受賞者総説

魚類中枢神経系の発達と機能に関する生理学的研究

(平成 15 年度日本水産学会賞進歩賞受賞者)

植 松 一 眞*

(広島大学大学院生物圏科学研究科)

Developmental and functional physiology of the fish central nervous system

KAZUMASA UEMATSU*

Graduate School of Biosphere Sciences, Hiroshima University, Higashi-Hiroshima, Hiroshima 739-8528 Japan

脳は動物の生命活動の根幹であり、行動の源でもある。脳の解明と理解は、先進的な増養殖技術、例えば自発摂餌システムの開発や、種苗性に優れた品種の育種などに必要と考えられる。しかしながら、魚類生理学全般の中で、魚類の中枢神経系に関する研究は著しく立ち遅れていた。そこで、筆者らは魚類、特に真骨魚類の脳と脊髄に着目し、その形態形成過程と遊泳運動の神経機構を中心とした課題に取り組み、一連の成果を得た。そもそも、この研究を始める動機は筆者のサケ *Oncorhynchus keta* の放卵機構の研究にあった。すなわち、筆者の博士号取得までの研究により、サケは全体側筋の同時収縮により産卵に必要な力を発生することが明らかになった。遊泳時の波状運動、産卵時の同時収縮、これが同じ体側筋により行われるには、中枢から脊髄に異なる司令がもたらされねばならない。しかし、当時、筆者には遊泳の神経機構はもちろん、魚の脳や脊髄に関する知識はまったくなかった。このレベルから始まった、これまでの研究の概要は以下の通りである。

1. 仔稚魚における脳の形態形成過程と行動の発達

海産仔稚魚の行動や感覚系の発達に関する研究は、福原 修,¹⁾ 川村軍蔵²⁾ や田中 克,³⁾ 各氏をはじめとする日本の水産学研究者による先進的な優れた研究が多数ある。しかし、脳の発達の研究はほとんど手つかずの状態であった。海外で行われた関連する研究の多くは淡水魚を対象とし、かつ脳の特定領域しか観察していない。⁴⁾

まずはじめに筆者らは、有用海産魚のうちマダイ *Pagrus major* などの仔稚魚を材料とし、飼育魚における脳の発達過程を把握するとともに、脳領域の相対体積の推移を比較した。⁵⁾ 脳各部の相対体積の変化と分化発

達過程の観察から、海産仔稚魚において脳各部の分化が完了するのは移行期に相当する 30 日齢前後であり、各種機能が急速に向上する時期は 40~50 日齢であることが示唆された。以上より、どの種でも初期の摂餌に必須と考えられる視覚系が先行して発達し、稚魚への移行期までに感覚系と運動系に関わる基本的な脳構造が整うことを初めて明らかにした。⁵⁾ また、高度不飽和脂肪酸を添加した餌料を与えることにより、ヒラメ *Paralichthys olivaceus* 稚魚の運動の調節や内耳側線感覚に関わる領域発達が促進されることが示唆された。⁶⁾ ブリ *Seriola quinqueradiata* でも、これらを含む餌料を与えることにより、小脳の発達が促進され、群行動の発現も早まることが示された。⁷⁾ 一方、ウナギ *Anguilla japonica* 脳の形態形成過程を全長 10~30 mm のレプトケファルス幼生(仔魚)・シラスウナギ(稚魚)・幼魚・成魚で調べたところ、仔魚は沿岸性魚類と同じく視覚に優れるものの、稚魚や成魚はそれらとは異なり嗅覚と前庭側線感覚に優れていると推察された。⁸⁾

