

魚類社会脳の分子神経基盤の解析

Analysis of molecular bases of fish social brain

(日本動物学会学会推薦)

代表研究者 岡山大学

竹内 秀明

Okayama University

Hideaki TAKEUCHI

協同研究者 基礎生物学研究所

亀井 保博

National Institute for Basic Biology

Yasuhiro KAMEI

基礎生物学研究所

成瀬 清

National Institute for Basic Biology

Kiyoshi NARUSE

Within group-living animals, individuals appropriately tailor their attitudes and responses to other group members according to the social context and external environment. The territory between sensory input and behavioral output, which comprises the integrative circuits underlying decision-making processes, however, is vast and mysterious. To address this issue, we have focused on medaka fish, a model animal used mainly in the field of molecular genetics. Recently we demonstrated the ability to recognize conspecific individuals in medaka fish. Our aim is to describe the neural network of the integrative circuits associated with individual recognition and the decision-making (social brain) using medaka fish. To this end, we constructed a new simple behavioral system to evaluate visually-mediated proximity behavior to conspecifics, which enables us to evaluate social recognition efficiently. In addition, we used genome-editing technology and generated some medaka mutants with defects in social behaviors mediated by individual recognition. We also found that the telencephalon consists of about 40 clonal units which form compartment structure. The findings will allow us to genetically label some clonal units and make the functional map of the social brain in the medaka telencephalon. Finally, we established a new behavioral system to discuss the adaptive significance of the female mating preference for the familiar mate.

研究目的

ヒトを含むいくつかの社会性動物は他者を記憶・識別して、社会関係を理解し、社会的な意思決定を行う。このような高次脳機能は「社会脳」と呼ばれる。これまでに私たちはメダカ1の社会行動(群れ行動¹、社会的学習²、メスの配偶者選択³、オスの配偶者防衛行動⁴を定量化する行動実験系を確立した結果、メダカは魚類であるにもかかわらず、社会認知に基づく高度な社会行動を示すことを発見した。例えば、メスメダカは前から見ていたオスを視覚記憶・識別して、配偶相手として選択し、新奇なオスを拒絶する³。またメダカ集団に対して視覚刺激と給餌を連合学習させると、未学習個体が学習個体を個体識別して追従することで「社会的学習(集団形成により効率的に外界情報を学習(利用)できるようになる現

象)」が生じる²。一方で「メダカ社会脳」の分子神経基盤を解明する目的で、最初期遺伝子を用いた神経興奮の可視化技術⁵及び赤外線レーザー誘起遺伝子発現操作法⁶やウイルス⁷を利用したメダカ脳の条件的遺伝子操作法を開発した。

メダカは小型魚類であり社会行動スクリーニングがマウスと比較して格段に容易であり、変異体や遺伝子改変個体も短時間で作成できるため、行動に関わる遺伝子、神経回路を大規模に検索できるメリットがある。またメダカはマウスのような嗅覚ではなく、ヒトと同様に視覚情報を介した個体識別能力を持つため、視覚的な社会認知能力に関わる分子・神経機構の解析を世界に先駆けて可能になると期待している。これまでに、私たちは個体認知を介した配偶者選択に異常が生じた変異体を同定・解析するこ

とで、終神経 GnRH3 ニューロン及び当該ニューロンから分泌される脳内ホルモン (GnRH3) が配偶相手の好みの創出に関わることを示した²。

本研究では、将来的に大規模に社会行動スクリーニングをする目的で、メダカ社会認知能力 (同種認識、個体認知) を評価する単純な社会性行動評価装置を作製した。そして魚類「社会脳」の分子神経基盤を遺伝子レベル、脳領域レベルで包括的に解析するために遺伝子編集法によるメダカゲノム破壊、及び条件的遺伝子操作法により、細胞系譜単位でパリウム (哺乳類の大脳皮質、海馬に相当) を領域特異的に遺伝的にラベルする手法をそれぞれ開発した。

