

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 2 日現在

機関番号：32665

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2016

課題番号：26670729

研究課題名(和文) オタマジャクシをモデルにした子宮内ストレスが脳のゲノム構造に与える影響

研究課題名(英文) signal transduction in the brains of *Xenopus* tadpoles under exposure to a predation fear

研究代表者

森 司 (MORI, Tsukasa)

日本大学・生物資源科学部・教授

研究者番号：60241379

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：カエル幼生を用いて恐怖ストレスが脳ゲノム構造に与える影響に関して研究を行ってきた。主な実験項目としては、近交系 *Xenopus tropicalis* を用いた捕食者誘導実験、捕食者添加による恐怖刺激で誘導される *Xenopus laevis* 幼生の脳で発現する遺伝子のシグナル伝達解析、形態変化を起こすエゾアカガエルの脳の大規模シーケンス、イメージングMSによる *Xenopus* 幼生の代謝物解析や1匹のエゾアカガエル成体からのゲノム抽出と全ゲノム解析等を行った。その結果、恐怖刺激で *Xenopus laevis* 幼生の脳で HIPPO, ILK, や RhoGDI など脳内シグナル伝達は大きく変化した。

研究成果の概要(英文)：Stress during developmental stages is known to adversely affect neural function in offspring of mammals and other animal groups. Here we use the model organism *Xenopus laevis* to investigate induced gene expression changes in the brains of larval stages (tadpoles) under the stress of exposure to a predator. We performed a 3 -tag digital gene expression profiling analysis using brain tissues. A pathway analysis based on the expression profiles of short time predation threat indicated that various signal transduction genes, such as HIPPO, ILK, and RhoGDI, were up-regulated, while a number of others were down-regulated. The tadpoles exposed predation stress showed defects in neural function as shown in posttraumatic stress disorder (PTSD). However, dynamic changes in signal transduction in the brain appeared to bring about to improve memory and cognition for survival.

研究分野：生理生化学

キーワード：カエル幼生 被捕食 *Xenopus*

1. 研究開始当初の背景

オタマジャクシは自然環境のなかでサンショウウオやヤゴなど複数の天敵と共存する。エゾアカガエル(*R. pirica*)の場合、吸血性のヤゴに対しては尾部を高くするなどの軽度の形態変化を示すのみであるが、口を開けて捕食するエゾサンショウウオに対しては *R. pirica* 幼生は全身を膨隆させて適応する。*R. pirica* 幼生はエゾサンショウウオ幼生が飼育環境に入って来た瞬間に行動が抑制的になり、10日程の時間で膨満形態を示す。我々はこの *R. pirica* 幼生の頭胴部で発現している遺伝子解析を行った結果、膨満化のために fibrinolysis の増加による血管系やリンパ管の維持 (Mori et al. 2005. *BBRC*) や ZP ドメインにより水の不透過を引き起こす Uromodulin-like 遺伝子が体表を包むように発現することを明らかにした (Mori et al, 2009. *PLoS One*). そのメカニズムとして、*R. pirica* が組織中の体液を増加させ、結合織の中にヒアルロン酸を大量に分泌し、ヒアルロン酸の水結合力により、取り込んだ体液をゲル状にして頭胴部の膨満化を安定させること (Mori et al, 2012. *Biology Open*) を明らかにした。

更に、エゾアカガエルのような極端な膨満形態は形成しない場合でも、捕食者により、尾部の伸長や鰭の肥大化、体色変化や体重増加などの共通する形態変化は多くの無尾類幼生 (アカガエル、アマガエル、ヒキガエルなど) で起きることを確認した。しかし、*R. pirica* を含めほとんどの無尾類幼生はゲノム情報が不足しているため網羅的遺伝子解析は困難である。そのため、遺伝子情報が構築されている *Xenopus laevis* 幼生を用いてサンショウウオ幼生の捕食ストレス実験を行った。その結果、10日程の捕食者誘導により尾部の伸長を確認した。次に、経時的に *Xenopus* 幼生の脳を取出し、イルミナ解析で発現してくる3,000万個 (ほぼ全ての発現遺伝子) の遺伝子解析を行った。すると、捕食者誘導を行った群では脳内遺伝子の発現が大きく変わることが明らかになった。そのため、捕食者誘導による恐怖ストレスで脳のシステムを変えることで対捕食者適応している可能性が出てきた。

