

機関番号：16301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2010

課題番号：21770238

研究課題名（和文）小脳神経回路に関する進化発生学的研究

研究課題名（英文）Evolutionary developmental research on cerebellar neural circuit formation.

研究代表者 川口 将史（KAWAGUCHI Masahumi）

愛媛大学・沿岸環境科学研究センター・グローバル COE 研究員

研究者番号：30513056

研究成果の概要（和文）：

小脳は運動やバランス感覚を制御しており、脊椎動物の進化の過程で二次的に付加されたと考えられる。最も原始的な脊椎動物の一種であるヤツメウナギにおいて、小脳神経回路の原型といえる脊髄小脳路の発生機構を解析した結果、神経軸索を反発するガイダンス分子 *Slit2* の発現が途切れた箇所を脊髄小脳路がすり抜けることがわかった。このようなパターンはマウスやカエルでも確認され、カエルの卵で *Slit2* の機能を阻害すると、脊髄小脳路の走行が乱れた。以上のことから、*Slit2* による脊髄小脳路の形成機構は、脊椎動物全体に共通な「小脳の原型」を完成するための仕組みの一つであると考えられた。

研究成果の概要（英文）：

The cerebellum, which regulates motor and sense of balance, thought to have been secondarily added to the primitive circuit during vertebrate evolution. To clarify the origin and evolution of the cerebellar circuit, we investigated the developmental mechanism of spinocerebellar tract in the lamprey, a primitive species of vertebrate. Then, we revealed that the spinocerebellar tract passes through the point breaking off the transcript of *Slit2*, a repulsive axon guidance molecule. The same pattern was observed in mouse and frog. In addition, functional inhibition of *Slit2* in the frog embryo induced the abnormal projection of spinocerebellar tract. These data suggest that *Slit2* dependent pathfinding of spinocerebellar axons is conserved through the vertebrate evolution and acts as a basic system for the cerebellar neural connections.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2010 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：進化発生学・神経発生学

科研費の分科・細目：生物科学・発生生物学

キーワード：神経系の進化・神経回路形成・軸索ガイダンス・無顎類

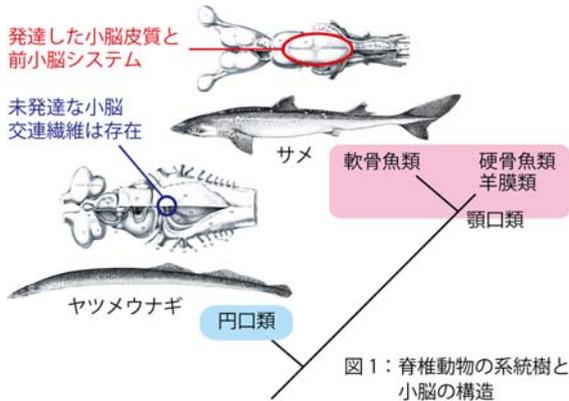
1. 研究開始当初の背景

脊椎動物の形態は多様性に富んでおり、その制御装置である脳神経系もまた驚くほど多様化している。神経系の機能単位である神経回路が進化の過程でどのようにして整備され、形態の機能と結びついてきたのかを理

解することは極めて重要であるにも関わらず、これまで解析がなされてこなかった。

小脳は中脳後脳境界（MHB）の背側に発生し、運動機能の統御やバランス感覚の制御を司る。ヤツメウナギなど円口類の小脳は未発達であり、脊髄小脳路などの単純な交連織

維のみが見られる。一方、顎口類の中で最も初期に分岐した軟骨魚類は、小脳皮質や前小脳システムなど、発達した小脳を持つ(図1)。このことから小脳神経回路は、脊椎動物の進化の過程で二次的に付加されと考えられる。このように系統間で明確な差異を示す脳構造について比較発生学的に解析することが、脊椎動物の神経回路が整備される過程を理解する上で最適なモデルになると考えた。



2. 研究の目的

本研究では、円口類から保存された小脳神経回路の起源的な形成メカニズムの解明を目指し、ヤツメウナギにおいてその原型といえる脊髓小脳路の発生機構を解析した。また、その発生機構について顎口類でも比較発生学的に解析し、実験発生学的手法を用いて機能解析を試みた。

3. 研究の方法

(1) ヤツメウナギの発生過程において脊髓小脳路を可視化するため、胚の体幹部背側にデキストランを注入した。また、脊髓小脳路と同時に軸索ガイダンス分子の遺伝子発現パターンを *in situ* ハイブリダイゼーションにて可視化し、脊髓小脳路の走行に関係する遺伝子の探索を試みた。

(2) (1)で同定された遺伝子について、顎口類でも同様の解析を行い、その神経回路形成機構が顎口類でも保存された脊椎動物に共通のものか、それとも円口類に特有のものか、比較発生学的に解析した。

