

令和 3 年 6 月 21 日現在

機関番号：13201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06462

研究課題名(和文) 脳の進化が種分化を促した? : 交配前隔離の神経基盤に関する実証の試み

研究課題名(英文) Did the brain evolution accelerate the speciation?; The neural mechanism of pre mating isolation.

研究代表者

川口 将史 (Kawaguchi, Masahumi)

富山大学・学術研究部医学系・助教

研究者番号：30513056

交付決定額(研究期間全体) : (直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文) : ヨシノボリ成体の終脳の構造を細胞構築と転写因子・神経化学因子の分布パターンを基に解析した(Kawaguchi et al., 2019)。現在、間脳・視床下部に関して、各神経核の発生的由来と神経化学的特性に基づいた詳細な同定を進めている。ヨシノボリ雄が営巣した水槽に同種雌を提示すると、雌の付近から巣に戻る雄は、一定のリズムで尾鰭を振る行動を示した。雌を巣へ誘引する視覚シグナルと考えられる。同種雌に求愛した雄と別種雌に威嚇した雄では、c-fos陽性細胞の脳内分布に違いが見られた。求愛特異的にc-fos陽性細胞が多く分布した神経核の中には、er-alpha陽性細胞を多く含む領域が複数見られた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

意思決定は人間の精神活動の中枢をなすが、意思決定に至る神経回路の道筋を人間で解明することは難しい。本研究では、人間と共通の仕組みながら単純な脳を持つ魚類をモデルとして、識別に伴って最適な行動を選択する過程を司る神経回路を理解する。行動選択は意思決定の根源的な素過程であることから、本研究の進展は意思決定の神経機構の解明に向けて、一般的なモデル動物の研究とは一線を画す登坂路を提供することが期待される。また本研究では、生殖的隔離の維持に関わる神経機構の解明を目指す。生殖的隔離は種分化をもたらす主要素の一つであることから、本研究は種分化を可能にした脳の働きの理解に繋がることが期待される。

研究成果の概要(英文) : We analyzed the construction of telencephalon in the adult brain of goby fish, depending on the cytoarchitectural observation and distribution patterns of transcriptional factors and neurochemical molecules (Kawaguchi et al., 2019). Now, we are trying to identify the structures of diencephalon and hypothalamus in the goby brain, based on developmental origins and neurochemical traits. When a female of the same species was put in the tank where a male established a nest, the male went back from a point near the female to the nest with shaking the caudal fin in a constant rhythm, regarding that this fin vibration might be the visual signal to invite the female to the nest. The distribution pattern of c-fos positive cells was different between in the brains of the courtship male and the aggressive male. Several brain regions, which were induced many c-fos positive cells depending on the courtship behavior, showed the intense distribution of er-alpha positive cells.

研究分野：神経解剖学

キーワード：配偶者選択 c-fos 間脳 視床下部 生殖的隔離

1. 研究開始当初の背景

ハゼ目に属するヨシノボリ属では、近縁種が同所的に生息していても各種の遺伝的独自性が維持されており、種間での生殖的隔離が成立している (Mizuno *et al.*, 1979, *Jap. J. Ecol.* **29**; Yamasaki *et al.*, 2015, *Mol. Phyl. Evol.* **90**)。配偶者提示実験では、繁殖期の雄は同種の雌に求愛する一方、別種の雌を威嚇することが観察されており (Kawanabe & Mizuno, 1989)、ヨシノボリ属の生殖的隔離は交配前隔離によって成立していることが示唆される。しかし、巢に近づいた雌の種を識別し、適切な配偶者を獲得するために求愛と威嚇の行動選択を実行する上で、雄の脳内でのような神経回路が働いているのかについては明らかになっていない。

