

平成 30 年 6 月 20 日現在

機関番号：13201

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K18335

研究課題名(和文)生殖前隔離はなぜ起こる? : 求愛と拒絶の神経回路

研究課題名(英文) Neural basis of reproductive isolation: Neural circuits for courtship and rejection.

研究代表者

川口 将史 (Masahumi, Kawaguchi)

富山大学・大学院医学薬学研究部(医学)・助教

研究者番号：30513056

交付決定額(研究期間全体) : (直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文) : 生殖的隔離の神経基盤を解明する目的で、ハゼ目小型魚類のヨシノボリに注目した。ヨシノボリの雄は、視覚情報だけで雌の種を識別し、求愛と威嚇の行動を正しく選択できた。神経活動マーカーであるc-fosの発現を指標に、行動に伴い活動した脳領域を観察した結果、求愛では終脳腹側野腹側部や視索前域が、威嚇では下垂体中葉が特異的に活動しており、脳の出力となる領域での活動の違いが確認された。ヨシノボリの終脳には、視覚中枢の構造として知られる終脳背側野外側部の複雑化や、他の魚種に見られない線条体様の構造が見いだされた。今後、これらの脳領域が、識別に伴う行動選択の中核として機能しているか、解析を進めていく予定である。

研究成果の概要(英文) : To elucidate the neural mechanism of reproductive isolation, we cast a spotlight on a Gobiida small fish, freshwater goby. Male gobies could discriminate females just with visual perception, and choose their reaction correctly between courtship and threatening behaviors. Expression patterns of c-fos, a marker for neural activity, revealed that the courtship behavior activated the ventral part of ventral telencephalon and the preoptic area, while the threatening induced the activity of the intermediate pituitary, suggesting that several brain regions related to the behavioral output show different responses between two behaviors. The telencephalon of freshwater goby exhibits some remarkable features; a complicated structure of the lateral part of dorsal telencephalon, the visual center of teleosts, and a striatum-like ventral telencephalic component. In future, we will examine whether these characteristic brain regions work as the center for behavioral selection.

研究分野：比較神経解剖学、行動生態学

キーワード：生殖前隔離 c-fos 行動生態学 魚類の脳 次世代シークエンサー

### 1. 研究開始当初の背景

地理的に隔絶していないにも関わらず、雌雄が交配しないために種分化が成立する現象を生殖前隔離という。生殖前隔離は種分化をもたらす主要素の一つだが、その成立メカニズムを動物の行動を司る神経回路の観点から明らかにした研究はこれまでにない。一般に、フェロモンや求愛歌、求愛ダンスなど、求愛要素の知覚が交配の成立に重要なことが知られている。特に弱電流で会話するアロワナ目のモルミルスは、種に特有の電気信号を用いて相手を識別しており、脳の発達に伴い微細な電気信号の違いを知覚できるようになったことで、種が多様化したと考えられている (Carlson *et al.*, 2011, *Science* 332)。以上より、求愛要素の知覚・判断を司る脳の処理過程が変容し、相手に応じた行動選択が変化すると生殖前隔離が起こると考えられる。すなわち、行動生態学的に生殖前隔離の成立が証明された野生動物を用い、同種と別種に対峙した際の脳の神経回路の活動の違いを比較することで、生殖前隔離の神経基盤の解明に迫れるのではないかと考えられる。

ハゼ目に属する小型魚類のヨシノボリでは生殖前隔離が成立しており、雄は同種に求愛する一方、別種を威嚇する (Kawanabe & Mizuno, 1989)。そのため、近縁種が同所的に生息していても、遺伝的な独自性を維持している (Mizuno *et al.*, 1979, *Jap. J. Ecol.* 29; Yamasaki *et al.*, 2015, *Mol. Phyl. Evol.* 90)。ところが、単一種だけが生息していた地域に移入種が混入した場合、容易に交雑が起こった (Mukai *et al.*, 2012, *Bull. Biogeogr. Soc. Japan* 67)。このことから、ヨシノボリは種分化の途上にあり、生殖前隔離だけで種の独自性を維持していることが推測されるため、生殖前隔離の神経基盤を解析する上で最適なモデルになる。これまでに、ヨシノボリの雄に水槽内で巣を作らせ、雌を提示することで求愛あるいは威嚇の行動を惹起できることを確認している。また、これらの行動に伴い活動した脳領域を、神経活動依存的に発現する *c-fos* の発現履歴に基づいて観察する系を確立した。

### 2. 研究の目的

本研究では、生殖前隔離を制御する神経基盤の理解を目指し、ヨシノボリをモデルとして以下の四点の解明を目的とした。

- (1) ヨシノボリの雌が、雄に求愛される条件とはどのようなものか？
- (2) ヨシノボリの雄は、どのような感覚情報に基づいて雌を識別するのか？
- (3) ヨシノボリをはじめとするハゼ目の脳の構造は、他の魚種とどこが異なるのか？
- (4) 同種に求愛している場合と別種を威嚇している場合で、*c-fos* の発現を指標とした雄の脳の活動領域は、どう異なるのか？

### 3. 研究の方法

上記四つの目的を達成するため、それぞれ以下の実験を行った。

- (1) 水温を調節できる水槽を設置し、夏の水温を 19、冬の水温を 10、繁殖期の 16 と設定して経時的に水温を変化させた。各時期の雌を撮影すると同時に、営巣する雄に提示し、その経時的な反応を観察した。
- (2) 視覚以外の感覚情報を排除して雌を雄に提示するため、雄が営巣する水槽とは個別の小さな水槽に雌を入れて雄に提示し、雄の反応を観察した。
- (3) ヨシノボリの脳切片を作成し、Nissl 染色および HuC/HuD に対する免疫染色を用いて細胞構築を観察した。また、次世代シーケンサーを用いたトランスクリプトーム解析によって、ヨシノボリの神経伝達関連因子や神経ペプチド、脳の構築に関わる転写因子の配列を同定し、これらの遺伝子の分布パターンを *in situ* ハイブリダイゼーションによって同定した。さらに、Tyrosine hydroxylase および Substance-P に対する免疫染色を行い、神経伝達路を観察した。
- (4) 雄が営巣する水槽とは個別の小さな水槽に雌を入れて雄に提示し、雄の反応を惹起した。反応開始から 30 分後に雄を麻酔下で断頭し、摘出した脳を新鮮凍結した。脳切片を作成して *c-fos* に対する *in situ* ハイブリダイゼーションを行い、卵成熟した同種の雌に求愛していた場合と別種の雌あるいは未成熟な同種の雌に威嚇していた場合の *c-fos* の分布パターンの違いを比較した。また、求愛特異的に活動した脳領域に対応する分布パターンを示す脳内因子を探索した。

### 4. 研究成果

各目的に対する結果は以下の通り。

- (1) 夏の水温 (19) から冬の水温 (10) の期間、カワヨシノボリの雌の体色は地味で目立たなかったが、繁殖期の水温 (16) では斑点の色素が凝縮して濃くなり、バックグラウンドの体色が明るくなった。また、腹部が大きく膨らんで黄色味がかかり、産卵口が突出した他、頬に黒いラインの模様が顕れた。これらがカワヨシノボリの雌の婚姻色と考えられる (図 1)。婚姻色の出ていない雌は同種の雄にも威嚇されたが、婚姻色を示す雌は同種の雄に求愛された。



図 1: 同一雌個体の経時的変化

- (2) カワヨシノボリの雄は、別の水槽に入れて提示された同種の雌に対し、典型的な求愛行動 (体色が黒くなる、口を震わせて水底を素早く這う動き、尾鰭を高く掲げて

振りながら巣に誘う動き)を示した。一方、同条件で提示された別種の雌に対し、典型的な威嚇行動(背鰭を立てて口を大きく開く、体当たりしようとする)を示した。以上の事から、嗅覚や聴覚の情報がなくても、視覚情報だけで雄は雌の種を識別し、適切な行動を選択できることがわかった(図2)。

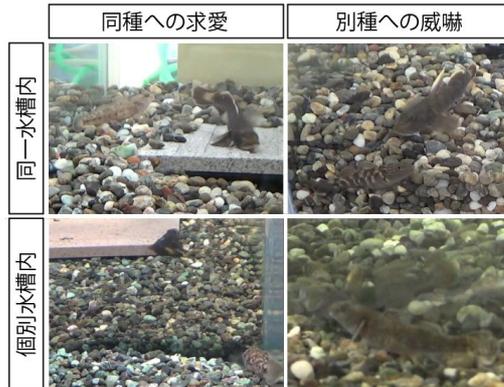


図2: 雌を同一水槽・個別水槽で提示した際の雄の反応

(3) ヨシノボリの終脳を観察した結果、以下の三点が他の魚種と大きく異なっていることがわかった。他の魚種で視覚情報の中枢として知られる終脳背側野外側部(DI)が複雑化しており、特に尾側に顕れるDI4-7は、細胞が密に並んだ板状構造で仕切られている。各DI領域は神経伝達関連因子や転写因子の分布パターンによって明確に区別でき、特にDI6には、DI4を介して上行するSubstance-P陽性線維(図3, 緑)が大量に終末している。終脳腹側野と連続した細胞集団が終脳全体に広く分布し、特に中心部(Vc1)が終脳背側野中心部(Dc)に大きく食い込んでいる。Vc1はGAD65, protachykinin, PENK-A陽性を示すことから、哺乳類の線条体に相当する構造であると考えられる(図3, 青)。終脳背側野背側部大細胞領域(Ddmg)の中にvGluT2a陽性を示す小型細胞集団がクラスター状に分布している。これらの細胞集団は吻側にも分布を広げ、Vc1の腹外側に接置する(図3, 赤)。これらの結果については現在、*The Journal of Comparative Neurology* に投稿中である。

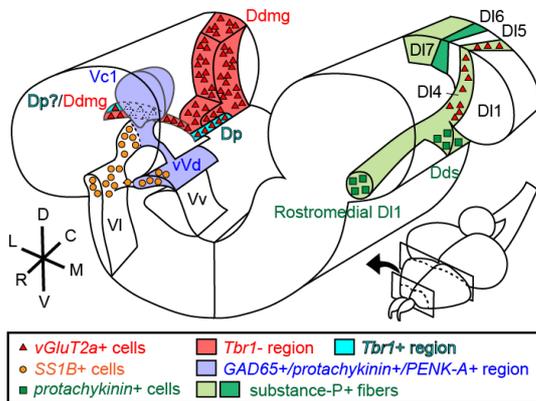


図3: 他の魚種に見られないヨシノボリの終脳の特徴

(4) 求愛でも威嚇でも、視覚伝導路である中脳視蓋とDIにc-fosの発現が確認された。

同種に求愛している雄では、終脳腹側野腹側部(Vv)や視索前域の吻側部に特異的な活動が確認されたのに対し、別種に威嚇している雄では、下垂体中葉で活動が観察された(図4上)。求愛特異的に活動が確認された視索前域の吻側部は、エストロゲン受容体α(ERα)陽性を示した(図4下)。また、同種の雌でも未成熟な雌に威嚇している雄では、別種に威嚇している時と同じc-fosの分布パターンが見られた(図4上)。以上よりカワヨシノボリの雄は、自分の縄張りに侵入した他個体に対し、基本的には威嚇して追い払うが、同種で卵熟した雌の時には神経回路のスイッチが切り替わり、求愛行動が惹起されることが示唆された。

