

# 論文内容の要旨

## 論文題目

Neuroethological analysis of the mechanisms underlying  
the optomotor response of medaka

メダカの視運動反応の基盤となる機構の神経行動学的解析

氏名 末廣 勇司

多くの動物は動的に変化する視覚情報、例えば景色の変化や仲間の動きに対して、適応的に応答する能力をもつ。外界で動く縞模様に対して追従応答を示す視運動反応もその1つで、自然界において周囲の仲間の動きをもとに群れ行動を示したり、水流や気流に流されないよう視界の変化を打ち消すように動く応答を反映したものと考えられている。この行動は多様な動物種で観察され、特に脊椎動物では魚類を用いた研究が進んでいる。神経行動学分野において、これまで視運動反応は主に視覚や運動能力を測るアッセイ系として利用されてきた。こうした研究の結果、終脳や視蓋、中脳にある脊髓投射神経等が視運動反応に関わると予想されている。また、従来の研究は縞の速度が一定の静的な条件で魚の挙動を調べたものであった。そこで私は、動的に変化する外界の視覚情報に対する適応的応答の神経・行動学的機構を解析する目的で、視運動反応中に縞の速度を変化させ続ける条件での行動を、メダカ (*Oryzias latipes*) を用いて解析した。メダカは視運動反応時に高い精度で縞とほぼ同じ回転速度で泳ぐことから、視覚情報に対する適応的な応答能力が高いと考えられ、また遺伝学を併用した神経科学的な解析にも利用出来るという利点がある。

私はまず、縞の回転速度を制御できる装置と、視運動反応の動画からメダカと縞の位置・体軸方向を抽出するプログラムを作成した。これを用いて縞の回転速度を正弦様に変化させ、メダカの応答を調べた。以後、縞とメダカの回転速度を以下の4つのパラメータからなる式で表す。

$$\text{回転速度} = \text{振幅} * \sin(2\pi t / \text{周期} + \text{初期位相}) + \text{平均速度}$$

これまで視運動反応中に縞の回転速度を変化させた例はない。このため、私はまず周期 10 秒、振幅と回転速度が 25, 135 deg/sec の速度変化を起こし、メダカが縞に追従できるかを調べた。その結果、縞の回転速度変化に応じてメダカも回転速度を正弦波様に変化させて追従した (図 1)。なお近似曲線は、メダカや縞の回転速度の実測値を式 (1) の形で表せるように、4 つの回転速度パラメータをフィッティングさせて得た正弦波として示している。この結果はメダカの視運動反応系が、従来のような単なる視覚能力や運動能力の確認のためのアッセイ系としてだけでなく、動的に変化する背景の動きに対する適応的な応答を調べる系としても利用できること意味する。

さらにこの応答が、高頻度で速度が変動する縞の動きに対しても見られるか調べるために、1-10 秒の様々な周期で縞の回転速度を変化させたときのメダカの回転速度を、式 (1) で近似したときの振幅と平均速度について調べた。その結果、メダカはどの周期で縞の回転速度が変動しても、縞とほぼ変わらない平均速度で泳ぐことを見出した (図 2b)。一方、メダカの回転速度の振幅は 10 秒周期では縞とほぼ同じ値を示したのに対し、周期が短くなるにつれて有意に減少することが分かった (図 2a)。フィッティングした振幅の値の減少は、メダカの回転速度が正弦波様の変動を示さなくなったことに起因すると考えられる。以上の結果は、メダカが高頻度で速度を変える縞の動きに対して、平均的には追従可能であるものの、縞と同じように速度を変動させて追うことはできなくなったことを示している。

こうした縞の速度変化の周期に応じたメダカの応答の変化について考察する上で私は、メダカの回転速度の変化が旋回と速度の調節の結果として生じることを踏まえて、10 秒周期で縞の速度が変化するときメダカが縞の動きに対してどのようなタイミングで旋回と速度を調節していたのかを調べた。このとき、

$$\text{速度 or 旋回} = \text{振幅} * \sin(\text{縞の回転速度位相} + \text{遅延}) + \text{平均量}$$

として速度や旋回を近似することで、縞の回転速度変化に対して、速度や旋回がどのくらい遅れて変化するかを求めた。まず旋回 (図 3a) については、縞の回転速度の変化 1 周期分 (緑線) に対し、旋回の変化の近似曲線 (赤線) は 150 msec ほど遅れていることが分かった。一方、速度 (図 2 b) については、縞の回転速度の変化 1 周期分 (緑線) に対し、速度は 500msec ほど遅れて変化する (赤線) ことが分かった。

修士課程において私は、縞の速度がメダカの遊泳速度に比べて十分に速いとき、メダカは通常の遊泳で示す緩やかな加速に加え、急な加速をすることでパルス状の速度を示すことを見出している。そこで、縞の回転速度の振幅を 60 deg/sec に設定して急加速を生じやすい条件でメダカの視運動反応を誘導し、250 msec 毎にパルス状の速度が生じた回数を数えた。その結果、図 2c に示しように、縞の回転速度の変化 1 周期分 (緑線) に対し、急加速の回数 (青いヒストグラム) も 500msec ほど遅れて増加することが分かった。高速度カメラで撮影したメダカの動きから、1 回の旋回 (体軸方向の変化) や加速 (尾びれの振動) にかかる時間はおよそ 100 200 秒であったため、こうした速度応答では、メダカがあえて遅延を伴って鈍感に反応している可能性がある。また、高頻度で縞の速度を変化させたときの結果と合わせて、メダカはある時点での縞の動きに追いつくよりも、一定時間の縞の動きをもとに速度調節をしている可能性が考えられる。自然条件でも、水流が時間や場所により不意に変動したり、群れの仲間の一部が突発的に動くことはあるであろう。このとき、メダカは高頻度の視覚情報変化に対してあえて速度応答を抑えることで、過剰なコストをかけることなく、流れの中でロバストに定位し続けたり、仲間と協調して動くことができるのかもしれない。以上、今回の実験系を用いることで、速度の遅延時間や、メダカが縞と同様の正弦的な動きを示すことができる臨界周期を抽出出来た。これは、一定の速度で縞を回転させる視運動反応系では抽出出来なかった、動的な視覚情報変化への適応能力を調べられる表現型であると考えられる。

