

令和 5 年 6 月 5 日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K06888

研究課題名(和文) 幼少期の神経活動依存的な神経経路の発達におけるNP関連ペプチドとその受容体の機能

研究課題名(英文) Role of natriuretic-like peptides and their receptors in the development of activity-dependent neural pathway in juveniles

研究代表者

浜崎 浩子 (Hamazaki, Hiroko)

北里大学・一般教育部・教授

研究者番号：00211483

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)：幼少期の学習の1つであるニワトリのインプリンティング(刷込み)に注目し、ナトリウム利尿ペプチドファミリーのCNP3と、オステオクリン(OSTN)の機能を調べた。ニワトリOSTNは、孵化後1日目よりも7日目の終脳で発現が強かった。OSTNはNPR3に結合して細胞内cAMP濃度を減少させた。NPR3は胚期から孵化後7日目の終脳で発現していた。CNP3は記憶・学習の成立、OSTNは記憶の固定・維持に促進的に働き、OSTNは胚期の脳の神経細胞の突起を減少させた。幼少期の学習に伴いOSTN濃度が上昇し、不要な神経突起の伸長抑制により神経経路の強化がおこり、記憶の固定や維持が容易になると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

オステオクリン(OSTN)の脳での発現は霊長類に限られていると報告されていたが、この研究により、鳥類の脳でも発現しており、神経活動依存的に神経系の可塑的变化に関与することが示された。これにより、鳥類モデルがOSTNの研究に寄与できることは、今後の研究の発展につながることを期待できる。また、NPR3を受容体として、インプリンティングにおける記憶の固定や維持に働くことが示された。これは、ヒトにおける幼少期の神経回路の発達、知能の発達や学習におけるOSTNの重要性を示唆するものであり、幼少期の知能発達障害や学習障害の病態解析や治療法の開発にも貢献できる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Focusing on imprinting in chicks, a form of juvenile learning, we studied the function of CNP3 and osteocrin (OSTN), members of the natriuretic peptide family. Chicken OSTN was more strongly expressed in the telencephalon at day 7 than at day 1 post-hatching. OSTN bound to NPR3 and reduced intracellular cAMP levels. NPR3 was expressed in the telencephalon from embryonic stage to day 7 post-hatching. CNP3 facilitated the establishment of memory and learning, and OSTN facilitated memory consolidation and maintenance. OSTN reduced neurite number in the embryonic brain. It was suggested that learning in early childhood increases OSTN levels, and suppresses unnecessary neurite outgrowth, thus strengthens neural pathways, facilitating memory consolidation and maintenance.

研究分野：神経科学

キーワード：ナトリウム利尿ペプチド オステオクリン CNP3 インプリンティング行動 終脳 ニワトリ 記憶・学習

1. 研究開始当初の背景

ナトリウム利尿ペプチドファミリーには、心房性 (ANP)、B タイプ (BNP)、C タイプ (CNP) の3種類の主要なグループからなるペプチドが含まれており、心臓や血管、腎臓で体液の浸透圧や血圧の調節に関与することが知られている。また、骨と筋肉の発生・分化を促進するペプチドとして知られているオステオクリンは、ナトリウム利尿ペプチドに共通してみられるナトリウム利尿ペプチド受容体に結合するモチーフを含んでおり、ナトリウム利尿ペプチド様のペプチドの1つとみなされる。

われわれは、幼少期の学習の1つであるインプリンティング (刷込み) に注目し、ニワトリ幼雛におけるインプリンティングの成立に伴って起こる神経回路の可塑的变化や、インプリンティングを引き起こすことのできる孵化後の短期間で終了する臨界期 (感受性期) 制御の分子基盤について研究を行ってきた。マイクロアレイによる解析で、CNP3 とオステオクリンは、臨界期中である孵化後1日目と臨界期終了後である孵化後7日目では mRNA の発現量が大きく変化し、孵化後1日目と比べると、7日目では CNP3 は低く、OSTN は高くなっていることを発見した。さらに、CNP3 とオステオクリンは、インプリンティングのトレーニング後に発現が増加するというデータが得られたことから、神経活動に依存して発現量が増加することが示唆された。

さらに、ニワトリの3種類のナトリウム利尿ペプチド受容体 (NPR1、NPR2、NPR3) をクローニングして培養細胞に発現させて調べると、CNP3 は NPR2 よりも NPR1 を強力に活性化させて cGMP 産生を誘導することがわかり、ニワトリにおいてもナトリウム利尿ペプチドと受容体の関係は保存されていることが予想された。

