

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 9 日現在

機関番号：27103  
研究種目：基盤研究(C) (一般)  
研究期間：2013～2015  
課題番号：25440181  
研究課題名(和文)ニューロンにおけるゲノム増幅機構の解明

研究課題名(英文)DNA amplification in neuron

## 研究代表者

松尾 亮太 (Ryota, Matsuo)

福岡女子大学・文理学部・准教授

研究者番号：40334338

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：軟体動物腹足類の脳には、巨大なニューロンが多数存在し、それらのゲノムDNAは大幅に増幅(倍数化)していることが知られている。こういったDNAの倍数化は、体の成長や肥満に伴って、ニューロンがより広い領域を神経支配できるようにするために起こっている適応的な応答であると考えられている。本研究では、腹足類の一種であるナメクジを用い、(1)脳のニューロンがどのように自身のDNA増幅の必要性を感知しているのか、(2)DNA全体が倍数化した結果、そこから読み出されて作られるmRNAの量についても一様に増加するのか?、という2つの問題について明らかにした。

研究成果の概要(英文)：The brain of gastropod mollusks contain many giant neurons whose genomic DNAs are repeatedly amplified (i.e. polyploid). The polyploidization is adaptive strategy of the animals, and is thought to occur in order to meet the increasing demand for macromolecules in the neurons to innervate growing peripheral organs during body growth. In the present research, we investigated following two issues: 1) How neurons in the brain sense the need to amplify their genomic DNA? 2) Is the amount of every mRNA increases concomitantly as a result of DNA polyploidization? We found that the neurons in the brain sense the need to amplify their own genome through innervation to the peripheral organs. We also identified a pair of genes whose expression levels change in the opposite direction in the same population of neurons during body growth, suggesting a differential regulation of gene expression levels in a polyploidized neuron.

研究分野：分子神経生物学

キーワード：DNA増幅 倍数化 ニューロン 腹足類

## 1. 研究開始当初の背景

ナメクジやアメフラシなどの軟体動物腹足類では、脳に巨大なニューロンが多数存在し、それらのゲノム DNA は大幅に増幅していることが知られている。これまでの申請者らの研究により、ナメクジでは体が大きくなるに従って核ゲノム DNA が増幅され、同時にニューロンのサイズも大きくなるが示されている。さらに、DNA の増幅が、特定のゲノム部位の局所的な増幅ではなく、ゲノム全体の倍数化であることも明らかにしている。つまり、エサを十分に与えられて体が大きくなると、脳のニューロンは DNA を繰り返し増幅させることで遺伝子とそこからの産物を増やし、体腔容積の増大に応じたニューロホルモンの増産や神経投射領域の拡大に対応していると考えられた。しかしながら、体のサイズ依存的なニューロンの倍数化に関し、未解明な問題がいくつか残っていた。それを以下に記す。

## 2. 研究の目的

上述のように、軟体動物腹足類の中樞神経系(脳)のニューロンにおける、体のサイズ依存的な DNA 増幅には、以下の未解明な問題(a)~(c)が残っていた。

- (a) 体液中に含まれる、栄養状態を反映する因子によって直接的にニューロンでの DNA 増幅が引き起こされるのか、あるいは神経投射を介して何らかの因子を逆行性に取り込むことによって引き起こされるのか?つまり、ニューロンはどのように自身のゲノム DNA を増幅させるの必要性を感知しているのか?
- (b) 飢餓状態におかれた場合、ニューロンでの核ゲノム DNA の減少は起こりうるのか?つまり、核内 DNA の量の変化は可逆的であるか?
- (c) ニューロンに DNA 増幅を引き起こす(外的な)因子は物質レベルで何であるのか?

本研究では、これらに加え、

- (d) ゲノム DNA 全体が倍数化した結果、そこから読み出されて作られる mRNA の量についても、一様に増加するのか、そうでないのか?