2. 研究の目的

本研究では、ヨシノボリ属の交配前隔離を可能にする神経機構の解明を目指した。目的を遂行するため、以下の細目について研究を進めた。

- (1) ヨシノボリの脳アトラスの作成を進めた。
- (2) ヨシノボリ雄が同種あるいは別種の雌個体に対して示す行動要素を定量し、比較した。
- (3) ヨシノボリ雄の求愛と威嚇で活動の違いを示す脳領域の同定を、*c-fos* を指標に試みた。

3. 研究の方法

(1) ヨシノボリの脳アトラス

ヨシノボリ雄を 4% パラホルムアルデヒドにて還流固定し、摘出した脳を 30 μm の厚さに薄切した。切片に対して Nissl 染色および抗 HuC/HuD 抗体を用いた免疫染色を行い、脳組織の細胞構築パターンを観察した。硬骨魚類では、細胞の大きさや Nissl 染色の濃淡などによって脳内の各神経核を定義している。そこでまず、コイ目ゼブラフィッシュ (Wullimann *et al.*, 1996) やアジ目アジ (Ou & Yamamoto, 2016, *Ichthyol. Res.* **63**) などの先行研究に基づいて、細胞構築パターンからヨシノボリ脳の各神経核を命名した。次に、各神経核の神経化学的な特徴や発生学的由来を明らかにするため、サブスタンス P やチロシン水酸化酵素 (TH) に対する免疫染色の他、グルタミン酸脱水素酵素 (GAD) などの神経伝達関連因子や神経細胞の分化に関わる転写因子に対する *in situ* ハイブリダイゼーションを行い、各因子の分布パターンを観察した。免疫染色は還流固定した脳、*in situ* ハイブリダイゼーションは新鮮凍結した脳をそれぞれ 30 μm の厚さに薄切して行った。ブロックごとに薄切角度が少しずつ異なるため、対比染色 (免疫染色では Nissl 染色、*in situ* ハイブリダイゼーションでは Neutral Red) で確認できる交連繊維や濃く染色される細胞集団、および外側陥凹などの特徴的な脳室の形態をランドマークとして背腹の補正を行った。

(2) ヨシノボリ雄が雌個体に示す行動要素

繁殖期のヨシノボリ雄を巣材の入った 30 cm 水槽に馴致し、営巣させた。営巣した雄の水槽に同種あるいは別種の卵熟雌を投入し、雄の行動を 30 分間正面から撮影した。撮影した動画は iMovie 上で再生し、コマ送りで行動を観察して行動要素の回数のカウントなどを行った。

(3) 求愛と威嚇で活動の違いを示す脳領域

最初期遺伝子 *c-fos* は神経活動を示した神経細胞で特異的に発現するため、行動に際して活動した神経細胞を組織学的に同定するツールとして有用である (Okuyama *et al.*, 2011, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **404**)。同種あるいは別種の卵熟雌を提示して 30 分間行動を惹起した後、捕獲したヨシノボリ雄を麻酔下で断頭した。摘出した脳を新鮮凍結し、30 μm の切片を作成して *c-fos* に対する *in situ* ハイブリダイゼーションを行った。Neutral Red による対比染色で *c-fos* 陽性細胞がどの神経核に属するか同定し、神経核ごとに *c-fos* 陽性細胞の数をカウントした。

4. 研究成果

(1) ヨシノボリの脳アトラス

ヨシノボリの終脳の構造を詳細に解析し、他の硬骨魚類で報告されていない特徴的な構造を見いだした (図 1: Kawaguchi *et al.*, 2019, *J. Comp. Neurol.* **527**)。これらの構造はマハゼでも確認され (Hagio *et al.*, 2021, *J. Comp. Neurol.* **529**)、ハゼ目魚類に共通の特徴であることが示唆された。(A) 終脳腹側野の一部の細胞集団が脳室周囲部から背外側へ分布を広げ、内層が神経線維、外層が細胞層からなる球状クラスターとして終脳背側野に陥入していた。このクラスターの外層には *gad65* 陽性細胞や *proenkephalin* (*penk*) 陽性細胞、*protachykinin* (*protach*) 陽性細胞が含まれており、哺乳類の線条体と類似の性質を示す細胞集団である可能