これとは別にメダカの配偶者選択の究極要因を考察するための新規行動実験系を確立した。メスメダカは前から見ていたオスを視覚記憶・識別して、配偶相手として選択する傾向があるが、その適応的な意義は不明であった。本研究では、メス・オス・オスの三者関係においては、オス同士はメスに近づぐための競争をしており、さらにライバルオスとメスとの間に割り込み行動をすることで、メスがライバルオスを記憶するのを防いでいることを示した。これによりメスは競争に勝った強いオスを記憶して、配偶相手として選択している可能性がある。

研究経過

(1) 社会認知能力 (同種認識、個体認知) を評価する単純な社会性行動評価装置の作成

本研究では生育ステージ (幼魚から成魚)、性差、魚種を問わずに視覚的な社会認知能力を定量化する行動実験系を確立した。この行動実験系の確立により、個体認知、同種認知に加え、成長に伴う社会認知能力の変化を定量できるようになった (誌上発表 1)。方法は直径の異なる二つの円形透明水槽を同心円状に配置し、外側と内側に魚を一匹ずつ入れた。2 個体の距離の経時変化を記録した結果、両者の個体間距離が短くなるよう行動 (近づき行動) することが分かった。

次に「内側の魚」と「外側の魚」のどちらが近づき行動を示すのかを調べる目的で、どちらか一方の魚の視神経を手術で切断して上記の実験を行った。その結果、「外側の魚」が盲目の時には、近づき行動を示したが、「内側の魚」が盲目の時には、当該行動を示さなかった。よって、この条件では「内側の魚」

が「外側の魚」に対して近接する行動を示すことを見出した。よって、本実験系では「内側の魚」の「外側の魚」に対する認知能力を検定できることが分かった。

次に同種認知を検定できるかを調べる目的で、外側にゼブラフィッシュをいれて実験を行った。その結果、成魚メダカは同じメダカに対しては近づき行動を示したが、異種 (ゼブラフィッシュ) には近づき行動を示さなかった。一方、稚魚メダカはゼブラフィッシュ及びメダカの両方に近づき行動を示した。このことから、メダカ社会認知能力は成長に伴って獲得される可能性がある。

さらに性成熟したメスメダカは「見知らぬオス」に対する選択的な近づき行動が、放卵前に見られたが、放卵後にはその選択性がなくなった。このことから本実験系で個体認知能力やメスの性的動機を検定できることが分かった。

(2) メダカを用いた遺伝子編集法 (TALEN 法と CRISPR/Cas9 法) と行動検定と組み合わせた社会行動に関わる遺伝子の検索

メダカ社会認知能力の遺伝子編集法は京都大学の安齋らによって 2013 年に TALEN 法が、2014 年に CRISPR/Cas9 法が確立された。私たちは安齋らとの共同研究により、メダカ社会行動に関わる候補遺伝子群のノックアウトを開始し、行動検定を行った。TALEN 法により作成したバソトシン遺伝子ノックアウトは配偶者防衛行動を示さないことを発見した⁴。さらに TALEN 法により作成したイソトシン遺伝子ノックアウトはメスの配偶者選択行動に異常があり、「見知らぬオス」ともすぐにカップルを作る異常を示した。さらにミツバチの脳の高次中枢 (キノコ体) に選択的に発現し、線虫では成長に従う軸索剪定に寄与する転写因子の脊椎動物ホモログ (Mbo-1) 遺伝子のノックアウトメダカを CRISPR/Cas9 法により作成した結果、配偶者選択行動に異常があり、「そばにいた見知らぬオス」に対する好みがなくなり、「見知らぬオス」と同様にその求愛を拒絶することを見出した。