2. 仔稚魚における脊髄ニューロンの分化と行動の発達

真骨魚類の脊髄ニューロンの分化過程に関する研究は、キンギョ *Carassius auratus*⁹⁾ やゼブラフィッシュ *Danio rerio*^{10,11)} を用いて 1980 年代に集中してなされた。しかしながら、この時点では、脊髄ニューロンの分化と行動の発達との関係は明らかではなかった。また、ニューロン活動の変化などの電気生理学的な研究もなかった。そこで、筆者らはエンゼルフィッシュ *Pterophylum scalare* 脊髄内運動ニューロンの分化発達過程を HRP などの逆行性神経トレーサーを用いて調べ、孵化直後は大型の一次運動ニューロンと呼ばれる少数の大型

* Tel : 81-82-424-7943. Fax : 81-82-424-7943. Email : uematuk@hiroshima-u.ac.jp

運動ニューロンのみが体側筋を支配し、その後数日以内に小型の二次運動ニューロンが多数分化し、筋支配に加わることを見出した。^{12,13)} 孵化直後の単調な屈曲運動は一次運動ニューロンのみにより制御されているのに対し、成長に伴い発達する波状運動は一次および二次運動ニューロンの協調により発現すると考えられた。実際、リズム生成回路を形成する介在ニューロンからの入力の場合である運動ニューロンの樹状突起は孵化後一週間目頃から急速に発達し広がり、¹³⁾ 運動ニューロンの電気的活動は10日目頃にならないと成魚型の安定したものにならない。¹⁴⁾ さらに、脊髄内運動ニューロンは孵化後3日目までに成魚での定数よりも過剰に分化するが、その後数週間内にアポトーシスにより定数まで減少することを初めて証明した。¹⁵⁾

全長約20 mmのウナギの仔魚においても、一次と二次の運動ニューロンが識別され、シラスウナギになってもその関係や位置は維持されるものの、一次運動ニューロンは顕著に大型化する。^{16,17)} さらに、体表の機械的感覚を司る背根神経節が、仔魚でも稚魚でも同じ脊髄の腹側方に位置することを確認した。^{16,17)} これらから、ウナギの仔魚は餌を視認し、巧みに捕えることができるのではないかと推察される。

3. 遊泳運動の神経基盤

魚類の代表的な遊泳の様式である躯幹部の波状運動が成立するための前提は体節構造である。体節構造は体側筋では筋節として表れ、さらに脊髄内のニューロンの配列にも反映し、脊髄には一つの筋節に対応する単位である脊髄セグメントがある。各脊髄セグメントからは左右1本ずつ脊髄神経が出る。脊髄神経は、背根から脊髄に入る感覚性の神経線維と腹根から出る運動ニューロンの軸索とからなる、脊髄の出入力経路である。⁹⁾

遊泳するときには、進行方向がわの筋節ほど先に収縮し、同じレベルの左右の筋節は交互に収縮する。この結果生じる波状運動により、魚は水を後方に押しやり推進力を得る。ある筋節が単位時間に収縮する回数を遊泳のリズムという。リズムは脊髄にある中枢内リズム生成回路 (central pattern generator, CPG) で作られると考えられる。

ヤツメウナギ類や両生類 *Xenopus laevis* 幼生の単離した脊髄においてCPGを構成するニューロンの同定が試みられた。その結果、CPGは各脊髄セグメントに一对一つあり、個々のCPGは少なくとも二種類の介在ニューロンからなることが分かった。それらはグルタミン酸作動性の興奮性下降介在ニューロンとグリシン作動性の抑制性交差介在ニューロンである。間接的な証拠から真骨魚のCPGも同様の仕組みをもつと考えられる。すなわち、脊髄内にはグリシンを神経伝達物質とするニ

ューロンが多数あること、¹⁸⁾ 逃避行動を司る延髄のマウスナー細胞に接続する脊髄ニューロンにはCPGの交差介在ニューロンや下降介在ニューロンと同じ形態的特徴と伝達物質を持つニューロンがあること、¹⁹⁾ などである。適当な賦活入力があれば、これらのニューロンからなるCPGは左右交互の律動のリズムを生成する。その入力の一つが、脳からの司令である。

Kashin らはコイ *Cyprinus carpio* の中脳に電気刺激を加えると遊泳運動を誘発することを示した。²⁰⁾ 筆者らはこれらの研究を受け、コイの中脳全域を対象として、まんべんなく微小電気刺激あるいはグルタミン酸を用いた微小化学刺激を行った結果から、遊泳運動開始信号の起始核は内側縦束核であると結論した。^{21,22)} すなわち、内側縦束核のニューロンはすべての脊髄セグメントのリズム生成装置と側枝で連絡することにより、脊髄の全レベルを同時に活性化するものと考えられた。

体重100 g程度のコイの内側縦束核に存在するニューロンの総数は500個程度であり、神経核全体は幅1500 μm 、長さ800 μm 、高さ600 μm くらいの、鳥が両翼を広げたような左右対称の形である (未発表)。脊髄のCPGを活性化し遊泳運動を引き起こすニューロンは興奮性の神経伝達物質をもつと考えられた。そこで、コイの脳切片を抗グルタミン酸抗体で免疫染色したところ個体あたり約400個のニューロンが染色された。さらに、神経トレーサーを頸部脊髄に注入すると、内側縦束核には脊髄に軸索を伸ばすニューロン (脊髄投射ニューロン) が400個以上標識された (未発表)。したがって、投射ニューロンのほとんどは代表的な興奮性神経伝達物質であるグルタミン酸を持つと考えられる。この事実は内側縦束核が脊髄のCPGを賦活することと完全に符合する。

魚類の脳ニューロンと脊髄ニューロンとの接続を直接確認した例は、これまでキンギョのマウスナー細胞の軸索と、脊髄運動ニューロンおよび下降介在ニューロンとの関係しかなかった。²³⁾ そこで、筆者らは2種類の神経トレーサーを用い、一つはコイの内側縦束核に注入して内側縦束核ニューロンの軸索を順行性に標識し、もう一つは同じ魚の体側筋に注入して脊髄運動ニューロンを逆行性に標識することを試みた。その結果、脊髄に投射する内側縦束核ニューロンの軸索はほぼセグメントごとに側枝を出し、運動ニューロンに終末することが確かめられた。また、同様に内側縦束核ニューロンの軸索を順行性に標識し、一方、抑制性介在ニューロンをグリシンとGABAに対する抗体を用いて標識したところ、内側縦束核ニューロンの軸索側枝がやはりこれらの介在ニューロンに終末していることを示唆する結果を得た (未発表)。

神経系だけの仮想的遊泳においても、自由遊泳におい

でも、遊泳中に持続的にスパイクを発する tonic ニューロンと、遊泳のリズムに同期して間欠的にスパイクを発する phasic ニューロンが観察された。²⁴⁾ 個々のニューロンの活動様式は実験中に変化することはなかった。したがって、内側縦束核には活動様式の異なる複数の遊泳に関わるニューロンの存在することが示唆される。tonic ニューロンは、ヤツメウナギ²⁵⁾や両生類幼生²⁶⁾の場合と同様、脊髄 CPG のすべてのニューロンにグルタミン酸受容体を介して興奮性のドライブ（入力）をかけると考えられる。これに賦活されて CPG がリズムを生成するのであろう。上述したように、tonic ニューロンは脊髄内を下降しながら、すべてのセグメントにおいて側枝を出して、そのセグメントの CPG ニューロンにシナプスすると考えている。

4. 魚類小脳の役割

哺乳類の小脳はスキル上達など運動学習に深く関わり、さらに最近では情動や認知など、高次の機能にも関係していることが分かってきた。²⁷⁾ しかしながら、真骨魚類は両生類や円口類に比べ、相対的に格段に大きな小脳を持ちながら、高次機能への関わりはもちろん、魚類の小脳体を切除しても運動はほとんど障害されないなど、運動制御に果たす役割さえ、ほとんど知られていない。²⁸⁾ また、小脳から小脳外の脳領域に情報を伝えるニューロンは四足動物小脳ではプルキンエ細胞であるが、真骨魚では同じくプルキンエ細胞層に分布する広樹状突起細胞であると言われるが実証されていない。そこで、筆者らは魚類小脳の機能を解明する第一段階としてキンギョ小脳の出力系を解析した。

真骨魚小脳は小脳体、小脳弁（内側葉と外側葉）、vestibulolateral lobe からなる。これらのうち主要な構造である小脳体および小脳弁からの出力線維を、神経トレーサーであるビオチン化デキストランアミン（BDA）を用いて順行性標識することによって解析した。²⁹⁾ キンギョの小脳体と小脳弁内側葉に BDA を投与した結果、標識された軸索の大半が小脳結合腕を通り対側に向かい、中脳では小脳弁外側核、中脳被蓋背側核、内側縦束核、赤核、視蓋、半円堤に終末した。間脳では、視床核や下葉、視蓋前域の神経核などに標識された軸索および終末が観察された。小脳弁外側葉からは小脳弁外側核、下葉、迷走葉、小脳体へ投射し、下葉への投射は局在性がみられた。これらの結果、小脳体と小脳弁内側葉からの出力は共通することが多いことが示唆された。²⁹⁾ これらは感覚情報のフィードバックや運動の調節に関与するのではないかと考えられる。また、視床への投射はより高次の機能への関与を示唆する。これらと小脳弁外側葉からの投射経路は全く異なっており、異なる機能を担う可能性が示唆された。

小脳体の広樹状突起細胞のみを逆行性標識してその形態を観察した。標識された細胞は大きな細胞体と複数の太い樹状突起を持ち、これから分岐した細い突起が分子層へと広がるのが観察された。このような樹状突起の広がり横断切片では観察されない。さらにこれらの結果をゴルジ染色を施した小脳体の標本を比較した結果、プルキンエ細胞層に存在し、1本の太い樹状突起を持ち、細胞体がしずく型のニューロンがキンギョ小脳体のプルキンエ細胞であることが明らかとなった（未発表）。

抗体、各種抗体を用いてキンギョ小脳体プルキンエ細胞層のニューロンの細胞体が標識し、続いて、小脳体基部から逆行性標識された広樹状突起細胞に免疫染色を施し、二重染色を行った。その結果、すべての広樹状突起細胞は抗 GABA 抗体と抗 zebrin-Ⅱ 抗体に対して陰性であり、その約半数がアスパラギン酸陽性であった。また、逆行性標識された広樹状突起細胞の周囲を zebrin-Ⅱ 陽性の線維が囲んでいるのが確認された。以上の結果より、一部の広樹状突起細胞はアスパラギン酸を伝達物質として興奮性の刺激を他の脳領域に送り、その活動はプルキンエ細胞からの GABA を伝達物質とする抑制性の神経支配を受けている可能性が示唆された。これは、四足動物におけるプルキンエ細胞と小脳核ニューロンの関係と同じである（未発表）。

5. 魚類の神経科学研究のためのツール開発（*in situ* hybridization とウイルストレーサー）

キンギョの脳から抽出した mRNA を鋳型にして、神経伝達物質であるアセチルコリンの合成酵素（choline acetyltransferase, ChAT）と、最初期遺伝子 *c-fos* の cDNA をクローニングした。ChAT の cDNA を元に作成したプローブを用いて *in situ* hybridization (ISH) を行い、アセチルコリンを伝達物質とする脊髄運動ニューロンなどの細胞質に、mRNA の発現を示す特異的な発色が現れることを確認した。このプローブは、おそらくすべてのコリン作動性ニューロンの簡便なマーカーとして用いることができる。また、同様にして、*c-fos* の mRNA に対するプローブを用いた ISH を行うことにより、遊泳や視覚など、特定の行動の背景にあるニューロンや感覚情報の中継に関わるニューロンを同定しうることを確認した。今後、記憶の場や、運動プログラムの収納形態などを特定するために活用されることを期待したい。

