

令和元年6月14日現在

機関番号：12102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K18592

研究課題名(和文) 前端部神経外胚葉のセロトニン神経が腸管形成を制御する新規メカニズムの解明

研究課題名(英文) Elucidation of a novel mechanism that serotonergic nervous system controls the formation of intestinal tract.

研究代表者

谷口 順子 (Yaguchi, Junko)

筑波大学・生命環境系・学振特別研究員(PD)

研究者番号：60743127

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、ウニ幼生の前端部神経外胚葉(脊椎動物の前脳と類似の遺伝子発現を示す領域)のセロトニン神経による、腸管形成への影響を解析した。セロトニン合成を阻害すると正常よりも小さな胃腸が形成されたことから、さらに遺伝子発現等の解析を通してセロトニンが影響を及ぼしている腸管内の組織等の確認を行った。その結果、食道、胃、腸の筋肉組織(幽門や肛門等を含む)は正常通りに形成されていた。一方で、新たに幽門の胃側と腸側にそれぞれ特徴的な神経様細胞が存在することが本研究遂行中に発見され、その一部の形成にセロトニンが必要であることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究結果により、脊椎動物前脳と相同のウニ前端部神経外胚葉のセロトニン神経が、遠く離れた組織である胃腸の形成に影響を与えることを明確に示すことができた。ウニと我々脊椎動物の共通祖先においてすでに脳と腸管神経系の形成は、それぞれが独立して発生を進めているものではなく、相互に密接な影響を及ぼしながら進行していた可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We analyzed how serotonergic neurons in the anterior neuroectoderm, which is reported homologous to vertebrates forebrain, influences the formation of digestive tract of sea urchin larvae. Because the stomach and intestine in the larvae, in which serotonin synthesis was inhibited, were smaller than those of control, we have tried to investigate gene expression patterns along the digestive tract to reveal what happened on the tissues without serotonin function. As a result, although the muscular structure of esophagus, stomach, and intestine were normal, a part of neuron-like cells in digestive tract was not normal, suggesting that the serotonin function is required for the formation of nervous system in sea urchin larvae.

研究分野：進化発生学

キーワード：腸管神経 セロトニン受容体

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

神経伝達物質セロトニンは、動物進化上、最も古い神経伝達物質のひとつであり、クラゲ等の二胚葉動物から我々ヒトにいたるまで広く保存されている(引用文献1)。ほ乳類において、腸管には神経堤細胞由来のセロトニン神経が存在しており、消化活動の蠕動運動の制御に関与している(引用文献2)。またセロトニン合成酵素 TPH2 のノックアウトマウスでは極端な成長遅延と高い致死性を示し、これは消化器系に不全が見られるためと予測されている(引用文献3)。ウニにおいて腸管形成にセロトニンが影響しているという報告はこれまでになかったが、セロトニン合成酵素阻害胚は明らかに腸管形成の不全をもたらすことが予備実験で確認されたことから、そのメカニズムを解明すべく本研究を実施するに至った。

2. 研究の目的

ウニにおいてもセロトニンが腸管形成に関与する可能性が強く示唆されたことから、そのメカニズムおよびシグナル経路を明らかにすることを目的にした。発生初期においてセロトニンは前端部神経外胚葉(脊椎動物の前脳と相同と示唆される領域)でのみ合成していると考えられていることから、どのようにして遠くで合成されたセロトニンが腸管形成の制御に関与しているのか、そのメカニズムを時間軸に沿って明らかにすることにした。具体的にはセロトニン合成経路、セロトニン神経ネットワーク形成、セロトニン受容システムのそれぞれを破壊した胚における腸管形成を、形態学的観察や網羅的遺伝子発現解析の技術を駆使して解析し、腸管構成細胞内における細胞分化シグナル経路を明らかにする。

3. 研究の方法

セロトニン合成経路、セロトニン受容システム等のそれぞれを、モルフォリノアンチセンスオリゴ等を用いて阻害し腸管の形成過程の観察を行なった。腸管形成の解析方法はいずれの阻害処理下においても、光学および電子顕微鏡による形態観察、細胞膜や各組織を染色する抗体および他の組織マーカーを利用したリアルタイムを含む蛍光顕微鏡による観察、*in situ* hybridization 法による各種 mRNA 検出、餌である珪藻を消化する能力の検証等を通して行った。

4. 研究成果

(1) セロトニン合成や伝達経路阻害による腸管形成不全の解析に先立ち、まずはウニ幼生の正常な腸管形成や機能の確認を行った。筋肉の収縮機能に関わる Troponin I (TnI) の抗体を作成しウニプルテウス幼生の免疫染色を行ったところ、噴門、幽門、肛門の筋肉組織に TnI が明確に観察された。TnI 機能抑制胚ではほぼ食道の動きがみられずエサである珪藻が取り込まれなくなった(発表論文4)。一方でセロトニン合成酵素 TPH における TnI の発現パターンを解析したところ、それぞれの筋肉組織の発達は正常胚と比較して、ほぼ変化が見られず、エサを取り込む食道の動きも正常通り見られた。TPH 阻害胚における小さな胃の形成はエサの取り込み不全から二次的に生じているものではなく、セロトニンが腸管形成過程に直接関与している可能性がより強く示唆された。

