

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 13 日現在

機関番号：16301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24650178

研究課題名(和文)脊椎動物の発生期に形成される神経回路が担う行動制御：その仕組みと進化

研究課題名(英文) Involvement of axon guidance molecules in the formation of early neuronal scaffolds and concomitant swimming behavior in anamniote vertebrates

研究代表者

村上 安則 (Murakami, Yasunori)

愛媛大学・理工学研究科・准教授

研究者番号：50342861

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円、(間接経費) 870,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではまず、薬剤処理により行動異常を生じたフグ仔魚では、中脳視蓋のサイズが特異的に減少することが明らかになった。このことは、孵化直後の遊泳行動発現には視蓋領域の発生が重要であることを示唆している。さらに、アフリカツメガエルでは神経ガイド分子slitとRoboのモルフォリン処理によって初期神経回路の一つである後交連が特異的に消失し、それらの個体では遊泳行動に異常が見られた。これらの遺伝子はヤツメウナギ胚でも確認されたことから、特定の神経ガイド分子により形成される初期神経回路は孵化後の遊泳行動の発現に重要であり、その仕組みは脊椎動物の進化の初期段階で確立された可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Vertebrate brain has specific neuronal tracts called the early axonal scaffold, which appear during its early development. These tracts include the longitudinal and commissural axonal bundles such as posterior commissure (pc), which are highly conserved in gnathostomes. We investigated the brain development and gene expression of axon guidance molecules in vertebrates including lamprey, teleosts, amphibians and reptiles, and found that pc was conserved in vertebrates. We further demonstrated that inhibition of Slit2 and Robo2 in *Xenopus* larvae resulted in the abnormal pc morphology and uncoordinated swimming pattern. Thus, Slit-Robo interaction appears to be involved not only in the formation of pc but also in the establishment of functional brain elements that triggers a swimming behavior. In course of the evolution, Slit-Robo signaling will be contributed to the construction of pc which is a prerequisite for the subsequent development of complex neuronal circuits and functions.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：脳神経科学・神経解剖学・神経病理学

キーワード：脳・神経 発生 行動 進化 遺伝子

### 1. 研究開始当初の背景

脊椎動物には水中を泳いだり空を飛んだりと実に様々な行動様式がある。これら多彩な行動はすべて脳内の神経回路によって制御される。行動の神経機構についてはこれまでに様々な研究がなされてきたが、行動を司る神経回路の発生についてはいまだ十分な研究は進んでおらず、また、生誕直後の行動発現に関して神経発生学の見地から研究した例はほとんどない状況であった。

### 2. 研究の目的

本研究では神経発生学と神経行動学の境界領域に挑み、神経ガイド分子-神経回路-行動というスキームで(図1)、円口類・魚類・両生類の神経発生の観察、遺伝子発現解析、行動解析、遺伝子の機能阻害実験により、行動を司る神経回路の分子基盤とその進化的変遷を明らかにすることを目的とした。

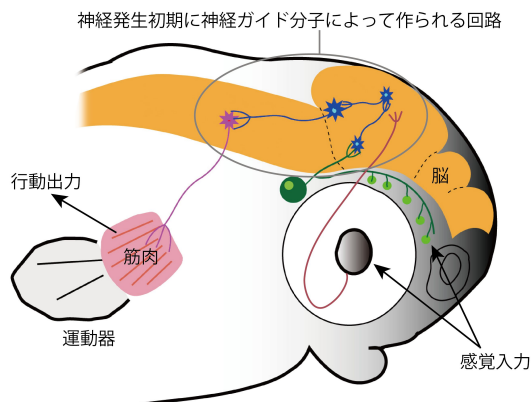


図1. 生誕直後の行動発現に関わることが予想される神経機構

### 3. 研究の方法

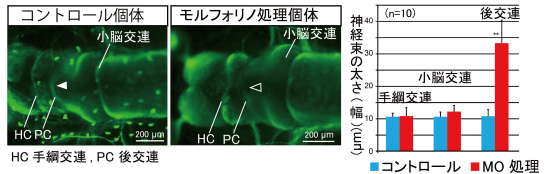
孵化直後に遊泳行動を示す真骨類のフグ、マダイ、両生類アフリカツメガエルを用いて、次世代シーケンサーを用いて神経ガイドに関わる遺伝子を単離し、発現解析、脳発生の観察、そして遊泳行動の解析を行った。また、爬虫類のスポン、鳥類ニワトリについて神経発生初期に形成される神経回路の形態を解析した。さらにアフリカツメガエルについてモルフォリノを用いた機能阻害実験機能阻害実験を行い、神経の発生異常と行動発現の関係を解析した。

### 4. 研究成果

薬剤処理により行動異常を生じたフグ仔魚では、中脳視蓋の剤図が特異的に減少していることが判明した(雑誌論文)。さらに、どのような神経回路の異常によって遊泳行動に異常が生じたのかを明らかにするため、様々な脊椎動物の神経発生過程を観察・記載した。その結果、いずれの動物においても手網交連、後交連、内側縦束などの神経回路が

