

論文審査の結果の要旨

氏名 磯江 泰子

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、神経細胞の数が稚魚から成魚にかけて5～10倍程度増加する。こうした成長段階で生じる神経新生は硬骨魚類の脳構築や行動発達に大きく寄与すると予想される。しかしながら、魚類の脳発達における神経新生の生理的意義は不明であった。論文提出者は、メダカを材料に、神経胚期の少数の神経幹細胞を遺伝学的にラベルすることでメダカの成体大脳（終脳）の全新生ニューロンの体系的な細胞系譜解析を行い、終脳が細胞系譜単位（クローナルユニット：単一神経幹細胞の子孫ニューロンから構成される新生ニューロン群）によって構築される様式を解析した。

本論文は6章からなる。第1章では成長段階にあるメダカ幼魚の脳の細胞増殖領域を体系的に同定している。第2章では発生初期に低頻度の Cre-loxP 組換えを誘導することで、新生ニューロンの細胞系譜単位を遺伝的にラベルして可視化している。第3章では体系的な細胞系譜単位の解析を行っている。まず緩和な熱ショックによって、神経胚期のごく少数の幹細胞を遺伝的にラベルする実験系を確立し、子孫の細胞群（細胞系譜単位）を蛍光タンパク質で可視化した。次に、終脳全体を3D撮影するため全脳を透明化して光シート顕微鏡で撮影する手法と、3D脳アトラスを「標準化」し、撮影条件によってサンプル間で生じたずれを補正する計算手法を確立した。70個体のサンプルを、標準化した脳アトラスに投射して細胞系譜単位の形態と位置関係を解析した結果、終脳背側にはブロック化した細胞系譜単位が排他的に配置し、複数の細胞系譜単位が既知の解剖学的区画を構成することを発見した。一方、終脳腹側では複数の細胞系譜単位がモザイク状に絡み合い既知の解剖学的区画を構築していた。従って、脳発達段階において、終脳背側では各細胞系譜単位が自律的に発生し、排他的区画を構築するのに対して、終脳腹側では、複数の細胞系譜単位が密接に相互作用

用しながら発生が進むと考えられる。

第4章では、こうした終脳背側・腹側の構築様式の違いを産み出す分子メカニズムを調べている。幹細胞の細胞運命が決定し、分化・増殖を経て各細胞系譜単位を産み出す不可逆的過程にはエピジェネティック機構が関わる可能性がある。そこで ATAC-seq を行い、全ゲノムレベルで終脳背側・腹側特異的オープンクロマチン領域を背側で940、腹側で536 個同定した。これらのゲノム領域が制御する候補遺伝子群の機能をアノテーションした結果、軸索ガイダンスに関わる因子群が集中して同定された。また RNA-seq 解析の結果、当該因子群の多くは背側・腹側で選択的な発現を示すことが分かった。従って、軸索ガイダンスの様式の違いが、終脳背側・腹側の構築様式の違いを生み出した可能性がある。さらに背側・腹側選択的な転写因子候補を検索した結果、背側選択的遺伝子についてはマウスの大脳初期発生に関わる因子群、腹側選択的遺伝子については成体神経新生に関わる因子群が多く同定され、背側・腹側に固有な分子機構の存在が示唆された。

第5章、第6章では将来的に、メダカの行動発達に関わる細胞系譜単位を同定するためのツールを開発している。第5章では特定の細胞系譜単位の発生や機能を遺伝学的に抑制するためにIR-LRGO法を確立した。第6章では、メダカの行動発達を定量化する新規な行動実験系を確立した。

本論文では、硬骨魚類終脳の背側・腹側の構築様式の違いが成長段階の神経新生を介して生じることが示された。魚類から哺乳類まで、脊椎動物の終脳は背側の「外套」と腹側の「外套下部」に分けられ、両者は構造と機能が異なる。「外套」は海馬や大脳皮質を含み、内部は多くの区画化された解剖学的領域に分かれ、その構造には種差が存在する。本論文では「外套」を構成する細胞系譜の自律的発生様式の違いが、その構造と機能の種多様性を生み出すとの仮説が提唱されている。一方で、「外套下部」は大脳基底核（線条体など）を含み、その構造と機能は脊椎動物間で比較的保存されている。本研究は、硬骨魚類の終脳の「外套」と「外套下部」の構築原理の一端を世界で初めて解明した独創的な研究成果であり、大変大きな学術的意義をもつ。今後、神経新生を介した

終脳構築機構が胎児・幼年期の哺乳類でも保存されているか検討することで、脊椎動物で保存された大脳構築機構の解明に繋がると期待される。

なお本論文の第1章と第2章は奥山輝大ら、第4章は中村遼平・武田洋幸ら、また論文全体に渡り、久保健雄・竹内秀明との共同研究であるが、論文提出者が主体となって分析及び検証を行ったもので、論文提出者の寄与が十分であると判断する。

したがって、博士（理学）の学位を授与できると認める。