ナトリウム利尿ペプチドと受容体の神経系における働きとして、NPR2 による背側神経節や脳神経節の神経の分岐の制御¹、記憶・学習行動に伴う CNP の NPR2 を介した神経細胞の活動の長期増強と長期抑制の制御²⁻³などが報告されていたが、この系が可塑的な神経回路形成に寄与することは具体的には示されていなかった。

一方、オステオクリンは、ヒトで胎生期から脳で発現し、視覚に関わる神経活動に依存してサルの大脳皮質視覚野での発現量が増加し、培養下のヒト胎生期ニューロンでは神経活動依存的に樹状突起の発達を制御することが報告された⁴が、その作用機序は不明であった。この論文では、オステオクリンの脳での発現は、霊長類に限定されることも報告されていた。

2. 研究の目的

本研究では、神経系の可塑的变化に果たす役割に関してはあまり注目されていなかったナトリウム利尿ペプチドとその関連ペプチド、およびその受容体に着目した。特に、オステオクリンと CNP3 がその受容体を介して、神経活動依存的にどのように脳の神経回路形成を制御するかについて、霊長類よりも実験が格段に容易なニワトリ幼雛と培養細胞を用いて明らかにしていくことをめざした。

具体的には、以下の4項目について調べることを目的とした。

- (1) オステオクリンの構造と脳における発現時期および発現部位
- (2) オステオクリン受容体の構造と脳における発現時期および発現部位、細胞内シグナル伝達の様式
- (3) オステオクリンと CNP3 の脳内投与のインプリンティングへの影響
- (4) オステオクリンの神経突起伸長への影響

3. 研究の方法

(1) 遺伝子の発現解析

(1) - 1 RT-PCR による mRNA の発現解析

ニワトリ胚あるいは孵化後のニワトリから脳を採取し、RNA を精製し、cDNA を合成した。特異性のある合成プライマーを準備し、cDNA を鋳型として 30~40 サイクルの PCR を行い、産物を電気泳動により解析した。

(1) - 2 *In situ* hybridization による組織における mRNA 発現解析

ニワトリ脳由来の cDNA を鋳型としてそれぞれの遺伝子に特異的な遺伝子断片を PCR によって増幅し、DIG 標識 cRNA プロープを作成した。

固定したニワトリ脳の凍結切片を作成し、通常の *in situ* hybridization の手順に従い、プロープを反応させて mRNA を検出した。

(2) 行動実験

液晶画面に水平方向に動く赤四角の図形を映し、孵化後1~2日のニワトリにインプリンティングの刺激として提示した。その後、インプリンティング刺激である動く赤四角、次に新規刺激となる動く青四角 (または青丸) を提示し、画面方向に向かっていく反応と逆方向に逃げていく反応を定量化し、動く赤四角に対して画面方法に向かっていく量の割合をインプリンティング成立の指標とした。

(3) ニワトリ NPR3 発現細胞を用いた解析

(3) - 1 NPR3 発現細胞の樹立

HA タグをつけたニワトリ NPR3 遺伝子を挿入した発現ベクターを準備して HEK293 細胞に導入し、薬剤による選別を行った。細胞からタンパク質を抽出し、抗 HA 抗体を用いたウェスタンブロットにより HA の発現の高いクローンを選択し安定発現細胞株として保存した。

(3) - 2 NPR3 発現細胞における細胞内 cAMP の濃度変化の解析

NPR3 発現細胞に Pink Flamingo ベクターを導入して cAMP に感受性のある蛍光タンパク質センサーを発現させた。細胞培養液にオステオクリンを添加し、共焦点顕微鏡下で一定時間ごとに画像を取得して保存した。NIH Image を用いてデータ解析を行い、細胞の蛍光強度を定量化した。

(3) - 3 NPR3 とオステオクリンの結合の解析

pAPTag ベクターにニワトリオステオクリン遺伝子を挿入したプラスミドを HEK293T 細胞に導入し、薬剤による選別を行って候補となるクローンを選別し、細胞上清を回収して AP 融合オステオクリン液を得た。細胞からタンパク質を抽出し、抗アルカリフォスファターゼ抗体を用いたウェスタンブロットによりアルカリフォスファターゼの発現を確認し、さらに呈色反応により細胞培養液中にアルカリフォスファターゼの活性が認められることを確認した。

NPR3 発現細胞を培養し、AP 融合オステオクリン液を添加し反応させた。内在性のアルカリフォスファターゼを不活性化した後、基質を加えて細胞に結合した AP を発色させて検出した。

