

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 19 日現在

機関番号：27103

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24570089

研究課題名(和文) 神経系進化における刺胞動物神経環の位置づけ：遺伝子発現解析によるアプローチ

研究課題名(英文) Identification and functional analyses of genes expressed in the nerve ring of Hydra

研究代表者

濱田 俊 (Hamada, Shun)

福岡女子大学・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) 4,300,000円

研究成果の概要(和文)：散在神経系は系統発生的に最も原始的な神経系と考えられている。散在神経系は一般に一様な神経網からなると考えられているが、神経細胞の集中を伴う明瞭な神経線維束も観察されており、それらは系統発生的に最も古い中枢化である可能性がある。本研究では、ヒドラの口周囲神経線維束、神経環に着目し、神経環に発現している遺伝子を差次的cDNAクローニング法とin situハイブリダイゼーション法により探索した。また神経環に発現する候補遺伝子として、我々はシナプシンを同定し、機能解析を行った。シナプシンは、神経環を含めたヒドラ神経系の一部の神経細胞に発現し、シナプシンの異所性発現は神経突起の形態変化を生じた。

研究成果の概要(英文)：The diffuse nervous system (DNS) is considered as the most primitive form of the nervous system. Though the DNS is generally believed to be homogenous neuronal network, conspicuous nerve bundles with concentration of neurons have been reported. These structures would be the phylogenetically oldest centralization of the nervous system. In this study, we focused on a nerve bundle around the mouth of Hydra, the nerve ring. We screened for genes that are expressed in the nerve ring of Hydra by differential cDNA cloning followed by in situ hybridization. Among the candidate genes, we confirmed that Hydra synapsin (HySyn) was expressed in the nerve ring. Interestingly, HySyn was detected in subpopulations of neurons including the nerve ring in the Hydra DNS. At the ultrastructural level, HySyn was detected with clusters of synaptic vesicles. Ectopic expression of HySyn-GFP in neurons which do not express detectable level of HySyn affected their neurite morphology.

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 神経回路

1. 研究開始当初の背景

中枢神経系は多数の神経細胞が規則正しく集積し、同じ機能に関わる神経細胞の軸索が神経伝導路を形成することにより構成されているが、どのように誕生し、進化してきたのか不明な点が多い。

神経系が初めて出現した動物は、クラゲやイソギンチャクなどの刺胞動物の仲間だと考えられている(現在では、有櫛動物も最初に神経系が出現した候補とされる)。刺胞動物や有櫛動物の神経系は、体全体に散在性に分布する神経細胞とその網目状の神経突起網から構成されており、散在神経系と呼ばれている。教科書的には、散在神経系は中枢神経系を持たず、神経細胞は刺胞動物等の体壁に一樣に分布しているように記述されることが多い。しかし、実際には口の周囲など一部の領域には、神経細胞が集中している。また、神経細胞の集中している部分には、神経突起が束になった神経伝導路様の構造も観察される。この神経伝導路様構造は神経環と呼ばれている。我々は、これらの散在神経系にみられ神経細胞の集中は、神経系の最初の中枢化ではないかと考え、研究を行ってきた。

2. 研究の目的

刺胞動物の神経環や口周囲の神経細胞が他の神経細胞と異なった特性、何らかの中枢化の指標となるような特性を有するかどうか調べるために、刺胞動物のモデル生物であるヒドラ (*Hydra oligactis*) を用い、口周囲に存在する神経細胞や神経環、あるいはこれらの近くで発現する遺伝子を同定することにした。そして、これらの遺伝子の発現を他の動物の中枢神経系で調べることにより、中

枢神経系の誕生や進化の過程を知る手がかりを得ることができるのではないかと考え、研究を開始した。

既に本研究の開始時点でヒドラの神経環に発現することが明らかとなっていたシナプス小胞タンパク質のシナプシンに関しては、遺伝子改変動物を用いた機能解析や他の刺胞動物(ネマトステラ)神経系における分布を明らかにすることを目標とした。

