

平成 30 年 6 月 6 日現在

機関番号：15301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2016～2017

課題番号：16H06987

研究課題名(和文)細胞系譜単位を介した終脳多様性・保存性の進化機構の解析

研究課題名(英文)Clonal analysis in the medaka telencephalon

研究代表者

磯江 泰子(Yasuko, Isoe)

岡山大学・自然科学研究科・客員研究員

研究者番号：60786119

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：脊椎動物の「終脳(哺乳類では「大脳」に対応)」は、背側の「外套(大脳皮質)」と腹側の「外套下部(大脳基底核)」から成る。感覚統合・記憶学習に重要な外套は種間で多様化している。外套の種多様性が生じる機構は脳進化を考える上で重要だが不明である。発生期では種間で保存されているので、生後脳発達に着目する必要があると考え、顕著な脳発達が見られ、かつ種間で外套構造の多様化が見られる硬骨魚類のメダカを研究対象とした。成体終脳の新生神経細胞の体系的な構造解析や、解剖領域を構成する新生神経細胞の遺伝子発現制御解析を行った。その結果、外套の構築原理(区画構造の創出機構)を発見し、種間多様性が生じる機構を考察した。

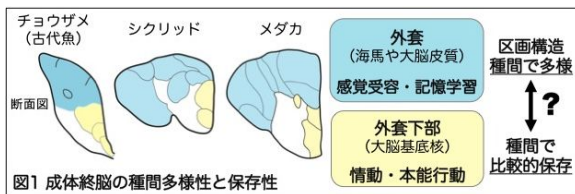
研究成果の概要(英文)：The telencephalon is considered as the center of higher brain function. It is constituted by the pallium and sub-pallium. It is reported that the pallium is highly diverse among vertebrates, and the sub-pallium is relatively conserved. It remains unknown how this difference has evolutionarily emerged. Since the structure of brain at the developmental stage is similar among species, we focused on the post-hatch neurogenesis and used medaka as a model. First, we systematically identify clonal units of new-born neurons and found that their morphology were different between the pallium and subpallium. Next, to investigate possible molecular mechanisms, we performed an integrative and genome-wide epigenomic analysis. It is suggested that the expression of genes of the axon guidance cascade were differentially regulated between the pallium and subpallium. It is assumed that different molecular mechanisms are involved in neurogenesis-mediated brain construction in the teleost telencephalon.

研究分野：神経科学

キーワード：終脳 神経新生 細胞系譜 神経幹細胞 硬骨魚類 メダカ

1. 研究開始当初の背景

脊椎動物の脳の最吻側に位置する「終脳(哺乳類では「大脳」に対応)」は、背側の「外套(大脳皮質に対応)」と腹側の「外套下部(大脳基底核)」から成る。終脳の解剖学的な区画構造や機能を種間比較すると、外套下部は魚類から哺乳類まで比較的保存されている。一方で、外套は同じ綱の種間でさえも大きく異なる[Comparative Neurology of the Telencephalon. Ebesson SOE, 1980]。例えば、硬骨魚類の古代魚のチョウザメでは解剖学的区画がほぼ存在しない一方、個体認知を行うシクリッドは種固有の解剖学的区画が存在する[Burmeister SS et al, 2009](図1)。外套は感覚統合・記憶学習に働き、脊椎動物の進化の過程で、大脳皮質の区画構造の複雑化が行動進化を生み出したとも考えられている。しかし、終脳の外套の種多様性が生じる機構は不明であった。



2. 研究の目的

成体終脳の外套構造は種間で多様な一方、発生初期の脳形態や遺伝子発現様式は種間で保存されている[Medina L et al. 2014]。そこで、私は多様性の解明には、より後期の生後の脳発達にも着目する必要があると考え、種間で外套構造の多様化が顕著に生じている硬骨魚類を研究対象にした。硬骨魚類ではふ化後、成体まで神経新生を介した顕著な脳発達が見られ、成体脳を構成するニューロンの多く(9割程度)が生後に新生したニューロン由来だと推定されている。硬骨魚類のモデル動物のゼブラフィッシュを使った研究から、成体終脳の各解剖学的区画で固有な遺伝子セットが発現し[Diotel et al, 2015; Ganz J et al. 2016]、外套表面の神経幹細胞から生じる新生ニューロンが腹側に移動して外套が発達することが報告された[Dirian L et al, 2014]。しかし、ゼブラフィッシュのゲノムサイズは1700Mbpと巨大で複雑なため、全ゲノムレベルでの解析や種間比較には必ずしも適していない。

本研究はメダカ(*Oryzias latipes*)を研究対象として選択した点が独創的である。メダカ外套はゼブラフィッシュと比較して、より複雑な解剖学的構造があり[Mueller T et al, 2011]、ゲノム解析手法も整備されている(ゲノムサイズ:700bp)[Kasahara M, 2007]。申請者は**メダカを用いて「生後の神経新生を介した終脳発達機構を解明」**することを目的とし

た。

3. 研究の方法

メダカの利点を生かして、(1)成体終脳の新生ニューロンの体系的な構造解析や、(2)解剖領域を構成する新生ニューロンの遺伝子発現制御解析を行った。

4. 研究成果

(1) 生後の神経新生に着目した終脳発達機構の解明

研究当初はメダカで新生ニューロンを標識する方法がなかったため、Cre/loxP組換えを誘導した少数の神経幹細胞から生じる、新生ニューロンの細胞系譜単位を可視化する系を確立した。新生ニューロン特異的に駆動するHuCプロモーター下流で組換え依存的にGFPが発現する遺伝子改変メダカ(HuC:loxP-DsRed-loxP-GFP、HuCメダカ)を使用し、低頻度で組換えを誘導することで、単一の神経幹細胞から発生する細胞系譜単位の構造を可視化した。方法は、熱刺激依存にCreが発現する遺伝子改変メダカ(HSP:Cre)とHuCメダカを掛け合わせ、神経管胚期に弱い熱刺激を加えて確率的な組換えを誘導した。さらに体系的な解析を行う目的で、ランダムに組換えを誘導した個体を約100個体作成し、細胞系譜単位の構造を同定・比較した。その結果、外套の解剖学的領域は複数個の区画構造の系譜単位から排他的に構築され、外套下部は複数の系譜単位由来の細胞が入り混じった構造をとっていた。外套下部の系譜単位の構築様式は本研究で初めて明らかになった。外套と外套下部の構築原理は、新生ニューロンの細胞系譜の観点から構造が大きく異なることを示した。

(2) 外套・外套下部の細胞系譜単位構造の違いをうむ分子機構の解明

成魚終脳内の系譜単位構造の違いに寄与する分子機構を調べる目的で、外套と外套下部で特異的に発現する遺伝子と発現制御に関わる分子候補をゲノムワイドに解析した。RNA-seqで2倍以上の発現の差のある遺伝子が集中するカスケードを探索すると「軸索ガイダンス因子」や「細胞接着因子」が挙げられた。さらに新生ニューロンで強く発現制御を受けるゲノム領域をエピゲノム解析し[Buenrostro J et al, 2015]、外套特異的に制御を受ける領域と外套下部特異的な領域が集中する遺伝子カスケードを探索すると、有意に「軸索ガイダンス因子」がヒットした。これらの発現制御の制御因子を探索するために、特異的な制御領域に選択的に出現する配列を機械学習で同定し(92%の正確性で判別可能)、結合し得る転写因子候補の発現をRNA-seqとin situ hybridization法で解析した結

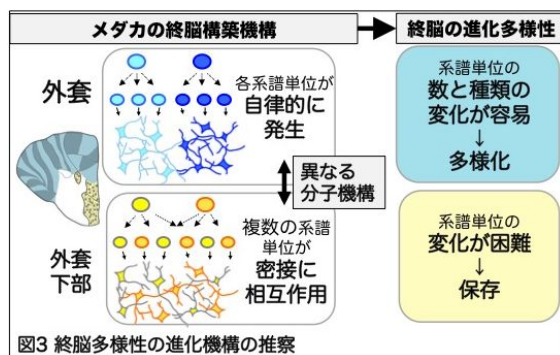
果、外套で選択的に制御する転写因子、外套下部の転写因子を同定した。外套と外套下部で各転写因子が特異的に発現し、ゲノム上で結合配列に選択的に強く結合して、軸索ガイダンス因子や接着因子の特異的な遺伝子発現を維持することで、成長過程を通して外套と外套下部で異なった系譜単位構造が構築されるという分子機構が示唆された。

