

## 論文内容の要旨

Analysis of construction mechanism of medaka telencephalon by post-hatch neurogenesis.

(生後の神経新生を介したメダカ終脳の構築機構の解析)

磯江 泰子

脊椎動物の脳は胚発生期にその基本的な神経回路が構築されるが、生後の成長期も継続して発達する。脊椎動物は種固有な、また種を越えて保存された行動様式を示すが、こうした生後の脳発達が行動発達とどのように関連するかは不明であった。モデル生物である硬骨魚類メダカ (*Oryzias latipes*) の終脳では生涯を通じて広範な領域で神経新生が生じるため、生後の脳発達と行動発達の関連を調べる上で優れた研究対象である。本研究では特に記憶・学習、外界認知、社会認知などの高次機能の中枢である終脳に着目した。終脳の全新生ニューロンの細胞系譜を系統的に解析した結果、魚類の種間で構造に多様性が見られる終脳背側と、魚類の種間で構造に共通性が見られる腹側では、神経新生を介した脳の構築原理が異なることを発見した。さらに、将来的にこうしたメダカの脳の構築機構がその社会性行動発達とどう関連するのか調べる目的で、視覚依存的な同種への近づき行動を定量化する新規な行動実験系を確立し、同種認知能力が成長段階に伴って発達することを見出した。

## 序論

終脳は発生過程において神経管の最も先端の脳のふくらみから生じる脊椎動物に共通した脳構造である。哺乳類では大脳に対応しており、様々な感覚情報を統合し、記憶・学習、生得的な行動の制御を行なう高次中枢として機能する。終脳は神経管の背側から発生する「外套」

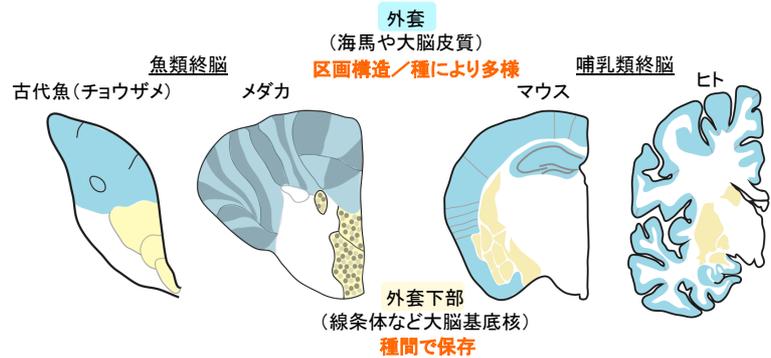


図1. 成体の終脳構造の脊椎動物種間比較

と腹側から発生する「外套下部」に分けられ、両者は構造と機能が大きく異なる(Ebbesson S.O. 1980)。「外套」は海馬や大脳皮質を含んでおり、内部が多く的小区画された解剖学的領域に分かれ、機能分化している。また外套の構造と機能は脊椎動物種間で大きく異なっている。一方で「外套下部」は大脳基底核(線条体など)を含み、脊椎動物間で構造と機能が比較的保存されている(図1)。胚発生過程において、神経管から外套・外套下部が分化する分子機構は脊椎動物間で保存されている。そこで私は、成体で見られるような外套・外套下部の内部構造の構築や機能分化は生後の脳発達過程で生じるのではないかと考え、「生後の成長過程における終脳構築機構」に着目した研究に着手した。

本研究では硬骨魚類メダカを用いた。硬骨魚類では成長段階において脳全体で神経新生が生じており、神経細胞数が稚魚から成魚にかけて5~10倍程度増加することから、新生ニューロンが脳構造の構築に大きく寄与すると予想される。修士課程では神経新生を追跡するために遺伝子改変メダカ

(HuC:loxP-DsRed-loxP-GFP、以降 HuC メダカ)を用いて、幼魚及び成魚脳の新生ニューロンを可視化した。次いで発生初期に少数の神経幹細胞で Cre/loxP 組換えを誘導し、細胞系譜を GFP で可視化したところ、成魚終脳の背側において区画構造が観察された。そこで私は硬骨魚類では成長段階において同一の神経幹細胞由来の新生ニューロン群(クローナルユニット)が終脳の区画構造を構築するという仮説を立てた(図2)。この仮説を検証するため、博士課程では終脳全体におけるクローナルユニットの体系的な解析を行なった。

