

平成 26 年 6 月 18 日現在

機関番号：13201

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2013

課題番号：23657149

研究課題名(和文) 魚類の種分化を引き起こす神経基盤の解明

研究課題名(英文) Neural basis giving rise to speciation in teleost

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円、(間接経費) 900,000円

研究成果の概要(和文)：生殖的隔離は種分化を引き起こす重要な素過程の一つであるが、その成立メカニズムは明らかになっていない。生殖的隔離の神経基盤を解明するため、ヨシノボリの雄が同種の雌に求愛、あるいは別種の雌を排他する際に活動する脳領域を、最初期遺伝子c-fosの発現パターンを指標に同定した。その結果、視覚情報の処理過程や全身性の反応を制御する下垂体・視床下部の活動に違いが見られた。このことから、ヨシノボリの雄は雌を視覚刺激で識別しており、視覚情報の一次入力領域である視蓋が行動選択における判断の中核として働くことが考えられる。

研究成果の概要(英文)：Reproductive isolation is the elementary process to cause the speciation. However, its forming mechanism is unclear. To elucidate the neural basis of reproductive isolation, we applied the freshwater goby. We detected the expression pattern of c-fos in the brain of male goby, and identified the brain region activated during the courtship behavior for conspecific female or the exclusive behavior against xenogeneic female. Then the difference of neural activity between courtship and exclusive behavior was observed in the neural circuit relating to the visual process, and the pituitary and hypothalamus regulating the systemic reaction. Taken together, it is suggested that the male goby discriminates females depending on the visual perception, and the tectum, the primary input area of vision, is the decision center of behavioral selection.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・発生生物学

キーワード：生殖的隔離 c-fos 神経活動履歴 ヨシノボリ 行動選択

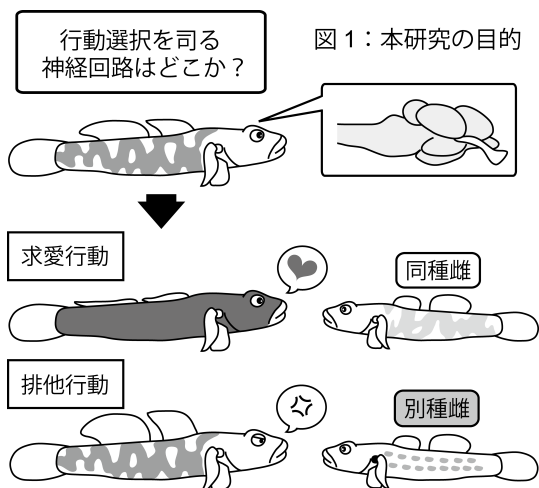
1. 研究開始当初の背景

生殖的隔離は種分化を引き起こす一要因であり、生物多様性を生み出す重要な素過程の一つである。しかしながら、生殖的隔離の成立に至るプロセスについては未だ明らかになっていない。これまでに昆虫での研究から、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であることが示されている (Yamamoto & Koganezawa, 2013, *Nat. Rev. Neurosci.* 14)。また、弱電流で会話するアロワナ目のモルミルスは、種に特有の電流パターンを知覚して相手を識別しており、電流知覚に関わる中脳領域の拡大が種の多様化を促したことが示唆されている (Carlson *et al.*, 2011, *Science* 332)。しかし、感覚情報の知覚・統合から生殖的隔離の実行に至る神経回路の全容とその構築過程を解明する試みは、これまでなされてこなかった。

ハゼ科に属するヨシノボリは、河川内で同所的に生息する近縁種間でも生殖前隔離が成立している (Kawanabe & Mizuno, 1989, "Freshwater fishes of Japan")。水槽内での出会い実験から、ヨシノボリの雄は知覚に基づいて雌の種を識別し、同種に求愛、別種は排他することで、生殖的隔離を維持していることが明らかになっている。このことから、生殖的隔離の神経基盤を解明する上で、ヨシノボリは最適なモデルになり得ると着想した。

2. 研究の目的

本研究では、最初期遺伝子 *c-fos* の発現を指標として、ヨシノボリの雄が同種の雌に求愛・別種を拒絶する際に活動した脳領域をそれぞれ同定する。また、ヨシノボリの受精卵を人工的に孵卵して経時的に神経発生過程を観察する。以上の解析から、ヨシノボリの雄が知覚に基づいて雌の種を識別し、求愛と排他の行動選択を実行する際に活動する神経回路とその構築過程の解明を目指すことが、本研究の目的である (図 1)。



