

平成 30 年 6 月 14 日現在

機関番号：32606

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07148

研究課題名(和文) 光刺激依存的に発現する神経ペプチドを介して視覚中枢の神経回路を精緻化する機構

研究課題名(英文) Visual neural activity regulates functional restoration of the photorecognition via neuropeptides during planarian brain regeneration

研究代表者

井上 武 (Inoue, Takeshi)

学習院大学・理学部・助教

研究者番号：40391867

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：脳は、感覚器官からの情報を処理しているが、外界からの刺激が、脳の形成にどのように影響しているか、またその分子機構の大部分は不明である。本研究では、感覚刺激によって機能的な脳を形成する分子機構について、プラナリアの脳再生をモデルとして解明することを目的とした。その結果、新規の神経ペプチドが、光刺激依存的に発現誘導される機構と、神経ペプチドが機能的な視覚中枢の形成に関わる機構を明らかにした。また、プラナリアが効率的で適応的な光応答行動を達成する仕組みを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：A variety of external signals interpreted into defined neural functions play important role in the refinement of the neural function. Much remains to be understood how external signals contribute to the formation of the efficient neural system that supporting the transformation of the appropriate behavioral response against the complicated stimulus. Planarians display behaviors responsive to signals coming from outside such as light avoidance behavior, and the nervous system can be regenerated and its function completely restored even after decapitated, since the extraordinary regenerative capacity of planarians. We analyzed the molecular mechanisms of behavioral recovery during brain regeneration using RNAi and a behavioral assay in the planarian. Here we show that the novel neuropeptides contribute to the restitution of the proper phototactic behavior by modulating the photo-recognition during brain regeneration.

研究分野：行動生理学、神経再生生物学、比較神経行動学

キーワード：活動依存的 神経ペプチド 脳再生 機能回復 環境応答行動 光応答行動 プラナリア 螺旋動物

## 1. 研究開始当初の背景

脳は高度な情報処理能力を持つが、その基盤となる複雑な神経回路は、遺伝的な情報をもとに形成されると考えられてきた。しかし近年、幼若期に外界からの刺激入力を受けることが神経回路の精緻化に必要であることや、脳が損傷すると、外界からの刺激入力を元に脳内では、脳機能を補償するように神経回路の再編成が誘導されることが報告されている (Sur & Rubenstein, *Science*, 310, 805-810, 2005; Lu *et al*, *Cell*, 150, 1254-1273, 2012)。これらの結果は、外界からの刺激入力、機能的に適応した脳の形成や再編成に重要な働きをしていることを示唆しているが、その機構の大部分は未解明であった。

プラナリアは、記憶・学習といった現象が知られていた上に、近年、脳の細胞および分子レベルでの解析が進化したため、脳の基本原理を理解する新規のモデル動物としても着目されている。そこで、外界からの刺激が脳の形成に影響しているかを調べるために、プラナリアを複数に切断した後、2 グループに分けて異なる環境下 (通常条件と光遮断) で脳を再生させる実験を行った。その結果、光遮断されたグループは、正常に光応答行動 (光忌避反応) を回復できなかったのに対して、光刺激があるグループでは、正常に行動を回復できることを発見した。

また、プラナリアの頭部再生過程において、視神経および脳の形態的な再生と機能的な再生には時間的ギャップがあることを報告者らは以前に報告していた (Inoue *et al*, *Zoolog Sci*, 2004)。つまり、視神経および脳の形態的な再生は再生 4 日目までに完了するが、光応答行動は再生 5 日目にならない。申請時において、脳の視覚中枢の神経細胞で発現し、しかも再生 5 日目で発現誘導させる遺伝子として、新規神経ペプチド遺伝子 (1020HH) の同定に成功していた。

これらの結果から、1020HH 神経ペプチドは眼から入力された光刺激によって脳の視覚中枢で発現誘導され、神経回路を精緻化することで、正常な光応答行動を獲得しているという仮説をたてた。しかし、1020HH の転写誘導機構や、1020HH 神経ペプチドが、どのように光応答行動の機能獲得に関与しているかについては分かっていなかった。

## 2. 研究の目的

本研究では、感覚刺激によって機能的な脳を形成する分子機構について、プラナリアの脳再生をモデルとして明らかにすることを目的とした。具体的には、報告者が発見した新規の神経ペプチドが、光刺激依存的に発現誘導される機構と、神経ペプチドが機能的な視覚中枢の形成に関わる機構を解明することを目指した。

## 3. 研究の方法

光応答行動における行動解析によって

様々な行動特性を定量化し、その値を変数として用いたコンピュータシミュレーションによって、それぞれの変数の役割を解析した。また、RNAi 法による遺伝子機能阻害個体を用いて行動解析を行うことで、シミュレーション解析の結果の確認を行った。また、再生過程における神経回路の変化を顕微鏡を用いてイメージング解析をおこなった。