魚類の神経壊死症原因ウイルスが、神経回路網の解析のための transneuronal tracer として有効であることを確認した。すなわち、エンゼルフィッシュの眼球内に注射したウイルスは網膜のニューロンに取り込まれた後、視神経を経て視覚の一次中枢である視蓋のニューロンにシナプスを越えて移ることが、免疫組織化学により証明

された。³⁰⁾

謝 辞

本研究のきっかけとなった研究テーマを与えていただいた日比谷 京先生、公私にわたりご指導いただいた羽生 功先生、山森邦夫先生、會田勝美先生、研究手法をていねいに教えてくださった諸先輩の方々、広島大学で私の研究を見守りかつ励ましていただいた村地四郎先生と難波憲二先生に深く感謝申し上げる。同僚の吉田将之助教授との毎朝の議論から多くのアイデアが生まれ、新たな研究が展開した。特に、心から感謝するとともに、今後の共同研究の発展を希望する。また、一緒に研究した多くの学生諸君と共同研究者の方々に厚くお礼を申し上げます。

文 献

- 1) Fukuhara O. Functional morphology and behavior of early life history of red sea bream. *Nippon Suisan Gakkaishi* 1985; **51**: 731-743.
- 2) Kawamura G, Ishida K. Changes in sense organ morphology and behaviour with growth in the flounder *Paralichthys olivaceus*. *Nippon Suisan Gakkaishi* 1985; **51**: 155-165.
- 3) Tanaka M. Factors affecting the inshore migration of pelagic larval and demersal juvenile red sea bream *Pagrus major* to a nursery ground. *Trans. Amer. Fish. Soc.* 1985; **114**: 471-477.
- 4) Brandstatter R, Kotschal K. Life history of roach, *Rutilus rutilus* (cyprinidae, teleostei). A qualitative and quantitative study on the development of sensory brain area. *Brain Behav. Evol.* 1989; **84**: 35-42.
- 5) Toyoda J, Uematsu K. Brain morphogenesis in the red sea bream *Pagrus major*. *Brain Behav. Evol.* 1994; **44**: 324-337.
- 6) Furuita H, Takeuchi T, Uematsu K. Effects of eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids on growth, survival and brain development of larval Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Aquaculture*. 1998; **161**: 269-279.
- 7) Ishizaki Y, Masuda R, Uematsu K, Shimizu K, Arimoto M, Takeuchi T. The effect of dietary docosahexaenoic acid on schooling behaviour and brain development in larval yellowtail. *J. Fish Biol.* 2001; **58**: 1691-1703.
- 8) Tomoda H, Uematsu K. The morphogenesis of the brain in larvae and juveniles of the Japanese eel, *Anguilla japonica*. *Brain Behav. Evol.* 1996; **47**: 33-41.
- 9) Fetcho JR. The organization of the motoneurons innervating the axial musculature of vertebrates. I. Goldfish (*Carassius auratus*) and mudpuppies (*Necturus maculosus*). *J. Comp. Neurol.* 1986; **249**: 521-550.
- 10) van Raamsdonk W, Mos W, Smit-Onel MJ, van der Laarse WJ, Fehres R. The development of the spinal motor column in relation to the myotomal muscle fibers in the zebrafish (*Brachydanio rerio*). I. Posthatching development. *Anat. Embryol.* 1983; **167**: 125-139.
- 11) Westerfield M, McMurray JV, Eisen JS. Identified motoneurons and their innervation of axial muscles in the zebrafish. *J. Neurosci.* 1986; **6**: 2267-2277.
- 12) Yoshida M, Fudoji M, Sakamoto H, Uematsu K. Posthatching development of spinal motoneurons in the angelfish *Pterophyllum scalare*. *Brain Behav. Evol.* 1999; **53**: 180-186.
- 13) Sakamoto H, Yoshida M, Sakamoto T, Uematsu K. Development of the myotomal neuromuscular system in embryonic and larval angelfish, *Pterophyllum scalare*. *Zool. Sci.* 1999; **16**: 775-784.