2. 研究の目的

子宮内環境が出生後の児の発達や、成人になった後の代謝性疾患に影響を与えるという子宮内プログラム説 (Baker の仮説) は疫学的にその妥当性を示す多くの報告があるが、哺乳類では子宮内環境を直視下に観察してコントロールする適切な実験モデルを欠くため直接的な証明を得ることは困難であった。

我々は胎外で発生の全過程を観察することができ、また幼生時の環境が成体となった後の表現型や行動に影響することが判明しているカエル (オタマジャクシ) を用いて、今までに捕食者に対するストレス応答が水分代謝遺伝子や発育速度のみならず視覚情報の処理能力、行動パターンの変化などを誘導し得ることを明らかにした。本申請ではそのメカニズムとして神経ネットワークのシナプス再構成やさらにその分子的基盤を明らかにし、児の健やかな発育を達成することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 近交系 *Xenopus tropicalis* を用いた捕食者誘導実験

恐怖ストレスによるゲノムの遺伝子組換えを証明するにあたり、個体間のゲノム変異が大きい個体を用いて解析を行うと個体間の遺伝子のバラツキにより、ゲノム変異が見えなくなる可能性がある。そのため、最適な実験動物としては *Xenopus tropicalis* のクローン体が最も望ましい。そのため広島大学、両生類研究所の柏木先生 (研究協力者) の協力を得て、皮膚移植が可能な近交系個体を用いた。本実験ではエゾアカガエル幼生と異なり捕食者を添加した *Xenopus levis* では顕著な膨満形態は示さないが、頭胴部に対して尾部の比率が有意 ($P < 0.01$) に大きくなり、被捕食ストレスを受けたか否かは尾部を計測することで判断できた。今回、種が異なる *tropicalis* を用いて同様な傾向を示すか否かを *Xenopus levis* と同様の捕食者誘導実験で明らかにした。

(2) 捕食者添加による恐怖刺激で誘導される *Xenopus levis* 幼生の脳で発現する遺伝子のシグナル伝達解析

実験としては5つの実験区を用意した。実験は $25 \times 10 \times 10$ cm の水槽に2Lの飼育水を添加し、捕食者を入れずに *X. laevis* 幼生50匹を10日間飼育したものを10daysCont群と

した。試験区としては同様の水槽に *X. laevis* 幼生 50 匹とエゾサンショウウオ 1 匹を入れて 10 日間飼育した 10daysEX 群を準備した。対照区と同様の飼育環境下において 9 日間と 18 時間飼育した後、サンショウウオを 1 匹添加して 6 時間飼育した 6 時間 EX 群、9 日間飼育し取り上げ前 24 時間にのみサンショウウオを 1 匹添加した 24 時間 EX 群、サンショウウオを添加して 5 日間飼育した後サンショウウオを除去し、さらに 5 日間飼育した 5daysOUT の 5 群を用意した。これらの実験群はいずれも 3 回の繰り返しで行った。この飼育実験では開始時と終了時を各群で合わせるにより、成長段階の差が出ないようにした。また、10 日間区および 5 日除去区前半では被食によりオタマジャクシが減耗するため、予備水槽として対照区と同様の水槽にサンショウウオを添加した水槽をさらに 6 群用意し、この予備水槽からオタマジャクシを追加した。10 日間の飼育実験の終了後に各群のオタマジャクシから脳を取り出して RNAlater で固定した。その後、Total RNA を抽出し、オリゴ dT ピーズを用いて mRNA の逆転写、制限酵素 NlaIII による切断とシーケンス用アダプターの連結、制限酵素の切り出しと精製の後に RNAseq をおこなった。これにより、データ量としては 23,000,000 ~ 25,000,000tag(遺伝子断片)のシーケンス遺伝子データが得られ、これを基にアダプターの無い配列、インサートを持たない配列、理論上短すぎる配列などを取り除き、*Xenopus tropicalis* と *X. laevis* の遺伝子データに当てて、約 130,000 ~ 160,000 種類の遺伝子を同定した。

