

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 29 日現在

機関番号：34506

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2015

課題番号：25650118

研究課題名(和文) 後脳・脊髄と網膜に存在する新奇GnRH産生細胞群の生理機能

研究課題名(英文) Roles of novel GnRH neurons in the hindbrain, spinal cord, and retina

研究代表者

日下部 岳広 (KUSAKABE, Takehiro)

甲南大学・理工学部・教授

研究者番号：40280862

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)：ゴナドトロピン放出ホルモン(GnRH)は脊椎動物の生殖機能を調節する神経ペプチドである。ホヤと脊椎動物において脳から尾部にいたる中枢神経系全体で広くGnRH遺伝子が発現することを見出し、さらに網膜でもGnRH遺伝子を発現する細胞群をみいだした。これらの新奇なGnRH産生細胞の役割について調べた結果、GnRHが生殖活動の調節以外にも多様な生理機能をもつことが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Gonadotropin-releasing hormone (GnRH) is a neuroendocrine peptide that plays a central role in the control of vertebrate reproductive functions. Three major GnRH systems have been characterized in vertebrates: the conventional hypophysiotropic GnRH system and two extrahypothalamic GnRH systems. Whether hypophysiotropic or extrahypothalamic, most functions of the GnRH systems have been implicated in the control of reproductive activities. The tunicate *Ciona intestinalis* has in its non-reproductive larval stage a prominent GnRH system spanning the entire length of the nervous system. We have found evidence for localization of cells producing GnRH in the hindbrain, spinal cord, and retina of vertebrates, suggesting that GnRH also plays a non-reproductive role in vertebrates. Our results demonstrate that the GnRH system is deeply associated with the chordate-specific characteristics and suggest a non-reproductive role of GnRH both in tunicates and vertebrates.

研究分野：発生生物学 神経生物学

キーワード：GnRH メダカ ホヤ 中枢神経系 プラコード 網膜

1. 研究開始当初の背景

視床下部のニューロンが産生するゴナドトロピン放出ホルモン (GnRH) は、下垂体前葉からゴナドトロピンを放出させる神経ペプチドであり、脊椎動物の生殖機能の重要な調節因子である。GnRH はまた終神経や中脳のニューロンからも分泌され、神経修飾因子として脳の各所や嗅上皮などの活動の調節を行っていると考えられている。GnRH は細胞膜上の G タンパク質共役型受容体を介して細胞に作用する。

研究代表者は、ホヤ幼生において、GnRH 遺伝子が脊椎動物の後脳・脊髄の相同器官である運動神経節と神経索で、その受容体が筋肉細胞で発現していることを発見した。ホヤ幼生は生殖活動とは無関係な発達段階であり、遊泳運動や変態の制御などの生理機能が推測された。脊椎動物における同様の GnRH 機能の可能性を検証するために、メダカを用いて類似の現象を探ったところ、後脳・脊髄・網膜に GnRH を産生する細胞が存在する証拠を得た。

2. 研究の目的

GnRH は脊椎動物の生殖機能を調節する神経ペプチドである。研究代表者は、ホヤ幼生の神経系で広く GnRH 遺伝子が発現することを見出し、さらにメダカの後脳・脊髄および網膜で GnRH 遺伝子を発現する細胞群をみいだした。これらの組織ではこれまでどの脊椎動物においても GnRH 産生細胞は報告されていない。本研究は、研究代表者がみいだした新奇 GnRH 産生細胞の実体およびその生理機能を明らかにすることを目的とする。発生遺伝学、蛍光イメージング、光行動遺伝学などの手法を駆使して、後脳・脊髄・網膜に存在する新奇 GnRH 産生細胞の生理的役割を明らかにする。本研究により、生殖制御因子の枠をこえた GnRH の新しい役割が明らかになるであろう。