3. 研究の方法

(1) ゼブラフィッシュとメダカの *c-fos* 遺伝子の比較から共通配列のプライマーを作成し、

ヨシノボリの *c-fos* ホモログを増幅してクローニングした。得られた *c-fos* プロブの有用性を確認するため、ヨシノボリを 25 mM ペンチレンテトラゾール (PTZ) で 30 分間処理して強制的に神経活動を惹起し、*in situ* hybridization にて確認した。

(2) 繁殖期の 6 月に、河川で捕獲したヨシノボリを 60 cm 水槽で飼育・馴致した。婚姻色が鮮やかな雄を 30 cm 水槽内で個飼いにして巣材の下に巣を作らせた。雄の準備が整った水槽に同種および別種の雌を投入し、求愛あるいは排他行動開始から 30 分後、雄を捕獲して脳をサンプリングし、*c-fos* の遺伝子発現パターンを求愛と排他時で比較した。

(3) ヨシノボリの受精卵を人工的に孵卵し、抗アセチル化チューブリン抗体を用いたホールマウント免疫染色により神経回路の形成過程を経時的に観察した。また、孵化した仔魚を飼育し、成魚まで生育可能かどうかを調べた。

(4) 非モデル動物で神経科学的解析を進めるための基盤情報を整備するため、ヨシノボリの脳アトラスの作成を進めると共に、次世代シーケンサーを用いて神経ペプチドや神経伝達関連遺伝子など脳内因子の遺伝子配列の同定を進めた。

4. 研究成果

(1) ヨシノボリの *c-fos* ホモログを用いて、ヨシノボリの脳に対する *in situ* hybridization を行った。未処理の脳では *c-fos* の発現はほとんど検出されないのに対し、PTZ 処理した脳では脳全体で発現が検出でき、神経活動の指標として有用であることが確認できた (図 2)。

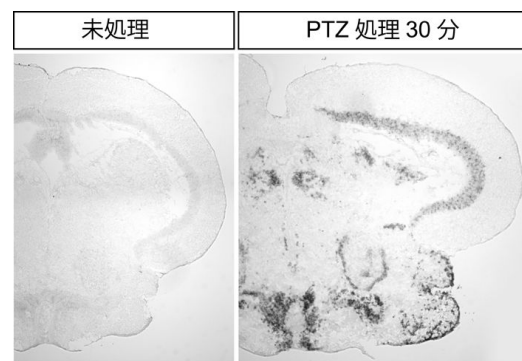


図 2: *c-fos* に対する *in situ* hybridization

(2) 同種の雌に求愛した際と別種の雌を排他した際に *c-fos* の発現パターンを比較した結果、大きく二つの点で相違が確認された (図 3)。まず、最初に網膜からの視覚情報が届く視蓋での神経活動は求愛と排他の両方で確認されたが、視蓋から終脳への視覚情報の中継核である視床前核では求愛行動の場合しか活動は検出できず、視覚の情報処理が求愛と排他では異なることが示唆された。また、下

垂体前葉や乳頭体での神経活動も、求愛行動の際に特に強く観察された。

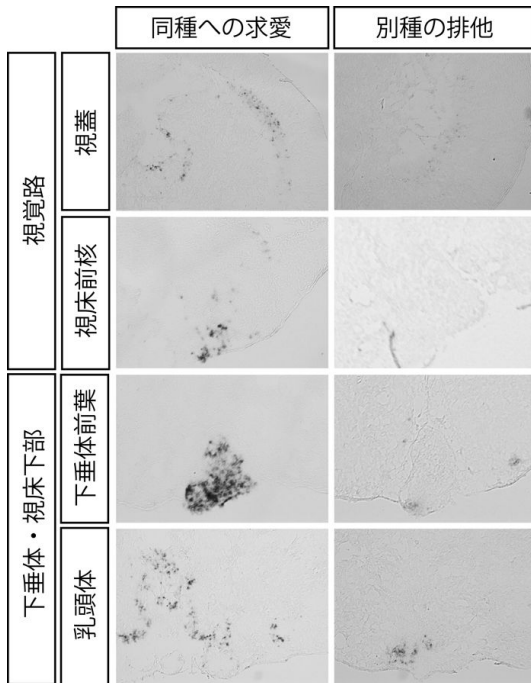


図3：求愛と排他での神経活動の違い

(3) ヨシノボリの胚発生を追って神経回路の形成過程を観察した結果、内側縦束や後交連など中枢神経系の初期神経回路は受精後4日目までにその枠組みが完成し、視蓋への神経投射は受精後5日目以降に進むことがわかった(図4)。また、受精卵から孵化した仔魚をブラインシュリンプおよび人工飼料で飼育し、約1年半で体長4 cmを超える成魚まで生育させることに成功した。