膨大な数の発現遺伝子の pathway 解析を行うためには、pathway 解析が出来る種の遺伝子 ID に変換する必要がある。そのため、今回得られた *Xenopus* による遺伝子は BioMart を用いて Zebrafish の 2,821 種の遺伝子 ID を取得した。この遺伝子 ID を用いて IPA 解析を行ったところ、重複した遺伝子を取り除かれ 1,966 種の遺伝子解析を行った。

(3) 形態変化を起こすエゾアカガエルの脳の大規模シーケンス

実験は *Xenopus* 幼生と同様にエゾアカガエル幼生を捕食者であるサンショウウオやヤゴと一緒に 10 日間飼育した。*R. pirica* の実験では 2 種類の捕食者としてエゾサンショウ

ウオとヤゴ(オニヤンマ幼生)を加えた。ヤゴは捕食能が高い為、*R. pirica* 幼生の飼育ケース内に更に小型の籠を入れてその中で飼育した。飼育時間は *Xenopus* で行っていた 6 時間を省き、24 時間、10 日間、5daysOUT の 7 群の実験を行った。10 日間の捕食者曝露実験の終了後に *Xenopus* も *R. pirica* の幼生から脳を取り出して RNAlater で固定した。その後、Total RNA を抽出し、オリゴ dT ピーズを用いて mRNA の逆転写、制限酵素 NlaIII による切断とシーケンス用アダプターの連結、制限酵素の切り出しと精製の後に RNAseq を行った。解析された遺伝子を Blast 解析にかけた後、コントロールに対する比で表現した。

(4) イメージング MS による *Xenopus* 幼生の代謝物解析

恐怖刺激を曝露した *X. tropicalis* 幼生の体内、そして脳内の陽イオン、陰イオンのイメージングを行い、何が変化してくるのかを代謝産物から解析をおこなった。並行して、変化が見られる組織が何なのかを明らかにするため、幼生を解剖して各臓器を取り出し、有機溶媒で抽出した臓器内の代謝産物イメージング MS により解析を行った。これにより臓器の組織切片で得られる曖昧な組織像からでもその臓器を特定出来るアトラスの作成を行った。

(5) 1 匹のエゾアカガエル生体からのゲノム抽出と全ゲノム解析

Rana pirica 幼生の恐怖刺激に応答するシステムをゲノムレベルで解析するために全ゲノム解析をスタートした。天然個体である *Rana pirica* の全ゲノム解析を行うためには、個体間のゲノム変異があるため、複数個体からゲノムを抽出して解析する場合は個体間のゲノム変異の影響で断片遺伝子を繋げるアセンブリーが出来ない可能性がある。そのため、親個体 1 匹の肝臓、脳、心臓、皮膚、筋肉などの各臓器からゲノムを抽出した。また、同様の組織から TotalRNA を抽出し、cDNA に変換した後イルミナ解析も行った。ゲノム DNA は Nanopore 社の MinKNOW を用いて 1D, 2D の両解析システムを用いて解析を行った。

