

令和 3 年 6 月 18 日現在

機関番号：27103

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06339

研究課題名(和文) 刺胞動物シナプスの形態と分子構築からシナプスの進化を探る

研究課題名(英文) Molecular characteristics of chemical synapses in the diffuse nervous system of Hydra

研究代表者

濱田 俊 (Hamada, Shun)

福岡女子大学・国際文理学部・教授

研究者番号：60282349

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：クラゲやヒドラ等の刺胞動物の神経系は、脊椎動物と共通の起源をもつ、最古の神経系であると考えられている。私達は、神経細胞の細胞間情報伝達の要所であるシナプスの起源と進化を考察するため、ヒドラを用いてシナプスにあると予想されるタンパク質の同定、局在と機能の解析を行った。また、ヒドラのシナプスの局在や機能を個体レベルで調べるためのツールとして、シナプス・タンパク質と蛍光タンパク質との融合タンパク質を発現するトランスジェニック(Tg)ヒドラを作製した。神経細胞のみでシナプス・タンパク質を発現させるための新たなプロモーターの取得とそれを用いたTgヒドラの作製も行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

刺胞動物の神経系は、脊椎動物と共通の起源をもつ神経系としては最古の神経系であると考えられている。刺胞動物の実験モデル生物、ヒドラを用い、シナプスに存在すると考えられる分子の同定・解析を行った。本研究で得られた情報は、シナプスがどのように誕生・進化したのかを考える上での重要となる。また、ヒドラのシナプスを研究するためのツールとして、シナプス・タンパク質と蛍光タンパク質との融合タンパク質を発現するトランスジェニック(Tg)ヒドラを複数作製した。ヒドラを用いてシナプス分子の研究を行う上で、重要な実験動物になると予想される。

研究成果の概要(英文)：The nervous system of cnidarians, such as jellyfishes and hydras, is thought to be the oldest nervous system, sharing a common origin with vertebrates. In order to examine the origin and evolution of synapses, which are the key points of intercellular communication in neurons, we identified proteins predicted to be present in synapses and analyzed their localization and function in hydras. We also generated transgenic (Tg) hydras expressing fusion proteins of synaptic proteins and fluorescent proteins as tools to study the localization and function of synapses in hydras. We also tried to determine a promoter DNA sequence for expressing synaptic proteins only in differentiated neurons, and used this promoter to create a Tg hydra.

研究分野：神経科学

キーワード：神経生物学 進化生物学 シナプス 刺胞動物 トランスジェニック動物

様式 C-19、F-19-1、Z-19(共通)

1. 研究開始当初の背景

刺胞動物の散在神経系は、神経節や神経突起束をもたないとされる。しかし、口の周囲などでは神経突起束もみられる。刺胞動物ヒドラの口の周囲には、神経環と呼ばれる神経突起束がある。これは系統発生的に最古の神経突起束の1つであると考えられ、私達は神経環の形成・機能に関わる分子の同定を行ってきた。その結果、神経環に強く発現する遺伝子として、シナプス小胞タンパク質であるシナプシンを同定した。

ヒドラ・シナプシンタンパク質の局在を検討したところ、神経環を含めた一部の神経細胞のみで強く発現することが明らかとなった。この結果は、一見一様にみえるヒドラの散在神経系でも、シナプスの分子構築は場所や神経細胞毎に異なることを示している。しかし、散在神経系のシナプス分子に関する実験的な研究はこれまでほとんど行われていなかった。

2. 研究の目的

シナプスがどのように誕生・進化したのかを探求することは神経生物学の重要な課題の1つである。刺胞動物のシナプスは、系統発生的に上位の動物のシナプスと比較すると、シナプス小胞の集積やシナプス膜の肥厚が不明瞭であることは知られていた。しかし、刺胞動物のシナプスが、系統発生的に新しい動物のシナプスと比較し、分子レベルでどのような違いがあるのかわかっていない。そこで本研究では、1)シナプシン以外の脊椎動物シナプス・タンパク質に対するヒドラ相同遺伝子(ヒドラ・シナプス分子候補)を同定すること、2)ヒドラ・シナプス分子候補がシナプスに局在するかどうかを明らかにすること、3)シナプス分子の発現を観察できる Tg ヒドラの開発、4)既に我々によりヒドラのシナプス・タンパク質の1つとして同定できているシナプシンについて、ヒドラのシナプスの形態や機能に果たす役割を明らかにすること、を目的とした。