3. 研究の方法

口周囲の神経細胞や神経環、あるいはその近傍で発現する遺伝子を同定するために、差次的相補的 DNA クローニング法 (differential cDNA cloning) を利用した。約 200 匹のヒドラから口周囲の組織(口周囲組織)を実体顕微鏡下で切り出した。また、隣接する胴体側組織(隣接組織)を同様に切り出した。口周囲組織、隣接組織からそれぞれ総 RNA を抽出し、逆転写酵素とオリゴ dT プライマーを用いて cDNA を合成した。組織量が少ないため、まずポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) を利用した cDNA 増幅を行った後、差次的 cDNA クローニング(口周囲組織 cDNA-隣接組織 cDNA)を行った。cDNA クローニングまでは、本研究開始時点までに終えていた。

(1) 得られた cDNA の解析

得られた cDNA の塩基配列を決定し、データベース検索により相同遺伝子や特徴的なタンパク質ドメイン構造の有無などの遺伝子情報を収集した。さらに、得られた cDNA に対応する遺伝子がどこで発現しているのか明らかにするため、得られた cDNA を鋳型に用いてジゴキシゲニン標識 RNA プローブを

合成し、in situ ハイブリダイゼーション法による発現解析を行った。

(2) ヒドラ・シナプシンの機能解析

遺伝子改変動物による解析

ヒドラ・シナプシンは、口の近傍の神経細胞や神経環に多く局在しており、体の下部の神経細胞にはほとんど分布していない。そこで本研究では、このようなシナプシンを発現していない体下部の神経細胞にシナプシンを発現させ機能を検討することにした。アクチン・プロモータの調節下で、シナプシンと緑色蛍光タンパク質(GFP)との融合タンパク質を発現させる発現ベクターを構築した。このベクターをヒドラの受精卵に顕微注入し、孵化後に蛍光実体顕微鏡を用いて GFP を発現する遺伝子改変ヒドラを選抜した。受精卵への顕微注入は、研究協力者の Bosch らのグループにより行われた。

また、RNA 干渉によりシナプシンの機能抑制を行うために、シナプシン mRNA の一部領域に対応する二本鎖 RNA と GFP を発現するベクターを構築した。このベクターも上記と同様にして受精卵に導入し、遺伝子改変ヒドラを選抜した。

シナプシン遺伝子改変ヒドラの神経系の評価には、ヒドラ神経系の主要な神経伝達物質である神経ペプチド (Hym-176, LWamide および RFamide ファミリー) に対する免疫染色を用いた。

ヒドラ・シナプシンの局在様式の検討

シナプシンが神経細胞のどのような部位に発現しているのか電子顕微鏡レベルで明らかにするため、包埋前染色法による免疫電子顕微鏡法を行った。ヒドラを 4%パラホル

ムアルデヒド固定液で固定し、25%ショ糖リン酸緩衝液に浸漬した後、ドライアイスヘキサンを使ってコンパウンド中で凍結させた。クライオスタットで 10 μ m に薄切し、スライドガラスに貼り付けた。風乾後、リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) で洗浄し、非特異的反応を抑制するため、ブロッキング試薬と反応させた。次に、抗ヒドラ・シナプシン抗体と 4 で二晩反応させた。PBS で洗浄後、ペルオキシダーゼ標識二次抗体と反応させ、ジアミノベンチジンと過酸化水素を基質として、抗体結合部位を可視化した。PBS で洗浄後、1%オスミウム酸による後固定を行い、エタノールによる脱水を行った後、エポキシ樹脂に包埋した。包埋された組織をウルトラミクロトームにより超薄切し、酢酸ウラニルと酢酸鉛で染色し、電子顕微鏡で観察した。

(3) ネマトステラ神経系でのシナプシンの分布

ネマトステラ (*Nematostella vectensis*) はヒドラ同様に刺胞動物のモデル生物であるが、ネマトステラは刺胞動物のなかでも原型と考えられている花虫類 (サンゴ、イソギンチャク等) に属する。ネマトステラの神経系でのシナプシンの発現が、ヒドラでみられるように主に口周囲の神経細胞のみにみられるかどうか検討するため、既にデータベースに登録されているネマトステラ・シナプシンのアミノ酸配列を元に抗原となるペプチドを合成しヘモシアニンと結合させた後、ウサギに免疫をして、ネマトステラ・シナプシンに対する抗体を作成した。ペプチド抗体だけでなく、ネマトステラ・シナプシンとグルタチオン S 転フェラーゼ (GST) タンパ