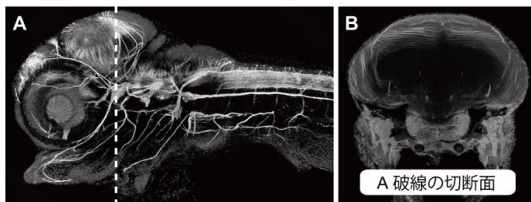


図4：ヨシノボリ胚(受精後7日目)の初期神経回路

(4) ヨシノボリの脳を30 μmの厚さでスライスし、連続切片にて脳の組織構造の観察を行った。現在、名古屋大学 生命農学研究科の山本直之教授の協力を仰ぎつつ、同じハゼ科のマハゼの脳切片との比較によってヨシノボリ脳の各神経核の同定を進めている。また、ヨシノボリ脳から抽出したRNAを用いてMiSeq次世代シーケンサーによるトランスクリプトーム解析を行った。現在、CLC Genomic Workbenchを用いて、遺伝子配列の解析を進めている。

(5) まとめ(図5)：*c-fos*の発現パターンの解析から、ヨシノボリの雄が同種に求愛、あるいは別種を排他する際には、視覚路の情報処理過程に違いがあることが明らかになった。

ヨシノボリの雄は雌の視認に伴い行動を開始する事から、視覚刺激が行動選択の開始シグナルであると考えられ、中脳視蓋が種の判別と行動選択の中枢であると考えられる。発生過程において視蓋の神経回路を観察することができたことから、今後、その構築過程の解明を進めていく予定である。

また、下垂体や視床下部でも求愛と排他で神経活動の違いが観察された。求愛の際には雄の体色が黒く変色することから、下垂体前葉での神経活動はメラニン細胞刺激ホルモンの分泌によるものが含まれると考えられる。今後、トランスクリプトーム解析の結果から各種神経ペプチドや神経伝達関連遺伝子のプローブを作成し、*c-fos*との二重染色を行うことで、求愛と排他の行動に伴って活動する神経細胞がどのような神経回路に属する素子なのかを解明していく予定である。

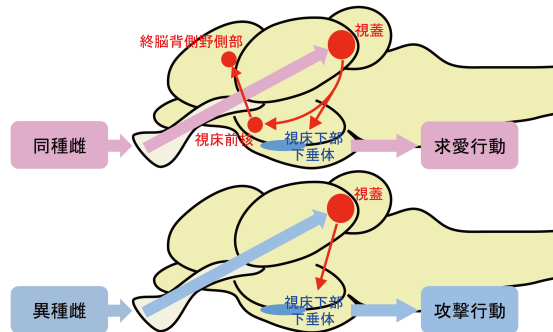


図5：同種への求愛と別種の排他で活動する神経回路の違い

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 9件)

Sugahara, Y., Kawaguchi, M., Kurokawa, D., Tosa, Y., Kitamura, S.I., Handoh, I.C., Nakayama, K. and Murakami, Y. (2014) Pyrene induces a reduction in midbrain size and abnormal swimming behavior in early-hatched pufferfish larvae. *Mar. Pollut. Bull.*に掲載決定, 査読有り

Toyoda, S., Kawaguchi, M., Kobayashi, T., Tarusawa, E., Toyama, T., Okano, M., Oda, M., Nakauchi, H., Yoshimura, Y., Sanbo, M., Hirabayashi, M., Hirayama, T., Hirabayashi, T., and Yagi, T. (2014) Developmental epigenetic modification regulates stochastic expression of clustered *Protocadherin* genes, generating single neuron diversity. *Neuron*, 82, 94-108., 査読有り

Masuda, T., Taniguchi, M., Sakuma, C., Yamagishi, T., Ueda, S., Kawaguchi, M. and Yaginuma, H. (2013) Development of the dorsal ramus of the spinal nerve in the mouse embryo: involvement of Semaphorin 3A in dorsal muscle innervation. *Congenit. Anom. (Kyoto)*, 53, 122-126., 査読有り

