

ゼブラフィッシュにおける睡眠障害：点灯前に産卵する集団の解析

伊藤真理子、藤田恭平、八田公平

生命理科学研究科 兵庫県立大学大学院 生体情報学 分野

A Sleep Disorder in Zebrafish: Analysis of a Population that Spawn before Dawn

Mariko ITOH, Kyohei FUJITA, and Kohei HATTA*

Grad. Sch. Life Sci. Univ. of Hyogo

* Corresponding author

Abstract

Zebrafish normally spawn after lighting under the cycle of 14 hour-light and 10 hour-dark periods. We here report a group of zebrafish that spawn within about 1 hour before or after lighting. We call them (or their behavior) HAYAOKI (abbreviated HO hereafter, and which translates as “early bird” in Japanese) because they often spawn in the dark as if they have predicted the coming dawn. Whereas the spawning of non-HO fish is usually inhibited in the dark, the spawning of HO-fish appeared not. Both the spawning of a HO male with a non-HO female and a HO female with a non-HO male resulted in a similar spawning as for a HO pair. The origin of HO spawning, while still unknown, may be linked with the environment during the growth of the fish. These observations suggest that fish in the HO condition may provide a model case study for sleep disorder.

Keywords: circadian rhythm, breeding, behavior, biological psychology

緒言

概日周期 (circadian rhythm) による行動の変化や、睡眠 (sleep) は動物に広く見られる現象であるが、それらに共通の仕組みがあることがわかったのは最近のことである。脳と心の間を研究する生物心理学 (biological psychology)において、神経伝達物質、ホルモンや、それらの受容体の遺伝子レベルでの解析が可能になったことによる [1]。睡眠を推進するように働く分子として、メラトニン (Melatonin)や、抑制する分子として、オレキシン (Orexin) 別名ヒポクレチン (Hypocretin) が知られている。これらの遺伝子は、ゼブラフィッシュからヒトまで、進化上保存されている。オレキシン受容体遺伝子に変異がある犬では、突然倒れるように眠り込むナルコレプシー (narcolepsy) 症状がみられる。緑藻の *Chlamydomonas reinhardtii* において発見された、波長 470nm の青色光を受けることにより開口する 7 回膜貫通型陽イオンチャネル、チャンネルロド

プシン 2 (*chr2*) 遺伝子[2]をオレキシン遺伝子制御配列を用いて、オレキシン神経細胞で発現させたトランスジェニックマウスの頭蓋の中に光ファイバーをいれて青い色の光をあてると、これらの神経細胞の興奮を誘発し、人工的に睡眠覚醒を制御することができる[3]。

ゼブラフィッシュは、脊椎動物のモデル生物としてゲノム配列がほぼ決定され、突然変異体の作成、モルフォリーノオレゴ(アンチセンス)による遺伝子機能阻害、ノックアウトや強制発現の技術に加え、胚は透明で発生が早く、神経細胞を生きたまま追跡することができるなど、細胞レベルでの解析に様々な利点がある [4,5]。これを活かして、睡眠覚醒を分子遺伝学的に細胞レベルで解析する研究も始まっている。

ゼブラフィッシュの稚魚(受精後 5・7 日目)では、その活動性(単位時間あたりの遊泳距離)が、消灯によって突然暗闇になると一時的に増加し、その後、休む時間と活動的な時期を繰り返すが、平均的に活動性が著しく減少することが知られており、この活動性の低下が睡眠の指標として使われている [6]。ゼブラフィッシュ稚魚において、オレキシンを熱ショック蛋白質の制御配列下で強制発現させると、個体の活動時間が熱ショックによって増加し、不眠症 (insomnia) のような症状を示す [6]。これらのことは、哺乳類と魚類の睡眠に共通の分子機構があることを示唆している。