(4) 神経突起の形態解析

ニワトリの 8 日目胚の脳のスライスを作成して培養し、エレクトロポレーションにより細胞に EGFP を発現させた。OSTN 添加群と非添加群について、共焦点顕微鏡を用いて EGFP を発現した神経細胞の観察を行い、撮影した。各神経細胞について、細胞体の中心から 10 マイクロメートルおきに同心円を描き、円と交差する突起の数を測定した。

4. 研究成果

(1) ニワトリオステオクリンの構造と脳における発現時期および発現部位

データベースを調べたところ、ニワトリオステオクリンにはエクソンの構成が異なるバリエーションが少なくとも 4 種類存在することがわかった。そこで、8 日目胚～孵化後 7 日目の脳でのこれらのバリエーションの発現を調べると、第 1 エクソンを共通にもつ 2 つのバリエーションでは、胚時期の発現は低い、孵化後 1 日目の脳で発現が上昇し始め、7 日目の脳では発現がより強くなっていた。この 2 つのバリエーションのアミノ酸配列の違いは、C 末端部分のアミノ酸残基 6 個の有無であった。孵化後 1 日目の終脳の HA 領域という背側部分で特に陽性細胞が多く見られた。この部位は、インプリンティングに重要な領域である visual Wulst (VW) の背側部を含む領域であった。一方、われわれはこれまでの研究で、CNP3 の終脳での発現は孵化後 1 日目の方が 7 日目よりも強く、VW のより腹側側に発現することを示しており⁵、オステオクリンとは相補的な関係にあることが示唆された。

オステオクリンは、VW の他、扁桃体領域に陽性細胞が多く集まっていた。扁桃体は、情動行動や社会性行動の調節を担う領域である。これに関連して、インプリンティングにおける社会性の発達について調べた。その結果、インプリンティング刺激の学習過程で隣に学習済みの個体が存在すると存在しない場合と比較して、インプリンティング刺激に対する反応性には差が見られないが、新規刺激に対する逃避行動が増大することが明らかになった。

(2) ニワトリオステオクリン受容体の構造と脳における発現時期および発現部位、受容体発現細胞の細胞内シグナル伝達機構

3 種類のナトリウム利尿ペプチド受容体のうち、NPR1 と NPR2 は CNP3 が結合すると活性化されて細胞内 cGMP の上昇を引き起こしたが、オステオクリンではこの反応はみられなかった。そこで、オステオクリンにより NPR3 が活性化されるのではないかと予想した。

データベースの検索により、ニワトリの NPR3 には 7 つのバリエーションがあることが予想された。そこで、RT-PCR によって 7 つのバリエーションの脳での発現をそれぞれ調べたところ、NPR3 の 7 つのバリエーションのすべてが 8 日目胚から孵化後 7 日目の脳で発現しており、発現量の明らかな変化は見られなかった。ニワトリ終脳では、VW を含んだ終脳の広い領域で発現していた。

オステオクリンと NPR3 の結合について、アルカリフォスファターゼを融合させたオステオクリンを作成し、NPR3 発現細胞と反応させて調べたところ、NPR3 発現細胞でアルカリフォスファターゼ活性が検出されたことから、オステオクリンが NPR3 と結合することが示された。

ニワトリ NPR3 の細胞内情報伝達系を確認するために、cAMP の細胞内動態を可視化できる蛍

光タンパク質センサーを NPR3 発現細胞に導入し、オステオクリンを添加すると、細胞内 cAMP 濃度の減少が見られた。これは、オステオクリンが NPR3 に結合し、細胞内 cAMP 濃度を減少させることを示していた。

(3) オステオクリンと CNP3 の脳内投与のインプリンティングへの影響

CNP3 をインプリンティング学習の直前にニワトリの脳内に投与すると、学習時のインプリンティング刺激の提示を短時間にしてインプリンティングが成立することから、CNP3 はインプリンティングの成立を促進することがわかった。