- 14) Yoshida M, Matsuura K, Uematsu K. Developmental changes of the swimming behavior and the underlying motoneuronal activity in larval angelfish, *Pterophyllum scalare*. *Zool. Sci.* 1996; **13**: 229-234.
- 15) Sakamoto H, Yoshida M, Uematsu K. Naturally occurring somatic motoneuron death in a teleost angelfish, *Pterophyllum scalare*. *Neurosci. Lett.* 1999; **267**: 145-148.
- 16) Yoshida M, Tomoda H, Uematsu K. Spinal and parachordal neurons in the eel leptocephali, *Anguilla japonica* revealed by labeling with a fluorescent dye. *Neurosci. Lett.* 1995; **195**: 206-208.
- 17) Yoshida M, Uematsu K. Spinal motor and dorsal root ganglionic neurons in the juvenile Japanese eel, *Anguilla japonica*. *Fish. Sci.* 1999; **65**: 708-711.
- 18) Uematsu K, Shirasaki M, Storm-Mathisen J. GABA- and glycine-immunoreactive neurons in the spinal cord of the carp, *Cyprinus carpio*. *J. Comp. Neurol.* 1993; **332**: 59-68.
- 19) Faber DS, Fetcho JR, Korn H. Neuronal networks underlying the escape response in goldfish. General implications for motor control. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1989; **561**: 11-33.
- 20) Kashin SM, Feldman AG, Orlovsky GN. Locomotion of fish evoked by electrical stimulation of the brain. *Brain Res.* 1974; **82**: 41-47.
- 21) Uematsu K, Ikeda T. The midbrain locomotor region and induced swimming in the carp, *Cyprinus carpio*. *Nippon Suisan Gakkaishi* 1993; **59**: 83-788.
- 22) Uematsu K, Todo T. Identification of the midbrain locomotor nuclei and their descending pathways in the teleost carp, *Cyprinus carpio*. *Brain Res.* 1997; **773**: 1-7.
- 23) Fetcho JR, Faber DS. Identification of motoneurons and interneurons in the spinal network for escapes initiated by the Mauthner cell in goldfish. *J. Neurosci.* 1988; **8**: 4192-4213.
- 24) Baba Y, Kake Y, Yoshida M, Uematsu K. Activities of mesencephalic nucleus neurons during fictive swimming of the carp, *Cyprinus carpio*. *Fish. Sci.* 2003; **69**: 581-588.
- 25) Wannier T, Deliagina TG, Orlovsky GN, Grillner V. Differential effects of the reticulospinal system on locomotion in lamprey. *J. Neurophysiol.* 1998; **80**: 103-112.
- 26) Soffe SR, Roberts A. Tonic and phasic synaptic input to spinal cord motoneurons during fictive locomotion in frog embryos. *J. Neurophysiol.* 1982; **48**: 1279-1288.
- 27) Middleton FA, Strick PL. The cerebellum: an overview, *Trends Neurosci.* 1998; **21**: 367-369.
- 28) Roberts BL, Van Rossem A, De Jager S. The influence of cerebellar lesions on the swimming performance of the trout. *J. Exp. Biol.* 1992; **167**: 171-178.
- 29) Ikenaga T, Yoshida M, Uematsu K. Efferent connections of the cerebellum of the goldfish, *Carassius auratus*. *Brain Behav. Evol.* 2002; **60**: 36-51.
- 30) Ikenaga T, Tatecho Y, Nakai T, Uematsu K. Betanodavirus as a novel transneuronal tracer for fish. *Neurosci. Lett.* 2002; **331**: 55-59.