(2) 次に、ウニ幼生の腸管神経系の有無について確認するため、神経特異的マーカーである SynaptotagminB 抗体染色胚を共焦点レーザー顕微鏡で詳細に観察した。その結果、幽門の胃側に1個、腸側に2個の神経様細胞の存在が確認された。また、これらの細胞においてウニの神経マーカーとして報告されている、*zfhx1*、*delta*、*soxC* の発現も確認されたことから、幽門近辺の細胞は神経そのものであるという可能性が高いと考えられた。さらに、幽門胃側の神経様細胞は神経型一酸化窒素合成酵素(nNOS)を発現しており、脊椎動物と同様にウニ幼生の幽門も

一酸化窒素によってその開閉がコントロールされていることが確かめられた（発表論文1）。TPH 阻害胚では、この胃側神経様細胞の Synaptotagmin B の発現が消失している割合が高く、セロトニンが腸管神経の形成にも関与している可能性が高いと考えられた（図1）。また、TPH 阻害胚は幽門開口の割合が減少し腸管の膨らみも小さいことから、セロトニン消失による腸管の膨らみ不全は、幽門胃側の神経用細胞の形成不全による影響を受けている可能性が高いと考えられた。本研究で明らかとなったセロトニンの腸管神経様細胞の形成への影響を考慮すると、セロトニン受容体が腸管に存在することが考えられるが、発現量が微量であることが想定され、本研究期間内に時空間的パターンの確認には至らなかった。しかしセロトニン受容体阻害剤やモルフォリノアンチセンスオリゴを用いた阻害胚を用いた実験では、明らかに幽門の開口率の低下がみられたことから、幽門近郊の神経細胞またはその近傍にセロトニン受容体が存在している可能性は十分に示唆された。

本研究全体を通してみると、ウニにおける腸管神経の発見、および神経型一酸化窒素合成酵素による幽門開閉への関与の解明に繋がり、非常にインパクトのある成果が得られた。また、セロトニンは腸管の形成だけでなく機能にも影響していることが判明し、胃腸に与えるセロトニンシグナルの影響は想定していた以上に複雑であると考えられた。今後のさらなる研究の発展において、本研究はウニ幼生の腸管神経系の重要な基礎データを示すことができた。

<引用文献>

1. Hay-Schmidt, 2000 Proc. R. Soc. Lond. B
2. Bornstein, 2012 Front Neurosci
3. Alenina et al., 2009 PNAS

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計5件)

1. Yaguchi Junko, Yaguchi Shunsuke, Evolution of nitric oxide regulation of gut function, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 査読有、116 巻、2019、5607-5612
DOI: 10.1073/pnas.1816973116
2. Yaguchi Junko, Microinjection methods for sea urchin eggs and blastomeres, Methods in Cell Biology, 査読あり、150 巻、2019、173-188
DOI: 10.1016/bs.mcb.2018.09.013
3. Yaguchi Junko, Yamazaki Atsuko, Yaguchi Shunsuke, Meis transcription factor maintains the neurogenic ectoderm and regulates the anterior-posterior patterning in embryos of a sea urchin *Hemicentrotus pulcherrimus*, Developmental Biology, 査読あり、444、2018、1-8
DOI: 10.1016/j.ydbio.2018.09.018
4. Shunsuke Yaguchi, Junko Yaguchi, Hiroyuki Tanaka, Troponin-I is present as an essential component of muscles in echinoderm larvae, Scientific Reports, 査読あり、7 巻、2017、43563
DOI: 10.1038/srep43563

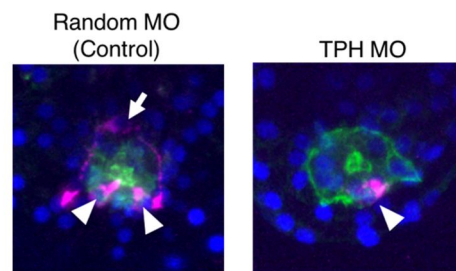


図1. TPH MO胚は幽門胃側の神経（左図の矢印）におけるSynaptotagminBの発現消失が見られる。幽門腸側の神経（矢尻）はTPH MO胚においても存在する。

5. Junko Yaguchi, Noriyo Takeda, Kazuo Inaba, Shunsuke Yaguchi, Cooperative Wnt-Nodal Signals Regulate the Patterning of Anterior Neuroectoderm, PLoS Genetics, 査読あり、12(4)巻、2016、1-27
DOI: 10.1371/journal.pgen.1006001

〔学会発表〕(計2件)

1. 谷口順子、ウニ幼生の消化管 - 形成過程とその機能 -、第88回 日本動物学会(招待講演)、2017年
2. Junko Yaguchi, Hiroyuki Tanaka, Shunsuke Yaguchi, The expression pattern and function of Troponin I in sea urchin larvae, 第87回 日本動物学会、2016年

〔図書〕(計0件)

〔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：
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：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等 なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。