一方、成魚においても、Fig. 1 に示したように、尻尾を垂れながら静止している睡眠類似状態がある。この状態は、刺激に対する反応の閾値が高まり、睡眠類似状態を弱い電気ショックによって阻害しつづけると長くなる (sleep rebound) [7]。しかし、成魚における研究では、オレキシンレセプターは、覚醒を司るモノアミンあるいはコリン作動性の神経細胞で発現するのではなく、睡眠を調節する視床下部前領域を含む GABA 作動性の神経細胞で発現する。さらにオレキシンレセプターの突然変異体では、魚が不眠症になると報告されている。したがって、全ての動物で常に同じ機能に使われているわけではないのかもしれない [7]。

光シグナルと弱い電気ショックを同時に与えることにより、それぞれの関連性を記憶し、光を感受するだけでも逃げ出す条件付け (AAC: active avoidance conditioning) が起こるが、夜間にはこの記憶能力が減少する。この実験系において、メラトニンが夜間における記憶形成を抑制すること、また、メラトニンレセプターのアンタゴニスト (Luzindole、あるいは K-185) を水中に投与すると、夜間における記憶能力の低下が回復することが示された [8]。一方、睡眠と密接な関係を持つ概日リズムを制御する体内時計遺伝子 *clock* は、脳、眼、松果体だけでなく腎臓や心臓を含む他の組織において、ゼブラフィッシュでもリズムに応じて発現することが報告されている [9]。

ゼブラフィッシュの産卵行動は、通常、朝、光がついてから、約 1 時間以内で起こる。この時、泳ぐスピードが非常に速くなり、雄が雌に向かって勢いよく接近し雌の周囲を円を描くように泳ぐ (Fig. 2, 3)。雄と雌がぴったりくっつき、卵がはじかれるように産卵し、体外で受精する。産卵は、数回にわたって行われることも多い。通常の飼育下で

も、光の点灯時間が規則的でなかったり、夜中に刺激を与えられたりしたとき、夜明け前や夜中に産卵することが、時々観察される。これらは、‘睡眠障害’に類似した状態と考えられるが、私たちが知る限り、小型魚類において定量的に調べた報告はない。今回、野生型ゼブラフィッシュで、点灯前にあたかも点灯を予測するように暗闇で産卵する特徴的な集団が観察されたので報告する。

実験方法

実験に用いたゼブラフィッシュは、実験を行う約半年前に業者から購入し、飼育施設に移送された。業者においては、明暗周期なしの薄暗い条件下で飼育され、不定時に産卵していたことがわかっている。一方、私たちが実験に用いた施設では、28.5 の水温、14 時間、明状態、10 時間、暗状態のサイクルで飼育し、掛け合わせ実験も同じ条件で行った。これらの魚は、点灯前に、あたかもそれを予測するように産卵することが観察されたので、その行動および、その行動を示す魚のことを HAYAOKI (HO)と呼ぶことにした。一方、コントロールとして使用した正常な魚のグループは、他の研究室で同じ明暗周期下で育てられたのち、実験の数ヶ月前に移送されたもの、または、私たちの飼育施設で卵から育てたものを使用した。

産卵させるときは、実験前日、ゼブラフィッシュを雄雌一匹ずつ、底に網が張ってある産卵用水槽に入れた [10]。翌日、点灯後 1~3 時間後に産卵が確認されたら、卵を採取し、顕微鏡で卵を観察して、その卵の発生段階を、発生段階表に当てはめて同定し、産卵時間を逆算した [11]。複数の発生段階の卵が得られた場合は、合計 19~20 の卵を無作為に選んで、各々の時間帯に産卵した卵に分類しパーセンテージを算出した。実験は、約 2 週間おこない、HO 集団については、雄 6 匹、雌 6 匹から選んだペアによる計 17 回の掛け合わせから、正常型は雄 5 匹、雌 5 匹から選んだペアによる計 11 回の掛け合わせからデータを得た。ヒストグラム (Fig.4)は、点灯時を 0 時としたときの経過時間を横軸に、上記のパーセンテージの平均を縦軸に表示した。

実験結果

HO 行動を示すゼブラフィッシュ集団の産卵時間のデータを Fig.4 (a)に、正常型の行動を示す集団の産卵時間については、Fig. 4 (b)にまとめた。Fig. 4 (a) と (b) に示したヒストグラムを比較すると野生型のゼブラフィッシュの集団では、多くのペアが、朝、光がついてから約 1 時間以内に産卵するのに対し、多くの HO は点灯時をピークにその前後約 1 時間の範囲で産卵することがわかった。その内訳は、計 17 例の HO 同士の掛け合わせのうち、点灯前のみに産んだのが 6 回、点灯前と点灯後の両方に産んだのが 7 回、点灯後のみに産んだのが 4 回であった。同一ペアで複数の掛け合わせをおこなったものについては、常に点灯前に産んだペアは 1 例のみで、常に点灯後に産んだペアはいなかった。HO 同士の掛け合わせで特徴的であったのは、多くの場合において、点灯す

る直前に、あたかも、点灯を‘予測’したように産卵が見られたことである。実験期間中には、その他の時間帯の産卵は観察されなかった。したがって、概日時計は、ほぼ正常、あるいは、約1時間はよい状態にセットされていたと考えられる。HOと正常な魚との違いは、正常な魚が、Fig. 4(a)に示されたように、一例をのぞいて点灯後に産卵したのに対し、HOは、約半数の卵について、点灯以前に暗闇で産卵されたことである。これらの卵は、正常に受精し発生した。また、正常な魚でも、まれに夜中に産卵することがあるが、これらの卵も正常に受精し発生する。これらの観察により、ゼブラフィッシュの産卵と受精に光は必須条件ではなく、暗闇の中でも産卵することが可能であるといえる。それに関わらず、正常な魚では、通常、暗闇で卵を産むことはないことから、暗闇が産卵行動を抑制している可能性が考えられる。

私たちの暗条件下の赤外線カメラによる観察によれば、複数のゼブラフィッシュをひとつの水槽に入れた時、各々の魚は、活動的な状態と非活動的な状態を別々に繰り返している。このとき、特に活動的な魚が、非活動的な魚に接触すると、後者が、一時的に活動的になることが、観察されている (data not shown)。さらに、HOと正常なゼブラフィッシュと掛け合わせた場合、産卵時間はHO型になることが示された。その際、雄と雌の組み合わせによる差は見られなかった。つまり、雄雌のいずれかが、HO型であると、産卵時刻がHO型になる。

HO行動を示していた魚について、移送後約9ヶ月後以降には、点灯前に産卵しなくなったことが観察された。また、HO型同士掛け合わせた子孫は正常な集団と同様の時刻に産卵することが観察された。このことから、HO型は環境要因によって生じたのかもしれない。これらの魚を購入した業者では、明暗周期なしの薄暗い条件下で不定時に産卵していたため、このような生育状況が異常を引き起こした可能性もあるが、今のところ、その要因は不明であり、今後検討する必要がある。

正常なゼブラフィッシュは、暗闇で産卵することが可能であるのに、通常、光が点灯しないと産卵しない。このことに、どのような適応的、生態的な意義があるかは不明である。しかし、HO行動は、この状態から逸脱していることから、いわば、睡眠障害に類似した状態であると考えられる。本研究では、HO行動が遺伝することを支持するデータはなく、また、生育環境とHO行動の関係を実験的に示すことはなされていない。今後このような障害を生み出す環境条件と、それに伴う細胞、分子レベルでの変化が特定できれば、このような状態にあるゼブラフィッシュを睡眠障害のモデルとして用いることが可能になると思われる。

結論

ゼブラフィッシュは、通常14時間、明状態、10時間、暗状態のサイクルの下、光照射後に産卵する。ここでは、光照射約1時間前から1時間後にかけて産卵するゼブラフィッシュの集団について報告した。まるで夜明けを予測するように、暗闇で産卵するこれ