## 4. 研究成果

### (1) GABA 作動性神経細胞が光認識している

まず、視神経から入力された信号が脳のどの神経細胞種で演算されているかを探った。その結果、光認識には、脳の視覚中枢にある GABA 神経細胞が中心的な機能をしていることがわかった。これは、プラナリアは光の入射角によって左右の眼における入力値が変動し、その際の左右の入力値の差 (引き算) を認識しているが、GABA 作動性神経回路が 2 つの眼の光の入力差を演算しているということであった。

### (2) 1020HH 神経ペプチド遺伝子の機能解析

プラナリアの光応答行動を定量化するために、光応答行動中の進行方向をベクトル化する定量解析法 (Orientation Assay with One Light Source; OA1L) を開発し、その解析を行った。その結果、正常個体では、視神経や脳の再生が完了している再生 4 日目では光と反対方向に有意に向かっているが (約 55%)、ベクトルが散漫になっており、弱い光応答行動が観察された。それに対して、再生 5 日目ではベクトルの約 70% が、光と反対方向を向いており、強い光応答行動が回復されたことが定量的に示された。この結果から、再生 4 日目でも光認識ができていても関わらず、正常の光応答行動がとれていないが、再生 5 日目になって正常な光応答行動が回復していることが分かった。

そこで、1020HH 神経ペプチドが、光応答行動における光方向の認識に関わるかどうかをしらべるために、RNAi 法を用いて 1020HH 遺伝子の機能阻害をおこない、その機能阻害されたプラナリアを用いて再び光応答行動の解析をおこなった。その結果、1020HH (RNAi) プラナリアは、再生 5 日目以降でも、ベクトルの約 55-60% しか光と反対方法になく、この値は再生 4 日目と同等であった。

これらの結果をまとめると、再生 4 日目から 5 日目に観察される光応答行動の機能回復は、光源方向を正確に認識できるようになる過程であり、その光源方向の正確な認識に 1020HH 神経ペプチドが必要であることが示唆された。

### (3) 光応答行動の効率を決定する機構

これまでの結果から、1020HH 神経ペプチドが、光源方向の正確な認識に関わることを示唆されたものの、そもそもプラナリアがどのように光源方向を認識しているかが分かっ

ていないことが課題として挙げた。

そこで、正常個体がどのように光源方向を認識しているかについて解析をおこなった。

まず、眼の構造について詳細に解析したところ、プラナリアの眼は正中軸に対して前方に約 20 度傾いている、つまり、約 40 度の両眼視野をもつことが分かった。次に、この両眼視野が光源方向の認識に関係するかをコンピュータシミュレーションによって調べた。その結果、両眼視野の角度によって左右差を認識可能な光の入射方向が変動し、光応答行動の精確性と効率に影響すること、且つ最適値が 40 度であることを明らかにした。

しかし同時に、両眼視野の形成に伴い前方に約 30 度(左右に $\pm 15$ 度)の左右差を区別できない範囲(前方死角)を生じてしまうことも発見した。その際、自律的首振り運動を定量したところ、首振り角度の平均値が 0 度、標準偏差が約 $\pm 20$ 度の正規分布に従うことを見いだした。この結果から、確率密度関数での計算が可能となり、自律的首振り運動のうち約 45%は 30 度の前方死角を超えた角度で首を振るため、2~3 回の首振り運動(1.5 秒以内)で眼の入力値に左右差を生じさせることが可能となる。すなわち、プラナリアは眼の左右差の認識機構に加えて、自律的首振り運動による左右非対称性の創出が眼の形態的特徴に伴う前方死角を補完することで、精確で効率的な光方向の認識と移動を達成していることを突き止めた。

霊長類では立体視のためにある両眼視野は、プラナリアでは左右の区別がつかない、つまり見えない範囲として存在し、この見えない両眼視野をもつことによって、光源方向を的確に認識し、最も効率良く光源方向から遠ざかることを可能にしていたことが判明した。

#### (4) 眼の入力値の左右差の閾値

眼から入力された光刺激の左右差を演算することで、光源方向を認識することが明らかとなったが、左右差の値によって体の方向を徐々に変えるのではなく、二値的に方向転換する観察結果を得た。そこで、様々な光の入射方向と体の反転角度を測定したところ、前方を 0 度とした時の -130 度~130 度の範囲で光が照射されるとプラナリアは体を反転させていることが分かった。この光の入射角より、眼の左右差の値を導き出したところ、最大入射光量を 1.0 としたときの 0.5 の差があるときに、プラナリアは体を反転させる反応が引き起こされることが明らかとなった。さらに、これを確認するために、コンピュータシミュレーションによって、反応閾値を変数として解析した。その結果、実測値と同様に、左右差が 0.5 以上の差があるときに体の反応が起こることが確認された。