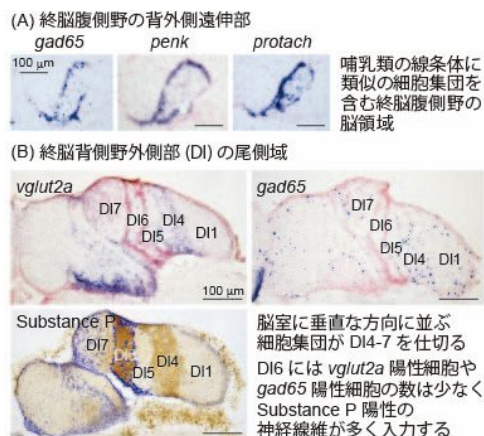


図 1: ハゼ目ヨシノボリの終脳に見られた特徴的な脳構造

性が示唆された。(B) 終脳背側野外側部 (DI) の尾側域には、脳室に垂直な方向に並ぶ細胞集団によって仕切られた領域が分布していた。これらの領域では *vglut2a* 陽性細胞や *gad65* 陽性細胞、およびサブスタンス P 陽性繊維の分布が異なっており、領域ごとに異なる神経化学的特性を示すことが示唆された。

ヨシノボリ成魚の間脳および視床下部について、細胞構築パターンだけでなく転写因子や神経伝達関連因子の分布パターンも詳細に解析し、各脳領域の発生的由来や神経化学的特性を詳細に同定した (図 2)。(A) 視索前域前方小細胞部は、エストロゲン受容体 α (*era*) 陽性細胞を含む腹側集団 (Ppa-v) と *six3* 陽性細胞や *arx* 陽性細胞を含む背側集団 (Ppa-d) に細分された。(B) 視床腹内側核 (VM) の腹尾側に位置する脳室周囲部は、VM と同じく *arx* 陽性細胞と *pax6* 陽性細胞を含むことから、VM の尾側部 (VMc) であることがわかった。(C) VMc の尾側には *arx* 陽性細胞を含むが *pax6* 陽性細胞を含まない領域があり、*sonic hedgehog* (*shh*) 陽性細胞より腹側に位置することから、視床下部結節後部領域の腹側部 (RTuV) に由来することがわかり、後結節側脳室部 (PPT) の背側領域 (PPTd) と名付けた。(D) PPTd の背尾側に位置する脳領域は *pax7* 陽性細胞を含むことから、プロソメア 3 の基板領域に由来する後結節背側部 (PTd) と名付けた。(E) PPTd の尾側で PTd の腹側には *otp* 陽性細胞を含むが *arx* 陽性細胞を含まない領域があり、ゼブラフィッシュ胚の後結節腹側部 (PTv) に相当すると考えられた (Schredelsker & Driever, 2020, *Front. Neuroanat.* 14)。(F) 大型の TH 陽性細胞を含む PPT の腹側領域 (PPTv) は、*otp* 陽性細胞と *arx* 陽性細胞を含む吻側集団 (PPTvr) と *otp* 陽性細胞を含むが *arx* 陽性細胞を含まない尾側集団 (PPTvc) に分かれており、これら二つの集団の間に *th2* 陽性細胞を含む脳室周囲器官 (PVO) が分布していた。(G) *th2* 陽性細胞を含む PVO は腹尾側に向かって分布を広げ、外側陥凹の腹側で外側視床下部 (LH) の背外側に分布した。(H) LH は、*vglut2b* 陽性細胞と *era* 陽性細胞を含む吻内側部 (LHrm)、*nkx2.4* 陽性細胞と *vglut2a* 陽性細胞を含む吻外側部 (LHrl)、*vglut2b* 陽性細胞と *era* 陽性細胞と *prodynorphin* (*prodyn*) 陽性細胞を含む尾内側部 (LHcm)、PVO の腹外側に分布して *arx* 陽性細胞を含む尾外側部 (LHcl) に細分することができた。

