

## 研究報告書

### 「進化的・構成的アプローチによる哺乳類型大脳皮質層構造の再設計」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 24 年 10 月～平成 28 年 3 月

研究者: 野村 真

#### 1. 研究のねらい

我々ヒトを含めた哺乳類の大脳皮質は感覚、随意運動、記憶学習、認知機能を司る最上位中枢として機能している。哺乳類大脳皮質は胎児期の細胞分裂によってその表面積を拡大し、かつ多種類の神経細胞を産み出すことにより6層の層構造を形成する。大脳皮質の6層構造は他の脊椎動物には決して見られないことから、哺乳類進化の過程で独自に獲得された形質であると考えられる。こうした哺乳類型大脳皮質構造を産み出した発生進化的機構については多くの説が唱えられているが、その実験的な裏付けは未だになされていない。哺乳類大脳皮質はよりシンプルな形態を示す爬虫類型大脳皮質から進化してきたと推測されている。そこで本研究提案では、申請者が独自に開発した爬虫類胚の個体遺伝子操作技術と、試験管内での大脳皮質再構築系を組み合わせることにより、爬虫類の大脳皮質を哺乳類型に改変・再設計することを目指した。申請者のこれまでの解析により、哺乳類大脳皮質を構築する細胞構成要素は、ほぼすべて爬虫類型皮質にも存在することが明らかとなっている。しかしながら、神経細胞を産み出す頻度とタイミング、また神経細胞の分化の時空間的制御機構が、爬虫類と哺乳類では大きく異なっており、これが爬虫類のシンプルな皮質形態をもたらしている主要な要因であると予測された。そこで本研究では、哺乳類と爬虫類の大脳皮質を構成する神経細胞の時間的・空間的な発生機構を比較し、さらに神経細胞の形態や配置を改変することにより、哺乳類型大脳皮質のフェノコピー創出実験を試みた。こうしたアプローチを導入することで、大脳皮質進化の過程において生じた発生プログラムの修飾・改変箇所を同定することを本研究提案の最終目標とした。

#### 2. 研究成果

##### (1) 概要

今回の研究成果により、1) 哺乳類大脳皮質の各層を構成する神経細胞に発現する遺伝子(転写因子)は、爬虫類や鳥類の大脳にも発現していること、しかしながらその発現制御メカニズムが哺乳類とは大きく異なっていることが明らかとなった。さらに、2) 哺乳類型大脳皮質の発生過程では、大脳皮質原基を移動中する神経細胞が多極性から双極性の形態に変化し、この特徴的な形態変化が哺乳類型層構造の形成に必須であるが、この神経細胞の形態変化が爬虫類皮質では起こらないことを発見した。さらに、哺乳類と爬虫類の皮質の発生過程を比較したところ、この哺乳類型の神経細胞の形態変化に特定の細胞外シグナルが関わっていることを見出した。この結果を踏まえて、爬虫類胚におけるこのシグナルの人為的操作を

行ったところ、爬虫類の神経細胞の形態に大きな変化が生じ、多極性から双極性の形態へと転換することを発見した。これらの結果は、神経細胞という「要素」の多様化、さらに構成要素を「配置」する機構の変化が、皮質層構造の進化の過程で重要な役割を果たしたことを示唆している。また今回の成果から、哺乳類独特の皮質層構造をもたらした遺伝学的背景として、哺乳類独特の遺伝子抑制機構を同定することに成功した。従って、哺乳類進化の過程で、恐らくすでに存在していた遺伝子の転写調節機構に大きな変化が生じ、時間的・空間的に厳密にコントロールされた遺伝子の活性化機構が確立されたことが、哺乳類に独特の脳構造の進化に大きく貢献したと推測された。