ク質との融合タンパク質を抗原として抗体を作成した。ネマトステラ・シナプシン cDNA を逆転写 PCR 法により pGEX6P ベクターにクローニングし、大腸菌で発現を誘導した。融合タンパク質をラットに免疫し、ネマトステラ・シナプシンに対する抗体を作成した。得られた抗体を用いて免疫染色法により、ネマトステラ神経系のどのような領域にシナプシンが発現しているのか検討した。

4. 研究成果

(1) 得られた cDNA の解析

頭部で発現する遺伝子に由来する cDNA を濃縮した cDNA ライブラリーから 1414 クローンの cDNA の塩基配列を決定し、まず相同遺伝子の解析を行った。1414 クローンのうち、195 クローンは他に相同遺伝子がみられなかった。残りの 1219 クローンの塩基配列には重複しているものもあり、相同性解析の結果、540 遺伝子に由来することがわかった。このうち、cDNA クローン数 1 位と 2 位の遺伝子はいずれもトロンボスポンジン 1 型リピート (TSR) ドメインを有するタンパク質をコードする遺伝子であった。出現数 (cDNA クローン数) が多かった上位 30 位の遺伝子を調べたところ、10 個の遺伝子が TSR ドメインを有することがわかった。また、我々が作成した頭部発現 cDNA ライブラリーのうち、TSR ドメインを有する cDNA が全体の 25% を占めており、TSR ドメインを有する遺伝子が頭部に強く発現することがわかった。これら 10 個の TSR ドメインを有する遺伝子のうち 9 個は *in situ* ハイブリダイゼーション法により頭部に強く発現することが確認できた。

TSR ドメインタンパク質以外に、神経細胞

での発現が期待できる遺伝子として、電位依存性イオンチャンネル、神経細胞特異的転写因子、神経ペプチドや希少アミン受容体、神経特異的 RNA 結合タンパク質に相同性のある遺伝子が見出された。理由は明確ではないが、これらの遺伝子に対する *in situ* ハイブリダイゼーション法では、シグナルを検出できなかった。原因のひとつとして、TSR ドメインタンパク質等に比較していずれも発現量が少なく、得られた cDNA から作成したプローブでは十分な感度で発現を検出できないのではないかと考えられる。我々の解析でヒドラ頭部神経細胞に発現することが明らかになったシナプシンも、得られた cDNA から作成したプローブでは *in situ* ハイブリダイゼーション法で十分なシグナルを得ることができなかった。これら頭部の神経細胞に発現が期待できる遺伝子については、cDNA 全長をクローニングし、新たなプローブを設計するか、抗体を作成し免疫染色により発現領域を検討する必要があると考えている。

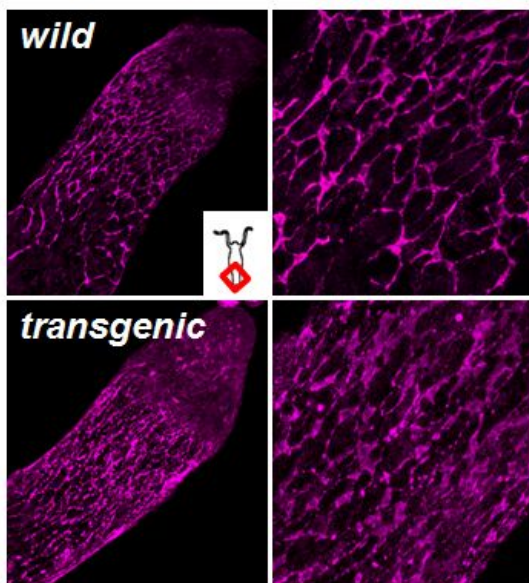
研究期間中、540 個の頭部発現遺伝子候補 cDNA のうち約 360 遺伝子について *in situ* ハイブリダイゼーション法による発現解析をおこなった。しかし前述の通り、シグナルの得られない遺伝子も多かった。チラミドシグナル増幅法など感度の高い方法も試みたが、改善はみられなかった。今後、遺伝子情報から判断し興味深い遺伝子に関しては、全長をクローニングした上でプローブを再設計し、発現解析を行う。

