

令和 5 年 5 月 25 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K06739

研究課題名(和文)光周性におけるシナプス可塑性現象の関与の解明

研究課題名(英文)Analysis of involvement of synaptic plasticity in photoperiodism

研究代表者

濱中 良隆 (Hamanaka, Yoshitaka)

大阪大学・大学院理学研究科・助教

研究者番号：10647572

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)：ヨーロッパモノアラガイは、産卵に明瞭な光周性を示し、産卵は長日で促進される。産卵は、排卵ホルモンを分泌するCDC細胞によって解発され、このCDCの興奮性は光周期によって調節される。しかし、その調節機構は未だ不明である。本課題では、CDCに発現する神経伝達物質の受容体を単一細胞レベルのRNA-Seqで解析し、CDCに存在する古典的神経伝達物質の受容体遺伝子を探索した。その結果、CDCには、複数の神経伝達物質を含むニューロン群が入力することが示唆された。光周期依存的なCDCの興奮性の切替には、日長の情報を伝える前ニューロンとCDCの間でのシナプス可塑性が関わるのかもしれない。

研究成果の学術的意義や社会的意義

光周期(季節)の情報は脳内の光周時計で処理されると考えられるが、無脊椎動物の光周時計の正体やその機能原理は未だ不明である。光周性の神経機構にシナプス可塑性が関与するのか？これは未開拓の課題であり、本研究の学術的意義は高い。本研究により、ヨーロッパモノアラガイの光周期依存的な産卵調節に関わるCDCがシナプスを介した入力を受けることが支持された。季節という長い時間軸を持った情報が脳でどのように処理されるのか？本研究は、光による環境周期への生物の適応機構を生理学的に解明しようとする試みであり、神経行動学の面白さを若い世代に広めるといった社会的意義も含んでいる。

研究成果の概要(英文)：The pond snail *Lymnaea stagnalis* displays clear photoperiodism in egg-laying behavior, which is known to be triggered by caudo-dorsal cells (CDCs) expressing an ovulation hormone, i.e. CDC hormone (CDCH). We have demonstrated that excitability of CDCs is modulated by photoperiod, which the snails underwent in a previous study. However, the mechanism remains to be revealed. In the present study, I analyzed neurotransmitter receptors that express in CDCs by means of single-cell RNA sequencing, and then I found that plural receptors for a small molecule of classic neurotransmitters express in CDCs. These facts imply that CDCs receive synaptic inputs from unknown pre-synaptic neurons. Accordingly, photoperiod-dependent switching of the excitability of CDCs might be attributed to synaptic plasticity between CDCs and the presynaptic neurons; the latter possibly carrying photoperiodic information to CDCs.

研究分野：Neuroethology

キーワード：光周性 軟体動物 Caudo-dorsal cell RNA sequencing

1. 研究開始当初の背景

日の長さ(光周期)に対する生物の応答は光周性と呼ばれる。古くから、日長の判断(測時機構)には約24時間のリズムを駆動する時計(概日時計)が関わると考えられており、一部の昆虫においては、概日時計の機能を阻害すると光周期を読み取れなくなることが報告されている。このように、無脊椎動物を代表する昆虫では、『光周性に概日時計が関わる。』とする過去のモデル実験の結果を裏づける証拠が近年得られている。しかし、概日時計(測時機構)だけでは光周時計の仕組みは説明できない。季節を正しく判断するためには、経験した光周期の回数を数える仕組み『計数機構』が必要とされる。この計数機構の本体とは何なのか?脳には、個体が経験した光周期の回数を数えるニューロンが本当に実在するのだろうか?

