

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 16 日現在

機関番号：63801

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25650086

研究課題名(和文)新規大脳新皮質進化モデルの提案

研究課題名(英文)A model of neocortical evolution

研究代表者

平田 かつみ(Hirata, Tatsumi)

国立遺伝学研究所・総合遺伝研究系・教授

研究者番号：80260587

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)：大脳新皮質「層構造」は、哺乳類にしか存在しないため、哺乳類の進化に伴って突如現れた新奇構造であると考えられてきた。しかしこれまでの我々の研究で、大脳新皮質の上層と下層の神経細胞に類似する細胞が、ニワトリの脳にも存在することが明らかになった。本研究では、より原始的な形態であるとされるカメの新皮質相同領域にも、上層と下層のマーカ遺伝子を発現する神経細胞が存在することを明らかにした。これら細胞の分布パターンは、ニワトリと非常によく似ており、神経発生の時空間的なパターンもニワトリとカメとでよく類似していた。以上の結果は、我々の提唱する「大脳皮質発生機構の古い起源説」を支持する。

研究成果の概要(英文)：The layered neocortex exists in only mammalian species, suggesting that it is a newly evolved structure in the mammalian lineage. However, our previous study showed that the chicken brain contains neuron subtypes that are similar to deep and upper layer neurons in the mammalian neocortex. In this study, we analyzed gene expressions in the softshell turtle brain, which is often referred to as an ancestral form of amniote brains, and found that the turtle brain also contains deep and upper layer-type neurons. The spatial distribution and neurogenetic patterns of these neurons are quite similar to those of the chick counterparts. The results provide another support for our hypothesis of an ancient origin of neocortical neuron subtypes.

研究分野：生物学

キーワード：神経 進化 発生

1. 研究開始当初の背景

ほ乳類における爆発的な知能の進化は、大脳新皮質の高度な発達に起因すると信じられている。領域の拡大はもちろんだが、最も決定的な変化は「層構造」を獲得したことだろう。ほ乳類の大脳新皮質において、神経幹細胞は、まず将来新皮質の下層を占める事になる神経細胞を生み出す。その後、より上層を占める神経細胞を順々に生みだして、最終的に6層からなるほ乳類独特の新皮質を作りあげる(図1A)。では、この層個性の違う細胞を順繰りに生み出す発生プログラムは、進化的にいつ獲得されたのだろうか? 多くの人が、この発生プログラムは、ほ乳類独特の新皮質の獲得と同時期に共進化してきたと考えている。しかしはたして本当にそうなのだろうか?

申請者らによる遺伝子発現解析から、終脳(哺乳類大脳に相同な脳領域)に層構造をもたないニワトリにおいても、ほ乳類新皮質の上層や下層に相同な神経細胞が存在することが明らかになっている(Suzuki et al., Dev Cell, 2012)。これらの細胞は、ニワトリ脳では、層状ではなく塊状に分布する(図1B)。その理由は、ニワトリの神経幹細胞の能力が、ほ乳類よりも制限されており、偏った種類の神経細胞を生み出すためである。すなわち、終脳内側に位置する幹細胞は下層タイプの神経細胞を、外側の幹細胞は上層タイプの神経細胞をもっぱら生み出すため、最終的に神経細胞の偏った分布がもたらされる。したがって、ほ乳類型大脳と非哺乳類型終脳との決定的な違いは、神経幹細胞の能力の差であると考えられた。

しかし、培養系を用いた更なる解析から、ニワトリ神経幹細胞の驚くべき潜在能力が明らかになってきた(図1B)。いくら能力の制限されたニワトリの神経幹細胞であっても、ひとたびクローン培養下に置かれると、ほ乳類に類似の発生プログラムを発揮して、

まず下層タイプの神経細胞を生み、次に上層タイプの神経細胞を生み出すのである。つまり、幹細胞の能力を制限しているのは、むしろニワトリ終脳の環境であって、幹細胞自身の性質ではない。幹細胞のデフォルトとしての性質は、ほ乳類であろうとニワトリであろうと、順繰りに多様な神経細胞を生み出す多能性を備えているのである。この結果は、層個性を生み出す発生プログラムが、ほ乳類固有に進化してきた訳ではなく、大脳皮質層構造が進化する前から既に存在していた事を意味する。これは、すなわち、これまで信じられてきた大脳新皮質進化の定説をくつがえすものである。

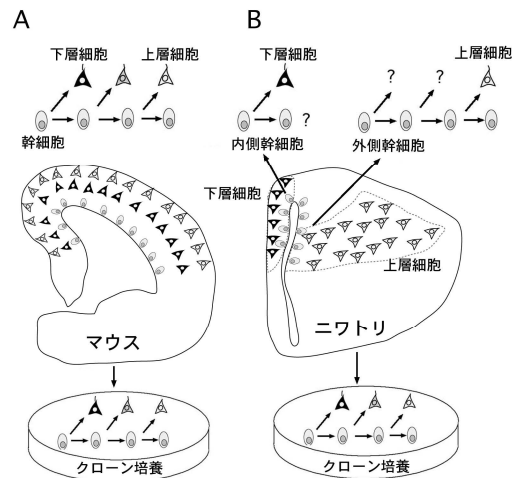


図1. マウス(A)とニワトリ(B)の神経発生 (A)マウスの終脳新皮質神経幹細胞は、どここの位置由来であっても、まず下層細胞を生み、上層細胞を生み出す。その結果、均一な層構造が形成される。(B)ニワトリ終脳では、内側の幹細胞は下層細胞を、外側の幹細胞は上層細胞をもっぱら生み出す。その結果、下層細胞が終脳内側に、上層細胞が外側に偏って存在することになる。しかしひとたびクローン培養すると、どこ由来の神経幹細胞であっても、下層細胞と上層細胞の両方を生み出す事ができる。

2. 研究の目的

ニワトリと哺乳類との比較だけでは、どちらの脳に特殊化が起きたのかは判断できず、これらの共通祖先が持っていたはずの終脳を予測することはできない。本研究では、我々が提唱する大脳新皮質進化仮説を検証するために、(1)より原始的な脳だといわれるカ

メの大脳皮質相同領域を用いて、遺伝子発現解析を行なった。また、ニワトリゲノムを持つトランスジェニックマウスを作成して、(2)ニワトリと哺乳類の間の神経発生プログラムの共通性をもたらす遺伝的基盤について検討した。

3. 研究の方法

(1) ほ乳類の大脳新皮質で層特異的に発現することが知られる遺伝子のカメにおけるオーソログ遺伝子を RT-PCR によりクローニングした。そして得られた遺伝子断片を用いて in situ hybridization を行い、様々な発生段階におけるカメの大脳新皮質相同領域における発現パターンを詳細に解析した。具体的には、第6層マーカーとして Tbr1、第5層マーカーとして Er81, Fezf2, Ctip2, 第4層マーカー Rorb, 第2/3層マーカー Foxp1, Mef2c, Satb2 について発現解析を行った。

カメの大脳新皮質相同領域における神経新生の時空間的パターンを解析するために、プロモドオキシウリジンの取り込みや、分裂マーカー、神経分化マーカー等の発現を各種特異抗体を用いて解析した。

(2) ほ乳類の新皮質層マーカー遺伝子とニワトリオーソログ遺伝子のゲノム配列を比較して、相同性が高く調節領域を含む可能性がある部分を選択した。そのような高い相同領域を含むニワトリゲノム BAC クローンを取りよせて、遺伝子組換えにより GFP をレポーター遺伝子を翻訳開始部位に挿入した。得られた BAC 組換え体をマウス受精卵に導入して、トランスジェニックマウスを作成し、生後 10 日前後でレポーター遺伝子の発現を検討した。

4. 研究成果

(1) カメの脳は単純ながらも一層の神経細胞層をもち、神経核のみで構成されるニワトリの脳とは、形態が大きく異なる。しかし、

大脳皮質層マーカー遺伝子の発現を調べると、カメとニワトリの神経細胞の分布パターンは、極めて良く似ている事がわかった。具体的には、いずれの動物においても、下層細胞は内側に、上層細胞は外側に分布しており、これが非ほ乳類羊膜類における基本型であると推察された。さらに、神経発生の時空間的なパターンもニワトリとカメとでよく類似しており、この神経発生のパターンが、哺乳類の層状の神経細胞分布との違いを生み出すと考えられた。

以上の結果は、我々が提唱する「大脳皮質発生機構の古い起源説」を支持する。そして、その背後には、誕生時期依存的に神経細胞の個性を決める機構の普遍性があることが推察される(図2)。