(3) 条件的遺伝子操作法による、脳領域特異的に遺伝ラベルする手法の開発

メダカ社会認知能力の神経基盤を包括的に解析し、機能地

図を作成するためには、脳を「解析可能な有限な数の脳領域」に分割し、各脳領域と社会行動との関係を解析する必要がある。我々は、脳を「解析可能な有限な数の脳領域」に分割して解析するために、細胞系譜単位に注目した。細胞系譜単位とは一つの神経幹細胞由来に発生したニューロン群のことで、成体脳全ニューロンは細胞系譜単位の組み合わせによって構成されている。またメダカのような硬骨魚類では、稚魚から成魚になるまでに全脳において神経新生が起り、脳の細胞数は10倍近く増加すると推定されている。よって、成体脳の神経回路の多くは、孵化後に新生したニューロンによって構成されているため、私たちは新生ニューロンに注目してその細胞系譜単位の構造を解析した。これまでに、発生初期に Cre/loxP 組換えを少数の神経幹細胞で誘導し、その幹細胞に由来する新生ニューロンを可視化した結果、発生初期の神経幹細胞由来に発生した新生ニューロン群（細胞系譜単位）は成魚の終脳において区画化構造を構築することを発見している⁶。本研究では、終脳は区画化した細胞系譜単位の集合から成るという仮説を検証する目的で、細胞系譜単位の構造を体系的に解析した。方法は、神経管形成期に確率的に低頻度で Cre/loxP 組換えを誘導し、細胞系譜単位をランダムに可視化した成魚脳を大量に用意し、解剖摘出した脳を透明化して、光シート顕微鏡で終脳全体を撮影した。更に、計算的画像変形処理によって標準化脳にマッピングすることで異なるサンプル間の細胞系譜単位構造を比較し、各細胞系譜単位の位置を同定した。その結果、終脳背側（外套）は区画化された細胞系譜単位から構成され、その数は片半球40個程度あることがわかった。

(4) メスの個体記憶を介した配偶者選択の適応的意義の考察

これまでに、メダカのメスは三角関係（オス、オス、メス）において、「そばにいたオス」を視覚的に記憶して、配偶相手として選ぶ傾向があることを見出していた。一方でメダカは午前中しか産卵しないにもかかわらず、三角関係において、オスは配偶行動をしない時間帯でも持続的に配偶者防衛（ライバルオスとメスとの間の位置をキープし、両者の接近を防ぐ）を示すことを見出していた。そこで本研究では、オスは持続的な配偶者防衛することで、メスに自らの存在をアピールし、記憶されることで、

翌朝メスに性的パートナーとして選ばれるというメリットがある。一方で、メスは「そばにいた記憶したオス」を選ぶことで、競争に勝った強いオスを性的パートナーとして選択するかという仮説を検証することにした。方法は水槽を透明な仕切り2枚で3区画に分けて、左端の区画から順に、メス、オス（メスから近いオス）、オス（メスから遠いオス）を一匹ずついれて一晩置き、翌朝オスの求愛に対するメスの受け入れの程度を評価した。この条件下で、近いオスは遠いオスとメスとの間の位置をキープする配偶者防衛行動を示す。すると、「近いオス」がメスの視野を遮るため「遠いオス」を記憶できず、メスは「遠いオス」の求愛を拒絶する傾向を示した。次に、配偶者防衛を示すことができない遺伝子変異オスを「近いオス」として用いた。この場合は「近いオス」はメスのそばにいるが、メスは「遠いオス」を見ることができるので、「遠いオス」の求愛をすぐに受け入れた。このことから配偶者防衛は、メスとライバルオスとの間の位置を持続的にキープすることで、メスにライバルオスを見せず、記憶させない効果があると考えられた。このことから、少なくともメダカの三角関係においては、メスは「そばにいたオス」を記憶して選択することで、競争に勝った強いオスを選択できるメリットがあると考えられる（誌上発表2）。

考察

本研究によって社会認知を評価する単純な行動実験系を確立し、遺伝子編集法によって容易にノックアウトメダカの行動検定をできるようになった。今回同定したイソトシン、バソトシンは哺乳類ではオキシトシン、バソプレッシンに対応しており、哺乳類でも攻撃行動や養育行動、一夫一妻など広範な社会行動に関わることを示されている。メダカのイソトシン、バソトシンの研究から、脊椎動物間で保存された「社会脳」の分子神経基盤が解明されることが期待される。また本研究によって、終脳背側（外套）は区画化された細胞系譜単位から構成されることを見出し、各区画を Cre/loxP 組換えにより遺伝的にラベルすることが可能になった。外套は哺乳類の大脳皮質や海馬に対応する脳領域しており、魚類では社会認知機能に関わると予想されている。今後、各細胞系譜単位に神経毒素などを強制発現した個体を用