一方オステオクリンは、インプリンティング学習の後にニワトリ脳内に投与すると、インプリンティングの記憶の固定・維持に促進的に働くことが明らかになった。

この結果は、インプリンティングの学習後の VW では、オステオクリンの発現は CNP3 の発現よりも時間的に遅れて上昇したという結果と整合性のあるものであった。

(4) オステオクリンの神経突起伸長への影響

オステオクリンのインプリンティングの記憶の固定・維持に対する効果が、神経細胞の突起伸長への影響と関連するものかどうかについて調べた。

ニワトリの胚期の脳スライスを用いて、オステオクリンの神経細胞の突起の形態に及ぼす影響を調べた。神経細胞には EGFP を発現させて可視化した。その結果、オステオクリンの存在下では、1つの神経細胞あたりの神経突起数が減少していた。このオステオクリンの効果は、すでに発表されているヒト胎生期のニューロンに対するもの⁴と同様であることが示唆された。これは、幼少期の学習モデルであるインプリンティングにおいても、学習に伴ってオステオクリン濃度が上昇することで、不要な神経突起の伸長が抑制され、必要な神経経路が強化される働きがあることを示唆すると考えられた。

< 引用文献 >

¹Ter-Avetisyan et al., J. Neurosci., 34: 737, 2014.

²Decker et al., Neurosci., 169: 8, 2010.

³Barmashenko et al., Front. Mol. Neurosci., 7: 95, 2014.

⁴Ataman et al., Nature, 539: 242, 2016.

⁵Nakamori et al., Brain Res., 1708:116, 2019.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Chiba, Y., Tsuchida, K., Maekawa, F., Nakamori, T., Inaoka, H. and Ohki-Hamazaki, H.	4. 巻 190
2. 論文標題 Presence of sibling during the learning phase of imprinting affects escape behavior from a new object in chicks.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Neurosci. Res.	6. 最初と最後の頁 60-66
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.neures.2022.12.004	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Murakami, S., Ohki-Hamazaki, H. and Uchiyama, Y.	4. 巻 530
2. 論文標題 Olfactory placode generates a diverse population of neurons expressing GnRH, somatostatin mRNA, neuropeptide Y, or calbindin in the chick forebrain.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 J. Comp. Neurol.	6. 最初と最後の頁 2977-2993
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/cne.25389.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 中森智啓、浜崎浩子	4. 巻 45
2. 論文標題 ヒヨコ脳に発現が見られるナトリウム利尿ペプチド	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 比較内分泌学	6. 最初と最後の頁 75-79
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 中森智啓、小松澤和泉、牧田愛美、岩田未羽、中川純香、浜崎浩子
2. 発表標題 NP関連ペプチド（NLP）は神経突起の分岐を制御し、記憶の固定化を促進させる
3. 学会等名 第46回鳥類内分泌研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Fumihiko Maekawa, Hiroko Ohki-Hamazaki
2. 発表標題 Application of chick imprinting behavior to evaluate developmental neurotoxicity of chemicals: Effects of in ovo valproic acid exposure.
3. 学会等名 12th International Symposium on Avian Endocrinology (ISAE2022) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 中森智啓、小松澤和泉、藤谷和子、牧田愛美、岩田羽未、中川純香、 浜崎浩子
2. 発表標題 視覚的刷込み学習の記憶保持におけるNP関連ペプチドの役割の解析
3. 学会等名 第45回 日本鳥類内分泌研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 中森 智啓、小松澤 いずみ、藤谷 和子、牧田 愛美、岩田 羽未、中川 純香、浜崎 浩子
2. 発表標題 鳥類の視覚的刷込みにおけるナトリウム利尿ペプチド様遺伝子の役割の解析
3. 学会等名 第44回 日本神経科学大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 中森智啓、小松澤和泉、藤谷和子、牧田愛美、岩田未羽、中川純香、浜崎浩子
2. 発表標題 視覚的刷込み行動の臨界期制御のメカニズム解明を目指して
3. 学会等名 第44回鳥類内分泌研究会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Tomoharu Nakamori, Yurino Chiba, Haruka Ueno, Ami Makita, Tsugumi Okubo, Kasumi Hirai, Hiroko Ohki-Hamazaki
2. 発表標題 A C-type natriuretic peptide and its receptors in chick brain are involved in the process of visual imprinting.
3. 学会等名 第42回日本神経科学大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小松澤和泉、中森智啓、浜崎浩子
2. 発表標題 ヒヨコの神経の可塑的变化における遺伝子Xの役割について
3. 学会等名 第43回鳥類内分泌研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中森智啓、藤谷和子、千葉ゆりの、上野晴香、牧田愛美、浜崎浩子
2. 発表標題 刷込み行動におけるナトリウム利尿ペプチドの働きの解明を目指して
3. 学会等名 第43回鳥類内分泌研究会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

北里大学 一般教育部生物学・大学院医療系研究科 浜崎浩子 研究グループ
<https://www.clas.kitasato-u.ac.jp/bio/personal/hamazaki/index20a.html>

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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------