ここで、反応閾値が 0.5 よりも高い場合における光応答行動をシミュレーションしたところ、再生 4 日目における光応答行動の様

子や 1020HH(RNAi) 個体における光応答行動の様子と極めて類似した進行方向のベクトルパターンを示すことに気付いた。

#### (5) NMDA 受容体を介して 1020HH 遺伝子は発現誘導される

1020HH 遺伝子の発現制御がどのようなメカニズムになっているかを詳細に解析するために、1020HH を発現している細胞が共発現している遺伝子群の解析を Single-cell PCR 法によって行った。脳の神経細胞を分散し、FACS (fluorescence-activated cell sorting) によって単一細胞ごとに回収した後、RNA を抽出して RT-PCR を行った。神経伝達物質の受容体遺伝子に着目して解析した結果、1020HH 発現細胞はグルタミン酸受容体を優勢的に発現していた。さらに、AMPA (alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionic acid) 型受容体と NMDA 型受容体を比較した場合、AMPA 型受容体の発現は検出されず、NMDA (N-methyl-D-aspartic acid) 型受容体が有意に多く発現していた。そこで、1020HH 遺伝子が、NMDA 型の受容体の活性化を介して発現誘導されているかを解析するために、NMDA を用いて神経細胞を刺激して神経細胞を活性化させる状態かつ視神経からの光刺激を排除するために暗黒下でプラナリアを再生させた。その結果、再生 4 日目で、1020HH 遺伝子の発現量が上昇し、さらに再生 5 日目ではさらに発現量が上昇し、NMDA 型受容体依存的なシグナルが両遺伝子の発現に重要な働きをしていることが示唆された。

以上の結果から、プラナリアの視神経は再生 4 日までに脳に投射することで光刺激を受容できるようになり、脳の投射先の神経細胞の NMDA 型グルタミン酸受容体を介して活性化させ、1020HH 遺伝子を発現誘導される。その後、両遺伝子産物は神経ペプチドとして分泌されることで、視神経の再編成をおこなうことで正常な負の走光性を回復できるようになると推察された。

#### (6) 1020HH 神経細胞と GABA 神経細胞の相互作用

1020HH 発現神経細胞と GABA 神経細胞を抗体染色によってラベルし、in vivo における相互作用を観察した。その結果、1020HH 神経ペプチドが、GABA 神経細胞に逆行性に取り込まれていることを突き止めた。これは、プラナリアの神経細胞の初代培養系を用いた in vitro の解析によっても確認した。これらの結果から、1020HH 神経ペプチドが、GABA 神経回路の精緻化に寄与することで視覚機能の回復に重要な働きをしている可能性が示唆された。加えて、1020HH(RNAi) における GABA 神経回路の観察をおこなったところ、GABA 神経突起の数や形態に異常がみられた。この結果から、1020HH 神経ペプチドによって、GABA 神経回路が精緻化されているということが示唆された。

(7) GABA 神経回路の精緻化は光応答行動の何を規定するのか？

GABA 神経回路の精緻化度合いを変える目的で、様々な量の 2 本鎖 RNA を用いて RNAi の効果が異なるプラナリアを作成のうえ、行動解析をおこなった。行動解析後に 1020HH 神経ペプチド量を測定し、また、GABA 神経回路を解析し、行動との対応をつけた。これらを用いて費用関数を算出したところ、1020HH 神経ペプチド量および GABA 神経回路の精緻化度合いと反応閾値の間に相関が認められた。この結果は、1020HH 神経ペプチドによって GABA 神経回路が精緻化させることで、光応答行動の反応閾値が決定されていることが示唆された。

以上をまとめると、本研究では、以下のことが明らかとなった。(i) プラナリアは、光方向の入射角によって変動する眼の左右差を演算することで光の方向を認識している。その左右差は、脳の視覚中枢の GABA 作動性神経回路によって演算されている。(ii) プラナリアは約 40 度の両眼視野をもち、その角度によって光応答行動における光から遠ざかる効率が変化する。また、約 40 度の両眼視野は効率的な光応答行動に最適な角度である。(iii) 眼の入力差から体を反応させるには、反応閾値があり、反応閾値によって光応答行動の効率が変化する。(iv) 1020HH 神経ペプチドは GABA 作動性神経回路の精緻化に必要である。(v) 1020HH 神経ペプチドは光刺激によって NMADA 受容体を活性化して発現誘導される。(vi) GABA 神経回路の精緻化によって反応閾値が決められる。

本課題研究によって、脳の形成過程で環境刺激を利用して環境適応的に正確な光方向を認識する機構や構造を獲得するメカニズムを明らかにすることが出来た。

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 7 件)

An, Y., Kawaguchi, A., Zhao, C., Toyoda, A., Sharifi-Zarchi, A., Ahmad Mousavi, S., Bagherzadeh, R., Inoue, T., Ogino, H., Fujiyama, A., Chitsaz, H. and Agata, K. (2018). "The draft genome of *Dugesia japonica* provides insights into conserved regulatory elements of the brain restriction gene *nou-darake* in planarians." *Zoological Lett*, *in press*.

査読有

Inoue, T. (2017). Functional Specification of a Primitive Bilaterian Brain in Planarians. "Brain Evolution by Design." Ed. by S. Shigeno, Y. Murakami and T. Nomura.

Tokyo, Springer Japan: 79-100.

査読有

Shimoyama, S., Inoue, T., Kashima, M. and Agata, K. (2016). "Multiple neuropeptide-coding genes involved in planarian pharynx extension." *Zoolog Sci* 33(3): 311-319.

DOI: 10.2108/zs150170

査読有

Cross, S. D., Johnson, A. A., Gilles, B. J., Bachman, L. A., Inoue, T., Agata, K., Marmorstein, L. Y. and Marmorstein, A. D. (2015). "Control of maintenance and regeneration of planarian eyes by ovo." *Invest Ophthalmol Vis Sci* 56(12): 7604-7610.

DOI: 10.1167/iov.15-17458

査読有

Akiyama, Y., Agata, K. and Inoue, T. (2015). "Spontaneous behaviors and wall-curvature lead to apparent wall preference in planarian." *PLoS One* 10(11): e0142214.

DOI: 10.1371/journal.pone.0142214

査読有

Nishimura, O., Hosoda, K., Kawaguchi, E., Yazawa, S., Hayashi, T., Inoue, T., Umeson, Y. and Agata, K. (2015). "Unusually large number of mutations in asexually reproducing clonal planarian *Dugesia japonica*." *PLoS One* 10(11): e0143525.

DOI: 10.1371/journal.pone.0143525

査読有

Inoue, T., Hoshino, H., Yamashita, T., Shimoyama, S. and Agata, K. (2015). "Planarian shows decision-making behavior in response to multiple stimuli by integrative brain function." *Zoological Lett* 1(1): 7.

DOI: 10.1186/s40851-014-0010-z

査読有

[学会発表](計 6 件)

T. Inoue, "Close relationship between the eye architecture and the spontaneous self-motion establishes robust photo-response orientation behavior in planarians", The International Research Symposium on Germness and Pluripotency of the Planarians in comparison with the Fly and Mouse Systems, 2018/3/29, Hirosaki University, 50th Anniversary Auditorium

秋山義太郎、阿形清和、井上 武, "Binocular field and spontaneous self-motion specify efficient phototactic behavior in planarians", 日本比較生理生化学会第 39 会大会, 2017/11/25-26, 福岡大学七隈キャンパス

秋山義太郎、阿形清和、井上 武, "プラナリアは自発的運動によって偽壁嗜好性行動を示す", 日本動物学会第 88 回大会, 2017/9/21-23, 富山県民会館

秋山義太郎、阿形清和、井上 武, "プラナリアでは両眼視野と自発的運動が走光性行動の効率を決定する", 第 3 回ユニークな少数派実験動物を扱う若手が最先端アプローチを勉強する会, 2017/8/25-26, 岡崎カンファレンスセンター

T. Inoue, T. Takano, Y. Umesono, K. Agata, "External signals restore the brain function via novel neuropeptide up-regulation during brain regeneration", CompBiol2015 広島大会 第 40 回日本比較内分泌学会大会 日本比較生理生化学会第 37 回大会 合同大会, 2015/12/11-13, JMS アステールプラザ、広島市

井上 武, "プラナリアにおける温度走性を制御する脳機能", 日本動物学会第 86 回大会 第 5 回ホメオスタシスバイオロジシンポジウム「温度受容と環境適応のメカニズム」, 2015/9/17-19, 朱鷺メッセ

〔図書〕(計 1 件)

井上 武, "第 3 章 扁形動物と脳の再生" 遺伝子から解き明かす脳の不思議な世界, 村上安則, 野村真, 滋野修一編, 一色出版 (印刷中)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称 :  
発明者 :  
権利者 :  
種類 :  
番号 :  
出願年月日 :  
国内外の別 :

取得状況 (計 0 件)

名称 :  
発明者 :  
権利者 :  
種類 :  
番号 :  
取得年月日 :

国内外の別 :

〔その他〕  
ホームページ等  
[www.planarian.jp](http://www.planarian.jp)

6 . 研究組織

(1) 研究代表者  
井上 武 (INOUE, Takeshi)  
学習院大学・理学部・助教  
研究者番号 : 40391867

(2) 研究分担者  
( )

研究者番号 :

(3) 連携研究者  
( )

研究者番号 :

(4) 研究協力者  
( )