3. 研究の方法

1)ヒドラ・シナプス分子候補の cDNA クローニング・発現解析

まず、げっ歯類の主要なシナプス・タンパク質(約 60 種類)との相同性検索、保存ドメイン検索を行い、オーソログと思われる cDNA 配列が同定できた 8 種類のタンパク質を最初の研究対象とした。ヒドラ (*Hydra vulgaris*)から逆転写 PCR 法により cDNA クローニングを行った。シナプス前終末側にあるタンパク質としてシナプトブレビン/VAMP3、シナプトブレビン/VAMP4、SV2、SNAP-25、SNAP-29、Munc-13、シナプス後部側タンパク質としては PSD-95、gephyrin を対象とし、cDNA を得た。5種類(SV2、SNAP-25、2 種類のシナプトブレビン、PSD-95)に関して、得られた cDNA を利用し、whole-mount in situ hybridization 法による発現解析を行った。

2)ヒドラ・シナプトブレビンおよび SNAP-25抗体の作成と発現解析

ヒドラ・シナプトブレビン/VAMP3 とヒドラ SNAP-25 については、合成ペプチドを抗原として抗体作成を行い、免疫染色により、タンパク質の局在を検討した。

3)ヒドラ single-cell RNA sequencing のデータを用いたシナプス分子候補の探索

2019年7月にヒドラの single-cell RNA sequencing (scRNAseq)の論文が発表され、そのデータが single cell portal (https://singlecell.broadinstitute.org/single_cell)で公開された。このデータを用いてヒドラの神経系で発現している主要なシナプス分子候補の探索と解析を行った。また、シナプトブレビン以外の、シナプス小胞開口分泌マーカー(Hydra synaptophlourin, HySynpH 下記参照)の構築に利用できるシナプス小胞タンパク質候補を探索した。

4) HySynpH 発現ベクター作製とその Tg ヒドラの作製

3)の情報に基づき、シナプス小胞タンパク質と予想される cDNA をクローニングした。この cDNA を利用し、pH 感受性 GFP を細胞外領域の末端部へ、また tdTomato あるいは mCherry を細胞内領域の末端部にもつ HySynpH を、アクチン・プロモーター下で発現させることができるベクターを作製した。HySynpH は、シナプス小胞の開口分泌が起こっていないときには tdTomato あるいは mCherry の蛍光のみを示す。開口分泌が起こると、それまで酸性だったシナプス小胞内の pH が上昇し、pH 感受性 GFP の蛍光を発する。HySynpH の発現ベクターを受精卵へマイクロ・インジェクションし、Tg ヒドラを作製した。

5) RFamide ペプチド受容体の Tg ヒドラの作製

ヒドラの主要な神経伝達物質に RFamide ペプチドがある。このペプチドは受容体である Hydra Na⁺ channel (HyNaC)のリガンドとして働き、HyNaC はシナプス後部に限局していることが予想される。そこで HyNaC の局在および動態を観察するために、HyNaC の必須サブユニットである HyNaC2 サブユニットと GFP との融合タンパク質を発現する Tg ヒドラを作成した。

6) チロシンリン酸化不能型シナプシンを発現する Tg ヒドラの作製

シナプシンはリン酸化によりその機能が調節されることが知られている。ヒドラ・シナプシンにも系統的に保存された予想チロシンリン酸化部位がある。この部位のリン酸化の役割を検討するため、このチロシン残基をフェニルアラニンに置換し、リン酸化を受けないシナプシン-GFP 融合タンパク質を神経細胞で発現する Tg ヒドラを作成した。