(3) (2)で共通性が見いだされた遺伝子について、アフリカツメガエル8細胞期に予定脳領域割球にモルフォリノオリゴを注入し、機能阻害した際の脊髓小脳路の走行パターンを解析した。

4. 研究成果

(1) ヤツメウナギ胚へのデキストラン注入により、脊髓から前方に走行する神経線維がMHB 後方の背側で交連する様子を可視化で

き(図2A 矢頭)、位置関係からこれが脊髓小脳路であると同定された。また、*in situ* ハイブリダイゼーションによる遺伝子発現パターンの解析より、反発性軸索ガイダンス分子である *Slit2* の発現がMHB 後方の背側で特異的に断絶しており、脊髓小脳路はその隙間を

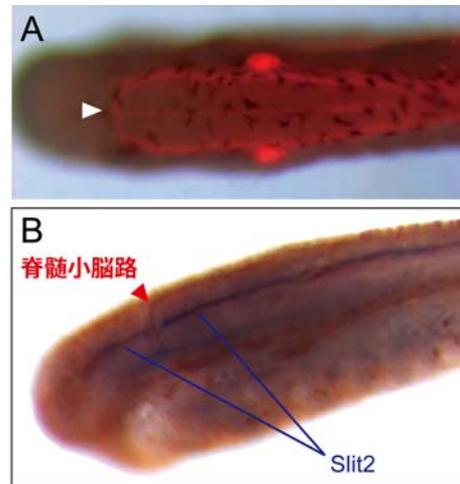


図2: ヤツメウナギ胚における脊髓小脳路の走行パターンと軸索ガイダンス因子Slit2発現パターンの関係性

すり抜けるように交連していることが確認された(図2B)。

(2) ヤツメウナギで観察された脊髓小脳路の走行パターンと *Slit2* 遺伝子の発現パターンの関係性が顎口類でも保存されているかどうか検討するため、哺乳類のマウスと生類のアフリカツメガエルの胚で解析を行った。その結果、顎口類でも脊髓小脳路は *Slit2* の発現ドメインを避けながら走行していることが明らかになった(図3)。

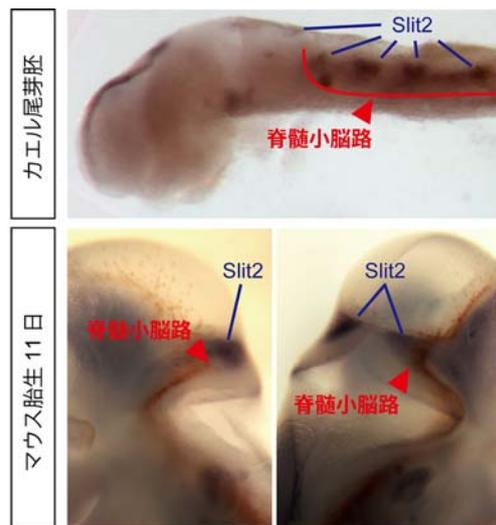


図3: 顎口類における脊髓小脳路と *Slit2* 発現パターンの関係性

(3) *Slit2* の発現パターンが脊髓小脳路の走行に機能的に影響を与えているのかどうかを検証するため、アフリカツメガエル胚に *Slit2*

モルフォリノオリゴを注入した (図 4A)。その結果、正常な脊髓小脳路は MHB 後方の背側に向かって緩やかにカーブしながら伸長するのに対し、*Slit2* を機能阻害した場合には、MHB に衝突して急に方向転換し、背側に伸長することが明らかになった (図 4B)。このことから、*Slit2* は脊髓小脳路の走行を機能的に制御していることが示唆された。

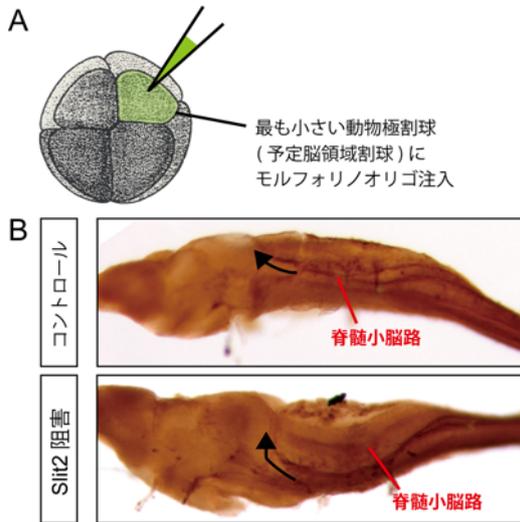


図 4: *Slit2* の機能阻害による脊髓小脳路走行パターンの変乱

(4) アフリカツメガエルの顔面・舌咽神経の両運動核において *Slit2* の発現が確認された (図 5A)。一方、ヤツメウナギの後脳では、舌咽神経運動核での *Slit2* の発現は観察されたが、顔面神経運動核での発現は確認されなかった (図 5B)。このことから、顔面神経運動核での *Slit2* の発現は顎口類の系統で二次的に獲得されたと考えられる。

