

令和 4 年 5 月 30 日現在

機関番号：12102

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K15855

研究課題名(和文)脊椎動物における視覚行動選択の進化的起源の解明

研究課題名(英文)Evolutionary origin of visual decision making in the vertebrates

研究代表者

鈴木 大地 (Suzuki, Daichi)

筑波大学・生命環境系・助教

研究者番号：60866672

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は視覚行動を制御する視蓋ニューロンの分化と進化のメカニズムの解明を目的とする。これまでの研究により、ヤツメウナギの視蓋には同側/対側の脳幹へ出力する2種類の視蓋ニューロンがあり、それぞれ忌避と指向の視覚行動を制御していることが明らかとなっている。本研究では、これら2種類の視蓋ニューロンについて、同側性ニューロンは幼生期での成長を通じて、対側性ニューロンは変態期に分化すること、そして同側性ニューロンではEphBという軸索誘導分子受容体遺伝子が特異的に発現することが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

視覚は他の感覚に比べ、遠距離の状況をすばやく詳細に知ることができることから、適応的な行動を選択する際に果たす役割がきわめて大きく、ヒトの健全な生活においても欠かせない要素である。また、視覚を使った行動の意思決定の中枢である中脳視蓋の神経構造は、ヒトを含めた脊椎動物で広く保存されていることが知られている。したがって本研究の成果は、視覚を使った行動の意思決定の原理の理解に大きな寄与を及ぼすものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：This study aims to elucidate the evolutionary origin of the vertebrate tectal neurons that control visual decision making. Previous study showed that there are two types of tectal neurons, one project to the brain stem ipsilaterally and the other contralaterally, controlling avoidance and orienting movements, respectively. In this study, we first clarified that the ipsilaterally brain stem-projecting neurons differentiate during larval stages, while contralaterally brain stem-projecting neurons appear in the metamorphosis. In addition, we also found that an axon guidance molecule receptor gene EphB is specifically expressed in the ipsilaterally brain stem-projecting neurons.

研究分野：進化神経行動学

キーワード：ヤツメウナギ 視蓋 視覚 意思決定

1. 研究開始当初の背景

空間内を自由に動き回る動物にとって、知覚した対象物に近づくか避けるかの行動選択は意思決定の根幹をなし、個体の生存に大きく関わる。視覚（ここでは光の有無や方向を知覚する光受容ではなく、外界を像として捉える像形成視 image forming vision を指すものとする）は嗅覚よりすばやく、触覚や電気受容よりも遠くから詳細に対象物を捕捉できる点で、適応的な行動を選択する際に果たす役割がきわめて大きい。

脊椎動物に至る系統では、視覚の進化（像形成視の獲得）は脊椎動物の共通祖先の段階で起こったと考えられている（図1、Suzuki & Grillner 2018, *Biol Rev* より改変）。脊椎動物に近縁な無脊椎動物である原索動物（ナメクジウオやホヤ）には光受容が可能な程度の眼しか無いのに対し、ほとんどの脊椎動物には視覚の形成が可能なカメラ眼が備わっているためである。また化石魚類であるハイコウイクチスやメタスプリッギナにも（カメラ眼の存在を示す）レンズ様の構造が見出されている。

しかし軟組織である脳・神経構造は化石にはほとんど残らないため、古生物学によって視覚系の進化を明らかにするには限界がある。そこで進化形態学・進化発生学・比較生理学的なアプローチが必要となる。脊椎動物の basalmost な動物群である円口類に属すヤツメウナギは祖先的な形質を多く保存するため（たとえば顎や対鰭を欠くなど）、重要な研究対象として扱われてきた。ヌタウナギはヤツメウナギと同じく円口類に属すが、深海への適応により視覚系については退化してしまっている。

哺乳類以外の脊椎動物では、中脳の視蓋と呼ばれる脳領域が主要な視覚中枢の役割を果たし、発生段階から視蓋への視神経の投射（神経入力）が形成される。一方で申請者らの研究によって、ヤツメウナギの視覚系は独特な段階的発達を示すことがわかってきた（図2、Suzuki & Grillner 2018, *Biol Rev* より改変）。成体では他の（非哺乳類）脊椎動物と同様に視蓋への投射が見られ、視覚を備えていると考えられている。それに対し初期幼生の眼は、負の光走性を司る光受容程度の機能しかないと考えられている。申請者らは、この初期幼生では視蓋への視神経投射が見

られず、間脳の視蓋前域という別の脳領域が主な投射先になっていること、さらにこの初期幼生の光受容系（視覚系）が原索動物ナメクジウオの光受容系と類似していることを明らかにした（Suzuki et al., 2015, *J Comp Neurol*）。つまりヤツメウナギの視覚系は原索動物型から脊椎動物型へと変化することが示唆された。

さらに申請者らは、ヤツメウナギ成体の視蓋には同側/対側の脳幹へ出力する2種類の視蓋ニューロンがあり、それぞれ忌避と指向の視覚行動を制御していることを明らかにした（図3、Suzuki et al., 2019, *PNAS* より改変）。つまり忌避/指向の視覚行動は、同側/対側の脳幹に投射する視蓋ニューロンに制御されており、この2種類のニューロンの分化が単純な光走性から複雑な視覚行動が進化した鍵だった可能性が示された。

2. 研究の目的

本研究は視覚行動を制御する神経回路の分化と進化のメカニズムの解明を目指して、ヤツメウナギの変態前後において視覚行動を制御する2種類の視蓋ニューロンの分化メカニズムを明らかにすることを目的とした。

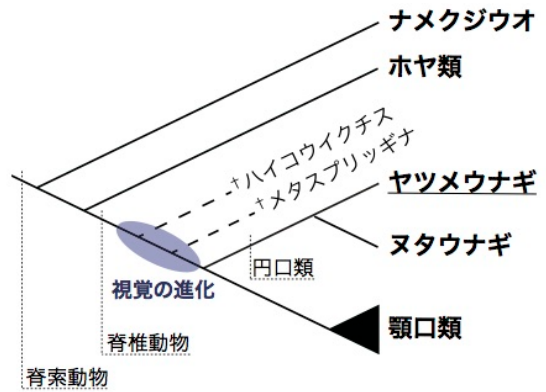


図1 脊椎動物の系統関係

原索動物（ナメクジウオやホヤ）には光受容が可能な程度の眼しか無いのに対し、ほとんどの脊椎動物には視覚の形成が可能なカメラ眼が備わっているためである。また化石魚類であるハイコウイクチスやメタスプリッギナにも（カメラ眼の存在を示す）レンズ様の構造が見出されている。

しかし軟組織である脳・神経構造は化石にはほとんど残らないため、古生物学によって視覚系の進化を明らかにするには限界がある。そこで進化形態学・進化発生学・比較生理学的なアプローチが必要となる。脊椎動物の basalmost な動物群である円口類に属すヤツメウナギは祖先的な形質を多く保存するため（たとえば顎や対鰭を欠くなど）、重要な研究対象として扱われてきた。ヌタウナギはヤツメウナギと同じく円口類に属すが、深海への適応により視覚系については退化してしまっている。

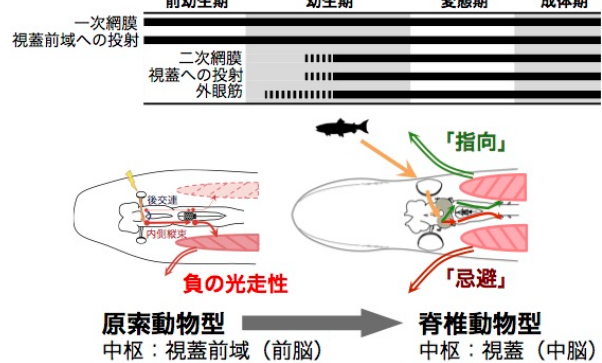


図2 ヤツメウナギ視覚系の段階的発達

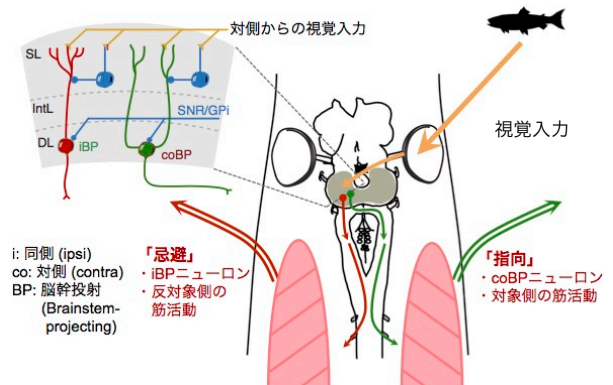


図3 視覚行動を制御すると推定されるヤツメウナギ成体の視蓋ニューロン

3. 研究の方法

① 変態前後での眼および視蓋の発達の定量化

ヤツメウナギの変態前後での視覚系の変化を形態の点から捉えるために、三次元立体構築による眼および視蓋の発達の定量化を行った。まず軟組織を可視化する diceCT (Ginac et al. 2016) によって、幼生期、変態期 (全 6 ステージ)、変態後の成体の各段階のヤツメウナギ頭部を μ CT スキャンした。次に、得られた三次元画像データを三次元画像解析ソフトウェア Amira によって眼および脳を三次元再構築した。

② 軸索トレースによる分化時期の特定

上述のように、ヤツメウナギの視覚系は初期幼生から成体になるまでに原索動物型から脊椎動物型に段階的に発達する。そこで同側/対側の脳幹に投射する 2 種類の視蓋ニューロンがどの段階で分化するのか特定するために、幼生期、変態期、変態後の成体の各段階で軸索トレース実験を行う。すなわち蛍光デキストランを脳幹部に微量注入し、逆行的に軸索をトレースすることで視蓋ニューロンを可視化し、観察した。

③ 細胞単離、微量 RNA-seq による特異的発現遺伝子の探索

上記実験と並行して、2 種類の視蓋ニューロンでどのような遺伝子が特異的に発現しているのか探索するために、細胞単離、微量 RNA-seq 実験を行う。すなわち成体の脳幹部に蛍光デキストランを脳幹部に微量注入して逆行的に軸索をトレースしたのち、左右の視蓋を切り分けて別々に細胞単離した。それにより、微量注入した同側の視蓋から同側性の視蓋ニューロンを、対側の視蓋から対側性の視蓋ニューロンを選択的に標識した。これらのニューロンを実体顕微鏡下で吸引ガラスピペットにより単離し、微量 RNA-seq を行って比較することで、2 種類の視蓋ニューロンそれぞれに特異的に発現する遺伝子を網羅的に探索した。

4. 研究成果

① 変態前後での眼および視蓋の発達の定量化

上の「研究の方法」で記載したとおり、幼生期、変態期 (全 6 ステージ)、変態後の成体の各段階のヤツメウナギ頭部の μ CT スキャン画像を取得した。このうち、幼生期、変態期ステージ M3 および M6 について、Amira による眼および脳の三次元再構築を実施した。定量解析として、得られた三次元モデルについて、「眼/脳全体」および「視蓋/脳全体」の容積比を算出し、変態前後での変化を調べた。その結果、変態期を通じて眼と視蓋が相対的に発達することが明らかになった。また変態期のうち、前半 (M1~M3) のほうが後半 (M4~M6) よりも発達の程度が大きいことがわかった。脳領域の拡大は一般的に、その脳領域の神経機能の高度化と関連していると考えられている。したがって以上の結果は、変態期を通じて眼および視蓋の神経機能が大幅に拡張されていることが示唆された。また組織学的解析からも、変態期を通じて視蓋深層の層構造が発達していくことが確認された。視蓋深層は脳幹に投射する 2 種類の視蓋ニューロンが分布する領域であるため、変態機に視蓋ニューロンの分化が活発になっている可能性が示唆された。

② 軸索トレースによる分化時期の特定

同側/対側の脳幹に投射する 2 種類の視蓋ニューロンがどの段階で分化するのか特定するために、幼生期、変態期、変態後の成体の各段階で軸索トレース実験を行った。その結果、同側性ニューロンは小型幼生の段階から分化が始まり、幼生期での成長および変態期を通じて数が多くなっていくことがわかった。一方で対側性ニューロンは幼生期には見られず、変態期になって蛍光デキストランにより標識されたニューロンが見つかった。すなわち対側性ニューロンはもっぱら変態期に分化することが示唆された。

③ 細胞単離、微量 RNA-seq による特異的発現遺伝子の探索

カワヤツメ成体 7 個体に対し逆行ラベリングを実施し、同側性ニューロン 7 サンプル、対側性ニューロン 6 サンプルを得た (1 サンプルごとの細胞数は 7~25 個)。これに対して微量 RNA-seq を実施した。しかし得られたデータを既存のヤツメウナギゲノム (ウミヤツメ: Pmarinus7、カワヤツメ: LetJap1) に対して MAP しても、MAP 率が低いという問題が生じた。そこで発生期カワヤツメの全身のトランスクリプトームデータ (DRX140843) をアセンブルして遺伝子モデルを構築して、この遺伝子モデルに対して MAP したところ、ほぼすべてのサンプルで約 70% の MAP 率を示した。しかし、この結果をもとに、DESeq2 による DEG 探索を試みたところ、FDR 閾値 (0.05) を満たす遺伝子は得られなかった。またアノテーションの結果、 p value ≤ 0.05 を基準とした DEG は既知の遺伝子と類似していないものが多かった。ただし、*EphB* が同側性ニューロンで強く発現していた ($p=0.02$)。in situ hybridization により *EphB* が幼生期や変態期のヤツメウナギの視蓋深層で発現することを確認した。

以上の結果から、視覚行動を制御する 2 種類の視蓋ニューロンのうち、同側性ニューロンは幼生期から分化が始まり、*EphB* を発現する一方で、対側性ニューロンは変態期で分化することが明らかとなった。今後、2 種類の視蓋ニューロンが視覚行動を制御する神経回路の形成メカニズムを分子レベルで解明するため、*EphB* を中心とする軸索誘導分子のニューロン型特異的な発現解析を進める予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 0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 Suzuki Daichi G.	4. 巻 36
2. 論文標題 Homology thinking reconciles the conceptual conflict between typological and population thinking	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biology & Philosophy	6. 最初と最後の頁 23
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s10539-021-09800-7	査読の有無 無
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 Suzuki Daichi G., Wada Hiroshi, Higashijima Shin-ichi	4. 巻 11
2. 論文標題 Generation of knock-in lampreys by CRISPR-Cas9-mediated genome engineering	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 19836
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-021-99338-1	査読の有無 無
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 Suzuki Daichi G.	4. 巻 15
2. 論文標題 Consciousness in Jawless Fishes	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Systems Neuroscience	6. 最初と最後の頁 751876
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fnsys.2021.751876	査読の有無 無
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1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 鈴木 大地
2. 発表標題 拘束からコストへ
3. 学会等名 日本進化学会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
---------	---------