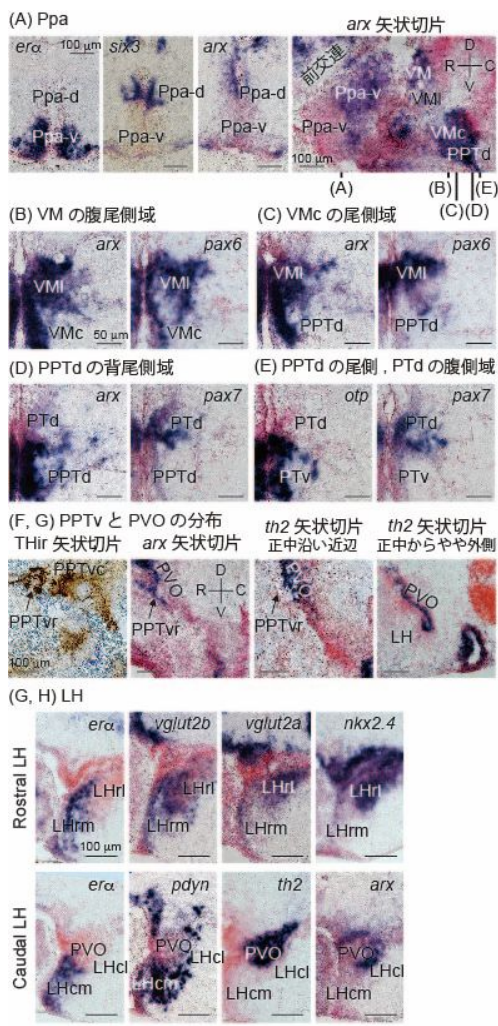


図 2: ハゼ目ヨシノボリの間脳・視床下部の構造

(PVO) が分布していた。(G) *th2* 陽性細胞を含む PVO は腹尾側に向かって分布を広げ、外側陥凹の腹側で外側視床下部 (LH) の背外側に分布した。(H) LH は、*vglut2b* 陽性細胞と *era* 陽性細胞を含む吻内側部 (LHrm)、*nkx2.4* 陽性細胞と *vglut2a* 陽性細胞を含む吻外側部 (LHrl)、*vglut2b* 陽性細胞と *era* 陽性細胞と *prodynorphin* (*prodyn*) 陽性細胞を含む尾内側部 (LHcm)、PVO の腹外側に分布して *arx* 陽性細胞を含む尾外側部 (LHcl) に細分することができた。

(2) ヨシノボリ雄が雌個体に示す行動要素

同種雌に対する求愛と別種雌に対する威嚇で、雄の行動の違いを定量化した (図 3)。(A) 雌の近くから巣に戻る際、1 秒間に尾鰭を振った回数を 0.25 秒ごとに計測した。その結果、求愛では 0.25 秒に 1 回のペースで尾鰭を振り続けるのに対し、威嚇では最初の 0.25 秒に 2 回尾鰭を振った後は尾鰭を振らないことがわかった。威嚇時の尾鰭の動きは、巣に戻る推進力を得るためのものであるのに対し、求愛時のものは雌を巣に誘引する視覚シグナルになると考えられる。(B) 雌を投入した 30 分の間に、同じペースで尾鰭を振る動作を伴って雌を巣に誘った回数は、同種雌の方が別種雌より優位に多かった (同種 6 匹, 別種 6 匹; Wilcoxon の順位和検定, $P < 0.01$)。 (C) 30 分の間に、雌個体に開口威嚇した回数と雌個体を追撃した回数の合計は、別種雌の方が同種雌より優位に多かった (同種 6 匹, 別種 6 匹; Wilcoxon の順位和検定, $P < 0.01$)。

