀樹、末廣勇司、今田はるか、島田敦子、川崎隆史、弓場俊輔、谷口善仁、亀井保博、田中実、成瀬清、武田洋幸、岡良隆、久保健雄、竹内秀明

“小型魚類を用いた視覚情報依存的な配偶者選択行動の分子・神経基盤解析” 第34回日本分子生物学会年会、横浜市、パシフィコ横浜 (2011年12月13日)

(20) 坪子理美、木村哲晃、末廣勇司、奥山輝大、島田敦子、武田洋幸、成瀬清、久保健雄、竹内秀明

“Searching for genes affecting visually-evoked startle response properties in Medaka (*Oryzias latipes*)” 第34回日本分子生物学会年会、横浜市、パシフィコ横浜 (2011年12月13日)

(21) 落合崇、末廣勇司、久保健雄、竹内秀

明 “メダカ集団を用いた視覚連合学習を定量化する新規実験系の確立” 第 34 回 日本分子生物学会年会、横浜市、パシフィコ横浜 (2011 年 12 月 13 日)

(22) 横井佐織、奥山輝大、久保健雄、竹内秀明 ”メダカを用いた、配偶者防衛行動の分子・神経基盤解析” 第 34 回 日本分子生物学会年会、横浜市、パシフィコ横浜 (2011 年 12 月 13 日)

(23) Isoe, Y., Okuyama, T., Taniguchi, Y., Kubo, T. and Takeuchi, H.

“p53 mutation caused suppression of neurogenesis in the juvenile medaka fish brain.” 第 34 回 日本分子生物学会年会、横浜市、パシフィコ横浜 (2011 年 12 月 13 日)

(24) Hideaki Takeuchi (2011 年 11 月 23 日) Invited

“ Neural basis underlying sexual selection in medaka fish”

The 1st Strategic Meeting for Medaka Research, National Institute for Basic Biology (岡崎)

(25) Isoe, Y., Okuyama, T., Taniguchi, Y., Kubo, T. and Takeuchi, H.

“p53 mutation caused suppression of neurogenesis in the juvenile medaka fish brain.” 第 34 回日本神経科学大会、横浜市、パシフィコ横浜 (2011 年 9 月 20 日)

(26) 横井佐織、奥山輝大、久保健雄、竹内秀明

“メダカを用いた配偶者防衛行動の神経基盤解析” 第 34 回日本神経科学大会、横浜市、パシフィコ横浜 (2011 年 9 月 20 日)

(27) Okuyama, T., Abe, H., Suehiro, Y., Imada, H., Shimada, A., Kawasaki, T., Yuba, S., Taniguchi, Y., Kamei, Y., Tanaka, M., Naruse, K., Takeda, H., Oka, Y., Kubo, T. and Takeuchi, H.

“Analysis of the molecular and neural mechanism of female sexual preference that depends on visual information in small fish medaka” 第 17 回小型魚類研究会、三島市、東レ総合研修センター (2011 年 9 月 20 日)

(28) Hideaki takeuchi (2011 年 9 月 15 日)

“ Neural basis underlying sexual selection in medaka fish”

The 34th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society “Vertebrate brain functions elucidated in zebrafish and medaka” (横浜)

(29) Isoe, Y., Okuyama, T., Taniguchi, Y., Kubo, T. and Takeuchi, H.

“p53 mutation caused suppression of neurogenesis in the juvenile medaka fish brain.” 第 17 回小型魚類研究会、三島市、東レ総合研修センター (2011 年 9 月 9 日)

(31) 横井佐織、奥山輝大、久保健雄、竹内秀明

“Analysis of neural basis for mate

guarding behavior, using small fish medaka” 第 17 回小型魚類研究会、三島市、東レ総合研修センター (2011 年 9 月 9 日)

(31) 坪子理美、木村 哲晃、末廣 勇司、奥山輝大、島田 敦子、武田 洋幸、成瀬 清、久保 健雄、竹内 秀明

“Searching for genes affecting visually-evoked startle response properties in Medaka” 第 17 回小型魚類研究会、三島市、東レ総合研修センター (2011 年 9 月 9 日)

(32) Hideaki Takeuchi (2011 年 6 月 2 日) Invited

“Neural basis underlying female mating preference in medaka fish”

The 8th International Congress on Comparative Physiology and Biochemistry (名古屋)

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

竹内 秀明 TAKEUCHI, Hideaki

(東京大学大学院理学系研究科・生物科学専攻) 研究者番号：00376534

(2) 連携研究者

亀井 保博 KAMEI, Yasuhiro

(基礎生物学研究所・光学解析室・特任准教授) 研究者番号：70372563