

令和 2年 10月 21日

海外特別研究員最終報告書

独立行政法人日本学術振興会 理事長 殿

採用年度 2018

受付番号 201860483

氏 名

磯江 泰子

(氏名は必ず自署すること)

海外特別研究員としての派遣期間を終了しましたので、下記のとおり報告いたします。

なお、下記及び別紙記載の内容については相違ありません。

記

1. 用務地（派遣先国名）用務地： ボストン （国名： アメリカ合衆国 ）
2. 研究課題名（和文）※研究課題名は申請時のものと変わらないように記載すること。
メダカの全神経ネットワーク解析によるスペーシング行動制御メカニズムの解明
3. 派遣期間：平成 30 年 9 月 1 日 ～ 令和 2 年 8 月 31 日
4. 受入機関名及び部局名
受入機関名： ハーバード大学
部局名： 分子細胞生物学研究科

5. 所期の目的の遂行状況及び成果…書式任意 **書式任意 (A4 判相当 3 ページ以上、英語で記入可)**

(研究・調査実施状況及びその成果の発表・関係学会への参加状況等)

(注)「6. 研究発表」以降については様式 10-別紙 1~4 に記入の上、併せて提出すること。

【研究・調査実施状況】

私は 2017 年からハーバード大学のフローリアン・エンゲルト教授の研究室へ留学している。海外学振で支援いただいた 2 年間 (2018-2020 年) とその前 1 年間 (2017-2018 年) を合わせた 3 年間において、複数のプロジェクトを担当し、多くの新しい技術を学び、研究結果を得たので以下に記述する。

〔鏡を用いた社会性行動の解析〕

私たち人間を含む社会性の動物は、同じ種の他の個体との距離を測りながら生活している。例えば広場で一人ぼっちの時に、他の人を発見したら、多くの場合、人はその人に少し近づこうとし、もしその人がやたらと自分の近くに近づいて来たら不審に思い避けようとする。このように、「他個体との距離を測り、近づいたり避けたりする行動」をスペーシング行動 (spacing behavior) と言い、社会性を構築・維持する上で重要であるが、その神経メカニズムはこれまで不明であった。他人との距離を測れない発達障害の患者を調べた研究から線条体が重要であることが示唆されている。しかし、視覚的な情報からどのように距離を測り、近づく・避けるといった意思決定を行うのかといった脳全体での一連の神経回路機構は不明である。脳全体の神経機構を網羅的に調べるためには脳全体でのライブイメージング系の開発が必須となるが、マウスなど大きなモデル動物では困難である。そこで私はモデル動物の中でも脊椎動物の稚魚、特にメダカとゼブラフィッシュの稚魚に着目した。メダカは日本の童謡の「メダカの学校」の歌にあるように、他個体との距離を取りつつ群れとして集まり行動する (Schooling)。一方でゼブラフィッシュの成魚はランダムな向きで集まって群れ行動を示す (Shoaling)。このように異なる群れ遊泳行動を示す魚種間で行動様式や行動に関わる神経活動・神経回路を比較することで、より効率的にスペーシング行動に関わる神経メカニズムが明らかになると考えた。

メダカの稚魚全体の大きさは 1cm 以下でとても小さく、脳全体でのイメージングが理論上可能である。私は留学先として、すでにゼブラフィッシュの稚魚を用いたカルシウムイメージングを確立している当該研究室を選び、この一年間で以下の研究事項を遂行した。(1) 鏡を用いたスペーシング行動アッセイ・記録系・解析系の確立 (2) 当該行動の種間比較 (3) 当該行動のモデリングとシミュレーション。(4) プロジェクターを使ったアルゴリズムの検証。