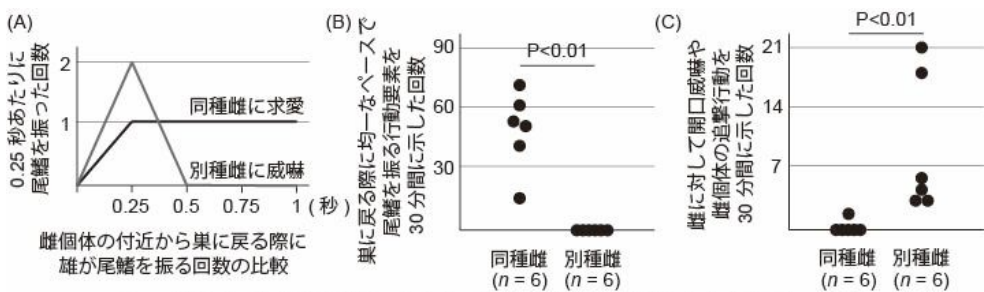


図 3: 営巣した巣に雌個体が侵入した際、雌の種に依存して雄が示した行動要素の比較

(3) 求愛と威嚇で活動の違いを示す脳領域

同種雌に求愛した雄と別種雌に威嚇した雄で、脳内の *c-fos* 陽性細胞の分布の違いを組織学的に比較した。その結果、求愛では Ppa-v に、威嚇では Ppa-d に多くの *c-fos* 陽性細胞の分布が確

認された。また、求愛では PTV、LHrm、中脳を中心灰白質 (PAG) に威嚇より多くの *c-fos* 陽性細胞の分布が確認された (図 4)。求愛した雄の脳内で活動が見られた脳領域の内、Ppa-v と LHrm は *era* 陽性細胞を多く含んでいた。今後、これらの *c-fos* 陽性細胞が *era* を共発現する細胞かどうか、二重 *in situ* ハイブリダイゼーションによる確認を進める。