3. 研究の方法

(1) GnRH / GnRH 受容体を発現する神経細胞の同定

メダカ GnRH2 遺伝子の転写制御領域を同定し、3種類の蛍光レポーター (GFP、mCherry、Kaede) を連結した DNA コンストラクトを作製し、これらのうち、GFP と Kaede については、ゲノムに安定的に組込まれたトランスジェニック系統を作製した。これらのトランスジェニック個体を用い、様々な細胞特異的マーカー (遺伝子プロンプ、プロモーター制御下でのレポーター発現、特異的抗体) と 2重染色を行うことで、後脳・脊髄、網膜において GnRH2 を発現する細胞を同定する。受容体についても同様の解析を行う。GnRH および GnRH 受容体特異的プロンプを用いた *in situ* ハイブリダイゼーションにより、内在性転写産物の発現を確認する。GnRH や GnRH 受容体に対する特異的抗体 (抗 GnRH については既

存のものが利用できる) を用いた免疫染色によりペプチドおよびタンパク質レベルの局在を解析する。

(2) 個体レベルの遺伝子機能操作による GnRH および GnRH 受容体の機能解析

アンチセンス・モルフォリノオリゴヌクレオチド (MO) を卵に顕微注入することによって、標的遺伝子の特異的な機能阻害 (ノックダウン) を行う。GnRH 前駆体および GnRH 受容体に対するアンチセンス MO を卵に顕微注入することにより、GnRH や GnRH 受容体のノックダウンが神経系や筋肉の機能や組織形態などに及ぼす影響を調べる。また、適当なプロモーターを用いて、GnRH または GnRH 受容体を異所的、異時的、または過剰に発現させ、同様にして表現型の解析を行う。

アンチセンス MO は、稚魚後期から成魚における機能阻害実験には適用が難しく、安定的、永続的に機能阻害する方法 (トランスジェニック、変異体作製等) が必要と考えられる。近年開発された個体レベルで特定のゲノム配列を標的として欠失や挿入などの改変を施すことができる TALEN 法や CRISPR/Cas9 法などのゲノム編集技術を用いて、GnRH や GnRH 受容体の機能喪失変異個体を作製し、表現型を解析する。また、いかにして特定の部位のみで GnRH や受容体の機能を阻害するかという点も重要である。この問題への対処として、ゲノム編集技術により、シス転写制御領域を破壊し、発生段階特異的・部位特異的に GnRH や GnRH 受容体の発現が失われた個体を作製し、表現型を解析する。

(3) GnRH / GnRH 受容体発現ニューロンの生理機能解析

光制御型チャネル/ポンプ (チャネルロドプシン ChR2、ハロロドプシン NpHR など) を GnRH 遺伝子調節領域の制御下でニューロンに発現させ、適当な波長の光照射により光依存的にニューロンの活動を制御することにより、遊泳行動や運動における GnRH 発現ニューロンの生理機能を解析する。

ニューロンの活動を可視化する方法としてカルシウムイメージングを行う。具体的には、蛍光カルシウムセンサータンパク質 G-CaMP を用いて細胞の活動をリアルタイムで可視化し、GnRH を発現する神経細胞の生理機能を解析する。

4. 研究成果

in situ ハイブリダイゼーションにより、GnRH2 の内在性転写産物の空間的分布様式を解析したが、間脳における既知の細胞集団以外における発現は検出できなかった。また、GnRH2 に対する特異的抗体を用いた免疫染色によっても、明瞭なシグナルを得ることができなかった。一方、RT-PCR では GnRH2 の転写産物は中脳、後脳、脊髄で検出され、GnRH 受容体の発現も中脳、後脳、脊髄に加え、骨格筋や眼でも検出された。GnRH2 の発現量は、*in situ* ハイブリダイゼーションや免疫染色

で検出するには少ないか、あるいは発現時期が限定されているなどの可能性が考えられた。そこで、メダカ GnRH2 遺伝子の転写制御領域を蛍光レポーターに連結した DNA を組み込んだトランスジェニック個体を用い、細胞特異的マーカーと 2 重染色を行うことで、GnRH2 を発現する細胞の同定を試みた。網膜については、組織構造や機能に対する GnRH の作用を明らかにするための基本データを得ることを目的として、網膜を構成する各細胞型特異的なマーカーの単離および、これらを発現するトランスジェニック個体の作製を並行して行い、細胞種特異的に蛍光標識された個体を得た。

網膜において GnRH2 遺伝子の転写制御領域の制御下においた蛍光レポーターの発現は、視細胞層よりも内側に位置する細胞層で検出された。さらに、上記トランスジェニック個体を用い、二光子励起レーザー顕微鏡を用いてレポーターを発現する細胞の解析を行った。その結果、中枢神経系深部および網膜における GnRH2 産生細胞および神経軸索の分布を明らかにすることができた。

個体レベルの GnRH の機能解析実験として、機能阻害実験と強制発現実験を行った。メダカ GnRH2 前駆体に対するアンチセンス MO をメダカ卵に顕微注入することにより、胚における一過的機能阻害を試みた。アンチセンス MO の注入により、中枢神経系や眼の発達異常がみられた。一方、MO の標的配列に変異を導入した GnRH2 mRNA を共注入したところ、発生異常が軽減され、特異的な効果であることが示唆された。また、GnRH2 mRNA の注入により GnRH2 を過剰発現させた個体において、発生初期の神経細胞を染色する CD57 を用いた免疫染色を行ったところ、陽性の細胞がより多く観察され、GnRH2 の過剰発現により、神経細胞の分化が異所的に促進された可能性が考えられた。

GnRH2 を発現する神経細胞の生理機能を解析する手段として、蛍光カルシウムセンサータンパク質 G-CaMP を用いて細胞の活動をリアルタイムで可視化することを検討した。予備実験として、ホヤ幼生の神経活動を G-CaMP により可視化することに成功した。

アンチセンス MO の効果は一過的であるため、永続的に機能阻害する方法として、近年開発された CRISPR-Cas9 法を用いた遺伝子破壊(ノックアウト)個体の作製を行った。GnRH 2 遺伝子中の GnRH ペプチドをコードする領域を標的としてガイド RNA を設計し、Cas9ヌクレアーゼ mRNA とともに、メダカ受精卵に顕微注入法により導入し、GnRH 2 欠損個体の作製を試みた。その結果、F0 個体において、高頻度で GnRH 2 コード配列に欠失変異をもつ個体を得ることができた。さらに、ゲノム編集を施した F0 個体を野生型個体とかけあわせて、GnRH2 欠損変異をヘテロにもつ F1 個体の作製に成功した。さらに、GnRH2 欠損変異をヘテロ接合でもつ個体どうしのかけあ

わせによって、変異をホモ接合にもつ F2 個体を得た。F2 ホモ個体を F2 ヘテロ個体とかけあわせ、F3 のホモ個体とヘテロ個体を得た。GnRH2 欠損個体は、形態的には正常であり、生殖能力においても大きな差異は認められなかった。また性比も大きな偏りはみられなかった。

系統発生的な知見を得ることを目的として、ホヤ幼生の GnRH 神経系の解析を行った。GnRH 投与や機能阻害実験により、GnRH がホヤ幼生において変態の制御に関わっていることを明らかにした。具体的には、カタユレイボヤに存在する 6 つの GnRH ペプチドのうち 2 つ (tGnRH-3, tGnRH-5) が、変態過程の尾部の吸収を促進するとともに、細胞周期の進行を停止させることにより成体器官の成長を抑制することが明らかになった。

幼生の脳の前背側の将来口になる部位付近に存在する GnRH ニューロンが、嗅覚の感覚細胞と類似することを明らかにし、さらにこの細胞が、発生的に頭部プラコードとよく似た性質をもつことを明らかにした。感覚器をはじめ頭部の重要な構造をつくる頭部プラコードが獲得されたことが、脊椎動物の初期進化において重要であると考えられてきたが、その起源がホヤと脊椎動物の共通祖先にまでさかのぼることを示した。

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)

島井光太郎, 日下部岳広 (2016) 太古に遡る嗅覚と生殖のつながり -ホヤを使った研究から- . *AROMA RESEARCH* 査読無, 第 17 巻 第 1 号 (通巻 65 号), pp. 42-44.

Philip Barron Abitua, T. Blair Gainous, Angela N. Kaczmarczyk, Christopher J. Winchell, Clare Hudson, Kaori Kamata, Masashi Nakagawa, Motoyuki Tsuda, Takehiro G. Kusakabe, and Michael Levine (2015) The pre-vertebrate origins of neurogenic placodes. *Nature* 査読有, Vol. 524, No. 7566, pp. 462-465, DOI:10.1038/nature14657

Yutaka Daido, Sakurako Hamanishi, and Takehiro G. Kusakabe (2014) Transcriptional co-regulation of evolutionarily conserved microRNA/cone opsin gene pairs: implications for photoreceptor subtype specification. *Developmental Biology* 査読有, Vol. 392, No. 1, pp. 117-129, DOI:10.1016/j.ydbio.2014.04.021

Chisato Kamiya, Naoyuki Ohta, Yosuke Ogura, Keita Yoshida, Takeo Horie, Takehiro G. Kusakabe, Honoo Satake, and Yasunori Sasakura (2014) Non-reproductive role of gonadotropin-releasing hormone in the control of ascidian metamorphosis.

Developmental Dynamics 査読有, vol. 243, No. 12, pp. 1524-1535, DOI:10.1002/dvdy.24176

〔学会発表〕(計 9 件)

細川恵梨華: オプシンがメダカ視細胞の形態多様性に及ぼす影響の解析. 第 37 回日本分子生物学会年会、2014 年 11 月 27 日、パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)

細川恵梨華: メダカ視細胞の形態多様性を生み出す要因の検討. 日本動物学会第 85 回大会、2014 年 9 月 13 日、東北大学川内キャンパス (宮城県仙台市)

Také Kusakabe: *Ciona* and medaka as model organisms for studying neural development and function. Seminar at Department of Molecular & Cell Biology, University of California, Berkeley, 2014 年 8 月 7 日、パークレー (米国カリフォルニア州)

Takeo Horie: Structural and physiological analysis for a central pattern generator controlling swimming locomotion of the ascidian larva. 第 91 回日本生理学会大会シンポジウム「無脊椎動物から哺乳類へとつながる運動制御の神経回路 -Central Pattern Generator 研究の最前線-」、2014 年 3 月 17 日、鹿児島大学郡元キャンパス (鹿児島県鹿児島市)

Také Kusakabe: Development and function of the sensory and motor systems in the simple chordate *Ciona intestinalis*. OIST Winter Course “Evolution of Complex Systems”、2013 年 12 月 3 日、沖縄科学技術大学院大学シーサイドハウス (沖縄県恩納村)

大道裕: 錐体オプシン遺伝子と共発現するマイクロ RNA の役割. 日本動物学会第 84 回大会、2013 年 9 月 27 日、岡山大学津島キャンパス (岡山県岡山市)

Yutaka Daido: Cone subtype-specific microRNAs as putative regulators for photoreceptor subtypes: evidence from primary transcripts localization and target prediction in medaka. 第 19 回小型魚類研究会、2013 年 9 月 20-21 日、仙台 AER ビル 5 階 仙台市情報・産業プラザ (宮城県仙台市)

Takehiro G. Kusakabe: Functional and structural evidence for a central pattern generator controlling swimming locomotion of the *Ciona intestinalis* larva. 7th International Tunicate Meeting、2013 年 7 月 25 日、Naples, Italy.

Yutaka Daido: Shared *cis*-regulatory modules regulate transcription of evolutionarily conserved and bidirectionally transcribed miRNA-opsin gene pairs in the medaka retina. 17th International Congress of Developmental Biology、2013 年 6 月 16-17 日、Cancún,

Mexico

〔その他〕

新聞報道等 (雑誌論文 に関する報道)

2015 年 8 月 20 日 (木), 東京 FM / JFN 38 局ネットワーク「中西哲生のクロノス」
"SUZUKI BREAKFAST NEWS" 8:00~

2015 年 8 月 15 日 (土), 日本経済新聞

2015 年 8 月 13 日 (木), 朝日新聞 (東京本社版) 夕刊

2015 年 8 月 11 日 (火), 朝日新聞 (大阪本社版) 朝刊

2015 年 8 月 11 日 (火), 神戸新聞 朝刊

2015 年 8 月 11 日 (火), 産経新聞 朝刊

2015 年 8 月 11 日 (火), 北日本新聞

6. 研究組織

(1) 研究代表者

日下部 岳広 (KUSAKABE, Takehiro)

甲南大学・理工学部・教授

研究者番号: 40280862

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

久原 篤 (KUHARA, Atsushi)

甲南大学・理工学部・准教授

研究者番号: 00402412