(1) 行動アッセイ・記録・解析系の確立

通常、社会性行動の研究は複数の個体を用いて行われるが、本研究ではより系をシンプルにするために、鏡を用いた行動アッセイ系を確立した。上からみて正方形の水槽の壁のうち、向かい合う 1 組の壁を鏡にし、鏡に映った自分の姿に対して稚魚がどのように反応するのかを観察した。以前所属していた研究室でもメダカ成魚の社会性行動の撮影・解析を行ったが、市販のハンディカメラで撮影し、ソフトウェアを用いて解析していた。しかし、本研究では稚魚のためのアッセイ系水槽もレーザーカッターを用いて作成し、高速カメラ (秒速 100 フレームで撮影可能) ・赤外線ライトを組み込んだ行動撮影装置を自分で組み立てた。さらに魚の位置・角度をトラッキングする解析もプログラミング言語 python で作成した。このように実験系のほぼ全てを自分の手で作り上げる経験ができた。

(2) 行動の種間比較

(1) で作成したアッセイ系にゼブラフィッシュの稚魚をいれると、稚魚が鏡の間を往復する一方で、メダカの稚魚を入れると、二つの鏡の間を平行に泳ぐことを見出した。まるで、ゼブラフィッシュの稚魚は鏡に映る他の魚一匹ごとにアプローチする一方で、メダカの稚魚は両方の稚魚から一定の距離を取るように泳いでいた。この行動はまた、成魚でみられるゼブラフィッシュの Shoaling とメダカの Schooling の行動の一端が稚魚で見出されているとも推

測された。本行動は鏡の存在によって発露したので視覚依存の行動である。本行動が他個体の視覚的なイメージによって生じた行動であるかどうかを示すために、複数のコントロール実験を行なった。まず、本行動が光走性かどうかを調べるために鏡の表面をヤスリで磨耗したところ、上記の行動は再現されなかった。また、鏡が平行にあると広い空間があるように見えるため、空間によって誘導された行動かどうかを確かめるために、鏡の代わりに透明な壁にして水槽の外にも水を張って稚魚の行動を確かめたが、上記の行動は再現されなかった。以上より、本行動は鏡に映った魚の姿によって発露した行動であることが示唆された。

メダカは1ヶ月齢から成魚まで社会性行動を示すことが知られているが、ゼブラフィッシュの稚魚は社会性行動（特に他個体への近づき）を示さないのではないかと、というのがゼブラフィッシュ業界の通説であった。しかし今回、鏡を用いることで、視覚的な情報のみを抽出して見せることで稚魚の他個体への近づきをみることで世界で初めてできた。また、このように同じアッセイ系においてモデル動物魚類種間で全く異なる行動出力が見出されたのも驚きであった。本実験は孵化してすぐの個体を用いて研究しているため、本行動の違いは遺伝的に決定された神経回路によって生み出される違いと推測された。この結果は、同じ視覚情報に対して二種が異なる意思決定を行うことを示している。次に本行動を生み出すアルゴリズムについてモデリングを行なった。

(3) 当該行動のモデリングとシミュレーション

当該研究室で初めて学んだことのひとつが、「面白いロバストな行動を発見し記述したら、次にその行動が生じるアルゴリズムを考える」という研究戦略である。これはコンピュータショナル・ニューロサイエンスの分野で David Marrが1982年に考案した研究戦略で、『(Level 1) 行動の意味は何か、(Level 2) 行動を生むアルゴリズムは何か、(Level 3) そのアルゴリズムを実装する生物装置は何かという、3つのレベルで行動を解析するべきである』という考え方に則っている。本行動は鏡で発露したので視覚に基づいた刺激であるから、鏡に映った他個体の姿が網膜のうちどの部位をどれだけ占めると、どのような確率で個体が方向転換するか、という論理の元、モデリングを行なった。方向転換の確率は実際の稚魚の方向転換の確率分布に従った。ゼブラフィッシュ、メダカ共に稚魚の位置（鏡に対する距離）と稚魚の頭の方向（角度）に基づく右目・左目の視野の占拠率を計算し、どのような意思決定ルールがあれば行動が再現できるかを考え、シミュレーションを行なった。その結果、ゼブラフィッシュは視野前方に注意を向け、視野が小さく占拠されているときは前進し、視野が大きく占拠されると方向転換し、一方でメダカはobjectが視野の真横に存在するように動くことでobjectに対し平行に泳ぎ、両目の視野の占拠率の差が小さくなるように泳いでいるというルールを仮定するとシミュレーションにて鏡で誘発される行動が再現された。