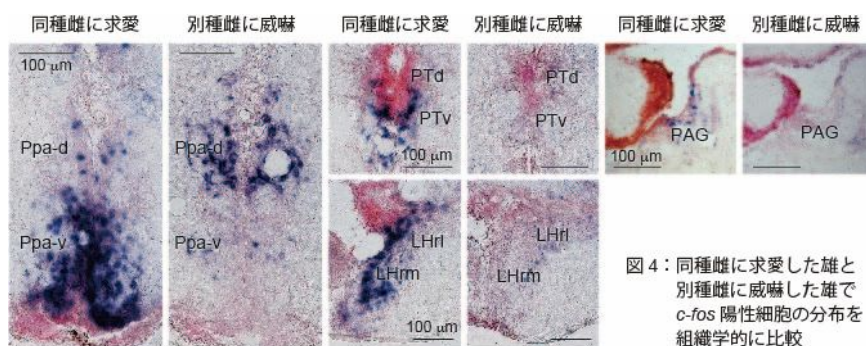


図 4：同種雌に求愛した雄と別種雌に威嚇した雄で *c-fos* 陽性細胞の分布を組織学的に比較

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Kawaguchi M, Hagio H, Yamamoto N, Matsumoto K, Nakayama K, Akazome Y, Izumi H, Tsuneoka Y, Suto F, Murakami Y, Ichijo H	4. 巻 527
2. 論文標題 Atlas of the telencephalon based on cytoarchitecture, neurochemical markers, and gene expressions in <i>Rhinogobius flumineus</i> [Mizuno, 1960].	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The Journal of Comparative Neurology	6. 最初と最後の頁 874-900
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/cne.24547.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hagio Hanako, Kawaguchi Masahumi, Abe Hideki, Yamamoto Naoyuki	4. 巻 529
2. 論文標題 Afferent and efferent connections of the nucleus prethalamicus in the yellowfin goby <i>Acanthogobius flavimanus</i>	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The Journal of Comparative Neurology	6. 最初と最後の頁 87 ~ 110
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/cne.24935	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計12件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 川口将史, 松本浩司, 山本直之, 萩尾華子, 仲山慶, 和泉宏謙, 赤染康久, 恒岡洋右, 須藤文和, 村上安則
2. 発表標題 ヨシノボリ属の種識別に伴う行動選択を制御する神経機構の解析
3. 学会等名 第124回 日本解剖学会総会 全国学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Masahumi Kawaguchi, Koji Matsumoto, Naoyuki Yamamoto, Kei Nakayama, Hanako Hagio, Hironori Izumi, Fumikazu Suto, Yasunori Murakami, Hiroyuki Ichijo
2. 発表標題 Behavioral and neural mechanisms of reproductive isolation among freshwater goby species.
3. 学会等名 第42回 日本神経科学大会・第62回 日本神経化学会大会 合同大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 川口将史, 松本浩司, 山本直之, 仲山慶, 曾我部篤, 柴田淳也, 川西亮太, 須藤文和, 村上安則, 一條裕之
2. 発表標題 c-fos分布パターンを指標としたヨシノボリ属の生殖的隔離を司る行動メカニズムの解析
3. 学会等名 日本動物学会 第90回 大阪大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 川口将史
2. 発表標題 ヨシノボリ属の生殖的隔離を維持する行動メカニズムの解析
3. 学会等名 9th Tokyo Vertebrate Morphology Meeting
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 川口将史
2. 発表標題 ヨシノボリ属の生殖的隔離を維持する行動メカニズムの解析
3. 学会等名 第26回 信州魚類研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 川口将史
2. 発表標題 ハゼ目ヨシノボリの前脳アトラス
3. 学会等名 第13回シンポジウム「水生動物の行動と神経系」
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kawaguchi M, Yamamoto N, Matsumoto K, Nakayama K, Hagio H, Shibata J, Sogabe A, Kawanishi R, Izumi H, Akazome Y, Suto F, Murakami Y, Ichijo H
2. 発表標題 Neural basis driving speciation among Rhinogobius species.
3. 学会等名 第41回日本神経科学大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 川口将史, 山本直之, 松本浩司, 萩尾華子, 仲山慶, 和泉宏謙, 恒岡洋右, 須藤文和, 村上安則, 一條裕之
2. 発表標題 ヨシノボリ属の種分化を促す神経機構の解析
3. 学会等名 第89回日本動物学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 川口将史, 萩尾華子, 山本直之, 松本浩司, 仲山慶, 赤染康久, 和泉宏謙, 恒岡洋右, 須藤文和, 村上安則, 一條裕之
2. 発表標題 ハゼ目魚類ヨシノボリの終脳に見出された特徴的な構造
3. 学会等名 平成30年度日本解剖学会第78回中部支部学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 川口将史
2. 発表標題 ヨシノボリ属の交配前隔離を制御する神経基盤
3. 学会等名 第25回信州魚類研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 川口将史
2. 発表標題 ヨシノポリ属の種分化を駆動する神経基盤の解析
3. 学会等名 第4回ユニークな少数派実験動物を扱う若手が最先端アプローチを勉強する会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 川口将史, 松本浩司, 山本直之, 萩尾華子, 仲山慶, 和泉宏謙, 赤染 康久, 恒岡洋右, 須藤文和, 村上安則
2. 発表標題 ヨシノポリ属の種識別に伴う行動選択を制御する神経機構の解析
3. 学会等名 第124回日本解剖学会総会・全国学術集会（招待講演）
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

2019年3月に朱鷺メッセで開催された「第124回 日本解剖学会総会・全国学術集会」において、金沢医科大学の伊藤哲史准教授と共に、S22シンポジウム「非モデル動物を用いた行動とそれを作り出す神経回路の探求」（3月28日開催）のオーガナイザーを務めた。（プログラム・抄録集 p.45参照）

6. 研究組織		
氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------