という問題にも取り組むことにした。

## 3. 研究の方法

上記のうち、(a)では、「脳まるごと移植技術」を用いることで、DNA 増幅に神経投射が必要であるのか否かを検討した。「脳まるごと移

植技術」とは、摘出した脳を、他個体の体腔内に移植して長期間生かしておく手法である。つまり、ホスト側の個体は、体内の自身の脳以外に他個体の脳をも宿すことになる。この技術を用いて本課題に取り組むロジックは次の通りである:もし、脳のニューロンが、体液中に存在する栄養状態等を反映する因子(グルコースやインシュリンなど)に直接的に反応して DNA 増幅を起こすのであれば、移植脳もホストの脳も同じように DNA 増幅を起こすはずである。しかし、もし投射先の臓器が成長していることを、何らかのフィードバックシグナルによりニューロンが感知し、自身の DNA 増幅に結び付けているのであれば、移植された脳はホストの臓器に対する神経投射を持たないため、いくらホスト個体を太らせても DNA 増幅の頻度は亢進しないはずである。従って、ここではホストを太らせた際の、ホスト側の脳と移植脳でそれぞれの程度 DNA 増幅頻度が亢進したかを、プロモデオキシウリジン(BrdU)の取り込みを指標とした組織化学的手法により定量した。また、移植脳を利用しない実験として、脳から出力している神経束の片側を手術により切断することにより、同側の脳に存在するニューロンの DNA 増幅頻度が低下するか否かを調べることも行った。

(c)では、手始めに、脳から投射を受けている臓器のひとつとして心臓に着目し、太らせたナメクジの心臓と、絶食させたナメクジの心臓から mRNA を抽出し、それぞれに含まれている分子種を RNAseq 解析により調べ、相対的な発現量が著しく違っているものを探索した。この中に、ニューロンに対するフィードバックシグナルを担うものが含まれている可能性を考えた。

(d)では、同じニューロンに発現しているにもかかわらず、DNA 増幅の結果発現量の変化の方向が逆であるような組合せの遺伝子を、脳由来 mRNA に対する RNAseq データの中から探索した。

## 4. 研究成果

3年の期間中、上記(a)~(d)のうち、(a)と(d)について進展が見られた。(b)は、ナメクジが飢餓状態に置かれてもあまり体重が減少しない、という問題があり、そのため脳のニューロン自身に大きな変化が起こるとは予想しにくかったため、さらに深い解析は行っていない。(c)は、現時点でも、発現量差のある遺伝子を探索中である。以下、(a)と(d)について、成果を記述する。

(a)において、上述のように、「脳まるごと移植技術」を利用した実験を行った結果、ホスト個体を食餌の制御によって太らせると、

ホストの脳では DNA 増幅の頻度が亢進したが、移植脳では DNA 増幅頻度の亢進は認められなかった。これは、移植する部位（ホストの頭部の近く、あるいは腹部）によらず、同じ結果であった。また、脳から出力している主要な神経線維束のひとつ（posterior pedal nerve）の左右いずれかを切断すると、そこから出力しているニューロンの細胞体が多く存在する、同側の pedal ganglia において、DNA 増幅の頻度が有意に低下した。つまり、神経投射を遮断されたニューロンでは DNA 増幅が抑えられたと解釈された。以上の結果から、肥満（ないしは体の成長）に応じて起こる、脳のニューロンにおける DNA 増幅の亢進には、末梢臓器への投射が必要であることが示された。以上の結果は、*Dev Neurobiol* 誌に掲載された<sup>5</sup>。

(d)では、肥満群の脳で増加している遺伝子のうち、新規のニューロペプチドをコードしていると思われる遺伝子の発現部位を調べたところ、右の parietal ganglion に特異的に発現することがこれまでに知られている lyc-peptide の発現パターンと一致することが予想された。そこで連続切片を用いた *in situ* hybridization により、さらに詳細な解析を行ったところ、両ニューロペプチド遺伝子は完全に同じニューロン群で発現していることが確認された。さらに、lyc-peptide の遺伝子は、肥満群で発現量が若干低下することが分かった。従って、共にニューロペプチドをコードする 2 種の遺伝子のうち、一方が DNA 倍数化により発現量が増加し、他方が減少することになり、このことから DNA 増幅によって鋳型 DNA 量が一樣に増えたとしても、そこから読みだされる転写産物の量は一樣に増える訳ではなく、遺伝子ごとに異なる発現制御を受けていることが推察された。これらの結果については、現在専門誌に投稿中である。

#### 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 5 件)

1. \*Matsuo R, Fukata R, Kumagai M, Kobayashi S, and Matsuo Y. Distribution of histaminergic neurons and their modulatory effects on oscillatory activity in the olfactory center of the terrestrial slug *Limax*. *J Comp Neurol* (2016) **524**, 119-135.
2. Koga Y, Matsuo Y, and \*Matsuo R.

Olfactory memory storage and/or retrieval requires the presence of the tentacle that was used during acquisition of that memory in the terrestrial slug *Limax*. *Zool Sci.* (2016) **33**, 78-82.