(4) プロジェクターを使ったアルゴリズムの検証

(3)で見出したアルゴリズム（ルール）が正しいかどうか確かめるためには、人工的に作成した視覚的な刺激に対して稚魚が実際にアルゴリズムに従って泳ぐかどうかを検証すればよい。当該研究室では、稚魚の泳ぐ空間の底に視覚的な刺激を投影し、その刺激に対してどのような反応を見せるかを解析する実験が多く行われている。赤外線、底からのプロジェクション、カメラのセットが8セット揃って8匹同時に行動観察できるアッセイ系がすでに存在する。しかし、社会性行動においては底からの視覚刺激ではなく魚と同じ高さの視覚刺激に対して応答するだろうと考え、横からの視覚刺激の投影が可能かどうかを検証した。そこで、鏡を利用して底に投影装置を置いて壁に投影する系を確立した。稚魚の遊泳する水深を測定し、魚の視覚刺激を的確な位置へ投影するプログラムをコーディング中である。

【グローバルモーションへの応答に関する種間比較】

人間を含む多くの動物は生きる上で必然的に体を動かすが、動きに伴って感覚情報の入力を常に処理することが必須となる。例えば、体を動かしたり頭、あるいは視線だけ動くときに、視野全体に映る画像（シーン）は、個体の体・頭・目の動きと逆方向に大きく移動する。このような視野全体のシーン移動はグローバルモーションと呼ばれる。グローバルモーション

ョンを処理しなければ動物は上手に移動することができず、グローバルモーションの知覚は生きる上で重要な機能である。生物の生息するそれぞれの環境によってグローバルモーションは異なることが予想され、生物の脳進化を理解する上で多様な環境へのグローバルモーションの知覚の適応は重要であるがこれまで比較を主とした研究はなされてこなかった。

過去にはグローバルモーションは、人間・猿・マウス・ゼブラフィッシュを含むモデル動物で研究されてきた。特にゼブラフィッシュ稚魚では当研究室で2種類の視覚的刺激（縞模様、ドット模様）を用いてグローバルモーションを処理する脳領域の同定が近年行われた。ゼブラフィッシュは自然界では流れの少ないあまり澄んでいない水域で生息している一方、メダカを含む多くの魚が澄んだ水域で生息していて、グローバルモーションが異なる可能性が高いと予想した。ゼブラフィッシュとメダカは3億年前から分岐しており、異なる生息地でそれぞれ進化した魚がどのようにしてグローバルモーションを処理しているのか、そこに種差が存在して神経回路の違いも存在するのかわかるために研究を進めた。本研究のように、生息地の環境とグローバルモーションの種差の行動学的知見は少ない。進化行動学において新たな分野を切り拓くことが期待される。

実験としては先述の2種類の視覚的刺激（縞模様、ドット模様）をメダカとゼブラフィッシュに見せて応答を統計的に解析した。結果として、メダカはドット模様の寿命が短いと認識できず、一方でゼブラフィッシュはドット模様の寿命が短くても認識できることがわかった。人間や猿においても寿命の短いドット模様を用いて、ドットが移動しているように認識できる。このような認識の違いは、視覚的刺激をどのような時間軸で処理しているかに依ると予想される。つまり、人間や猿では目のサッカードが常に起きていて、目が動いている間は視覚的刺激を脳で処理しない。一方でゼブラフィッシュではバウトスイミングと言って0.8Hzの断続的な泳ぎ方をしており、体を動かす100msの間には入力が抑制されている。つまり、人間や猿のような断続的な入力を処理している。しかし、メダカは継続的な水泳を行い、視覚的な刺激の入力が遮断されることがないと推測される。このような入力情報処理の時間差の違いに起因して、模様の有効性の種差が生じたのだと考えられる。

現在は以上の仮説をもとに、脳イメージングでグローバルモーションに関与する神経回路を明らかにする目的で実験を進めている。ゲルに体半分を埋めて尻尾が動く状態の稚魚に、同様の模様を見せて尻尾が動く方向を観察している。さらに、以下で述べる遺伝子改変システムを用いて、近い将来に脳イメージングを行う。

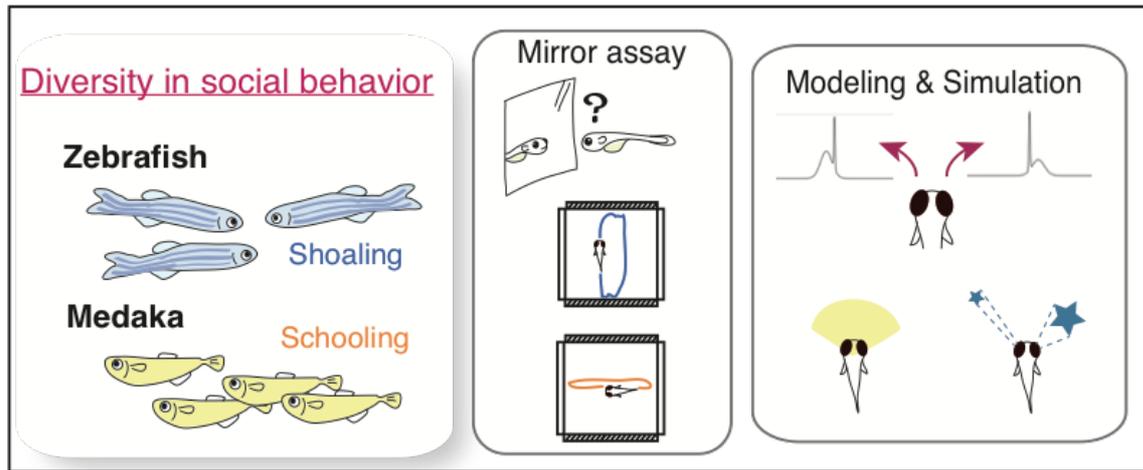
〔遺伝子組換えシステムの確立〕

行動中の神経活動をライブでイメージングする目的でメダカの遺伝子組み換えシステム（HuC:GCaMPシステム）の確立を行なっている。当研究室はwetな実験系をやっている人がほとんどいないので、大学内の同じ建物で別の階にある、同じくゼブラフィッシュを使って主に発生学に従事している Schier 研究室との共同研究でプラスミドを作成した。共同研究先のMark Fishmanラボと共に現在作出し、現在当該遺伝子組み換えシステムを用いた脳イメージング実験を行う準備をしている。

〔種間での脳解剖学比較〕

当該研究室ではゼブラフィッシュ神経系の網羅的な構造解析と遺伝子発現解析を目的として、近年、稚魚の神経アトラスが整備された(Randlett 2015)。さらに電子顕微鏡を用いた超細部の構造解析が行われた(Hildebrand 2017)。将来的にゼブラフィッシュとメダカの神経回路を比較するためにはメダカ稚魚の神経構造を明らかにする必要があると考え、ゼブラフィッシュの神経アトラスを作成したのと同じ条件でメダカの全神経細胞の可視化をtERK抗体を用いた免疫染色によって行い、複数匹の神経構造を共焦点顕微鏡で観察して平均像を作成した。ゼブラフィッシュとメダカでは大まかな脳領域は似ているが異なる構造の解剖学的領域がある。現在は Zuse Institute BerlinのVohra Sumit Kumar研究員の協力を得て、詳細なメダカ稚魚の脳アトラスを作成中である。

将来的には行動中に神経発火する脳領域を神経アトラスに照らし合わせ、種間で神経回路の網羅的が比較解析を行う。



【成果の発表・関係学会への参加状況】

本研究の成果について The Japan-US Science Forum in Boston でポスター発表した。また所属研究室が主催するリトリート兼学会 (NeuroTuscany、イタリア) にて口頭発表を行った。その後、ドイツを訪れ、ケルン大学でセミナーを行った (UNIVERSITÄT ZU KÖLN, ドイツ)。

当研究室の卒業生 (多くが卒業の後に自分の研究室を主催している)、また共同研究者やゼブラフィッシュ関連の研究者が 頻繁に研究室を訪れ、研究を議論し友人になる機会に大変恵まれている。