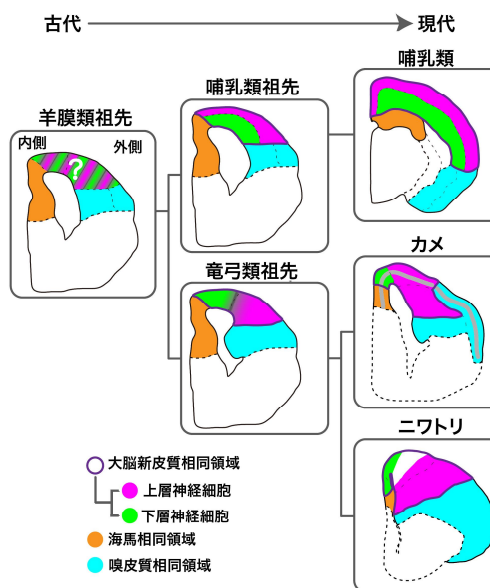


図2.羊膜類における脳進化のモデル

(2) 層特異的神経細胞の発生プログラムがニワトリとマウスで保存されているならば、層個性マーカー発現の遺伝子基盤も保存されている可能性が考えられる。すなわち、層がないニワトリの遺伝子であっても、層が存在するマウス大脳新皮質の環境下におけば、層特異的に発現する可能性が期待できる。そこで、ニワトリゲノムを導入したトランスジ

ェニックマウスを作成し、終脳新皮質におけるニワトリ遺伝子の遺伝子発現パターンを解析した。

哺乳類の層特異的遺伝子を3種類選び、これらのニワトリオーソログ遺伝子を含むゲノムBAC計6種類について、GFPレポーター遺伝子を組換え挿入の後、トランスジェニックマウスを作成した。しかし、マウス新皮質において再現性のみられるレポーター発現は検出できなかった。これはハイリスク挑戦的な実験であり、この結果がすなわちニワトリの哺乳類との遺伝子発現制御の共通性を否定するものではないが、新皮質「層構造」の共通性はそれほど単純ではない、と考えられた。

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 4件)

(1) S. Mita, P. Monasterio-Schrader, U. Fünfschilling, T. Kawasaki, H. Mizuno, T. Iwasato, K.-A. Nave, H. B. Werner, and T. Hirata (2014): Transcallosal projections require glycoprotein M6-dependent neurite growth and guidance. *Cerebral Cortex* [Epub ahead of print]

doi: 10.1093/cercor/bhu129 査読有

(2) I. K. Suzuki and T. Hirata (2014): A common developmental plan for neocortical gene-expressing neurons in the pallium of the domestic chicken *Gallus gallus domesticus* and the Chinese softshell turtle *Pelodiscus sinensis*. *Front. Neuroanat.* April 8 1-17.

doi: 10.3389/fnana.2014.00020 査読有

(3) Y. Ohtani, M. Miyata, K. Hashimoto, T. Tabata, Y. Kishimoto, M. Fukaya, D. Kase, H. Kassai, K. Nakao, T. Hirata, M.

Watanabe, M. Kano and A. Aiba (2014): The synaptic targeting of mGluR1 by its carboxyl-terminal domain is crucial for cerebellar function. *J. Neurosci.* 34 2702-2712.

doi: 10.1523/JNEUROSCI.3542-13.2014. 査読有

(4) I. K. Suzuki and T. Hirata (2013): Neocortical neurogenesis is not really “neo”: a new evolutionary model derived from a comparative study of chick pallial development. review, *Dev. Growth Differ.* 55, 173-187. doi: 10.1111/dgd.12020. 査読有

[学会発表](計 4件)

(1) T. Hirata, Evolutionary conservation of neocortical neurogenetic program in the mammals and birds. 9th World Congress IBRO 2015, Symposium: Evolution of cerebral cortical development, 2015年7月7~11日, Rio de Janeiro, Brazil (招待講演)

(2) T. Hirata, Origin of the neurogenetic program in the mammalian neocortex, 第48回日本発生生物学会 シンポジウム Vertebrate brains: Structure, Function and Evolution, 2015年6月2-5日, 筑波(招待講演)

(3) T. Hirata, Mammalian-type neurogenic potential in chick pallial neural progenitors, The Company of Biologists Workshop, Evolution of the Human Neocortex: How Unique Are We?, 2013年9月22-25日, Wiston House, West Sussex, UK (招待講演)

(4) T. Hirata, The making of the

様 式 C - 1 9、F - 1 9、Z - 1 9 (共通)

mammalian neocortex, CDB Symposium –
The Making of a Vertebrate, 2013 年 3 月
4-6 日 Kobe, Japan

〔その他〕

ホームページ等

所属研究機関のニュース

<http://www.nig.ac.jp/Research-Highlights/1468/1515.html>

<http://www.nig.ac.jp/english/highlight/1470/1516.html>

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

平田 たつみ (HIRATA TATSUMI)

国立遺伝学研究所・総合遺伝研究系・教授
研究者番号：80260587

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし