

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 5月21日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2012

課題番号：22700336

研究課題名（和文）神経回路の再編成に関与する新規神経ペプチドの機能解析

研究課題名（英文）Functional analysis of the novel neuropeptide genes involved in the refinement of the neural circuits

研究代表者

井上 武 (INOUE TAKESHI)

京都大学・理学研究科・特定助教

研究者番号：40391867

研究成果の概要（和文）：機能的な成熟した神経回路は、発生過程で、まず遺伝的情報により形成された後、活動依存的に機能回路単位の再編成が行われることで完成する。神経回路の再編成は、神経伝達を促進するシグナル分子が、シナプス後細胞で活動依存的に発現し、シナプス前細胞と相互作用することが必要と考えられる。本研究では、新規神経ペプチドが活動依存的な神経回路の再編成に関与することで、プラナリアの頭部再生過程における正常な負の走光性行動の機能回復に機能していることを見いだした。

研究成果の概要（英文）：A variety of external signals interpreted into defined neural functions play important role in refinement in the neural function. Much remains to be understood how external signals contribute the formation of the efficient neural system that supporting the transformation of the appropriate behavioral response against 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 photorecognition during brain regeneration.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
22年度	1,100,000	330,000	1,430,000
23年度	800,000	240,000	1,040,000
24年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	2,700,000	810,000	3,510,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：脳神経科学・神経科学一般

キーワード：発生・発達・再生神経科学

1. 研究開始当初の背景

(1) 神経回路網は、形成初期段階は、主に遺伝的支配により形成される。しかし、発

生過程で一旦回路が形成された後、環境からの情報をより効率良く処理するために、神経回路は、細かな単位で再編成が起きる。この

神経回路の再編成は、内外の環境からの情報による活動依存的に行われると考えられている。しかし、神経回路の再編成過程で、最終的に残る神経回路と脱落する神経回路が、どのような分子メカニズムで選抜されるのかは未知の部分が多い。筆者は、一旦形成された神経回路の中から、シナプス伝達効率を上げるように、促進性のシグナル受けることで、回路が選抜され再編成が起きると考えている。

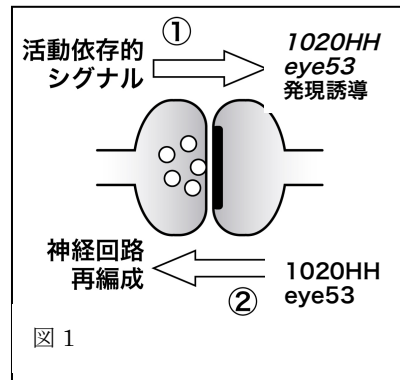
(2) プラナリアは極めて高い再生能力をもち、頭部を切断しても約1週間で元の頭部を再生させることができる。また、プラナリアは進化上最初に集中神経系を獲得した動物と考えられている。つまり、プラナリアは脳によって様々な行動を制御しているが、頭部を切断しても、脳の構造だけではなく機能も元通りに再生させることができ、脳の再生の研究に適していると考えられる。

(3) 筆者はこれまでに、プラナリアの視神経および脳の形成過程をモデルとした研究によって、プラナリアの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見いだした。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、負の走光性は再生5日目にならないと回復しない。再生4-5日目の間に機能を回復する機構があることが示唆され、さらに、再生5日目から発現が開始される、2種の新規の神経ペプチド前駆体遺伝子(1020HH, eye53)を同定している。1020HH, eye53は、視神経の投射先の神経細胞で発現しており、RNAi法を用いた機能解析の結果、再生5日目に観られる負の走光性の回復が阻害されることを見いだしている(Inoue *et al.*, *Zool. Sci.*, 2004)。しかし、この神経ペプチドがどのようにして機能回復に関わっているかは全く分かっていなかった。

2. 研究の目的

プラナリアが、頭部再生過程で正常な負の走光性を回復するには、プラナリアの視神経-視覚中枢神経の回路形成過程で、光シグナルが入ることで、活動依存的に1020HHおよびeye53の発現が誘導され、さらに1020HHおよびeye53が、シナプス間のシグナル伝達効率の増強および神経回路の再編成に関与しているという仮説をたてた(図1)。そこで本研究では、初期段階の神経回路が形成された後の再編成過程で、1020HHおよびeye53が、活動依存的に発現し、細かな神経回路単位の増強作用を介して、神経回路の再編成に機能していること

を明らかにすることを目的とした。



3. 研究の方法

RNAi法により1020HHおよびeye53の機能阻害実験を行い遺伝子発現解析および走光性の行動解析によって解析した。

4. 研究成果

(1) 1020HHとeye53は再生過程で脳の形態的な再生や運動機能の回復には関与しない

まず、走光性行動解析法を改良し、プラナリアの行動を感度良く定量化できるようにした。その方法を用いて、RNAiによる1020HHとeye53の表現型を確認した。その結解、先行研究と同様の結果を得た。さらに、RNAiプラナリアの運動能力に影響がないかを調べたが、正常個体との差は全くなかった。また、脳の形態的な異常があるかどうかも様々な神経細胞特異的抗体を用いて詳細に解析したが、RNAi個体では全く異常が観られなかった(図2)。このことから、RNAiによって走光性行動の回復に異常がでたのは、脳の形態的な再生や運動能力によるものではなく、光認識が正常におこなえなくなっていることがわかった。

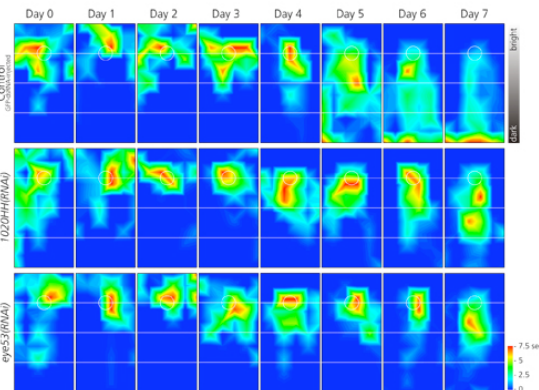


図2. 頭部再生過程における走光性行動の回復

(2) 1020HHとeye53は再生過程で光認識の回復に機能する

光認識を定量化するために、プラナリアの

走光性行動中の進行方向をベクトル化し定量解析を行った。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、弱い負の走光性が観察されたものの、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、強い走光性が回復されたことが定量的に示された(図3)。この結果から、再生4日目でも光認識ができていながらも関わらず、正常の負の走光性行動がとれていないが、再生5日目になって正常な負の走光性が回復していることが分かった。一方、*1020HH(RNAi)*プラナリアおよび*eye53(RNAi)*プラナリアは再生5日目以降でも、ベクトルの約55-60%しか光と反対方向になく、この値は再生4日目と同等であった。以上の結果から、脳の神経回路が形成された後の再生4-5日目の間に、脳機能を回復する機構があり、*1020HH*および*eye53*が光の認識機構を調整することで、走光性の回復に機能しているというモデルをサポートする結果が定量的に示された。

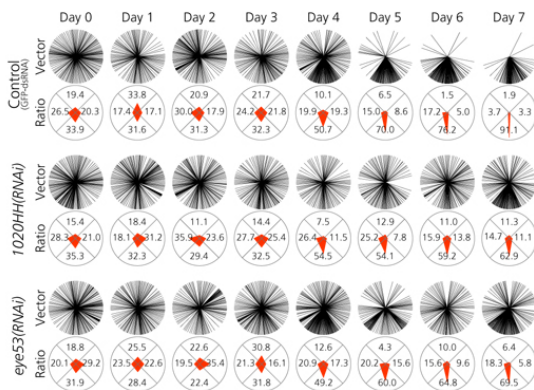


図3. 頭部再生過程における光認識の回復

(3) *1020HH* と *eye53* は光認識のモジュレータとして機能することで走光性行動の回復に寄与する

1020HH および *eye53* が光刺激に対してどのような働きを持っているかをしらべるために、それぞれの遺伝子を RNAi によって阻害したプラナリアを用いて、光の強度を変えて走光性の解析を行った。その結果、コントロールは光の強弱によらず、一定の走光性行動を示したが、*1020HH(RNAi)* プラナリアおよび *eye53(RNAi)* プラナリアは光の強さが弱いほど、正常な走光性を示せなくなった(図4)。この結果は、プラナリアが光の強弱によらず、光のコントラストを認識して、速やかにくらい方向に向かうために、*1020HH* および *eye53* が光刺激の脳の視覚中枢の神経細胞内で弱い光のシグナルを増強する調節因子として機能してい

ることが示唆された。

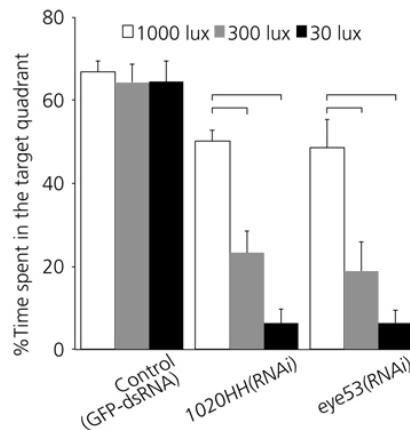


図4. *1020HH*, *eye53* は弱い光シグナルを脳内で増強している

(4) *1020HH* と *eye53* は神経ペプチド

1020HH と *eye53* から予測されるアミノ酸配列から両遺伝子産物は、KK, KR のプロホルモンコンバーターゼの認識配列を有し、予想されるペプチド配列間を比較すると、相同性が高く、ペプチド前駆体であることが考えられた。そこで、ペプチドを人工合成し、RNAi プラナリアに投与したところ、走光性行動が回復し、RNAi の表現型がレスキューされた。以上の結果から、*1020HH* と *eye53* は神経ペプチドとして、光認識を回復に機能していることが示唆された。

(5) *1020HH* と *eye53* の発現制御機構

視神経が脳に投射する再生4日目ではなく、再生5日目に走光性が回復できるのか? 光刺激が *1020HH* および *eye53* の発現に影響があると考え、プラナリアを、まったく光のない暗闇で再生させ、ある程度の光が当たっている通常の状態から再生させたプラナリアと暗闇で再生させたプラナリアで、2つの遺伝子の発現量を比較した(図5)。その結果、光のシグナルがない暗闇で再生させたプラナリアでは、*1020HH* と *eye53* の発現量が低くなっており、*1020HH* と *eye53* の発現量は光刺激によって上昇することが示唆された。さらに、2つの遺伝子の配列を調べた結果、どちらも神経ペプチドであることがわかった。以上の結果から、この2つの分子は、視神経で受け取った光刺激をより効率よく脳に伝達するための、神経伝達の増強や神経回路の再編成を担うものとして機能しているのではないかと推察された。脳の機能回復においては、脳や視神経を再生し形態形成したあとに、外界からのシグナルを効率よく伝達できるようにする段階があると考えられる。

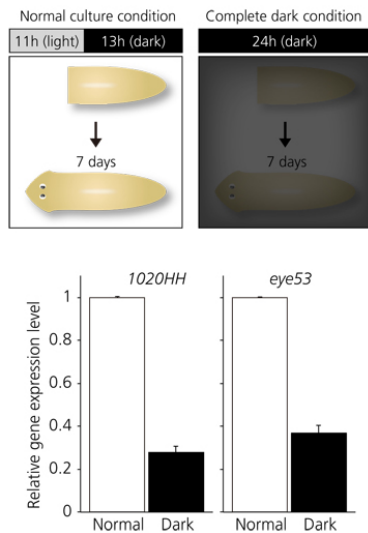


図 5. 光シグナルによって 1020HH, eye53 は発現誘導される

(6) 光シグナルは 1020HH と eye53 発現細胞の NMDA 受容体を介して伝達される

1020HH と eye53 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 と eye53 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 および eye53 発現細胞はグルタミン酸受容体を多く発現していた。さらに、AMPA (alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic 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 と eye53 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、カリウムイオンや 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 と eye53 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 (図 6)。

以上の結果をまとめると、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 と eye53 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る。

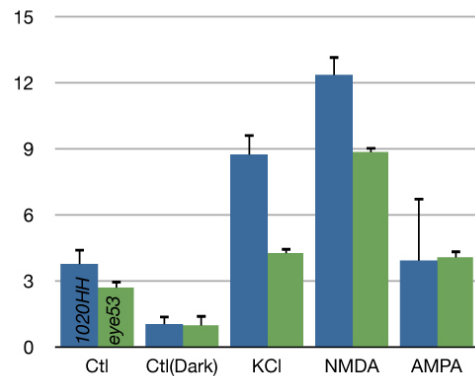


図 6. NMDA 刺激によって、1020HH, eye53 は発現上昇する

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 2 件)

- ① Rouhana, L. Weiss, J. A. Forsthoefel, D. J. Lee, H. King, R. S. Inoue, T. Shibata, N. Agata, K. Newmark, P. A., 'RNA interference by feeding in vitro synthesized double-stranded RNA to planarians: Methodology and dynamics' *Dev Dyn*, 242(6):718-730. (2013) 査読有
doi: 10.1002/dvdy
- ② Agata, K. Inoue, T., 'Survey of the differences between regenerative and non-regenerative animals.' *Dev Growth Differ*, 54, 413-452 (2012) 査読有
doi: 10.1111/j.1440-169X

[学会発表] (計 9 件)

- ① 井上武, 脳を再生できる動物から脳再生のメカニズムを探る. 第 12 回日本再生医療学会総会 (招待講演), 2013/3/21, パシフィコ横浜 (横浜市)
- ② Hoshino, H., Inoue, T., Yamashita, T., Agata, K., Investigation of neural cell types involved in learning and memory in planarian, *Dugesia japonica*, 第 35 回分子生物学会, 2012/12/12, 福岡国際会議場 (福岡県博多市)
- ③ Shimoyama, S., Inoue, T., Agata, K.,

Molecular ethological analysis of planarian feeding behavior, 第 35 回分子生物学会, 2012/12/12, 福岡国際会議場(福岡県博多市)

- ④ Inoue, T., Takano, T., Umesono, Y., Agata, K., 'Neural activity regulates proper restitution of phototaxis via novel neuropeptide genes during head regeneration in planarian' Joint meeting of The 45th Annual meeting of the Japanese Society of Developmental Biologists and The 64th Annual Meeting of the Japan Society for Cell Biology, 2012/5/28, 神戸国際会議場(神戸市)
- ⑤ Inoue, T., Nishimura, K., Urata, Y., Michibayashi, C., Agata, K., Development of a Strategies for Future Brain Therapy: Lessons from Planarian and Newt Brain, The 21st CDB Meeting (招待講演), 2011/11/24, RIKEN CDB (神戸市)
- ⑥ Inoue, T., Planarian brain morphogenesis and function, Planarian regeneration research meeting (招待講演), 2011/11/22, 関西セミナーハウス (京都市)
- ⑦ 井上 武, 高野智美, 梅園良彦, 阿形清和, プラナリアの脳機能回復に関与する神経活動依存的な新規神経ペプチドの解析, 第 34 回日本神経科学大会-こころの脳科学-2011/09/14, パシフィコ横浜(横浜市)
- ⑧ Inoue, T., Takano, T., Umesono, Y., Agata, K., 'Neural activity regulates proper restitution of the brain function through novel neuropeptide genes in planarian regeneration.', 47th Annual Meeting of the Japanese Society of Developmental Biologists, 2011/05/18, 沖縄コンベンションセンター(沖縄県宜野湾市)
- ⑨ Inoue, T., Takano, T., Umesono, Y., Agata, K., Analysis of the novel genes require for the proper functional recovery in neuronal regeneration, EMBO Conference Series 3rd in a series <Molecular and cellular basis of regeneration

& tissue repair>, 2110/09/26, Hotel Do Mar Sesimbra (ポルトガル)

〔図書〕(計 2 件)

- ① 井上 武, 神経回路網が制御する神経細胞再生機構, プレインサイエンスレビュー2012 伊藤 正男, 川合 述史 編, pp. 151-174, (2012)クバクロ
- ② 井上 武, 脳 Ver.1 からみえてくるものの, 生き物たちのつづれ織り:多様性と普遍性が彩る生物模様 阿形 清和, 森哲 監修, 下巻, pp. 55-69 (2012) 京大出版

〔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

<http://mdb.biophys.kyoto-u.ac.jp>

6. 研究組織

(1)研究代表者

井上 武 (INOUE TAKESHI)

京都大学大学院・理学研究科・特定助教

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 :