らの集団の行動、また、そのような行動をする魚を、私たちは、早起き、HAYAOKI (HO) と名付けた。正常なゼブラフィッシュは暗闇での産卵行動が抑制されているが、HO では抑制されていないと考えられた。HO の雄と正常な雌または、HO の雌と正常な雄の組み合わせでも、HO 同士の組み合わせのように点灯前に産卵することが観察された。HO が生じた原因は不明であるが、成長過程の環境要因に起因している可能性もある。HO の表現型をもつ魚は、睡眠障害のモデルになるかもしれない。

謝辞

データを収集する過程で、山本珠実さん、磯田恵里佳さん、松下淑恵さんに大変お世話になりました。渡辺憲二教授、池永隆徳さん、西上範幸さん、小西潤治さん、Saeed Kamali さん、中山創平さんには、有益なコメントをいただきました。この場をおかりして感謝を申し上げます。

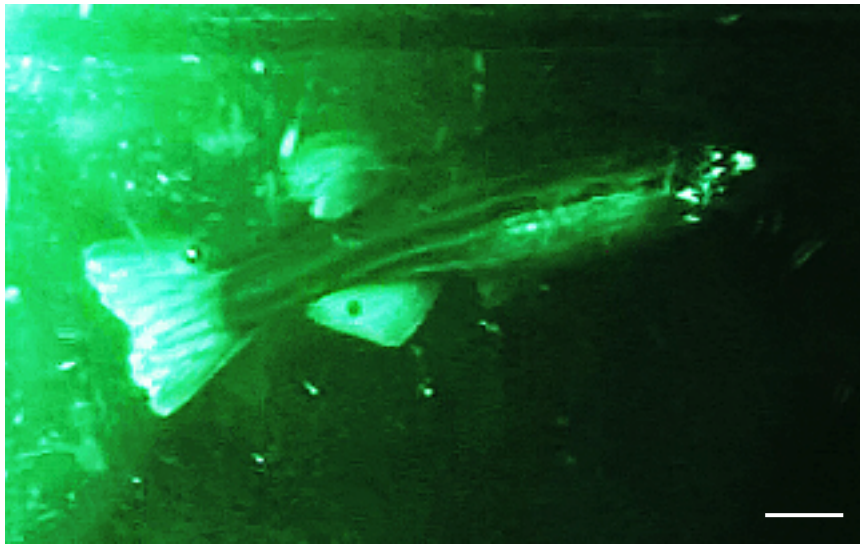


Fig. 1. A typical posture of zebrafish (drooping caudal fin) in a state of inactivity which is considered as sleep

A video frame recorded at midnight in the dark using a Sony Handycam (HDK-SR12) with infrared illumination provided by the Nightview function. Scale bar: 5 mm.

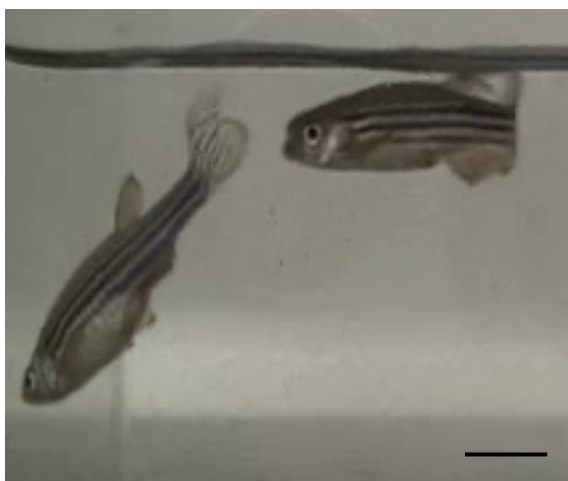


Fig. 2. A spawning behavior of zebrafish

A video frame recorded in the morning after lighting using a Sony Handycam (HDK-SR12). A male fish (slim and slightly orange or yellow-colored on the right) is actively chasing after a female fish (silver-colored with a round belly on the left). Scale bar: 10 mm.