7) シナプシン Tg ヒドラの神経終末部分のシナプス小胞の観察

ヒドラの散在神経系では、外胚葉の足部神経細胞はシナプシンを発現していない。この神経細胞にシナプシンを異所性発現させたシナプシン Tg ヒドラでは、外胚葉の足部神経細胞の神経突起の瘤状構造 varicosity の数が変化することが私達によって示されている。本研究では、シナプシン Tg ヒドラと野生型ヒドラとで足部神経細胞の神経突起の形態を透過型電子顕微鏡を用いて比較した。

4. 研究成果

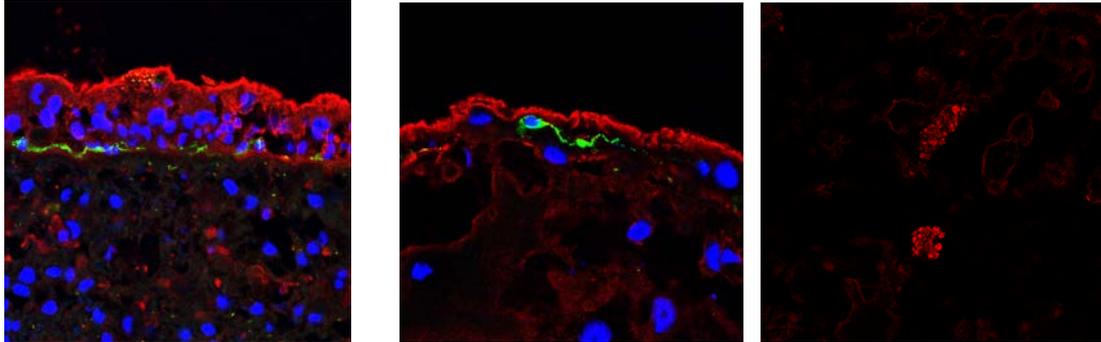
1) ヒドラ・シナプス分子候補の同定・局在解析

ヒドラを含め、刺胞動物ではヒドラ・シナプシン以外のシナプス分子は知られていない。本研究では、シナプシン以外のヒドラのシナプス分子を探すため、高等動物でシナプス分子であることがわかっているタンパク質の相同分子、ヒドラ・シナプス分子候補としてクローニングした。シナプス前部マーカーとしてシナプス小胞タンパク質であるシナプトブレビン/VAMP3, シナプトブレビン/VAMP4, SV2, SNARE 複合体関連タンパク質の SNAP-25, SNAP-29, Munc-13, シナプス後部分子としてシナプス足場タンパ

ク質の PSD-95 と gephyrin の推定相同分子をすべてクローニングした。

これらのうち 5 種類において whole-mount in situ hybridization 法による発現解析を行った。当初の予想とは異なり、5 種類すべてで神経細胞での遺伝子発現は認められなかった。その一方で、いずれの遺伝子も上皮細胞や腺細胞などの非神経細胞で発現していた。

シナプトブレビン/VAMP3、SNAP-25 に関しては抗体作成行い、免疫組織化学による局在検討を行った。



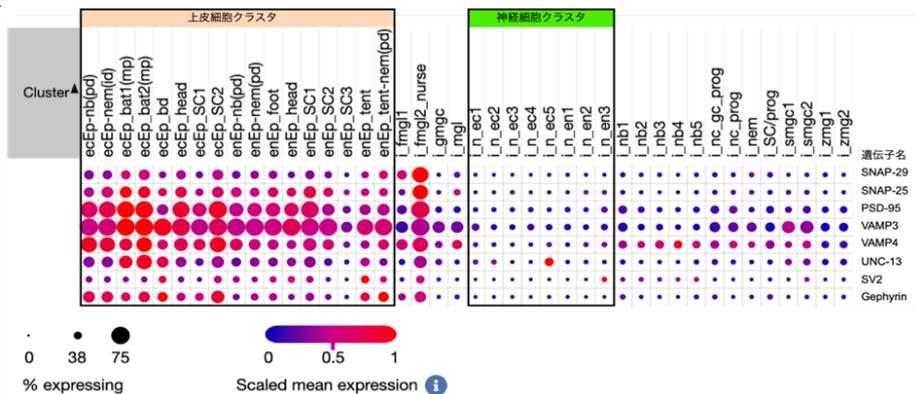
SNAP-25(赤)、RFamide(緑)

シナプトブレビン/VAMP3(赤)、RFamide(緑)

いずれの抗体でも、上皮細胞に強い免疫反応が検出され、神経細胞での発現は確認できなかった。SNAP-25 では上皮細胞の内部の小胞と思われる部分で強い免疫反応が検出された。シナプトブレビン抗体を用いた免疫組織化学では、内胚葉・顆粒細胞の中の分泌顆粒様構造体に免疫反応が検出された。

以上の検討で、当初ヒドラ・シナプス分子候補とした分子が神経細胞に発現しないことが明らかになった段階で、ヒドラ single-cell RNA sequencing のデータが公開された。このデータにおいても、本研究で発現解析を行ったヒドラ・シナプス分子候補はいずれも神経細胞における発現レベルが低いことがわかった(表1)。

表 1



2) シナプス分子の発現や挙動を観察できる Tg ヒドラの開発

私達は、公開されたヒドラ scRNAseq データを再解析し、229 個の遺伝子が神経細胞に強く発現することを見出した。これらの遺伝子に対して、さらにドメイン構造解析等を行い、ヒドラ・シナプス分子候補の cDNA クローニングを行った。この cDNA を利用し、HySynpH を発現させるベクターの構築と Tg ヒド

ラを作成を行った。しかし、神経細胞においてこの融合タンパク質を発現する Tg ヒドラを得ることができなかった。上皮細胞のみで HySynpH を発現する Tg ヒドラは得られることから、非上皮系の細胞(間細胞系列の細胞:神経細胞、刺胞細胞、腺細胞、生殖細胞)で広範に HySynpH を発現させると個体が生存できない可能性が考えられた。

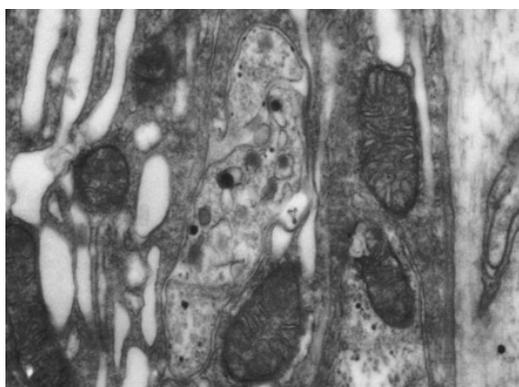
この可能性を少しでも減らすため、分化した神経細胞のみで HySynpH を発現させるためのプロモーター配列の取得を行った。分化した神経細胞でのみ強く発現が見られる遺伝子上流約 1.5kb のヒドラ・ゲノム DNA をクローニングし、その制御下で GFP を発現するベクターを作製し、Tg ヒドラの作成を行った。現在までに、神経細胞で GFP を発現する Tg ヒドラを複数ライン得ている。このプロモーターで安定的に分化した神経細胞のみで発現調節できれば、HySynpH Tg ヒドラ作製に利用する予定である。

また、シナプス後膜を可視化するため、ヒドラの主要な神経伝達物質である RFamide 神経ペプチドの受容体の局在を明らかにできる HyNaC2-GFP Tg ヒドラを作製した。今後、解析を進める。

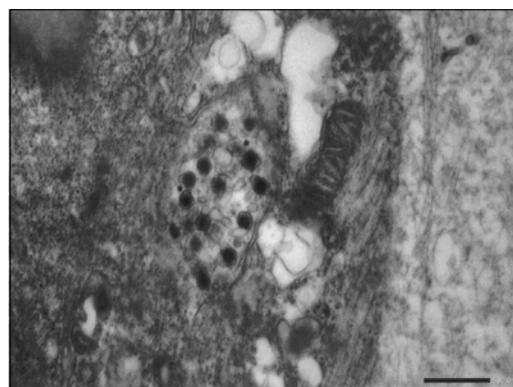
3) ヒドラ・シナプシンの機能解析

高等動物のシナプシンはシナプス小胞同士およびシナプス小胞とアクチン骨格との相互作用を高め、シナプス小胞をシナプス前終末に集合させる役割があると考えられている。また、シナプシンはリン酸化により、シナプス小胞の集合状態を制御する。脊椎動物のシナプシンは、チロシンリン酸化部位一か所を含む、9 ヶ所のリン酸化部位をもつ。ヒドラ・シナプシンでは、脊椎動物等と共通しているリン酸化部位は一か所で、チロシンリン酸化部位のみであった。そこで、このチロシン残基をフェニルアラニンに置換し、リン酸化を受けないシナプシンを発現する Tg ヒドラを作製した。現在までに、神経突起の走行に変化がみられるという予備的な結果を得ている。

また、シナプシン Tg ヒドラを用い、本来シナプシンを発現しない外胚葉の足部神経細胞にシナプシンを発現させた際の微細構造の変化を、透過型電子顕微鏡により検討した。神経突起の中で、シナプス小胞が集積しているように見える終末様領域を観察すると、Tg ヒドラではシナプス小胞の密度が増加する傾向が認められた。しかし、ヒドラの神経突起では active zone が明瞭ではないため、通常の電子顕微鏡標本で定量的な実験を行うことには限界があった。今後は、シナプス小胞マーカーとなる抗体の作製や、FIB-SEM などの新しい電顕技術を利用して、より定量的な解析を進めていきたいと考えている。



野生型ヒドラ終末様構造



シナプシン Tg ヒドラ終末様構造

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件(うち招待講演 0件/うち国際学会 3件)

1 . 発表者名 Minobe, S. et al. (11人中最後)
2 . 発表標題 A novel hydra neuropeptide, tentflectin, induces a rhythmic movement of tentacles.
3 . 学会等名 Internationa Workshop "At the roots of bilaterian complexity:insights from early emerging metazoans", Tutzing (国際学会)
4 . 発表年 2019年

1 . 発表者名 Kurumata-Shigeto, M., Hamaguchi-Hamada, K. et al. (7人中最後、発表者)
2 . 発表標題 Distribution and function of synapsin in the diffuse nervous system of Hydra.
3 . 学会等名 The 40th Annual Meeting of Japanese Society for Comparative Physiology and Biochemistry, Kobe, Japan (国際学会)
4 . 発表年 2018年

1 . 発表者名 David, C., Schneid, S. et al. (8人中6番目)
2 . 発表標題 Immunostaining for neuropeptides identifies the neural circuits controlling behavior in Hydra described by Dupre and Yuste
3 . 学会等名 Cnidofest 2018: The Cnidarian Model Systems, Meeting University of Florida, Whitney Laboratory for Marine Bioscience (国際学会)
4 . 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

研究者データベース | 福岡女子大学 地域連携センター
<http://www.fwu.ac.jp/teachersdatabase/detail/?masterid=74&gakkaid=203&gakubuid=20>
 福岡女子大学 生体制御学研究室 | 濱田研究室
<http://www.fwu.ac.jp/wp/hamada/>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	濱田 香世子 (Kayoko Hamaguchi-Hamada) (20448814)	福岡女子大学・国際文理学部・学術研究員 (27103)	
研究分担者	美濃部 純子 (Sumiko Minobe) (80190718)	福岡女子大学・国際文理学部・助手 (27103)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関		
ドイツ	クリスティアン・アルブレヒト 大学キール	ルートヴィヒ・マクシミリアン 大学ミュンヘン	