3. Matsuo Y, Uozumi N, and \*Matsuo R. Phototropotaxis based on projection through the cerebral commissure in the terrestrial slug *Limax*. *J Comp Physiol A* (2014) **200**, 1023-1032.
4. \*Matsuo R, Kobayashi S, Wakiya K, Yamagishi M, Fukuoka M, and Ito E. The cholinergic system in the olfactory center of the terrestrial slug *Limax*. *J Comp Neurol* (2014) **522**, 2951-2966.
5. \*Matsuo R, Yamagishi M, Wakiya K, Tanaka Y, and Ito E. Target innervation is necessary for neuronal polyploidization in the terrestrial slug *Limax*. *Dev Neurobiol* (2013) **73**, 609-620.

〔学会発表〕(計 12 件)

1. 松尾亮太. 「ナメクジ嗅覚中枢におけるヒスタミン性神経投射」(第 68 回日本動物学会九州支部大会、福岡大学、2015 年 5 月 23 日)
2. 松尾亮太. 「ニューロンにおける DNA 倍数化」(山田科学振興財団研究交流会、東京、2015 年 5 月 30 日)
3. 松尾亮太、永田茜、松尾優子「眼を用いない光感知システムによる負の光走性行動」(第 5 回九州地区動物談話会、九州地区国立大学九重共同研修所、2015 年 8 月 21 日)
4. Matsuo R, Nagata A, and Matsuo Y. “Ocular and non-ocular photosensig

- in the terrestrial slug *Limax*.” 13th International Society for Invertebrate Neuroscience, Tihany, Hungary, August 28, 2015.
5. 松尾亮太. 「ナメクジの脳における DNA 増幅」(大阪市立大学理学系研究科生物学科セミナー講演、2015 年 9 月 7 日)
  6. 松尾亮太. 「非眼性光感知システムによる負の光走性行動」(第 86 回日本動物学会大会、新潟、2015 年 9 月 19 日)
  7. Matsuo R, Tanaka M, Fukata R, Kobayashi S, Aonuma H, and Matsuo Y. “Octopaminergic system in the brain of the terrestrial slug *Limax*.” (第 40 回日本比較内分泌学会・第 37 回日本比較生理生化学会合同大会、広島、2015 年 12 月 12 日)
  8. Matsuo Y, Uozumi N, and Matsuo R. “Negative phototaxis using bilateral eyes in the terrestrial slug *Limax*.” 11th International Congress of Neuroethology and 36th Annual Meeting of The Japanese Society for Comparative Physiology and Biochemistry, Sapporo, July 31, 2014.
  9. 松尾亮太、魚住奈々、松尾優子. 「ナメクジ大脳神経節の交連部を介した光情報の左右比較」(第 4 回九州地区動物談話会、島原市、2014 年 8 月 22 日)
  10. Matsuo R. “Photo-tropotaxis based on projection through the cerebral commissure in the terrestrial slug *Limax*.” International Workshop *Neuronal principles of learning and*

*memory and its perspectives for designing autonomic distributed systems*, Honolulu, October 3, 2014.

11. 松尾亮太. 「ナメクジの嗅覚中枢におけるアセチルコリン作動性神経の分布と機能」(日本比較生理生化学会第 35 回大会、2013 年 7 月、姫路)
12. 松尾亮太. 「ナメクジの脳におけるニューロンのゲノム DNA 増幅」(日本動物学会第 84 回大会、2013 年 9 月、岡山、招待講演)

〔図書〕(計 4 件)

1. Matsuo R. ”The computation and robustness of the mini-cognitive centers of terrestrial mollusks – an exquisite outcome of brain evolution.” in *Brain Evolution by Design*, Chapter 9, Shigeno S, Murakami Y, Nomura T ed., Springer, New York (in press).
2. Matsuo R. ”Consolidation and reconsolidation of olfactory memory in the terrestrial pulmonates.” in *Memory Consolidation*, pp 53-64. Sakakibara M and Ito E ed., Nova Publishers, New York (2015).
3. 松尾亮太、他 38 名. 「研究者が教える動物実験」(第 3 巻) pp170-173. 日本比較生理生化学会編、共立出版 (2015 年).
4. 松尾亮太、他 13 名. ”ニューロンにおける DNA の増幅” in 「ブレインサイエンスレビュー2014」, pp 251 - 266. 廣川信隆編、クバプロ (2014 年).

〔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://researchmap.jp/matsuor/>

<http://www.fwu.ac.jp/teachersdatabase/detail/?masterid=61&gakkaid=202&gakubuid=20>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

松尾 亮太 (MATSUO RYOTA)

福岡女子大学・国際文理学部・准教授

研究者番号：40334338

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：