4. 研究成果

(1) 近交系 *Xenopus tropicalis* を用いた捕食者誘導実験

Xenopus laevis では被捕食ストレスにより、

尾部筋肉・尾部の伸長が見られた。その結果、遊泳速度が上昇し、捕食者からの逃避を行っているのだと考えてきた。今回、熱帯ツメガエルの種類を *Xenopus tropicalis* に変えて実験したところ、48 時間の捕食者ストレスにより、頭部に近い筋肉が縮小する一方で、頭部から離れている尾部の筋肉は増大していることが分かった。このことから、尾部の筋肉があたかも一本線になるような変化が 48 時間経過という短期間で見られた。一方、24 時間の捕食者ストレスにより尾部下ヒレの縮小が見られた。更に 10day のような長期的な捕食者曝露により更に尾部を縮小させる傾向が見られた。また、今回の実験では遊泳速度に関する有効なデータを取ることが出来なかった。

(2) 捕食者添加による恐怖刺激で誘導される *Xenopus laevis* 幼生の脳で発現する遺伝子のシグナル伝達解析

オタマジャクシを用いて恐怖が脳に与える影響を RNAseq による発現遺伝子を明らかにし、それら遺伝子群からシグナル伝達のレベルから恐怖が脳に与える影響を解析した。研究にはモデル生物であるアフリカツメガエル *Xenopus laevis* 幼生を用いた。この *X. laevis* はサンショウウオ幼生と同所的に飼育すると尾部を伸長し、遊泳速度を速めた。そのため、この *X. laevis* は被捕食ストレスを認識して表現型の可塑性を示したことを意味する。そのため、この被捕食ストレスにより *X. laevis* の脳はどのような遺伝子発現をして、それはどのようなシグナル伝達を示すのかを解析することを目的にした。その結果、多くのシグナル伝達が短時間で変化する事が明らかになり、ストレスを抜いても PTSD の反応の遺伝子群が検出された。そのため、カエル幼生を用いた恐怖ストレスが哺乳類にも利用の可能性が示唆された。

捕食者を添加して 6 時間後の脳内で高発現した遺伝子のトップは cytochrome P450 であった。その他、unidentified genes も含まれるが、non-NMDA glutamate gene (kainate receptor) もコントロールに比べ 5.2 倍も高発現を示した。また、捕食者添加後 24 時間の脳では、calcium ATPase (ATPase, Ca²⁺ transporting, cardiac muscle, slow twitch 2) がコントロールの 10 倍の発現量を示した。5dayOut 群の遺伝子発現のプロファイルは 6

時間群と似たプロファイルを示した。これらを基にした Pathway 解析では 1,996 種類の遺伝子を用いて IPA pathway 解析をした。シグナル伝達解析の結果から 6 時間と 5dayOut 群は似たパターンを示した。例えば *EIF2*, corticotrophin releasing hormone は 6 時間群と 5dayOut 群では低下していた。しかし反対に、11 個のシグナル伝達である *HIPPO*, *ILK*, *RhoGDI*, *eIF4*, *p70S6K* と Huntington ' s disease シグナル伝達は 6 時間と 5dayOut 群で増加を示した。しかしながら、*mTOR*, *ATM*, Cell Cycle, や Remodeling of epithelial adherens signaling は 6 時間群と 5dayOut 群で異なった発現パターンを示していた。

一方、様々なシグナル伝達、例えば actin cytoskeleton や CREB signaling は 24 時間群で増加した。しかしながら、24 時間で増加したこれらの多くのシグナル伝達は 10 日間群では低下した。

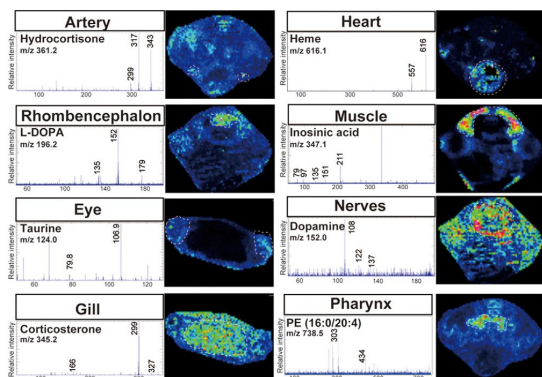
(3) 形態変化を起こすエゾアカガエルの脳の大規模シーケンス

イルミナ解析により *Rana pirica* 幼生の脳を解析している。各実験群において 3,000 万個のタグを解析した。得られた遺伝子は *Xenopus* のデータベースと照合し、約 20,000 種類の遺伝子を同定した。