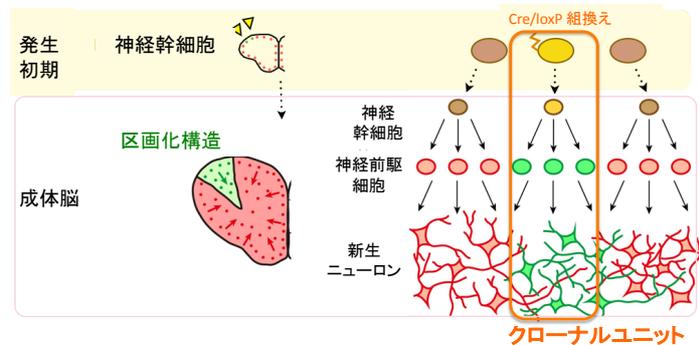


図2. メダカの発生初期の同一神経幹細胞由来の新生ニューロン(クローナルユニット)は成体終脳背側で区画構造を構築

さらに、将来的に終脳における神経

新生の社会性行動発達への寄与を調べる目的で、様々な成長段階の魚を用いて社会認知(同種認知、個体認知)能力を検定する行動実験系を確立し、成長段階に従って社会認知能力が変化・発達するか検定した。

## 結果

### 1. 成魚終脳を構成する、神経管胚期の神経幹細胞由来のクローナルユニットを同定

クローナルユニットの体系的な解析を行なう上で、次の3点を工夫した。①特定の発生時期の神経幹細胞由来の細胞系譜(クローナルユニット)を可視化するために、熱刺激依存に遺伝子発現が誘導される HSP-Cre メダカを用いた。HuC メダカと HSP-Cre メダカを掛け合わせた卵が神経管胚期のときに熱刺激を与え、Cre/loxP 組換えを誘導した。②終脳全体の蛍光像を観察するため、透明化試薬 Sca/e A2 を用いて光シート顕微鏡で撮影した。③複数サンプルを比較するために脳を「標準化」し、撮影条件に

よりサンプル間で生じたずれを標準化という計算手法で補正することで、現在までに 70 個体のサンプルを比較可能な形式に変換し解析を行なってクローナルユニットの構造を同定した。

## 2. 終脳背側／腹側はクローナルユニットの構造が大きく異なることを発見

クローナルユニットの構造解析を行なったところ、終脳背側の解剖学的区分は複数のクローナルユニットが排他的に配置し、クローナルユニットがブロックのように組み合わせられて構築されていることを見いだした。標準脳へのシグナル投影の結果、複数のクローナルユニットが、過去に解剖学的に同定されていた区画に対応し、既知の解剖学的区画が複数のクローナルユニットから構成されることを示した。一方で終脳腹側の解剖学的区分では DsRed・GFP シグナルが混在し、複数のクローナルユニットがモザイク的に絡み合い、区画を構築することを発見した(図3)。