## (2) 詳細

研究テーマ A: ヤモリ大脳皮質神経幹細胞の幹細胞クローン解析と神経細胞の移動様式の解析」

哺乳類大脳皮質は多種類の神経細胞で構成されているが、これらの神経細胞は単一の神経幹細胞から産生されることが明らかとなっている。一方、爬虫類型の皮質にも多種類の神経細胞が存在するが、これらが単一の神経幹細胞から産生されるのか否かは明らかとなっていなかった。この問題を明らかにするため、GFP を発現するレンチウイルスベクターを用いて、爬虫類(ヤモリ)、鳥類胚の大脳皮質(ニワトリ背側外套)の神経幹細胞の系譜解析を行った。現在までにニワトリ胚 10 クローン(N=49 細胞)、ヤモリ 5 クローン(N=11 細胞)を解析し、少なくとも1つの神経細胞クローン集団が2つ以上の転写因子を発現するヘテロな神経細胞サブタイプから構成されていることを確認している。従って、爬虫類・鳥類皮質(外套)も哺乳類の皮質と同様に単一の神経幹細胞から多種類の神経細胞が産生されていることを同定した。次に、哺乳類と爬虫類の皮質を構成する神経細胞に発現する転写因子の発現様式を比較した。その結果、哺乳類では BCL11B(CTIP2) と SATB2 の2つの転写因子は層ごとに排他的な発現を示すのに対し、爬虫類、鳥類では多くの細胞がこれらの転写因子を同時に発現していた(図1)。さらに、bcl11b のゲノム領域の比較を行ったところ、転写の抑制に必要なシス制御領域である MAR (Matrix Attachment Region) の数と分布が動物ごとに大きく異なり、哺乳類 bcl11b のゲノム領域に存在する5'側の MAR が爬虫類、鳥類には存在しないことが明らかとなった(図2)。また個々の MAR の転写活性を比較したところ、哺乳類に比べて爬虫類、鳥類の MAR の転写抑制活性が低いことが明らかとなった。以上の結果から、哺乳類進化の過程で bcl11b のゲノム配列に変化が生じ、2つの転写因子を排他的に発現させる機構が獲得されたことにより、層を構成する神経細胞の形態的・機能的特異化が進んだことが予測された。さらに、皮質原基を移動する神経細胞の移動様式についても種間比較解析を行った。その結果、哺乳類皮質の構築過程で見られる神経細胞の多極性から双極性への形態変化が、爬虫類、鳥類皮質では観察されないことが明らかとなった。すなわち、神経細胞が双極性に転換することで、先に移動した神経細胞の集団を後から産まれた神経細胞が乗り越え、常に皮質の最外部へと到達することで皮質6層構造が形成されると考えられ、この神経細胞の形態変化が哺乳類型層構造獲得の鍵革新の一つであることが予測された。

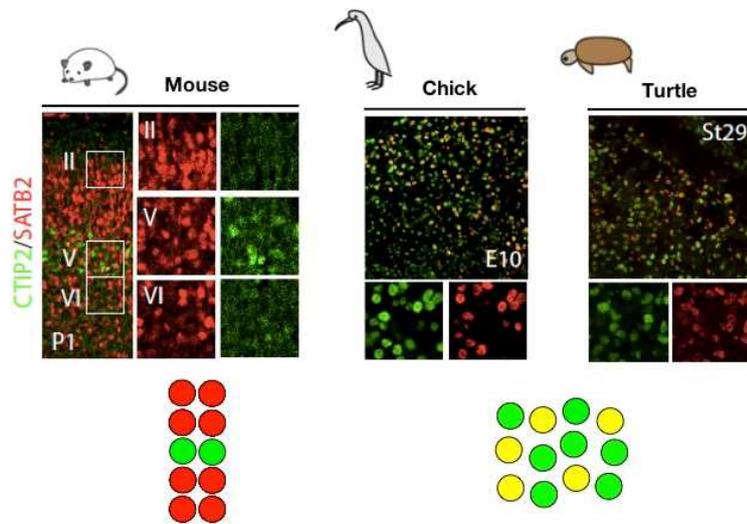


図1: 神経細胞サブタイプを決定する転写因子 BCL11B (CTIP2) と SATB2 の発現を様々な羊膜類の大脳皮質騒動領域で比較した結果。哺乳類(マウス)ではこれらの転写因子は層ごとに排他的な発現を示すが、鳥類(ニワトリ)、爬虫類(カメ)では2つの転写因子は1つの神経細胞で同時に発現している。下の丸は発現の様式を模式的に表したものの。