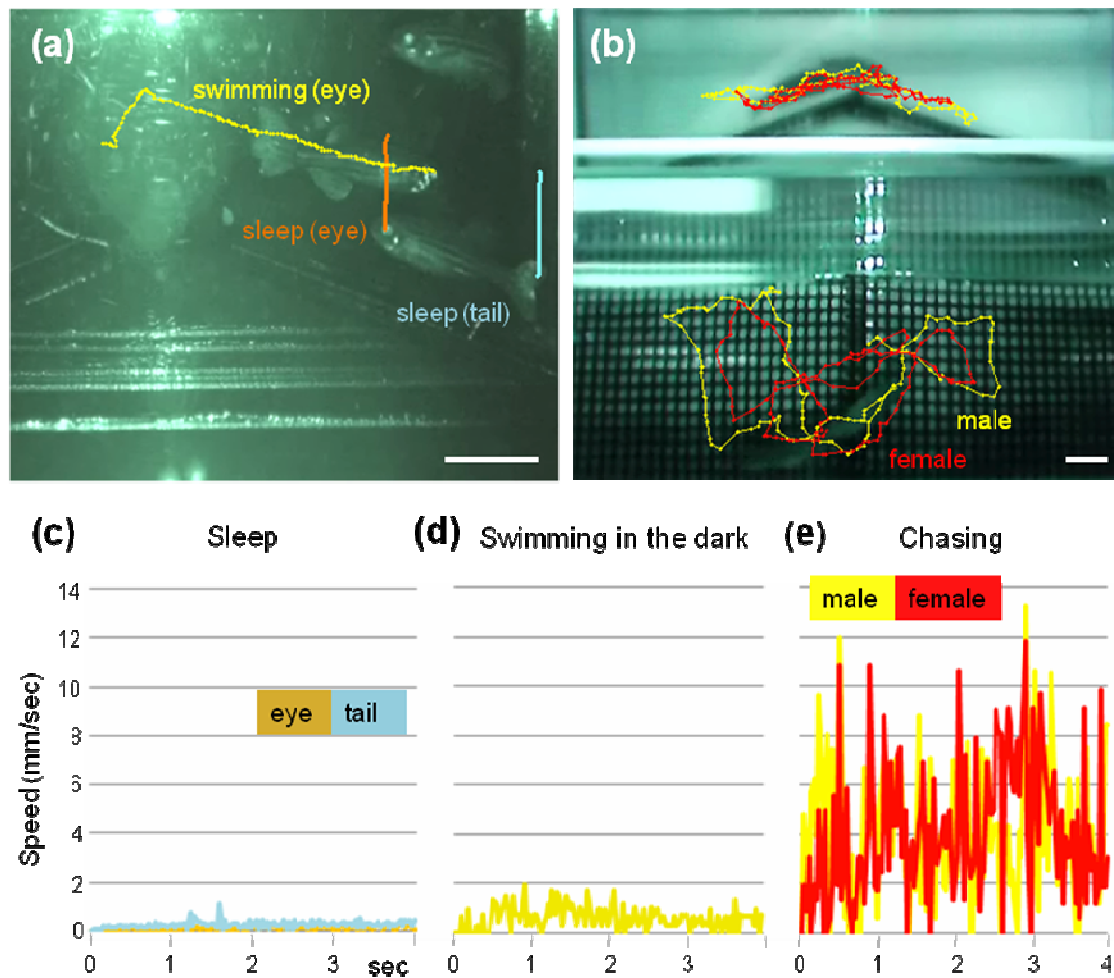


Fig. 3. Tracking analysis of sleep, swimming in the dark (a, c and d), and chasing after female by male, a behavior related to spawning, under the light after dawn (b and e).