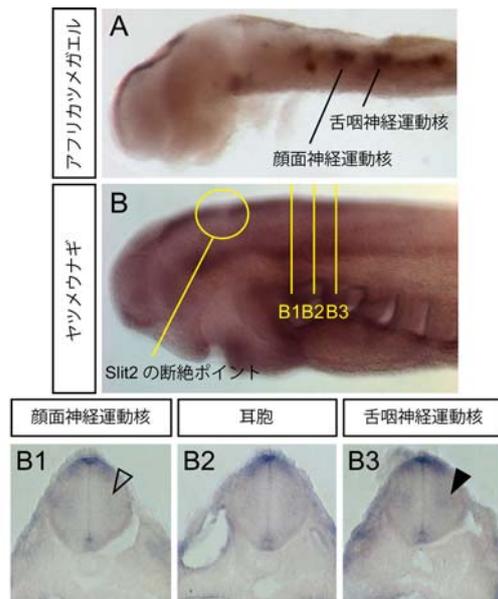
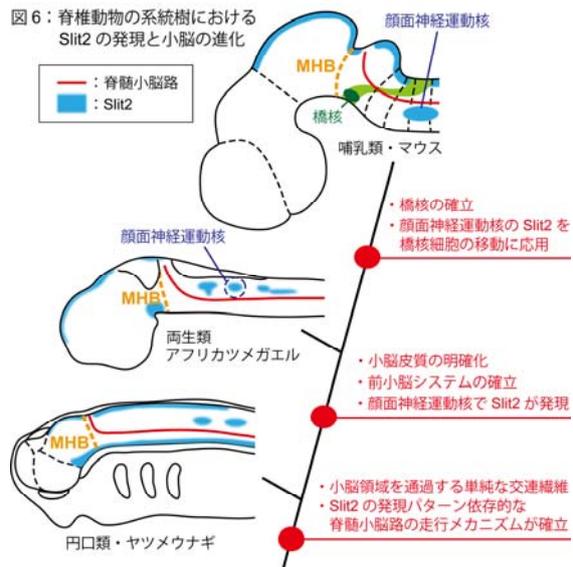


図 5: 円口類と顎口類の鰓弓運動神経核での *Slit2* 発現の比較

マウスでは、顔面神経運動核で発現する *Slit2* が橋核神経細胞の移動を制御することが知られているが、羊膜類以外の脊椎動物には橋核が存在しない。すなわち、顎口類の進化の過程で前小脳システムに橋核が付加された際、元から存在していた顔面神経運動核の *Slit2* 発現が細胞移動のランドマークとして応用されたと推測される。

(5) まとめ: 脊椎動物の小脳は、共通祖先の段階ですでに確立していた *Slit2* の発現パターンがあり、円口類では脊髓小脳路などの単純な交連繊維だけで構成されていたのだろう。その後、顎口類の系統で小脳皮質や前小脳システムが付加された他、顔面神経運動核が *Slit2* の発現を獲得した。さらにその後も、段階的に様々な神経細胞が付加される過程で、元からあった軸索ガイダンス分子の発現パターンを二次的に利用しながら神経回路が整備され、現在見られる小脳構造として完成してきたと考えられる (図 6)。



5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 4 件)

(1) Masahumi Kawaguchi*, Yuki Sugahara*, Tomoe Watanabe, Kouta Irie, Minoru Ishida, Daisuke Kurokawa, Shin-Ichi Kitamura, Hiromi Takata, Itsuki C. Handoh, Kei Nakayama, Yasunori Murakami (2012) Nervous system disruption and concomitant behavioral abnormality in early hatched pufferfish larvae exposed to heavy oil. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **In press** (*: equal contribute), 査読有り

(2) Kouta Irie*, Masahumi Kawaguchi*, Kaori Mizuno, Jun-Young Song, Kei Nakayama, Shin-Ichi Kitamura, Yasunori Murakami (2011) Effect of heavy oil on the development of the nervous system of floating and sinking teleost eggs. *Mar. Pollut. Bull.* **63**, 297-302 (*: equal contribute), 査読有り