(2) ヒドラ・シナプシンの機能解析

遺伝子改変動物による解析

アクチン・プロモータの制御下でシナプシ

ン-GFP 融合タンパク質を発現する遺伝子改変ヒドラは数系統樹立された。このうち、2系統では、全身の間細胞系列（神経細胞、腺細胞、刺胞細胞、生殖細胞）のみで導入遺伝子の発現が確認された。そこで、この遺伝子改変ヒドラを用いて、本来シナプシンが発現していない足部の神経細胞の形態を遺伝子改変ヒドラと野生型のヒドラで神経ペプチドに対する免疫染色により比較した。その結果、シナプシン-GFP を異所性に発現させた神経細胞の突起には形態的な異常が観察され（図1）、現在、定量的な解析を進めている。



（図1 シナプシン-GFP 異所性発現[下2枚、右は左の拡大]による神経細胞の形態変化）

RNA 干渉によるシナプシン機能喪失型遺伝子改変ヒドラも間細胞系列で導入遺伝子が発現している系統が得られたが、いままでのところ表現型の異常は見出されていない。

ヒドラ・シナプシンの局在様式の検討

包埋前免疫電子顕微鏡法でヒドラ・シナプシンの局在様式を検討した。その結果、シナプス小胞が集中している瘤状構造（varicosity）の部分に免疫陽性反応が認め

られた。この結果は、ヒドラのシナプシンも、脊椎動物のシナプシンと同様にシナプス小胞同士を集めてシナプス小胞プールを形成するのに重要であることを示唆している。

（3）ネマトステラでのシナプシンの分布

ネマトステラ・シナプシンのCドメインに対し、2種類のペプチド抗体を作成した。これらの抗体は酵素結合免疫吸着法(ELISA)にて高力価を示したが、免疫染色では陽性反応が得られず、使用できなかった。そこで、ヒドラ・シナプシンのCドメインをGST融合タンパク質として発現させたものを抗原としてラットに免疫し抗体作成を行った。抗血清を用いてネマトステラに対して免疫染色を行ったところ、口周囲および体上部で瘤状構造を伴う神経線維が観察された。抗血清からシナプシンに対する抗体のみを精製するため、同じ抗原部位をマルトース結合タンパク質の融合タンパク質として発現させ、抗体精製を行ってから、再度免疫染色を行う計画である。

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1件)

Koizumi O., Hamada S., Minobe S., Hamaguchi-Hamada K., Kurumata-Shigeto M., Nakamura M., Namikawa H. The nerve ring in cnidarians: its presence and structure in hydrozoan medusae. *Zoology*, 査読有、118(2), 2015, 79-88

DOI:10.1016/j.zool.2014.10.001

〔学会発表〕(計 4 件)

濱田俊、重藤麻美、濱田香世子、美濃部純子、
小泉修 散在神経系における synapsin の発
現とその意義 第 38 回日本神経科学大会
2015 年 7 月 28 日 神戸国際会議場

Hamada, S., Shigeo, M., Hamada, K., Minobe,
S., Khalturin, K., Koizumi, O., Bosch, T.
Distribution pattern of hydra synapsin
revealed heterogeneity of synapses in the
diffuse nervous system. The 120th Annual
Meeting of the Japanese Association of
Anatomists and the 92th Annual Meeting of
the Physiological Society of Japan, 23th,
March, 2015, Kobe convention center

Yatabe, M., Nakamura, M., Namikawa, H.,
Kurumata-Shigeto, M., Hamada, S., Minobe,
S., Koizumi, O. Nerve ring of cnidarians:
is it a CNS(central nervous system)-like
neuronal structure? The 34th annual
meeting of the Japanese society for
comparative physiology and biochemistry,
6th-8th, July, 2012, The graduate university
for advanced studies / Shonan village
center, Hayama

Kurumata-Shigeto, M., Hamaguchi-Hamada,
K., Minobe, S., Khalturin, K., Bosch,
T.C.G., Koizumi, O., Hamada, S.
Distribution pattern of hydra synapsin
revealed heterogeneity of synapses in the
hydra nervous system. The 34th annual

meeting of the Japanese society for
comparative physiology and biochemistry,
6th-8th, July, 2012, The graduate university
for advanced studies / Shonan village
center, Hayama

〔その他〕
ホームページ等
<http://www.fwu.ac.jp/wp/hamada/>

6. 研究組織

(1) 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

(2) 研究分担者

濱田 香世子 (HAMADA, Kayoko)
福岡女子大学・国際文理学部・研究員
研究者番号: 20448814

(3) 研究協力者

Bosch, Thomas, C. G.
キール大学(ドイツ)・動物学研究所・
教授