Video recordings taken as above for 4 sec were analyzed by tracking the movement of an eye, the tail fin, or the head, one frame by one, manually or automatically with DippMotion2D software (a, b). The intervals between the successive frames were 0.01 sec for a, c and d, and 0.03sec for b and e. The speed of each moment was calculated with the same software and plotted on graphs (c, d, e). Two males and two females (a), or a pair of male and female (b) fish were put together in a cage with a reversed V-shaped metal mesh at the bottom. In b, a mirror was set beside the tank, reclined 45 degrees against a side of the tank, so that the record can be made both in dorsal (lower) and side (upper) views simultaneously. Note that, during the sleep (a and c), a fish was sliding down slowly without moving the head or the tail. Fish can be moderately active in the dark (a and d). On the other hand, a male is actively chasing a female under the light after dawn (b and e). Scale bars: 20 mm.

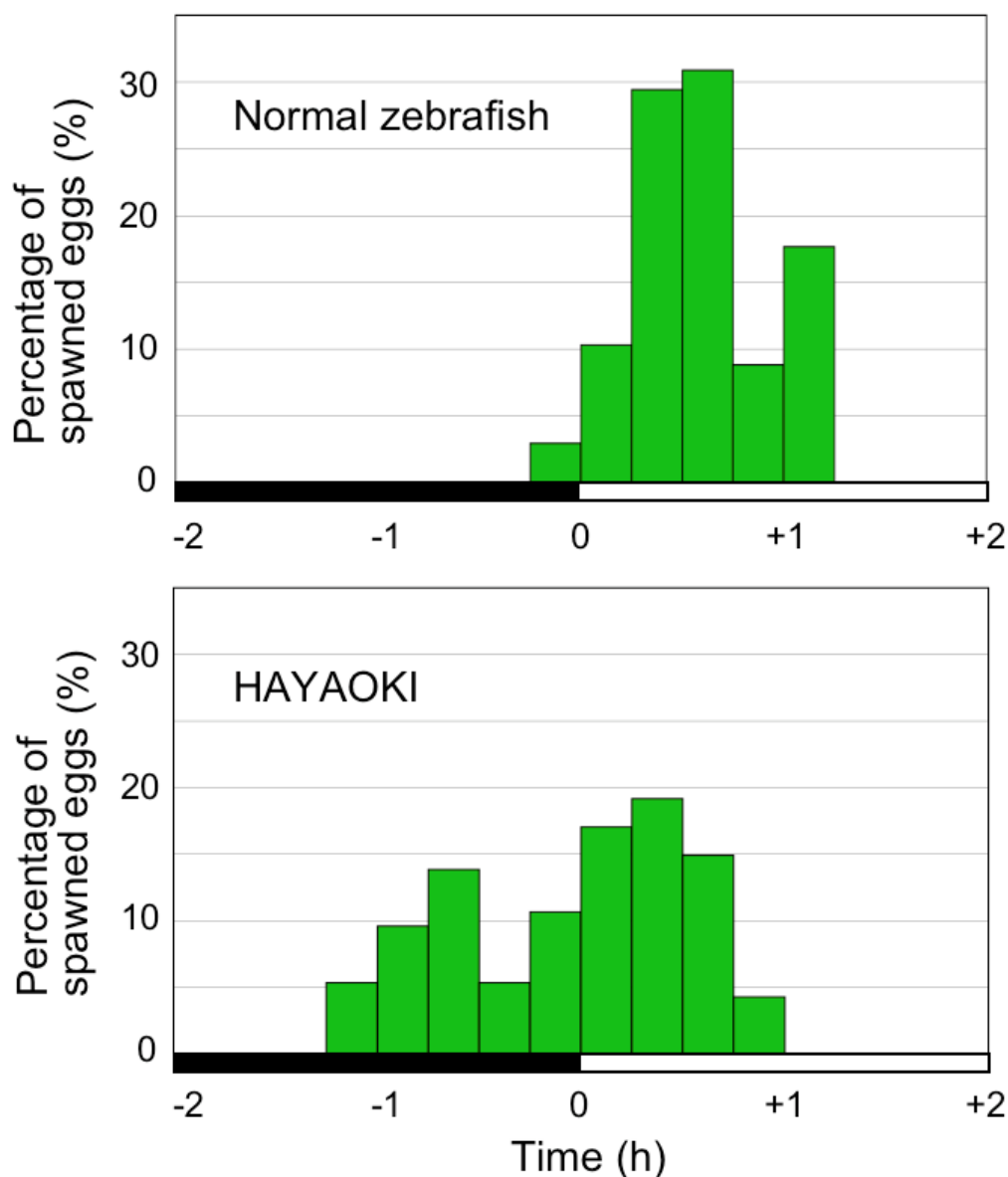


Fig. 4. Histograms comparing the time of spawning by normal (upper) or HAYAOKI (lower) zebrafish group

The light was turned on in the morning and 14 hour-light and 10 hour-dark cycle were maintained. The dark bar under the histogram indicates the period in the dark and the empty bar indicates the period in the light. The horizontal axis indicates the time in hours, in which the time to turn the light on in the morning is designated as 0, and the vertical axis indicates the averaged percentage of spawned eggs.

参考文献

- [1] Mark F. Bear, Barry W. Connors and Michael A. Paradiso. Neuroscience, Exploring the brain. Lippincott Williams & Wilkins (2007)
- [2] Georg Nagel, Tanjef Szellas, Wolfram Huhn, Suneel Kateriya, Nona Adeishvili, Peter Berthold, Doris Ollig, Peter Hegemann and Ernst Bamberg. Channelrhodopsin-2, a directly light-gated cation-selective membrane channel. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 100, 13940-13945 (2003)