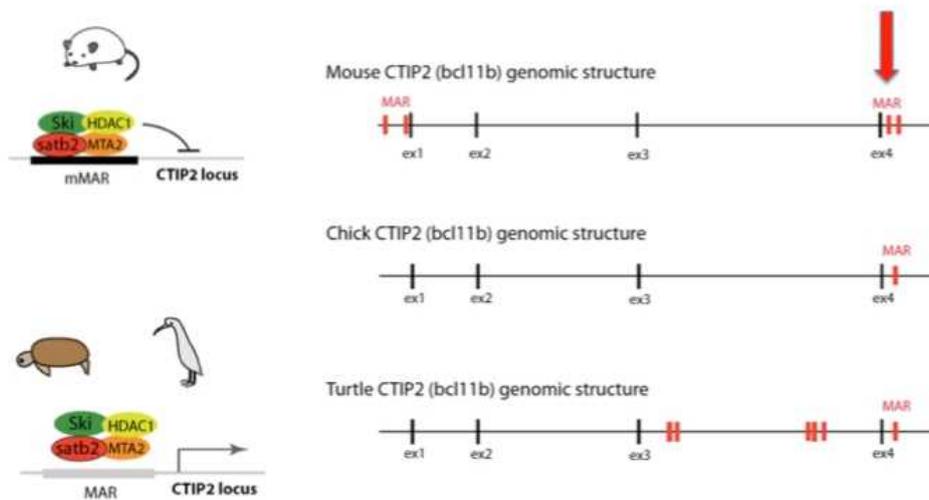


図2: 様々な羊膜類の *bcl11b* (CTIP2) 遺伝子のゲノム領域における転写抑制に必要な調節領域の比較結果。MARと呼ばれるシス制御領域の数と分布が種間で大きく異なっており、特に5'側のMARは哺乳類にしか存在しないことが明らかとなった。また3'側のMARの転写抑制活性は鳥類や爬虫類では低いことも、これらのMARを組み込んだベクターによるルシフェラーゼアッセイにより確認している。

研究テーマ B 「In vitro, in vivo におけるヤモリ大脳皮質の改変による哺乳類型皮質層構造の作製」

研究テーマ A の結果を踏まえて、試験管内および発生する胚において爬虫類皮質の発生過程を改変することで、哺乳類型の層構造を持つ大脳皮質の表現型模写実験を試みた。まず、試験管内での再現について、ヤモリ大脳皮質から神経幹細胞を単離し、qSFEB 法を用いて脳再凝集体を作製し、凝集体内での層構造の再構築を試みた。様々な条件を検討した結果、低濃度のマトリゲル存在下で幹細胞培地から分化培地に移行した場合に、多種類の神経細胞を効率的に誘導できることを見出した。また特に細胞外分泌シグナルを阻害した場合に、神経細胞が凝集体の外側に集積することも見出しており、今後神経細胞の配置のコントロールが可能かどうかを検討する予定である。一方、in vivo において、どのようなシグナル分子が神経細胞の形態変化に関わっているかを検討した結果、特定の細胞外分泌シグナルの活性化が哺乳類と爬虫類の皮質発生過程で大きく異なっており、哺乳類では多極性から双極性への神経細胞の形態変化が起こる過程で特定の細胞外シグナルの活性が減少するが、爬虫類ではこの減少が見られないことを明らかにした。また、爬虫類の神経細胞を哺乳類皮質に移植した場合、爬虫類神経細胞は多極性の形態を保持し、脳外側への移動を停止するが、哺乳類皮質においてこのシグナルの下流経路を恒常的に活性化した場合も同様の表現型が得られることが明らかとなった。またこのシグナル分子の下流経路を爬虫類皮質で阻害した場合、爬虫類の神経細胞の形態が多極性から哺乳類皮質で見られるような双極性の形態に変化した(図3)。従って、このシグナルの活性化のコントロール機能の変化が哺乳類型大脳皮質の層構造の獲得に大きく貢献したことが推測された。