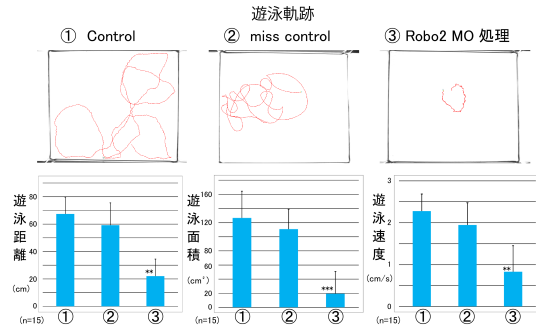
発生の極めて限られた時期に形成されていることが判明した(雑誌論文②-⑤⑦)、本研究ではさらにアフリカツメガエルを用いて上記の神経回路の形成に関する機能的な解析を進めた。その結果、神経ガイド分子である slit2 と robo2 の機能をモルフォリノ処理により阻害したところ、いずれの場合でも初期神経回路の1つである後交連の神経束が形成されていないことが判明した(図2)。さら

図2. Robo2の阻害により後交連(PC)の形成が異常になる(矢じりの部分)



に、それらの個体では、遊泳面積が正常個体と比較して有意に小さくなっていることが判明した(図3)。これらの結果は発生初期に形成される初期神経回路の1つ後交連が、後に形成される複雑な行動に影響を及ぼしており、神経ガイダンス分子の一部がその分子的な基盤となっていることを示唆している(投稿準備中、今年度の欧州進化発生学会議 Euro Evo Devo2014にて発表予定)。さら

図3 Robo2を阻害した個体では遊泳行動に異常が生じる



にヤツメウナギを用いた解析から、robo 遺伝子の発現位置と後交連の位置が対応していることが判明し、上記の分子機構が脊椎動物の進化の初期の段階で存在していた可能性が示唆された。これらの成果により、本研究の目的である、「脊椎動物の発生期に形成される神経回路が担う行動制御の理解」を達成できたと考えられる。

### 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 7 件)

T. Nomura, Y. Murakami, H. Goto, K. Ono.

Reconstruction of ancestral brains: exploring the evolutionary process of encephalization in amniotes. Neuroscience Research. 査読有, 2014, in press,

Y. Sugahara, M. Kawaguchi, T. Itoyama, D. Kurokawa, Y. Tosa, S.I. Kitamura, I.C. Handoh, K. Nakayama, Y. Murakami. Pyrene induces a reduction in midbrain size and abnormal swimming behavior in early-hatched pufferfish larvae. Marine pollution bulletin, 査読有, 2014, in press,

F. Sugahara, Y. Murakami, N. Adachi, S. Kuratani. Evolution of the regionalization and patterning of the vertebrate telencephalon: what we can learn from cyclostomes? Current Opinion in Genetics and Development. 査読有, 23, 2013, pp475-483,

T. Nomura, M. Kawaguchi, K. Ono, Y. Murakami. Reptiles: a new model for brain evo-devo research. Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution. 査読有, 1320, 2013, pp57-73,

M. Iida, E.Y. Kim, Y. Murakami, Y. Shima, H. Iwata. Toxic effect of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo—dioxin on the peripheral nervous system of developing red seabream (*Pagrus major*). Aquatic toxicology. 査読有, 128-129, 2013, pp193-202,

M. Rhinn, K. Miyoshi, A. Watanabe, M. Kawaguchi, F. Ito, S. Kuratani, C.V.H. Baker, Y. Murakami, F. M. Rijli. Evolutionary divergence of trigeminal nerve somatotopy in amniotes. The Journal of Comparative Neurology. 査読有, 521, 2013, pp1378-1394,

M. Kawaguchi, Y. Sugahara, T. Watanabe, K. Irie, M. Ishida, D. Kurokawa, S.I. Kitamura, H. Takata, I.C. Handoh, K. Nakayama, Y. Murakami. Nervous system disruption and concomitant behavioral abnormality in early hatched pufferfish larvae exposed to heavy oil. Environmental Science and Pollution Research. 査読有, 19, 2012, pp2488-2497,

〔学会発表〕(計 6 件)

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。日本動物学会 第84回大会, 2013年9月27日, 岡山。

Y. Murakami. Origin and evolution of molecular mechanisms underlying the regionalization of the developing telencephalon. International Symposium on Morphological Sciences. 2013年9月12日, 新潟 (招待講演)。

村上安則, 脊椎動物の進化過程における脳領域と神経回路の多様化。第2回Tokyo Vertebrate Morphology Meeting. 2012年12月01日, 東京 (招待講演)。

Y. Murakami. Evolution of craniofacial neuronal connections in vertebrates. Workshop “Evolution of the Brain” 2012年11月13日, 葉山, 神奈川 (招待講演)。

Y. Sugahara, M. Kawaguchi, D. Kurokawa, H. Takata, S.I. Kitamura, I.C. Handoh, K. Nakayama, Y. Murakami. Pyrene induces nervous system disruption and concomitant behavioral abnormality in early-hatched pufferfish larvae. SETAC Asia/Pacific 2012. 2012年09月25日, 熊本。

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。日本動物学会 第83回大会, 2012年9月13日, 大阪。

〔図書〕(計 2 件)

村上安則、化学同人、脳の発生学、14 章、脊椎動物の脳の進化, 2013、総ページ数 17  
鈴木大地、村上安則、株式会社エヌ・ティ・エス、生物の科学 遺伝 特集 形態進化のロジックを辿る「脊椎動物の脳の起源と進化」, 2013、総ページ数 6

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 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 0 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

村上 安則 (MURAKAMI YASUNORI)  
愛媛大学・大学院理工学研究科・准教授  
研究者番号：50342861

##### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

##### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：