- [3] Antoine R. Adamantidis, Fhang Zhang, Alexander M. Aravanis, Karl Deisseroth and Lecea de Lecea. Neural substrates of awakening probed with optogenetic control of hypocretin neurons. Nature 450, 420-424 (2007)
- [4] Kohei Hatta, Hitomi Tsujii and Tomomi Omura. Cell tracking using a photoconvertible fluorescent protein. Nature Prot. 1, 1-8 (2006)
- [5] Shinsuke Aramaki and Kohei Hatta. Visualizing neurons one-by-one in vivo: optical dissection and reconstruction of neural networks with reversible fluorescent proteins. Dev. Dyn. 235, 2192-2199 (2006)
- [6] David A. Prober, Jason Rihel, Anthony A. Onah, Rou-Jia Sung and Alexander F. Schier. Hypocretin/Orexin overexpression induces an insomnia-like phenotype in zebrafish. J. Neurosci. 26, 13400-13410 (2006)
- [7] Tohei Yokogawa, Wilfredo Marin, Juliette Faraco, Guillaume Pezeron, Lior Appelbaum, Jian Zhang, Frederic Rosa, Philippe Mourrain and Emmanuel Mignot. Characterization of sleep on zebrafish and insomnia in hypocretin receptor mutants. PLOS Biology 9, 2379-2397 (2007)
- [8] Oliver Rawashdeh, Nancy Hernandez de Borsetti, Gregg Roman and Gregory M. Cahill. Melatonin suppresses nighttime memory formation in zebrafish. Science 318, 1144-1146 (2007)
- [9] David Whitmore, Nicholas S. Foulkes, Uwe Strähle and Paolo Sassone-Corsi. Zebrafish *Clock* rhythmic expression reveals independent peripheral circadian

oscillators. *Nature Neurosci.* 8, 701-707 (1998)

[10] Monte Westerfield. *The zebrafish book*. The University of Oregon Press. 2.2 (1995).

[11] Charles B. Kimmel, William W. Ballard, Seth R. Kimmel, Bonnie Ullmann and Thomas F. Schilling. Stage of embryonic development of the zebrafish. *Dev. Dyn.* 203, 253-310 (1995)

(Received December 8, 2008 ; Accepted February 24, 2009)