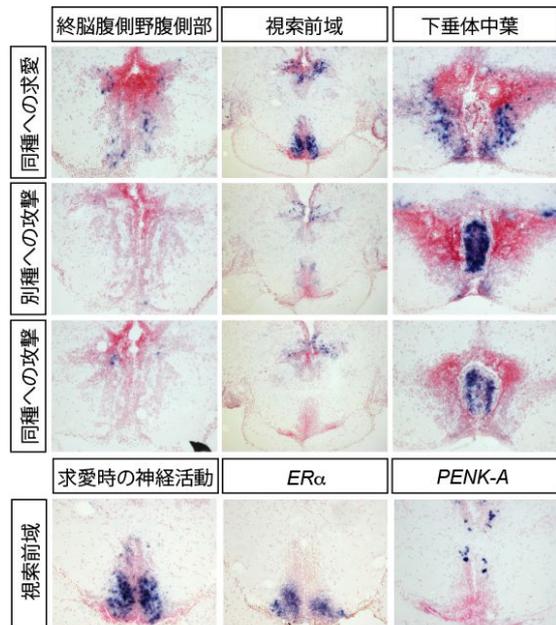


図4: 求愛と威嚇における雄の脳の活動の比較

以上のように、ヨシノボリの雄が視覚情報に基づいて雌の種を識別し、求愛と威嚇で異なる神経回路を使い分けることで、行動選択を実行していることが示唆された。しかし今回、神経活動の違いが見いだされた脳領域は主に行動の実行に関わる出力の領域であり、識別に伴い神経回路の切り替えを行う脳領域はまだ明らかになっていない。終脳に見いだされたいくつかの特徴的な構造が、これらの行動選択の中枢として機能している可能性がある。そこで今後は、これらの脳領域に注目し、解析を進めていく予定である。

### 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 5件)

Noguchi K, Ishikawa R, Kawaguchi M, Miyoshi K, Kawasaki T, Hirata T, Fukui M, Kuratani S, Tanaka M, Murakami Y. (2017) Expression patterns of *Sema3A* in developing amniote limbs: With reference to the diversification of peripheral

nerve innervation. *Dev. Growth Differ.* **59**, 270-285. doi: 10.1111/dgd.12364.

Itoyama Y, Kawara M, Fukui M, Sugahara Y, Kurokawa D, Kawaguchi M, Kitamura SI, Nakayama K, Murakami Y. (2017) Nervous system disruption and swimming abnormality in early-hatched pufferfish (*Takifugu niphobles*) larvae caused by pyrene is independent of aryl hydrocarbon receptors. *Mar. Pollut. Bull.* **124**, 792-797. doi: 10.1016/j.marpolbul.2017.02.058

Ichijo H, Nakamura T, Kawaguchi M, Takeuchi Y. (2017) An evolutionary hypothesis of binary opposition in functional incompatibility about habenular asymmetry in vertebrates. *Front. Neurosci.* **10**, 595. doi: 10.3389/fnins.2016.00595. eCollection 2016

Tosa Y, Tsukano K, Itoyama T, Fukagawa M, Nii Y, Ishikawa R, Suzuki KT, Fukui M, Kawaguchi M, Murakami Y. (2015) Involvement of Slit-Robo signaling in the development of the posterior commissure and concomitant swimming behavior in *Xenopus laevis*. *Zoological Lett.* **5**, 28. doi:10.1186/s40851-015-0029-9.

Tosa Y, Hirao A, Matsubara I, Kawaguchi M, Fukui M, Kuratani S, Murakami Y. (2015) Development of the thalamo-dorsal ventricular ridge tract in the Chinese soft-shelled turtle, *Pelodiscus sinensis*. *Dev. Growth Differ.* **57**, 40-57. doi:10.1111/dgd.12186.

〔学会発表〕(計 19件)

招待講演 Kawaguchi M. Neural basis of driving speciation among *Rhinogobius* species. The 2<sup>nd</sup> Brain Research Institute Monash Sunway-University of TOYAMA International Symposium –Recent Updates on Neurobehavioral Studies–. 2017 Dec 16; Toyama, Japan.

オーガナイザー 川口 将史. 第88回日本動物学会シンポジウム・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のシンポジウム. 2017 Sep 21; 富山.

招待講演 川口 将史. ヨシノボリ属の生殖前隔離を制御する神経基盤. 第3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. 2017 Aug 25-26; 岡崎.

川口 将史. ヨシノボリ属の交配前隔離を制御する神経基盤. 第24回 信州魚類研究会. 2017 Aug 6; 長野.

Kawaguchi M, Matsumoto K, Yamamoto N, Nakayama K, Hagio H, Shibata J, Sogabe A, Kawanishi R, Izumi H, Akazome Y, Suto F, Ichijo H, Murakami Y. Neural basis driving speciation

among *Rhinogobius* species. 第40回 日本神経科学学会大会. 2017 Jul 20-22; 幕張.

川口 将史. ヨシノボリ属の交配前隔離を制御する神経基盤. 第1回愛媛ヨシノボリ研究会. 2017 Jun 23; 愛媛.

招待講演 川口 将史. ヨシノボリ属の交配前隔離を制御する神経機構の解析. 第40回 長崎最西端 進化生態学セミナー. 2017 Mar 30; 長崎.

招待講演 川口 将史. カメの脊髄神経～ボディプランの改変が支配神経に及ぼす影響～. 第37回肉眼解剖懇話会. 2017 Mar 27; 長崎.

招待講演 川口 将史. 神経科学者、川に入る～種分化の起源に脳から迫る～. 弘前大学農学生命科学部 平成28年度第13回研究推進セミナー. 2016 Dec 13; 弘前.

招待講演 川口 将史. ヨシノボリ属の交配前隔離を制御する神経基盤. 第2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. 2016 Aug 21-22; 岡崎.

川口 将史. ヨシノボリ属の交配前隔離を制御する神経基盤. 第23回 信州魚類研究会. 2016 Aug 6-7; 長野.

Kawaguchi M, Matsumoto K, Nakayama K, Yamamoto N, Shibata J, Sogabe A, Kawanishi R, Akazome Y, Suto F, Ichijo H, Murakami Y. Neural basis of premating isolation in *Rhinogobius* species. 第39回 日本神経科学学会大会. 2016 Jul 20-22; 横浜.

招待講演 川口 将史, 渡邊 愛己, 真喜屋 宏美, 川崎 能彦, 増田 知之, 土佐 靖彦, 倉谷 滋, 村上 安則. カメ体幹部における脊髄神経形成過程の発生プログラムの進化. 第121回 日本解剖学会総会全国学術集会. 2016 Mar 28-30; 福島.

川口 将史, 松本 浩司, 仲山 慶, 山本 直之, 赤染 康久, 大森 浩二, 須藤 文和, 一條 裕之, 村上 安則. ヨシノボリ属の生殖前隔離を制御する神経基盤. 第11回 水生動物の行動と神経系シンポジウム. 2015 Dec 5-6; 横浜.

川口 将史, 松本 浩司, 柴田 淳也, 川西 亮太, 曾我部 篤, 仲山 慶, 山本 直之, 大森 浩二, 須藤 文和, 一條 裕之, 村上 安則. ヨシノボリ属の求愛行動を制御する神経基盤の解析. 日本動物学会 第86回大会. 2015 Sep 17-19; 新潟.

招待講演 川口 将史. ヨシノボリ属の生殖前隔離を制御する神経基盤. 第1回 ユニ-

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. 2015 Aug 18-19; 岡崎.

川口 将史, 松本 浩司, 柴田 淳也, 川西 亮太, 曾我部 篤, 仲山 慶, 山本 直之, 赤染 康久, 大森 浩二, 須藤 文和, 一條 裕之, 村上 安則. ヨシノボリ属の生殖前隔離を制御する神経基盤. 第5回 Tokyo Vertebrate Morphology Meeting. 2015 Aug 11; 東京.

川口 将史. ヨシノボリ属の生殖前隔離を制御する神経基盤. 第22回 信州魚類研究会. 2015 Aug 8-9; 長野.

Kawaguchi M, Matsumoto K, Nakayama K, Yamamoto N, Akazome Y, Suto F, Ichijo H, Murakami Y. Neural basis of reproductive isolation in *Rhinogobius* species. 第38回 日本神経学会大会. 2015 Jul 28-31; 神戸.

〔その他〕

ホームページ等

テレビ出演 川口 将史. BBTジオグラフィック富山. 2015 Aug 7; 富山テレビ.

テレビ出演 川口 将史. みんなのニュースBBTチャンネルエイト「水辺の探検隊」. 2015 Jun 29; 富山テレビ.

市民公開講座 川口 将史. 好き嫌いが種を分ける? : 求愛と拒絶の神経回路. ひみラボ市民公開講座. 2015 Jun 6-7; 氷見.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

川口 将史 (KAWAGUCHI, MASAHUMI)  
富山大学・大学院医学薬学研究部(医学)・  
助教  
研究者番号: 30513056

### (2) 研究協力者

山本 直之 (YAMAMOTO, NAOYUKI)

萩尾 華子 (HAGIO, HANAKO)

松本 浩司 (MATSUMOTO, KOJI)

仲山 慶 (NAKAYAMA, KEI)

和泉 宏謙 (IZUMI, HIRONORI)

村上 安則 (MURAKAMI, YASUNORI)