

令和 6 年 6 月 25 日現在

機関番号：43202

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K06439

研究課題名(和文) 脳の進化が種分化を促した? : 交配前隔離における間脳領域の役割の解明

研究課題名(英文) Role of diencephalon and hypothalamus for pre-mating isolation among goby fishes

研究代表者

川口 将史 (Kawaguchi, Masahumi)

富山短期大学・その他部局等・准教授

研究者番号：30513056

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) : ヨシノボリの交配前隔離を制御する神経基盤を解明するため、四足動物の知見に基づき、転写因子と脳内因子の分布パターンの解析から、ヨシノボリ成魚の視索前域・視床下部・間脳の構造を同定した。その結果、魚類の脳に哺乳類の視床下部室傍核や不確帯のA13、視蓋前域の三つの区画に相同な構造が存在することを明らかにした。雄の求愛行動を解析する基盤として、求愛中の雄に特有な行動を探索した。その結果、雌の傍を離れても1.5秒以内に雌の傍に戻る行動が求愛中の雄に有意に多いことがみいだされた。また、雄に求愛される雌は、輝度値110を超えるピクセルが体表の30%以上を占めるといった外部形態の特徴を示すことがわかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、本能行動や精神疾患の神経基盤を解明する目的で魚類がモデル動物として選択される機会が増えている。しかし、魚類は系統が非常に多様なため、魚種間でも脳構造の相同性に関する議論が遅れており、魚類の脳構造に関する一般化された理解がなされていない。本研究では、ヨシノボリ成魚の視索前域・視床下部・間脳について転写因子と脳内因子の分布パターンを解析し、四足動物との相同構造を明らかにした。今回の知見は、ゼブラフィッシュやメダカなど一般的な魚類モデルと人間の脳構造を比較する上でも参考となるものであり、学術的意義と共に社会的意義を有する。

研究成果の概要(英文) : To elucidate the neural basis for the regulation of pre-mating isolation in the freshwater goby, we identified structures in the preoptic area, hypothalamus, and diencephalon of adult goby fish based on the distribution patterns of transcription factors and brain factors based on our knowledge of tetrapods. The results revealed the presence of homologous structures in the fish brain to the hypothalamic paraventricular nucleus, A13 of the indeterminate zone, and three compartments of prepectum in mammals. As a basis for analyzing male courtship behavior, we searched for behaviors specific to males during courtship. We found that courtship males were significantly more likely to return to the female's side within 1.5 seconds after leaving the female's side. In addition, we found that females courted by males exhibit a characteristic external morphology in which pixels with luminance values greater than 110 occupy more than 30% of the body surface.

研究分野：神経解剖学，行動生態学

キーワード：魚類モデル 求愛行動 視索前域 視床下部 間脳

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ハゼ目に属するヨシノボリ属では、近縁種が同所的に生息していても各種の遺伝的独自性が維持されており、生殖的隔離が成立している (Mizuno *et al.*, 1979, *Jap. J. Ecol.* **29**; Yamasaki *et al.*, 2015, *Mol. Phyl. Evol.* **90**)。水槽実験では、雄は同種の雌に求愛する一方、別種の雌を威嚇することが観察されており (Kawanabe & Mizuno, 1989)、ヨシノボリ属は交配前隔離によって生殖的隔離を維持していると示唆される。これまでの解析から、求愛している雄と威嚇している雌では、視索前域や視床下部など、一般に間脳とよばれる領域に *c-fos* 陽性細胞の分布の違いが確認された。しかし、これまでに報告されている魚類の脳アトラスでは、魚種間で間脳領域の同定方法に齟齬があり、統一された見解が得られていない。また、求愛や威嚇の積極さに従って、*c-fos* 陽性細胞の数が増える脳領域と増えない脳領域があるのかなど、明らかになっていない。さらに、ヨシノボリの雌は繁殖期に婚姻色を呈することは知られているが (Kawanabe & Mizuno, 1989)、ヨシノボリの雄が雌を視覚刺激によって識別しているのかどうか、明らかになっていない。

2. 研究の目的

本研究では、ヨシノボリ属の交配前隔離を可能にする神経機構の解明を目指した。目的を遂行するため、以下の細目について研究を進めた。

- (1) ヨシノボリの間脳領域について、転写因子と神経ペプチド・神経伝達物質関連因子の分布を参考に、他の脊椎動物との相同性を元に構造を同定した。
- (2) 雄個体ごとの求愛や威嚇の積極さの違いを測る指標として、ヨシノボリ雄が同種あるいは別種の雌個体に対して示す行動要素を定量し、比較した。
- (3) 同種の雌の卵熟に応じて、体色の明るさがどのように変化するのか、また体色の明るさによって雄に求愛されるか威嚇されるかが決まるのか、検討した。

3. 研究の方法

(1) ヨシノボリの視索前域・視床下部・プロソメア (間脳) 領域の同定

Puelles と Rubenstein (2003) は転写因子の分布パターンに基づいて脊椎動物の前脳を再区分し、終脳・視索前域・視床下部からなる Secondary prosencephalon と、腹側視床・背側視床・視蓋前域からなる Prosomere (プロソメア) に区分した。この区分では、間脳に相当する脳領域はプロソメアに限られる。この区分に基づく前脳構造の理解は、四足動物ではすでに一般的だが、魚類では、ゼブラフィッシュ胚において視床下部の構造に四足動物との相同性が確認されたに留まっている (Schredelseker & Driever, 2020)。本研究では、*in situ* ハイブリダイゼーションと免疫組織染色を用いて各種転写因子・神経ペプチド・神経伝達物質関連因子の分布パターンを解析し、四足動物との相同性により成魚の視索前域・視床下部・プロソメア (間脳) の同定を試みた。

(2) 雄の往復行動の解析

雄が営巢中の水槽に侵入者として雌を提示し、30 分以内に雌が雄に追従して巢に入った場合を求愛、30 分の間にこのような行動が見られなかった場合を威嚇とみなした。雌を提示した雄の行動観察から、求愛中の雄は雌の傍を離れてもすぐに雌の傍に戻る傾向にあることがみいだされた。そこで、雄に雌を提示した 30 分間に、雄が雌の周囲 (雌の重心から雌の体長で描いた円の内側) を離れる行動を示したら、すべての行動について、再び雌の周囲に戻ってくるまでの往復時間を測定した。往復時間の分布を求愛中の雄と威嚇中の雄で比較し、求愛に特有の時間分布があるか検討した。

(3) 雌の明るさ率の解析

雄に提示した雌は、雄の水槽から取り出した後、小水槽に移して側面から写真を撮影した。写真画像について Fiji で解析を行った。線で囲んだ領域に含まれる各ピクセルの輝度値 (0~255) を測定させ、輝度値 110 を超えるピクセルが含まれる割合を明るさ率とした。

4. 研究成果

(1) ヨシノボリの視索前域・視床下部・プロソメア (間脳) 領域の同定

魚類では、前交連の腹尾側で視交叉の背吻側にあたる領域が視索前域とされており、前方小細胞部 (Ppa)、大細胞部 (Pm)、後方小細胞部 (Ppp) に分類されている。Pm には *isotocin* 陽性あるいは *vasotocin* 陽性の大型細胞が分布しており、大型細胞は *otp* 陽性を示した。哺乳類では、視床下部室傍核にオキシトシン・バソプレシン分泌細胞が分布し、*otp* は室傍核の特異的マーカーとして知られている。このことから、魚類の Pm は哺乳類の室傍核に相同で、哺乳類の視索前域に相当する領域は Ppa に限定されると考えられた。Ppa は *era* 陽性細胞を多く含む腹側領域 (Ppa-v) と *arx/six3* 陽性の背側領域 (Ppa-d) に分割された (図 1)。

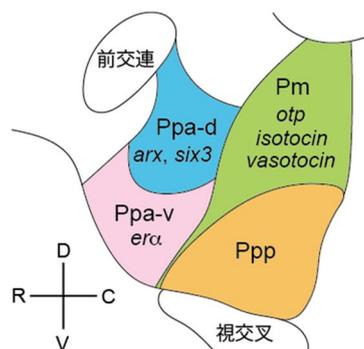


図 1 視索前域の転写因子・脳内因子分布

後結節脳室周囲核 (TPp) には THir の大型細胞が分布し、大型細胞は *otp* 陽性を示した。ゼブラフィッシュ胚での解析から、視床下部の Retromammillary 領域は *otp* 陽性を示すことが報告されており (Schredelseker & Driever, 2020)、THir の大型細胞が分布する TPp 領域は Retromammillary 領域に相当すると考えられた。THir の大型細胞が分布する TPp 領域の背内側には脳室沿いに *th2* 陽性細胞が密に分布しており、この細胞集団は外側陥凹の背外側から後方を回り込んで腹外側まで広がって分布していた。同様の分布はゼブラフィッシュの傍室器官 (PVO) でも確認されていることから (Xavier et al, 2017)、PVO に相当すると考えられた。哺乳類の同在しており (Schredelseker & Driever, 2020)、同様に正中の *foxb1* 陽性領域として血管囊核 (SV) がみいだされた。このことから、SV が哺乳類の乳頭体に相同な可能性が示唆された (図 2)。

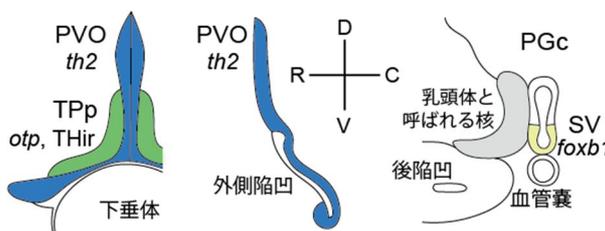


図 2 視床下部の転写因子・脳内因子分布

arx 陽性の腹側視床に、*pax6* 陽性で THir の中型細胞の集団が分布した。これらの細胞集団は哺乳類の不確帯にある A13 に相同と考えられた。また、GABA 作動性ニューロンが主要な腹側視床に、*dlx2* 陽性で *vglut2* 陽性の細胞集団が分布した。哺乳類でも、vLGN (外側膝状体腹側部) 内側領域あるいは不確帯の一部に *vglut2* 陽性の細胞集団が分布する (Fratzl & Hofer, 2022)。背側視床の最吻側領域には視床前核 (A) が、その尾側の腹外側には視床挿入核 (IC) があり、これらの神経核には GABA 作動性ニューロンが多く分布した。四足動物でも、背側視床の最吻側領域 (pTh-R; Vue et al, 2007) からは GABA 作動性の vLGN 外側領域と外側膝状体層間部 (IGL) が発生することが知られており、A や IC はこれらの神経核に相同と考えられた。IC の腹側には翼板/基板境界を示す *shh* 陽性細胞の集団があり、そのさらに腹側には *pax7* 陽性の細胞集団が分布した。脊椎動物のプロソメア 3 基板部は *pax7* 陽性を示すことから、ゼブラフィッシュ胚の記述 (Schredelseker & Driever, 2020) を参照して後結節背側核 (PTd) と名付けた。四足動物の視蓋前域は吻尾軸に沿って *bhlhb4* (*bhlhe23*) 陽性の交連前部、*six3* 陽性の交連傍部、*pax7* 陽性の交連部が分布するが、ヨシノボリの視索前域室傍核 (PP) も、この三つの領域に区画できた。交連部 (PPc) には、他の魚種と同様に THir の中型細胞が分布した。一方、交連前部 (PPpc) と交連傍部 (PPjc) は *5htt* 陽性の大型細胞を含み、反屈束 (fr) の背腹両側に分布した。PPpc と PPjc の腹側には、*vglut2* 陽性細胞を含む視床中心後核 (CP) が接していた (図 3)。

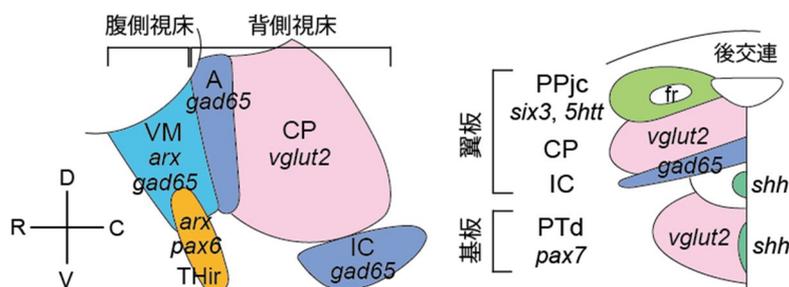


図 3 間脳プロソメアの転写因子・脳内因子

(2) 雄の往復行動の解析

威嚇中の雄では、往復行動に 1.5 秒より長くかかる時間分布が多く見られた。一方、求愛中の雄では、0-0.5 秒をピークとする 1.5 秒以内の大きな時間分布が見られた。1.5 秒以内の往復行動の回数と 1.5 秒超過の往復行動の回数を、求愛中の雄群と威嚇中の雌群と比較しところ、有意差が見られた (カイ二乗検定)。そこで、各雄が 30 分間の間に 1.5 秒以内の往復行動を示した回数 (巣の外にいる時間で補正した回数) を、求愛中の雄群と威嚇中の雌群と比較しところ、求愛中の雄の方が有意に多くこの行動を示した (ウェルチの t 検定)。よって、1.5 秒以内の往復行動は求愛中の雄に特有の行動だと考えられた (図 4)。ヨシノボリの雄は縄張り意識が高く、縄張りに侵入者がいると近づいて威嚇し、しばらくすると巣に戻って警戒する。このため、威嚇中の雄は雌の傍を離れるとしばらく戻ってこないと考えられる。一方、求愛中の雄は、雌を巣に誘導しようとするが、雌が巣に付いてきていないとすぐに雌の傍に戻り、再び雌の気を惹こうとする。このため、求愛中の雄は雌の傍を離れた際の往復時間が短くなると考えられる。

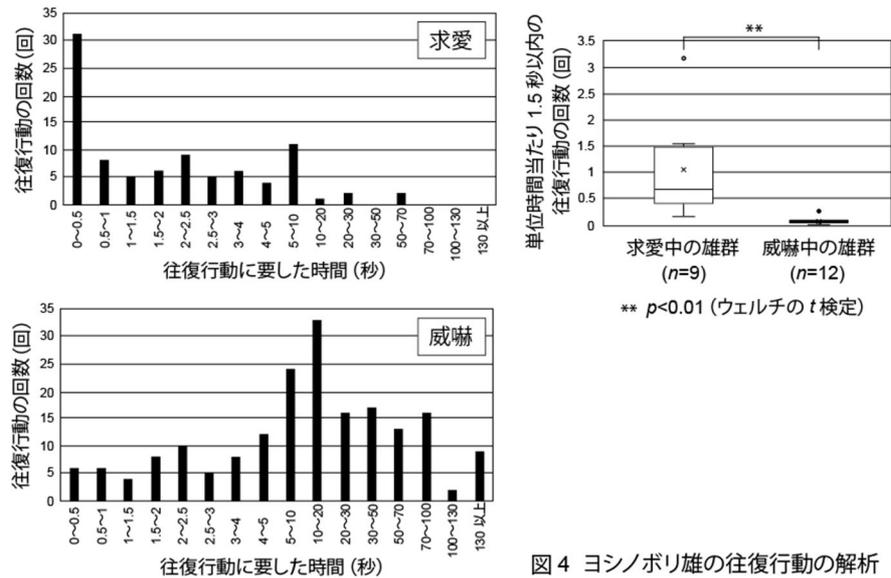


図 4 ヨシノボリ雄の往復行動の解析

(3) 雌の明るさ率の解析

卵熟した雌は体色が鮮やかになり、婚姻色を呈することが知られている (Kawanabe & Mizuno, 1989)。求愛された雌群は威嚇された雌群に比べ、体表の明るさ率が有意に高かった (ウェルチの t 検定)。具体的には、輝度値 110 を超えるピクセルが体表の 30% を超える雌は、非常に雄に求愛されやすい傾向を示した。求愛された雌群の明るさ率の下限値は、威嚇された雌群の明るさ率の上限値より高かった。一方で、腹部の膨らみ指数 (= 腹部の体高/肛門部の体高) が大きいにもかかわらず、明るさ率が低い (体色が暗い) 雌は威嚇された (図 5)。このことから、腹部の膨らみより体色の明るさの方が、雄にとっては重要な視覚刺激になっていると考えられた。

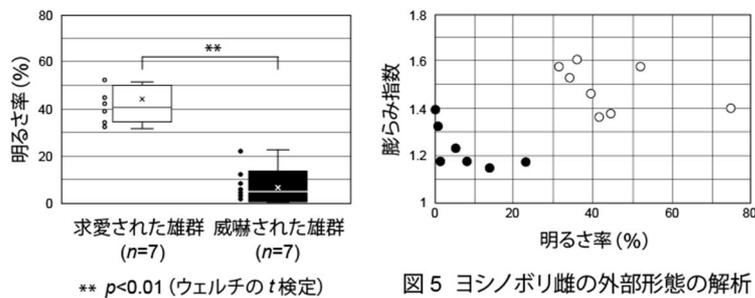


図 5 ヨシノボリ雌の外部形態の解析

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 佐野瑞樹, 鍋田あい, 川口将史
2. 発表標題 栄養状態が配偶者選択に及ぼす影響の解析：小型魚類の求愛行動 (1)
3. 学会等名 第70回日本栄養改善学会学術総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 鍋田あい, 佐野瑞樹, 川口将史
2. 発表標題 栄養状態が配偶者選択に及ぼす影響の解析：小型魚類の視覚的鍵刺激 (1)
3. 学会等名 第70回日本栄養改善学会学術総会
4. 発表年 2023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
---------	---------