(3) Masahumi Kawaguchi*, Jun-Young Song*, Kouta Irie, Yasunori Murakami, Kei Nakayama, Shin-Ichi Kitamura (2011) Disruption of *Sema3A* expression causes abnormal neural projection in heavy oil exposed Japanese flounder larvae. *Mar. Pollut. Bull.* **63**, 356-361 (*: equal contribute), 査読有り

(4) Ryosuke Kaneko, Masahumi Kawaguchi, Tomoko Toyama, Yusuke Taguchi, Takeshi Yagi (2009) Expression levels of Protocadherin-a transcripts are decreased by nonsense-mediated mRNA decay with frameshift mutations and by high DNA methylation in their promoter regions. *Gene* **430**, 86-94, 査読有り

[学会発表] (計 22 件)

(1) 川口将史「脊椎動物における小脳神経回路の進化」第 82 回日本動物学会年会 (旭川), 2011 年 9 月 22 日, ポスター発表

(2) Masahumi Kawaguchi “Evolution of developmental plan for peripheral nervous system in amniote trunk region” 第 34 回日本神経科学学会年会 (横浜), 2011 年 9 月 16 日, 英語口頭発表

(3) Masahumi Kawaguchi “Effect of heavy oil exposure during embryogenesis of the nervous system and behavior” International Symposium on Advanced Studies by Young Scientists on Environmental Science and Ecotoxicology (Matsuyama, Japan), 2011 年 8 月 5 日, 英語口演, **Best Oral Award 受賞**

(4) 川口将史「脊椎動物における小脳神経回路の進化」筑波大学下田臨海実験センターセミナー (下田), 2011 年 6 月 9 日, 招待口演

(5) Masahumi Kawaguchi “Modified developmental plan of peripheral nervous system in turtles” 第 88 回 日本生理学会大会 / 第 116 回 日本解剖学会総会・全国学術集会 合同大会シンポジウム「解剖学・生理学およびその融合的解析から見えてきた神経回路形成」(横浜), 2011 年 3 月 28 日, 英語招待口演

(6) 川口将史「脊椎動物の神経系の進化」第 4 回 EvoDevo 青年の会 (東京), 2010 年 11 月 27 日, 招待口演

(7) Masahumi Kawaguchi “Development of the peripheral nervous system in turtles; with reference to the evolution of the vertebrate trunk region” Neuro2010 (神戸), 2010 年 9 月 2 日, 英語口頭発表

(8) Masahumi Kawaguchi “Developmental plan of the peripheral nervous system in the turtle trunk region” EuroEvoDevo 2010 Conference (Paris, France), 2010 年 7 月 8 日, ポスター発表

(9) 川口将史「カメ体幹部における神経回路形成機構の解析」第 43 回日本発生生物学会年会 (京都), 2010 年 6 月 21 日, ポスター発表

(10) Masahumi Kawaguchi “Effects of heavy oil in the developing nervous system of Japanese flounder” 6th International Conference on Marine Pollution and Ecotoxicology (Hong Kong SAR, China), 2010 年 6 月 2 日, 英語口頭発表

(11) 川口将史「カメ体幹部における神経回路形成機構の解析」第 32 回日本神経科学学会年会 (名古屋), 2009 年 9 月 17 日, ポスター発表

[図書] (計 3 件)

(1) Interdisciplinary Studies on Environmental Chemistry Vol.6 “Advanced Environmental Studies by Young Scientists” (2012) Edited by: Masahumi Kawaguchi, Kentaro Misaki, Hiroyuki Sato, Taichi Yokokawa, Takaaki Itai, Tue M. Nguyen, Jun Ono, Shinsuke Tanabe. Global COE Program, Ehime University. TERRAPUB 出版, 総ページ数: 470 ページ

(2) Masahumi Kawaguchi, Junya Shibata, Ryota Kawanishi, Atsushi Sogabe, Torao Kawanaka, Koji Matsumoto, Koji Omori, Yasunori Murakami (2012) Establishment of the protocol for developmental analysis and observation of embryogenesis and axonogenesis in a freshwater goby, *Rhinogobius flumineus*. In: Interdisciplinary Studies on Environmental Chemistry Vol.6 “Advanced Environmental Studies by Young Scientists” TERRAPUB 出版, pp. 41-48, 査読有り

(3) Takako Noguchi, Takaaki Itai, Masahumi Kawaguchi, Shin Takahashi, Shinsuke Tanabe (2012) Applicability of human hair as a bioindicator for trace elements exposure. In: Interdisciplinary Studies on Environmental Chemistry Vol.6 “Advanced Environmental Studies by Young Scientists” TERRAPUB 出版, pp. 73-77, 査読有り

6. 研究組織

(1) 研究代表者

川口 将史 (KAWAGUCHI MASAHUMI)

愛媛大学・沿岸環境科学研究センター

グローバル COE 研究員

研究者番号 : 30513056