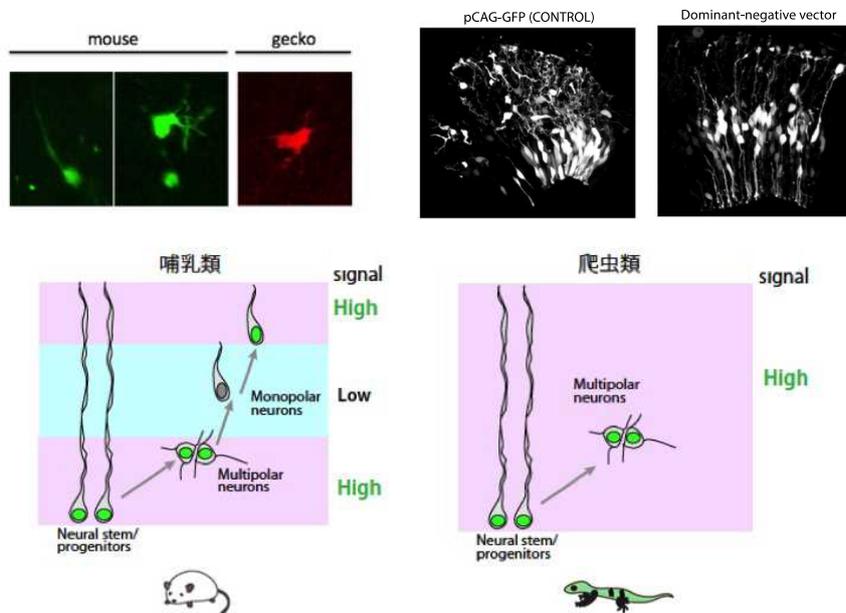


図3 左上: マウスとヤモリの神経細胞の形態的違い。マウス皮質の神経細胞は双極性の形態をとるのに対し、ヤモリでは多極性の形態を維持している。右上: 細胞外シグナル経路を阻害するとヤモリの神経細胞の形態を双極性に変化させることができる。下: 今回明らかになった哺乳類と爬虫類の皮質構築過程の違い。

### 研究テーマ C「生殖系列ゲノムに外来遺伝子が挿入されたトランスジェニックヤモリの作製」

本研究で使用しているマダガスカル産地上性ヤモリ(ソメワケササクレヤモリ)を爬虫類のモデル実験動物として確立するために、トランスジェニック動物の作製が可能かどうかを検討した。爬虫類胚は産卵時にすでに神経胚まで発生が進行しているため、両生類や鳥類で行われている初期胚への遺伝子導入が困難である。そこで、成体オスの精巣に電気穿孔法で遺伝子を導入することにより、精子幹・前駆細胞を介してトランスジェニックヤモリの作製を試みた。成体ヤモリの麻酔下での手術と遺伝子導入は全く報告例が無かったが、哺乳類での手順を応用・改変することで、爬虫類の精巣への遺伝子導入法を確立することができた。遺伝子導入個体を複数のメスと交配させ、産卵された卵から胚を採取しジェノミック PCR によるスクリーニングを行ったが、残念ながら現在までに外来遺伝子が導入された個体を得ることができていない。精細管への遺伝子導入には成功しているため、今後どの程度の精子幹細胞に遺伝子が実際に導入されたかの定量的な解析が必要である。また、メスの産卵数が期待よりもはるかに少なかったため、十分な胚を得ることができなかった。従って、より大きな動物コロニーを持つ繁殖施設との共同研究も必要であると考えている。

### 3. 今後の展開

研究テーマ A に関してヤモリゲノム配列情報を基にしたシス制御領域の同定、さらにニワトリ BAC クローンを用いたトランスジェニックマウスの作製を計画している。また、研究テーマ B に関しては、ヤモリ大脳皮質において、シグナル分子の抑制による神経細胞の移動と配置様式を解析し、ヤモリの皮質に新たな層構造が形成されるかを検討する。研究テーマ C に関しては、レンチウイルスベクターを用いた遺伝子導入法を検討するとともに、より大きなコロニーを維持している施設との共同研究を行うことも視野に入れている。

### 4. 評価

#### (1) 自己評価

(研究者)

本研究は、爬虫類皮質の再構成による哺乳類型皮質への転換という挑戦的なテーマを掲げた。実際には、このような表現型模写実験を通じて、脳の進化の過程で起ったはずの発生プロセスの変更箇所を同定し、これまでにない新しい脳進化の説を提唱することが本研究の大きな目標であった。この目標を達成するために、3つの研究テーマを遂行したが、そのうちの A に関しては大枠において達成できたと考えている。B に関しては、未だ爬虫類脳に完全な哺乳類型の層構造の構築には至っていないが、層構造を形成する上での基盤となる細胞の形態変化を誘導することに成功した。特に、A、B のテーマに共通して、哺乳類独自の発生プロセスの変更箇所を同定できたことは大きな成果であったと考えている。一方 C に関しては未だ研究の途上であるが、爬虫類をモデル実験動物として確立するために重要なテーマであることから、今後方法論的な改善とともに、繁殖動物数の大幅なスケールアップも必要であると考えている。

さきがけの期間中に上記の研究計画を遂行するにあたり、2名の研究補助者を雇用し、実質3名の研究体制で研究を行った。研究代表者の所属する講座(医学部教養部)の特性上、

学部生や大学院生の参画がほとんど期待できないため、大学業務と並行して研究計画を遂行するために上記2名の研究補助者には多大な貢献をして頂いた。3年半の研究実施期間において、研究費はすべて研究遂行に不可欠な備品(培養装置、電気穿孔装置、超低温フリーザー等)、消耗品、旅費、そして研究補助者への給与として使用し、適切に執行された。

3年半のさきがけ研究の期間中に、本研究テーマに関連した3本の原著論文、3本の英文総説、2本の和文総説(すべて筆頭および責任著者)を発表し、そのうち2本の原著論文に関しては JST と共同でプレスリリースを行い研究成果の社会に向けた発信を行った。その波及効果として、NHK スペシャル「生命大躍進・第3週・ついに知性が生まれた」の企画アドバイザーの依頼(2015 年夏放映)、さらに 2016 年にシュプリンガーから刊行予定である英文書籍「Brain Evolution by Design」のエディター依頼を受けている。また、さきがけ期間中に様々な国際学会シンポジウムのオーガナイザー、ヨーロッパやアジアでの国際学会や国内研究会での招待講演、新たに申請する脳進化関連の新学術の計画班としての参画、Neuroscience Research のゲストエディター、サイエンスカフェの講師など、さきがけ研究に関連した脳進化の研究成果を広く学会や社会に向けて発信できる機会を得た。現在遂行中の研究成果を論文として公表する際はこれまでと同様に積極的なプレスリリースを計画しており、社会への研究成果の還元を図るとともに、脳進化研究を積極的に推進する若手研究者の育成を目指す。

## (2) 研究総括評価

哺乳類と爬虫類の大脳皮質を構成する神経細胞の時間的・空間的な発生機構を比較し、さらに神経細胞の形態や配置を改変することにより、哺乳類型大脳皮質のフェノコピーを創出する研究で、独自に開発した爬虫類胚の個体遺伝子操作技術と、試験管内での大脳皮質再構築系を組み合わせ、哺乳類と爬虫類の神経細胞の移動様式の比較解析から、Wntシグナルの制御機構の変化が脳構造の進化を引き起こしている可能性を明らかにした点を、大いに評価します。

今後は、この仮説を実験的に検証していき、哺乳類の大脳皮質の6層構造が、進化の過程で独自に獲得され、産み出される発生進化的機構を解明して頂きたい。

多くの招待講演や第38回日本神経学会大会でこの新しい領域のシンポジウムオーガナイザーを務めるなど、オピニオンリーダーとして、活躍している。

## 5. 主な研究成果リスト

### (1) 論文(原著論文)発表

1. T. Nomura, C. Ohtaka-Maruyama, W. Yamashita, Y. Wakamatsu, Y. Murakami, F. Calegari, K. Suzuki, H. Gotoh, K. Ono. The evolution of basal progenitors in the developing non-mammalian brain. Development in press.
2. T. Nomura, W. Yamashita, H. Gotoh, K. Ono. Genetic manipulation of reptilian embryos: toward an understanding of cortical development and evolution. Frontiers in Neuroscience 2015, 9, 45, 1-11.
3. T. Nomura, Y. Murakami, H. Gotoh, K. Ono. Reconstruction of ancestral brains: exploring the evolutionary process of encephalization in amniotes. Neuroscience Research 2014, 86, 25-36.

4. T. Nomura, H. Gotoh, K. Ono. Changes in the regulation of cortical neurogenesis contribute to encephalization during amniote brain evolution. *Nature Communications* 2013, 4, 2206.

5. T. Nomura, M. Kawaguchi, K. Ono, Y. Murakami. Reptiles; a new model for brain evo-devo research. *Journal of Experimental Zoology partB, Molecular and Developmental Evolution* 2013, 320, 52-73.

(2)特許出願

研究期間累積件数:0件

(3)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

【国際学会(海外)招待講演】

“Changes in progenitor dynamics during amniote brain evolution” 7<sup>TH</sup> Conference of Developmental Neurobiologists in Korea, Dec 18-19<sup>th</sup> 2015.

“Regulation of neural stem cells and brain evolution in amniotes” GSCN Satellite symposium, Neural Stem Cells in Evolution, Dresden July 8<sup>th</sup>, 2014.

【シンポジウムオーガナイザー】

第 38 回日本神経科学学会大会シンポジウム「脳の構造と機能の創出原理:細胞間相互作用から個体間相互作用・環境ストレスまで」2015年7月28日 神戸

Neuro2013 シンポジウム”Evolution of the mammalian cerebral cortex-new research strategies” 2015年6月20日 京都

Neuro2013 サテライトシンポジウム”Molecular and Cellular Mechanisms of Brain Development and Evolution” 2013年6月19日 京都

【国際シンポジウム・セミナー口頭発表】

“Evo-devo approach to explore the origin of the neocortex” JST-JHU Symposium on systems and synthetic biology, Sep 23 2015, Johns Hopkins University, Baltimore, USA.

“Conserved and derived mechanisms of cortical neurogenesis during amniote brain evolution” Neurogenesis 2013, Matsushima, Oct 16-18, 2013.

“Beef or Chicken? No, I need a Gecko!” 3<sup>rd</sup> German-Japan bilateral event on neural stem cells in mammalian neurogenesis. Miyagi, Oct 13-15, 2013.

“Changes in the regulation of neurogenesis contributed to parallel encephalisation during amniote evolution” CDB Symposium 2013, March 6, 2013, Kobe, Japan.

【国内学会・セミナー招待講演】

「羊膜類脳進化における神経幹・前駆細胞の動態の変化」異種間比較が解き明かす生命システムの普遍性と多様性 日本分子生物学会年会 2015年12月2日 神戸

「胚操作技術を用いた羊膜類大脳皮質進化過程の解明」細胞を創る研究会8.0 2015年11月13日 大阪大学

“Evolution of progenitor dynamics and transcriptional regulation in amniote brains” Symposium  
“Vertebrate Brains, Structure, Function and Evolution”, 48<sup>th</sup> Annual Meeting of Japanese Society  
of Developmental Biologists, Tsukuba, June 5, 2015.

「哺乳類型大脳皮質の進化をもたらした発生機構の解明」第1回発生発達基礎医学研究会 2014  
年11月28日 東北大学

「羊膜類胚操作による大脳皮質進化機構の解明」シンポジウム・終脳発生研究の進歩」第  
118回日本解剖学会総会 2013年3月28日 香川

【プレスリリース】

「ヒトの進化の記憶を鳥の脳から解き明かす～哺乳類大脳の進化過程の一端を明らかにする論  
文が掲載」2016年1月

「爬虫類の脳はスローペースで作られる～哺乳類脳の巨大化の進化起源に迫る～」2013年7月