脳内で光周期の情報を処理する経路の探索、及び、その機能原理の理解には、光周性機構の核となるニューロンを単細胞レベルで同定しておく必要がある。淡水生の巻貝であるヨーロッパモノアラガイ(以下、モノアラガイ)の脳は構成ニューロンの数が1.5~2万個程度で、昆虫に比べて構成ニューロンの数が一桁以上少ない。また、細胞体が大きく(~70µm)、細胞レベルでの生理学が行い易い。加えて、モノアラガイでは、i)産卵行動に明瞭な光周性が見られること、ii)産卵誘導に関わる神経分泌細胞Caudo-dorsal cell(CDC)の興奮性が長日で高く、短日で低いことが、単細胞レベルの電気生理学で明らかになっている。これは、CDCの上流に、光周時計を構成する『測時機構』や『計数機構』が存在することを示唆している。本研究課題では、『光周時計の概念的な要素である計数機構の正体がニューロン間のシナプス可塑性で説明できるのではないか?』という仮説に基づき、単純な脳を持つモノアラガイの光周期依存的な産卵行動にシナプス可塑性が関与する可能性について検討しようと考えた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、無脊椎動物の光周性の神経基盤の一端を解明することにある。モノアラガイの脳にある産卵誘導ニューロン(CDC)の興奮性は長日で高く、短日で低い。これは、CDCが日長の情報を符号化する光周時計からの入力を受け取ること強く示唆している。CDCの細胞体は巨大で、解剖学的な位置関係から、実体顕微鏡下で一一つの細胞を区別して単離することができる。そこで、単一CDCのRNA sequencingによって、CDCに発現する古典的神経伝達物質の受容体遺伝子を特定し、CDCのシナプス前ニューロン候補を探索することにした。さらに、本種のシナプス形成に重要なシナプス関連タンパク質がCDCで発現することを確認することで、CDCが前ニューロンからのシナプス入力を受け取ること確かめる。以上により、本種の光周性にニューロン間のシナプス可塑性が関与する可能性について検討した。加えて、短日個体と長日個体のCDCに発現する遺伝子の発現量を網羅的に比較することで、CDCの興奮性を切り替える分子基盤の一端を解明する。

3. 研究の方法

CDCの細胞体は巨大、且つ灰白色に見えることから、他の細胞と区別して単離できる。単離した細胞を抽出液(Recombinant RNase InhibitorをLysis Bufferで溶かしたもので)で破碎し、total RNAを抽出した。以降のcDNA libraryの作成、およびシーケンシングは外部委託によって行った。シーケンシングの完了後、まずCDCのマーカー遺伝子である排卵ホルモン(CDC hormone, CDCH)遺伝子の発現の有無により、サンプリングしたSingle CellがCDCであるか否か?を確認する。CDCであることが確認できたサンプルに関しては、すでに取得済みであった本種の全脳由来のContig配列と照らし合わせを行う事で、CDCに発現する遺伝子(Contig)のData baseを作成する。続いて、モノアラガイあるいは近縁種ですでに明らかとなっている古典的神経伝達物質の受容体遺伝子の配列情報を利用して、CDCに発現する古典的神経伝達物質の受容体遺伝子を探索する。さらに、CDCに発現する遺伝子(Contig)の発現量を短日vs長日で比較することによって、光周期依存的に発現量を変化させる遺伝子(differentially expressed genes, DEGs)の解析を実施する。

4. 研究成果

本研究によって、CDCには数種類の古典的神経伝達物質の受容体遺伝子が発現することがわかった。さらに、CDCには本種のシナプス形成に重要なシナプス関連タンパク質が発現することが明らかとなった。以上の結果は、CDCの活動が複数の前ニューロンからのシナプス入力によって複雑に制御されていることを示唆している。候補となる前ニューロンの中に光周期の情報を伝達するものが含まれているのか?これは今後の研究課題である。さらに、短日個体と長日個体由来のCDCに発現する遺伝子(Contig)を網羅的に比較することで、現在までに、300個以上

の遺伝子の発現量が短日あるいは長日特異的に上昇することがわかってきた。これらの遺伝子が光周期依存的な CDC の活動パターンの切り替えにどのように関与しているのか？ 今後は、これらの DEG の機能解析を進めて行く予定である。

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Hamanaka Yoshitaka, Shiga Sakiko	4. 巻 529
2. 論文標題 Photoperiodic control of electrophysiological properties of the caudo dorsal cells in the pond snail, <i>Lymnaea stagnalis</i>	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Comparative Neurology	6. 最初と最後の頁 3360 ~ 3374
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/cne.25196	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 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Ju Kyungsu, 濱中 良隆, 志賀 向子
2. 発表標題 Photoperiodic effects on clock gene expression in the central nervous system in <i>Lymnaea stagnalis</i>
3. 学会等名 日本比較生理生化学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 濱中 良隆, 志賀 向子
2. 発表標題 Electrophysiological properties and morphology of a neurosecretory canopy cell in the pond snail, <i>Lymnaea stagnalis</i>
3. 学会等名 日本比較生理生化学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Sonoko Fukumoto, Yoshitaka Hamanaka, Sakiko Shiga
2. 発表標題 The role of neurosecretory canopy cells in photoperiod-dependent reproduction and its morphology in the pond snail, <i>Lymnaea stagnalis</i>
3. 学会等名 日本比較生理生化学会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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