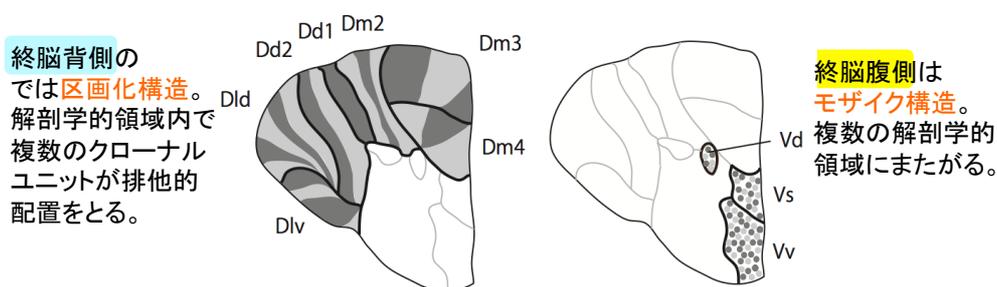


図3. メダカ終脳背側/腹側のクローナルユニットの構造の違いを同定

## 3. 終脳背側／腹側で異なる遺伝子発現制御を受ける遺伝子発現カスケードを検索

脳発達段階において終脳背側では各クローナルユニットが自律的に発生することで排他的な区画を構築するのに対し、終脳腹側では複数のクローナルユニットが密接に相互作用しながら、一つの区画を構築すると考えられる。このクローナルユニットの構築様式の違いを生む分子メカニズムを調べるために遺伝子発現制御を調べた。一般に、幹細胞の細胞運命が規定され、分化・増殖を経てクローナルユニットを生み出す不可逆的過程にはエピジェネティックな遺伝子発現制御機構が関わりとされる。区画／モザイク構造の違いを生み出す遺伝子発現制御様式を調べる目的で ATAC-seq (転写因子が結合しているゲノムシーケンスを読み、遺伝子発現制御を受ける遺伝子候補を同定する方法) (Buenrostro J. D. *et al.* 2013) を行なった。

その結果、終脳背側／腹側特異的に強く発現制御を受けるゲノム領域を背側で940、腹側で536個同定した。これらのゲノム領域が転写制御する遺伝子候補群の機能をアノテーションデータベース DAVID (Huang D. W. *et al.* 2008)を用いて解析を行った。

## 4. 近づき行動実験系の確立と近づき行動の発達、生理状態に依存した変化の検出

上記のような脳構造とその発達機構が、どのような行動発達と関連するかを調べる上で、メダカを用いた行動アッセイ系を確立する必要がある。ここでは特に成長に伴って発達する社会性行動に注目し、様々な成長段階にあるメダカを用いて、視覚依存的に他個体へ近づく行動を定量化する行動アッセイ系を確立した。方法は円柱形の透明な水槽を二つ重ねて内側と外側に1匹ずつメダカを入れ、個体間距離が一定距離以内にいた頻度を「近づき頻度」として計測した。視神経を切除した個体を内側または外側に用いた実験の結果、内側の魚が外側の魚に接近しており、「近づき頻度」は内側の魚の視覚依存的接近により決まることが分かった。次に、成長過程に依存して当該行動が変化するか調べた結果、孵化後1ヶ月の稚魚は異

種（ゼブラフィッシュ）と同種の両方に接近したが、孵化後2ヶ月以上の幼魚や性成熟した成魚では同種のみ接近した。以上より、成長段階に従って同種認知能力が発達し同種への接近行動が確立する、または異種への接近行動が失われる可能性が考えられた。

### 考察とまとめ

本研究ではまず、硬骨魚類メダカを用いて成長過程における終脳発達機構を解析する目的で、新生ニューロンのクローナルユニットを体系的に調べ、脊椎動物「外套」に対応する背側で区画化構造、脊椎動物「外套下部」に対応する腹側でモザイク構造をつくることを発見した。脊椎動物の脳（終脳）構築様式を、発達期に生じる新生ニューロンの細胞系譜という観点から解明したのは本研究が初めてである。次にこのような構造様式の違いを産む分子機構候補を検索し、少なくとも小型魚類においては外套と外套下部で分子的構築原理が異なっている可能性を示唆した。今後、この構築原理が哺乳類など他の脊椎動物にも敷衍できるかが興味深い課題である。

外套の構造と機能は魚類とほ乳類で大きく異なり、硬骨魚類の種間でさえも解剖学的に同定できる脳領域の数や構造が異なる(図1)。魚類進化の過程で外套を構築するクローナルユニットの数と種類の変化することで、外套構造の種差が出現した可能性が考えられる。さらに哺乳類では外套の解剖学的な脳領域は機能ユニットになっていると考えられている（「脳機能局在論」）。マウス大脳皮質では同じ神経幹細胞から発生したニューロン群はお互いにシナプスを形成しやすく(Yu YC. *et al.* 2009)、類似した感覚情報を処理しており(Li Y. *et al.* 2012)、クローナルユニットが機能ユニットとして機能することが示唆されている。今後、脳の機能分化機構を理解する上でクローナルユニットが「機能ユニット」に相当するか解明することが重要であると考えている。

最後に、同種への近づき行動を定量化する行動実験を確立することで、メダカに特徴的な視覚依存的な社会性行動の定量に成功した。同種他個体への近づき行動（同種認知）の確立は多くの社会性動物の最初の必須な行動ステップであり、種を越えて広く観察される。将来的に、同種認知の発達に終脳の特定のクローナルユニットが必要であることが証明できれば、クローナルユニットを社会認知の「機能ユニット」と捉え、その構築過程を個体発生と系統発生の両面から理解できると期待している。