Nomura, T., Kawaguchi, M., Ono, K. and Murakami, Y. (2013) Reptiles: a new model for brain evo-devo research. *J. Exp. Zool. B Mol. Dev. Evol.*, 320, 57-73. , 査読有り
Rhinn, M., Miyoshi, K., Watanabe, A., Kawaguchi, M., Ito, F., Kuratani, S., Baker, C.V.H., Murakami, Y. and Rijli, F.M. (2013) Evolutionary divergence of trigeminal nerve somatotopy in amniotes. *J. Comp. Neurol.*, 521, 1378-1394. , 査読有り
Hirano, K., Kaneko, R., Izawa, T., Kawaguchi, M., Kitsukawa, T. and Yagi, T. (2012) Single-neuron diversity generated by *Protocadherin-β* cluster in mouse central and peripheral nervous systems. *Front. Mol. Neurosci.*, 5, 90-99. , 査読有り
Kawaguchi, M., Sugahara, Y., Watanabe, T., Irie, K., Ishida, M., Kurokawa, D., Kitamura, S.I., Takata, H., Handoh, I.C., Nakayama, K. and Murakami, Y. (2012) Nervous system disruption and concomitant behavioral abnormality in early hatched pufferfish larvae exposed to heavy oil. *Environ. Sci. Pollut. Res.*, 19, 2488-2497. , 査読有り
Kawaguchi, M., Song, J.Y., Irie, K., Murakami, Y., Nakayama, K. and Kitamura, S.I. (2011) Disruption of *Sema3A* expression causes abnormal neural projection in heavy oil exposed Japanese flounder larvae. *Mar. Pollut. Bull.*, 63, 356-361. , 査読有り
Kawaguchi, M., Irie, K., Mizuno, K., Song, J.Y., Nakayama, K., Kitamura, S.I. and Murakami, Y. (2011) Effect of heavy oil on the development of the nervous system of floating and sinking teleost eggs. *Mar. Pollut. Bull.*, 63, 297-302. , 査読有り

[学会発表](計 16件)

須藤 文和, 川口 将史, 大隅 典子, 一戸 紀孝「セマフォリン/プレキシシグナルは扁桃体と分界条床核との接続を制御する」第47回日本発生生物学会, 2014年5月27-30日 名古屋大学, ポスター発表

川口 将史「求愛と拒絶の神経回路～ヨシノボリの生殖前隔離を制御する神経基盤～」新潟大学 生物学講会～生物学を職業にするとする～, 2014年5月23日 新潟大学, 招待口演

川口 将史「ヨシノボリ属の求愛行動を制御する神経基盤の解析」東京大学 第211回臨時生物科学セミナー, 2014年3月26日 東京大学, 招待口演

川口 将史, 柴田 淳也, 川西 亮太, 曾我部 篤, 大森 浩二, 一條 裕之, 松本 浩司, 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」第84回日本動物学会, 2013年9月26-28日 岡山大学, 口頭発表

塚野 清人, 深川 真惟, 川口 将史, 鈴

木 賢一, 新居 由佳子, 高田 裕美, 村上 安則「アフリカツメガエルの神経回路形成における Slit2 と Robo2 の役割」第84回 日本動物学会, 2013年9月26-28日 岡山大学, 口頭発表

豊田 峻輔, 川口 将史, 小林 俊寛, 足澤 悦子, 遠山 知子, 岡野 正樹, 小田 昌朗, 中内 啓光, 吉村 由美子, 三宝 誠, 平林 真澄, 平山 晃斉, 平林 敬浩, 八木 健「Dnmt3b 依存的な DNA メチル化は単一神経細胞におけるクラスター型プロトカドヘリン遺伝子群の確率的発現と樹状突起の自己忌避を制御する」第36回日本神経科学学会, 2013年6月20-23日 京都国際会議場, 口頭発表

川口 将史, 柴田 淳也, 川西 亮太, 曾我部 篤, 大森 浩二, 松本 浩司, 村上 安則「カワヨシノボリの求愛行動を制御する神経基盤の解析」第83回 日本動物学会, 2012年9月13-15日 大阪大学, 口頭発表

川口 将史, 塚野 清人, 獵山 直也, 新居 由佳子, 鈴木 賢一, 高田 裕美, 村上 安則「脊椎動物における小脳神経回路の起源」第35回日本神経科学学会, 2012年9月18-21日 名古屋国際会議場, ポスター発表

豊田 峻輔, 川口 将史, 遠山 知子, 岡野 正樹, 小田 昌朗, 小林 俊寛, 平山 晃斉, 平林 敬浩, 八木 健「クラスター構造依存的なプロモーターDNA メチル化はプロトカドヘリン遺伝子クラスター内のアイソフォーム発現の分配を制御する」第36回日本神経科学学会, 2012年9月18-21日 名古屋国際会議場, 口頭発表

豊田 峻輔, 川口 将史, 遠山 知子, 岡野 正樹, 小田 昌朗, 平林 真澄, 平林 敬浩, 八木 健「Promoter DNA methylation is dependent on gene cluster structure and regulates allocation of isoforms expression in each Protocadherin cluster.」第34回日本分子生物学会, 2011年12月13-16日 パシフィコ横浜, 口頭発表

川口 将史, 獵山 直也, 新居 由佳子, 塚野 清人, 高田 裕美, 村上 安則「脊椎動物における小脳神経回路の起源」第82回日本動物学会, 2011年9月21-23日 大雪クリスタルホール (旭川), ポスター発表

川口 将史, 渡辺 愛己, 真喜屋 宏美, 長島 寛, 川崎 能彦, 平田 たつみ, 増田 知之, 倉谷 滋, 村上 安則「Evolution of developmental plan for peripheral nervous system in amniote trunk region.」第34回日本神経科学学会, 2011年9月14-17日 パシフィコ横浜, 口頭発表

菅原 由貴, 川口 将史, 渡部 友恵, 半藤 逸樹, 北村 真一, 仲山 慶, 村上 安則「重油とその構成物質暴露による硬骨魚類の初期発生と行動への影響」第17回

日本環境毒性学会・バイオアッセイ研究会合同研究発表会, 2011年9月3-4日 鹿児島大学, 口頭発表

川口 将史, 菅原 由貴, 渡部 友恵, 入江 浩太, 北村 真一, 仲山 慶, 半藤 逸樹, 村上 安則「Effect of heavy oil exposure during embryogenesis of the nervous system and behavior.」International Symposium on Advanced Studies by Young Scientists on Environmental Science and Ecotoxicology, 2011年8月4-6日 愛媛大学, 口頭発表 (Best Presentation Award 受賞)

村上 安則, 菅原 由貴, 川口 将史, 半藤 逸樹, 北村 真一, 仲山 慶「Effect of heavy oil and polycyclic aromatic hydrocarbons on developing pufferfish nervous system.」15th international Symposium on Toxicity Assessment, 2011年7月3-8日 City University of Hong Kong, 口頭発表

川口 将史「脊椎動物における小脳神経回路の進化」筑波大学下田臨海実験センターセミナー, 2011年6月9日 筑波大学下田臨海実験センター, 招待口演

〔図書〕(計 3件)

Edited by: Kawaguchi, M., Misaki, K., Sato, H., Yokokawa, T., Itai, T., Nguyen, T.M., Ono, J., and Tanabe, S. (2012) Interdisciplinary Studies on Environmental Chemistry Vol.6 “Advanced Environmental Studies by Young Scientists” Global COE Program, Ehime University. TERRAPUB 出版, 総ページ数: 470 ページ

Kawaguchi, M., Shibata, J., Kawanishi, R., Sogabe, A., Kawanaka, T., Matsumoto, K., Omori, K. and Murakami, Y. (2012) Establishment of the protocol for developmental analysis and observation of embryogenesis and axonogenesis in a freshwater goby, *Rhinogobius flumineus*. In: Interdisciplinary Studies on Environmental Chemistry Vol.6 “Advanced Environmental Studies by Young Scientists” TERRAPUB 出版, pp. 41-48.

Noguchi, T., Itai, T., Kawaguchi, M., Takahashi, S. and Tanabe, S. (2012) Applicability of human hair as a bioindicator for trace elements exposure. In: Interdisciplinary Studies on Environmental Chemistry Vol.6 “Advanced Environmental Studies by Young Scientists” TERRAPUB 出版, pp. 73-77.

〔産業財産権〕

出願状況(計 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:

番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕
ホームページ等

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) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号: