

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和元年5月30日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(B) (特設分野研究)

研究期間：2016～2018

課題番号：16KT0072

研究課題名(和文) 脳発達における外套の機能構築原理とその創発特性の検証

研究課題名(英文) The basic design of post-hatch development of the pallium and examination of its emergent properties

研究代表者

竹内 秀明 (TAKEUCHI, Hideaki)

岡山大学・自然科学研究科・准教授

研究者番号：00376534

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,800,000円

研究成果の概要(和文)：脊椎動物の脳は、背側パリウム(大脳皮質に対応)と腹側のサブパリウム(大脳基底核に対応)に大別される。メダカではパリウムの各区画構造は孵化後の成長過程に生じる「新生ニューロンの細胞系譜単位」が「レゴブロック」のように組合わさることにより構築されることを見出した。さらにパリウム及び比較対象としてサブパリウムの細胞系譜単位を合計30個程度摘出して、ATAC-Seqによりオープンクロマチン領域を全ゲノムレベルで比較した。その結果、パリウムとサブパリウムのエピゲノムパターンは大きく異なっており、パリウムの各細胞系譜単位の間にも特徴的なエピゲノムパターンを存在することを発見した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

脊椎動物の脳背側パリウム(大脳皮質)は、記憶・学習や社会認知等の脳の高次機能に関わっている。魚類から哺乳類までパリウムは解剖学的に明確に区画化されており、パリウムは各区画によって機能分担されていると考えられている。これまでパリウムを区画化する仕組みは不明であった。本研究ではメダカ成体脳のパリウムを構成する脳区画が生後の脳発達段階で生まれた新生ニューロンの細胞系譜単位に対応しており、各細胞系譜単位は特徴的なエピゲノムパターンを持つことを世界に先駆けて発見した。今後、本研究を足場にして生後の脳発達期に社会認知機能などの高次脳機能が発達する仕組みを分子レベルで解明できることが期待される。

研究成果の概要(英文)：The telencephalon can be subdivided into the pallium (dorsal part) and subpallium (ventral part). The pallium consists of multiple compartmentalized anatomical regions. In this study, we found that the individual anatomical regions of the pallium comprise multiple clonal units of new-born neurons. Each clonal unit was generated from a single progenitor cell during the post-hatch stage. Here we dissected clonal units (about 30 units), which were genetically labeled with GFP, and compared open chromatin profiles using ATAC-Seq. Here we showed significant difference of profiles between the pallium and subpallium. In addition, individual clonal units have specific profiles, suggesting that epigenetic modification might regulate gene expression of the clonal units and "lineage diversity" could generate compartmentalized structures of the pallium.

研究分野：神経科学

キーワード：神経新生 脳発達

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

脊椎動物の終脳は、脳を外から覆うパリウム（哺乳類の大脳皮質に対応）とその下部に位置するサブパリウム（大脳基底核）から構成されている。サブパリウム（大脳基底核）の構造と機能は脊椎動物間（魚類から哺乳類まで）で比較的保存されている。一方で、パリウムの構造と機能は魚類、鳥類、哺乳類で大きく異なり、同じ動物類内でも解剖学的に脳領域の数が異なっている。例えば哺乳類間で比較すると、げっ歯類では7-12個の大脳皮質領域があるのに対して、霊長類では30-50個の領域に分けられる。また、真骨魚類の外套は10-20個に区画化されており、魚種によって区画数が異なる（図1）。ヒトを含めた哺乳類の外套は区画毎に機能分化したと考えられており（「機能局在論」）、パリウムにおいて言語野等の新規な区画が獲得されたことが、動物の高度な認知能力やヒト知性を生み出したと信じられている。このようにパリウム区画化と種多様性は脊椎動物で広く観察されているが「外套の区画化を生み出す原理」は不明であり、脳神経科学分野において古くから謎であった。

一方で、真骨魚類（メダカ）では、孵化後も脳全体で神経新生が継続して生じており (Isoe et al., 2012, Kuroyanagi et al., 2010)、脳の細胞数は稚魚から成魚になるまでに5~10倍近く増加する。よって成体脳を構成するニューロンの多くは、胚発生過程に誕生したのではなく、成長段階で生まれた新生ニューロン由来であると推定される。そこでメダカ（真骨魚類）の終脳の新生ニューロンの細胞系譜解析（一つの神経幹細胞から発生した細胞群）を行った結果、いくつかのパリウム区画が新生ニューロンの細胞系譜単位に対応することを見出した (Okuyama et al., 2013)。

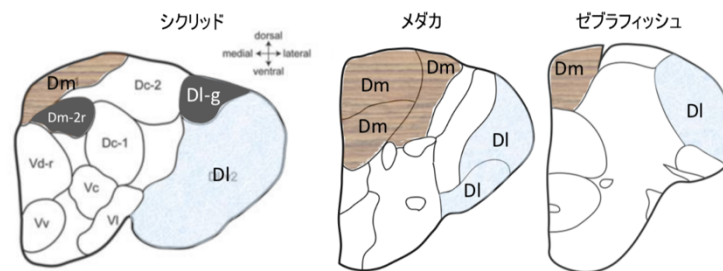


図1 終脳右半球の区画化構造(断面)の種間比較図
Dm, Dlに対応する領域を同じパターンで表示。濃い色で示した領域(Dm-2r, Dl-g)がシクリッド種固有な区画 (Burmeister et al., 2009)。

2. 研究の目的

- (1) 本研究のメダカを材料にして神経新生を介して成体脳パリウムが区画化される分子機構を解明する。
- (2) メダカのパリウムがほ乳類のように各区画が機能分化しているか否か調べると目的で、社会的刺激によって活性化する脳領域をパリウムで検索した。

3. 研究の方法

- (1) 遺伝子改変個体を用いた遺伝的ラベルによってメダカの成体終脳の全新生ニューロンの細胞系譜解析を体系的に行った。神経胚期に熱刺激に Cre/loxP 組換えを低頻度に誘導することで、新生ニューロンを生み出す神経幹細胞を遺伝的にラベルし (Okuyama et al., 2013)、成体脳を光シート顕微鏡で3D撮影した。ここでは光シート顕微鏡を用いた透明化終脳(大脳)の3次元画像取得法とメダカ脳の標準化法の確立することで、成体脳が新生ニューロンの細胞系譜単位によって構築される様式を解析した。
- (2) パリウムとサブパリウムの構築様式の違いを生む分子機構を調べる目的で、ATAC-seq法を行い、全ゲノムレベルでそれぞれに特異的なオープンクロマチン領域を同定した。ATAC-seq法では解剖して抽出した脳領域(数千~数万細胞)から抽出した核をトランスポゼース処理し、ゲノム上のオープンクロマチン領域内に特定アダプター配列を挿入する。挿入されたDNAの近辺を、アダプター配列を利用してPCRによって増幅し、次世代シーケンサー解析を行うことで、オープンクロマチン領域を同定した (Nakamura et al., 2018)。
- (3) パリウムの細胞系譜解析で特徴的なエピゲノムパターンがあるかどうかを検証する目的で、ビプラトーム切片からラベルされたGFPシグナルを目印に約30種類の系譜単位を回収し、ATAC-seqを行った。
- (4) メダカのオスとメスのペアーをガラスの仕切り越しに半日お見合いさせると、メスはお見合いした「見知ったオス」を性的パートナーとして選択し、「見知らぬオス」を拒絶する傾向がある (Okuyama et al., 2014)。さらに、メスは「顔」でオスを見分けており、ヒトの心理学実験で有名な「倒立顔効果」がメダカでも生じる (Wang and Takeuchi, 2017)。このことからメダカにもヒト同様に顔認知に特化した神経機構(顔領域)がパリウムに存在する可能性がある。本研究課題では、オスの視覚刺激を与えた後に、メダカのメス脳のパリウムにおいて

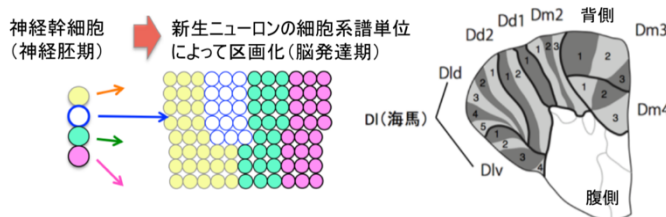


図2 メダカ成体脳パリウムは細胞系譜単位によって区画化する
片半球で計40個の領域に区画化(図は21個の領域を示す)

活性化している脳領域を最初期遺伝子の *in situ* hybridization 法によって検索した。

4. 研究成果

(1) メダカ大脳（パリウムとサブパリウム）の新生ニューロンは神経胚期の 80 個（片半球 40 個）の神経幹細胞から発生することを発見した。またパリウムでは全ての細胞系譜単位が排他的に配置し、各細胞系譜単位が解剖学的区画（Dm や D1）の中で小区画を構築していた（図 2）。このことから、外套では新生ニューロンの細胞系譜単位が区画構造を生み出すことを見出した。一方で、サブパリウムは一つの脳区画は複数のクローナルユニットが複雑に組み合わさってできていた。

(2) パリウムとサブパリウム特異的なオープンクロマチン領域をそれぞれ 940 個、536 個同定することに成功した（図 3）。また機械学習によりパリウムとサブパリウムのオープンクロマチン領域に共通した塩基配列を見出し、その塩基配列に結合する転写因子群がパリウムとサブパリウム選択的に発現することを見出した。これにより、パリウム/サブパリウムの違いは両脳領域のエピジェネティックな状態によって規定されており、特定の転写因子を介した制御が存在することを示唆した。

(3) 全ゲノムにおいてオープンクロマチンのピークを比較しクラスタリング解析の結果、オープン・クローズドのクロマチン構造パターンがパリウムの解剖学的領域間で異なることが示唆された（図 4）。

(4) オスの視覚情報を与えた結果、メスの脳において細胞系譜単位に対応するの 1 区画で最初期遺伝子の発現が選択的に検出された。ほ乳類と硬骨魚類の大脳（終脳）の構造は大きく異なり、海馬や大脳皮質に相当する脳領域は硬骨魚類には存在しないと信じられていた。しかし、現在では脳の発生過程や遺伝子発現プロファイルの比較生物学的解析から、パリウム D1（背側外側）領域（図 2）がほ乳類の海馬に対応すると考えられている。さらに真骨魚類では網膜で受容された視覚情報は上丘（視蓋）を経由して、パリウム D1 領域に入力するため、当該脳領域は真骨魚類の高次視覚野は対応すると考えられている。霊長類では「顔領域」は海馬体周辺のパリウムの高次視覚中枢に存在する。パリウム（Dd）は D1 領域と近接していることから、当該領域はメダカと同種認知（顔認知）に関わる可能性がある。

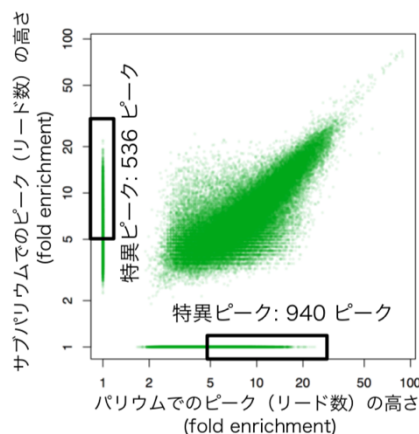


図 3 ATAC-seq法でパリウム/サブパリウムに特異的なオープンクロマチン領域の同定した

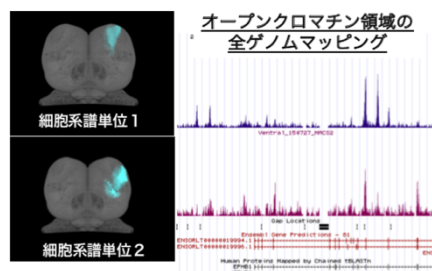


図 4 ATAC-seq法でパリウムの細胞系譜単位同士のエピゲノムパターンを比較

<引用文献>

- (1) *p53* mutation suppresses adult neurogenesis in medaka fish (*Oryzias latipes*). Y. Isoe, T. Okuyama, Y. Taniguchi, T. Kubo, and H. Takeuchi, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **423**, 627-631 (2012).
- (2) Proliferation zones in adult medaka (*Oryzias latipes*) brain. Y. Kuroyanagi, T. Okuyama, Y. Suehiro, H. Imada, A. Shimada, K. Naruse, H. Takeda, T. Kubo, and H. Takeuchi, *Brain Res.* **1323**, 33-40 (2010).
- (3) Controlled Cre/loxP site-specific recombination in the developing brain in medaka fish, *Oryzias latipes*. T. Okuyama, Y. Isoe, M. Hoki, Y. Suehiro, G. Yamagishi, K. Naruse, M. Kinoshita, Y. Kamei, A. Shimizu, T. Kubo, and H. Takeuchi, *PLoS ONE* **8**, e66597 (2013).
- (4) CTCF looping is established during gastrulation in medaka embryos. R. Nakamura, Y. Motai, M. Kumagai, H. Nishiyama, N.C. Durand, K. Kondo, T. Kondo, T. Tsukahara, A. Shimada, E. Aiden, S. Morishita, H. Takeda, *bioRxiv* (2018), <https://doi.org/10.1101/454082>
- (5) A neural mechanism underlying mating preferences for familiar individuals in medaka fish. T. Okuyama, S. Yokoi, H. Abe, Y. Suehiro, H. Imada, M. Tanaka, T. Kawasaki, S. Yuba, Y. Taniguchi, Y. Kamei, K. Okubo, A. Shimada, K. Naruse, H. Takeda, Y. Oka, T. Kubo, and H. Takeuchi, *Science* **343**, 91-94 (2014).
- (6) Individual recognition and the 'face inversion effect' in medaka fish (*Oryzias latipes*). M. Y. Wang* and H. Takeuchi, *eLife*, **6**, 24728 (2017).

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計4件)

- ① 「メダカの個体認知能力と配偶者選択」王牧芸、横井佐織、奥山輝大、竹内秀明、生物の科学「遺伝」72, 630-636. エヌ・ティー・エス (2018)、査読なし
- ② 「メダカの行動学研究の最先端～メダカはなぜ豊かな色彩を持つのか？」竹内秀明、深町昌司、亀井保博、成瀬清；生物の科学「遺伝」72, 608-610. エヌ・ティー・エス (2018) 査読なし
- ③ 「メダカを用いた”魚類社会脳”の分子神経基盤の解明」竹内秀明、ブレインサイエンス・レビュー 2017 (公財)ブレインサイエンス振興財団 p.115-134 (2017) 査読なし
- ④ Molecular basis of social competence in medaka fish. T. Okuyama, S. Yokoi and H. Takeuchi *Dev. Growth. Differ.* 59, 211-218 (2017) 査読あり

[学会発表] (計6件)

- 1) Hideaki Takeuchi (2019年3月) “The molecular basis underlying social behaviors in medaka fish” “The Third Sino-Japan Symposium on the Frontier of Behavioral Neuroendocrinology (つくば)
- 2) Hideaki Takeuchi (2018年5月) “Social peptides in medaka fish” International workshop on “UNDERSTANDING THE NEUROREGULATORY ACTIONS OF OXYTOCIN AND ITS POTENTIAL CLINICAL APPLICATIONS”, ERICE, Italy
- 3) Hideaki Takeuchi (2018年4月) “Individual recognition in medaka fish” 4rd Medaka Strategic Meeting, Heidelberg, Germany
- 4) Hideaki Takeuchi (2017月6月) “Molecular basis underlying fish social competence ~ Social Neuropeptide in medaka fish.” Symposium on Oxytocin and Social Behavior: Animal and Human Studies toward ASD Pathophysiology and Therapeutic Effects (浜松)
- 5) Hideaki Takeuchi (2017月4月) “Molecular basis of social competence in medaka fish” 18th International Congress of Comparative Endocrinology, Chateau Lake Louise, Canada
- 6) 竹内秀明 (特別講演) (2017月3月) 「メダカの社会的コンピテンスを生み出す分子神経機構」, 第70回栃木県精神医学会, 宇都宮市

[その他]

ホームページ等

<https://sites.google.com/view/molecular-ethology-laboratory/>

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：中村 遼平

ローマ字氏名：NAKAMURA, Ryohei

所属研究機関名：東京大学

部局名：大学院理学系研究科(理学部)

職名：助教

研究者番号 (8桁)：30756458

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：磯江 泰子

ローマ字氏名：ISOE, Yasuko

(3) 研究協力者

研究協力者氏名：亀井 保博

ローマ字氏名：KAMEI, Yasuhiro

(4) 研究協力者

研究協力者氏名：野中 茂紀

ローマ字氏名：NONAKA, Shigenori

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。