視運動反応から新たに抽出した速度遅延やメダカの正弦的応答の臨界周期を決める神経基盤を探索するため、これまで視運動反応に関わるとされてきた領域を含む神経系に機能障害を与えた際の視運動反応の

解析を試みた。そのため脳の物理的除去などを行ったが、死亡率が高いという問題があった。そこで私は侵襲性の低い方法として、アデノウイルスベクターによる遺伝子導入系を介した神経機能修飾を試みた。ヒトアデノウイルスベクターは、これまでマウスやトリなど他の動物種で一般的に用いられているが、魚類の脳 (*in vivo*) への応用例はない、そこでまず、アデノウイルスの感染が起こるか調べた。メダカ稚魚の中脳脳室内に、ユビキタスプロモータの下流に lacZ をもつウイルスを注入し、1週間後に X-gal 染色を行った。その結果、コントロール (溶媒注入) と比べて終脳や中脳脳室周辺、小脳前端部などで gal のシグナルが見られた (図 4) ことから、ウイルスの感染と外来遺伝子の発現が確認できた。さらに、cre を発現するウイルスベクターを、loxP サイトを持つトランスジェニックメダカに注射し、リポーター遺伝子の蛍光波長によってウイルスの感染、および cre-loxP 組み換えが起こることも同時に確認した。この手法を用いることで、今後 cre を発現するウイルスと、loxP サイトの下流に神経興奮抑制性のカリウムイオンチャンネルをもつトランスジェニックメダカ (作成済み) を組み合わせることで、神経系の機能修飾が可能になると期待される。

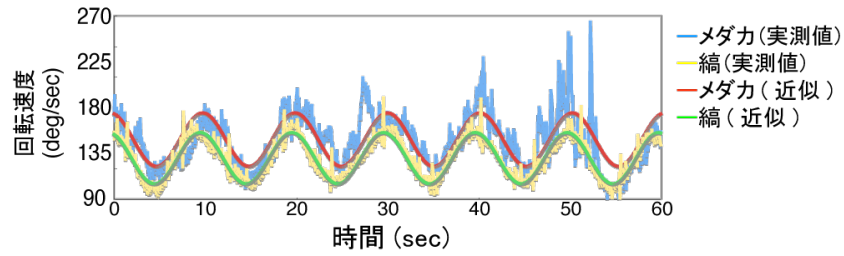


図1 正弦波様に速度が変化する視運動反応系でのメダカと縞の回転速度変化

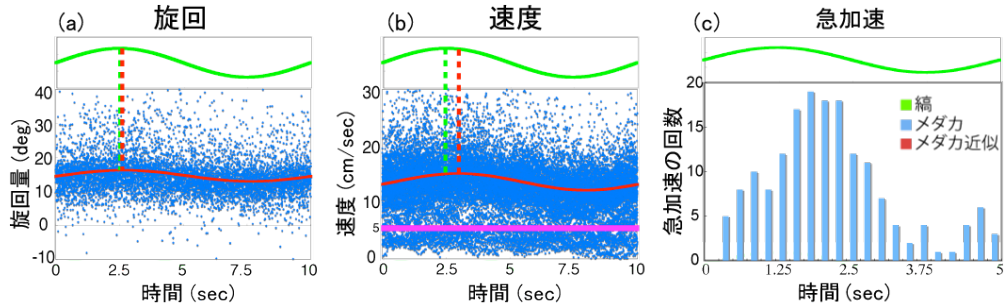


図2 縞の回転速度周期を変化させたときの応答

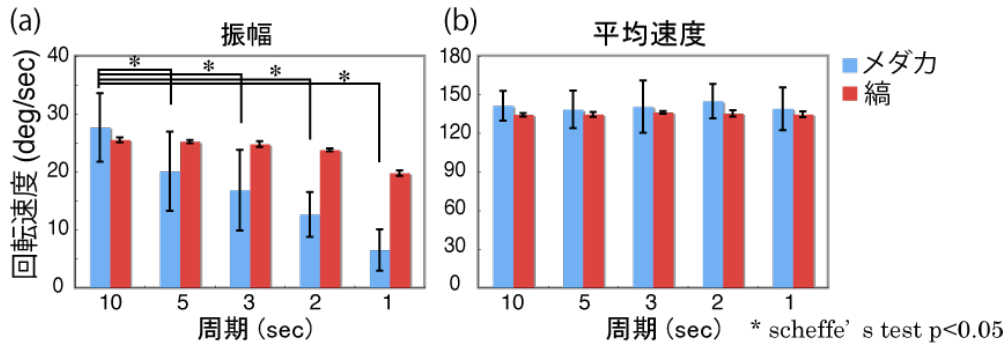


図3 縞の動きに対する旋回・速度の遅延

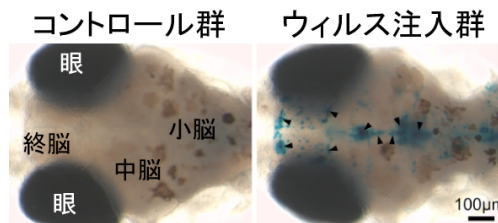


図4 アデノウィルスの感染確認