(4) イメージング MS による *Xenopus* 幼生の代謝物解析

5 日間の被捕食ストレスを受けた個体でも多くの代謝物の量が異なっている事が予備実験で明らかになった。しかし、これらの代謝産物の解析は組織切片上で行われるため、どの組織なのかを正確に特定する必要がある。特に、組織切片では切断部位の形状の変化により、組織の同定が極めて難しい場合が多い。そのため、本実験ではこれから用いる事が多い、*Xenopus* 幼生を用いて、その組織の同定を代謝産物から行った。そのため、各臓器を正確に同定できる切片を作製し、その切片を用いて MS 解析を行った。その結果、図 1 に示す様に動脈では Hydrocortisone、心臓では Heme 鉄、菱脳では L-DOPA、筋肉ではイノシン酸、目ではタウリン、神経ではドーパミン、鰓ではコルチコステロン、咽頭では 1-palmitoyl-2-arachidonoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine が主な代謝産物である事が明らかになった。これにより、脳を含んだ体全体での代謝産物と組織の関係

が明らかになった。



(図1) イメージングMSによる解析

(5)1匹のエゾアカガエル成体からのゲノム抽出と全ゲノム解析

エゾアカガエル成体からの全ゲノム解析は本研究期間内では完了することは出来なかった。現在はnanopore社のMinIONを用いてゲノムシーケンスをかけている途中であるが、ゲノムライブラリーを1D、又は2Dで解析してもゲノム解析用セルのpore(通常セル当たり1,500個程のporeが活性を持っている)1つで読むことが出来た最大長の遺伝子断片が10kbから20kb程度であった。そのため今後、シーケンスの最適条件を検討する予定である。

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)

1. Naoko Goto-Inoue, Akihiko Kashiwagi, Keiko Kashiwagi and Tsukasa Mori. Metabolomic approach for identifying and visualizing molecular tissue markers in tadpoles of *Xenopus tropicalis* by mass spectrometry imaging. *Biology Open* 査読有り (2016) 5, 1252-1259 doi:10.1242/bio.019646.

[学会発表](計 3件)

1. Tsukasa Mori, Yoichiro Kitani, Naoko Goto-Inoue, Yukio Yanagisawa
Exposure to a predation fear induced dynamic changes of signal transductions in the brain of *Xenopus* tadpole. The 87th Annual Meeting of the Zoological Society of Japan. 14-19 (17-18) November, 2016. Okinawa Convention Center (沖縄・宜野湾市)

2. Ryuhei Minei, Tsukasa Mori, Atsushi Ogura
Comparative brain transcriptome analysis of

predator-specific morphological changes in *Rana pirica* tadpoles. The 87th Annual Meeting of the Zoological Society of Japan. 14-19 (17-18) November, 2016 Okinawa Convention Center (沖縄・宜野湾市)

3. Tsukasa Mori

“Dynamic Changes in Signal Transduction in the Brains of *Xenopus* Tadpoles under Exposure to a Predation Fear”

International Meeting on Aquatic Model Organisms for Human Disease and Toxicology Research 招待講演

March 18 (Fri)-19, at Okazaki Conference Center 2016, (愛知県・岡崎市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

森 司 (MORI, Tsukasa)

日本大学・生物資源科学部・教授

研究者番号: 60241379

(2) 研究分担者

早川 智 (HAYAKAWA, Satoshi)

日本大学・医学部・教授

研究者番号: 30238084