いて行動検定をすることで、外套の機能を脳領域ごとの包括的に解析し、その機能地図が作成する。本研究によって、メダカの社会認知の分子神経基盤を遺伝子レベル、脳領域レベルで包括的に解析するツールの整備が完了することができた。

今回は三角関係におけるメダカの配偶者選択や配偶者防衛の適応的意義を考察することができた。しかし、今回の研究は長年実験動物として研究室内で飼育・維持されている実験系統を用いているため、野生メダカとは行動・生態が異なる可能性がある。また研究室内の小型水槽を用いて実験を行っているため、個体間密度（生育空間）や障害物の存在などによって自然状態とは行動が異なる可能性がある。将来的にメダカの社会行動の進化生態的意義を議論するためには、「野生メダカ集団」を用いて野外池や大型水槽など自然環境に近い条件で行動を観察することが重要であると考えている。

参考文献

1. H. Imada *et al.*, *PLoS ONE* 5, e11248 (2010).
2. T. Ochiai *et al.*, *PLoS ONE* 8, e71685 (2013).
3. T. Okuyama *et al.*, *Science* 343, 91-94. (2014)
4. S. Yokoi *et al.*, *PLOS Genetics* 11, e1005009. (2015)
5. T. Okuyama *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 404, 453-457 (2011).
6. T. Okuyama *et al.*, *PLoS ONE*, 8 e66597. (2013)
7. T. Okuyama *et al.*, *FEBS Lett.* 584, 3545-3549 (2010)

研究の発表

口頭発表

1. 竹内秀明「メダカの恋の三角関係を生み出す分子神経機構」第23回日本行動神経内分泌研究会サテライトミーティング、KKR 仙台ホテル(仙台)、2015年9月
2. H. Takeuchi “Neural mechanism of female preference mediated by social memory” 東北知のフォーラム(Tohoku Forum for Creativity)、東北大学(仙台) 2015年9月
3. 竹内秀明「個体の記憶が異性の好みを生み出す分子神経機構」異なる動物種間での記憶回路制御機構の統合的理解による記憶回路原理の解明、

比較記憶研究会、生理学研究所(岡崎) 2015年10月

4. H. Takeuchi (Keynote Lecture) Exploring the neural geography of the social brain using medaka fish” 3rd Medaka Strategic Meeting (Flinders, Australia) 2016年2月
5. H. Takeuchi (Keynote Lecture) “Exploring the neural geography of the social brain using medaka fish” 17th Australia & New Zealand Zebrafish Meeting (Flinders, Australia) 2016年2月

誌上発表

1. Isoe, T., Konagaya, Y., Yokoi, S., Kubo, T & Takeuchi, H, Ontogeny and Sexual Differences in Swimming Proximity to Conspecifics in Response to Visual Cues in Medaka Fish, *Zoological Science* (*in press*)
2. Yokoi, S., Ansai, S., Kinoshita, M., Naruse, K., Kamei, Y., Young, L. J., Okuyama, T. & Takeuchi, H. Mate-guarding behavior enhances male reproductive success via familiarization with mating partners in medaka fish, *Frontier in Zoology* (*in press*)

謝辞

本稿で紹介した研究は、横井佐織博士、磯江泰子博士、小長谷有美さん、奥山輝大博士、安齋賢博士、木下政人博士、ラリー・ヤング博士、島田敦子博士、野中茂紀博士、中村遼平博士、武田洋幸博士、岡良隆博士、久保健雄博士との共同研究として遂行されました。本研究に参加、協力して下さった方々に心より感謝申し上げます。