### (3)外套の細胞系譜単位ごとの遺伝子発現制御解析

最後に、外套の系譜単位が独自の遺伝子発現制御を受けるかどうかを検証した。GFPで標識した成魚外套の細胞系譜単位を切り出して系譜単位間でエピゲノムを比較した。その結果、ゲノムワイドに独自のオープンクロマチンパターンが存在し、各系譜単位が独自のエピゲノムを持つことを示した。この結果は、外套の各系譜単位は独自のエピゲノム情報を元に自律的に発生することを示唆している。

以上より少なくとも硬骨魚類では、外套と外套下部で細胞系譜単位による構築原理が異なることが分子レベルでも明らかになった(図3)。外套を構成する各系譜単位は構造的にブロック化していることから、同じ系譜単位内の細胞同士で軸索を伸ばして接着して排他的な区画を作る。一方で、外套下部では外套とは別のガイダンス因子が発現して複数の系譜間で細胞が移動して混ざり合うことが示唆された。

では進化の過程でどのように終脳の種間多様性・保存性が生じたのか。本研究から、申請者は外套では、系譜単位間の相互作用が少なく自律的に発生するため、その数や種類の変化に対する拘束性が少ない。そのため細胞系譜の変化により多様化が生じやすい。一方で外套下部は系譜単位が密接に相互作用するため、変化に対する拘束性が高くなり、種間で保存されたという仮説を提案する(図3)。鳥類や哺乳類では成体での脳容積が大きいいため、脳発達段階で系譜単位構造の体系的な解析をすることが難しかった。本研究が脊椎動物終脳の種多様性・保存性の進化機構の解明の一端となることが期待される。



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 0件)

[学会発表](計 8件)

1. 磯江泰子 Clonal analysis of newborn neurons in the adult telencephalon in medaka fish, Neuroscience 2017/Society for Neuroscience 2018年11月, ワシントンDC(アメリカ)

2. 磯江泰子 Clonal analysis of newborn neurons in the adult telencephalon in medaka fish, Neuro2017/The 40th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society, 2017年7月, 神奈川県・横浜

3. 磯江泰子, Clonal analysis of construction mechanism of the adult telencephalon mediated by post-hatch neurogenesis in medaka fish. 18th International Congress of Developmental Biology, 2017年6月, シンガポール

4. 磯江泰子, Analysis of construction mechanism of medaka telencephalon by post-hatch neurogenesis., Symposium of Wiring and Functional Principles of Neural Circuits, 2016年11月 サン・ディエゴ(アメリカ)

5. 磯江泰子, Analysis of construction mechanism of medaka telencephalon by post-hatch neurogenesis. Society for Neuroscience, 2016年11月 サン・ディエゴ(アメリカ)

6. 磯江泰子, Effect of behavioral development and social experience on visually-mediated conspecific interaction in Japanese medaka fish (Oryzias latipes), Society for Social Neuroscience (S4SN), 2016年11月 サン・ディエゴ(アメリカ)

7. 磯江泰子, メダカの成長過程における社会性の発達と終脳の発達, 行動遺伝学研究会, 2016年10月, 静岡県・三島

8. 磯江泰子, 生後の神経新生を介したメダカ終脳構築機構の解析から探る、硬骨魚類の終脳進化機構, 日本進化学会第18回年会, 2016年8月, 東京

[図書](計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況（計 0 件）

取得状況（計 0 件）

〔その他〕

ホームページ等

#### 6．研究組織

##### (1)研究代表者

磯江 泰子 ( ISOE Yasuko )

岡山大学・大学院自然科学研究科・客員研究員

研究者番号：60786119

##### (2)研究分担者

( )

研究者番号：

##### (3)連携研究者

##### (4)研究協力者

竹内 秀明 ( TAKEUCHI Hideaki )

岡山大学・大学院自然科学研究科・准教授

研究者番号：00376534

中村 遼平 ( NAKAMURA Ryohei )

岡山大学・大学院自然科学研究科・助教授

研究者番号：30756458