

ウルトラディアンリズムを制御する神経基盤および分子基盤の解明

Neuronal and Molecular Basis underlying Ultradian Rhythms in Planarian

(日本動物学会推薦)

代表研究者 鳥取大学 井上 武 Tottori University Takeshi INOUE

Biological rhythms are prevalent in the organisms, with the underlying mechanisms being widely conserved. However, the mechanisms regulating ultradian rhythms, which are periodic movements that occur on a timescale of several hours and play a role in various physiological functions such as, homeostasis, cardiovascular system, and metabolism, remain largely unexplored. Planarians belong to an early branching bilateral group of organisms with a simple, nevertheless sophisticated brain and exhibit ultradian rhythms through spontaneous activity and rest cycles without external stimuli. In this study, we investigated the neural basis and molecular mechanisms regulating the ultradian rhythm of spontaneous movement in the planarian *Dugesia japonica*. Results showed that their locomotion does not adhere to a circadian rhythm but displays multiple cycles in ultradian rhythms (approximately 30, 60, 90, and 120 minutes). In addition, our results suggest that integrating ultradian rhythm periodicity and environmental information in the brain leads to doubling, tripling, or quadrupling the basic 30-minute ultradian cycle, resulting in a longer cycle. Our RNA-seq data showed that planarians lack conventional clock genes; instead, they rely on novel factors to regulate the ultradian rhythm. These findings suggest that phase synchronization of circadian rhythms may be achieved through mechanisms that extend ultradian rhythms via environmental factors.

研究目的

概日リズムをはじめとする生物リズムは、ほぼすべての生物に存在し、その基本的なメカニズムも広く保持されている。概日リズムの周期は24時間であり、概月リズムは1ヶ月、概年リズムは1年である。このような長周期の生体リズムは、全て地球環境に適応したものである。では、どのようにして地球環境に適応したのだろうか？

ウルトラディアンリズムは、数十分から数時間単位で生じる短期的な生物リズムである。かつては概日リズムにおけるノイズと考えられていたが、現在では、真核微生物から哺乳類まで、ほとんどの生物のあらゆるレベルの生命プロセスで見られる現象として認識されている。ウルトラディアンリズムは、環境情報を遮断しても、中枢時計である視交叉上核の時計遺伝子を阻害しても持続するため、行動や環境によって生成されるのではなく、自律的に生成されることや概日リズムに関連する中枢時計とは別の

振動子によって生成されていることが示唆されている。さらに、ウルトラディアンリズムはタンパク質の合成、酵素の活性、体温、酸素消費量、血圧、ホルモン分泌、消化、睡眠の位相などでウルトラディアンリズムが発現しており、これら多くの生理的サイクルと個体の休止・活動サイクルが同様の周期性で発生している。これらの事実は、体内システム全体にわたってウルトラディアンリズムを調節する新たな振動子が存在することを意味している。しかし、その振動子の実体や調節機構についてはまだ明らかになっていない。内因性のリズムが地球環境に適応するための鍵は、脳の獲得にあると考えた。つまり、進化の過程で脳が獲得されたことによって、環境情報を脳に集約し、全身の調節が可能になったと推測した。

プラナリアは、動物進化の初期に脳を獲得した種と密接に関連していると考えられており、その脳は、動物の脳のプロトタイプとされている。したがって、

プラナリアの解析により、内因性リズムを駆動する機構が地球環境の周期にどのように適応したのか、またウルトラディアンリズムを駆動する普遍的な機構が何であるのかを明らかにすることが可能であると考えられる。さらに、プラナリアは外部刺激に依存せず、自律的に活動と休止を繰り返すウルトラディアンリズムを示すが、その詳細な運動の特性や制御機構はまだ明らかにされていない。

本研究では、プラナリア (*Dugesia japonica*) の自発運動におけるウルトラディアンリズムの特性と、その制御機構を明らかにすることを目的としている。具体的には、まずウルトラディアンリズムにおける活動と休止の繰り返しパターンと環境刺激との関連を詳細に調査した。次に、活動期と休息期にある個体の脳から RNA を抽出し、RNA-Seq 解析を実施した。これにより、活動期と休息期における発現変動する遺伝子を解析した。

研究経過

1. プラナリアにおけるウルトラディアンリズムは内因性の振動子により駆動される

まず、本研究ではプラナリアのウルトラディアンリズムの運動を詳細に解析した。解析に際しては、12 時間毎の明暗サイクル (12L/12D) に同調させた個体を用い、恒暗 (24D) 条件下で 1 個体ずつに分けて

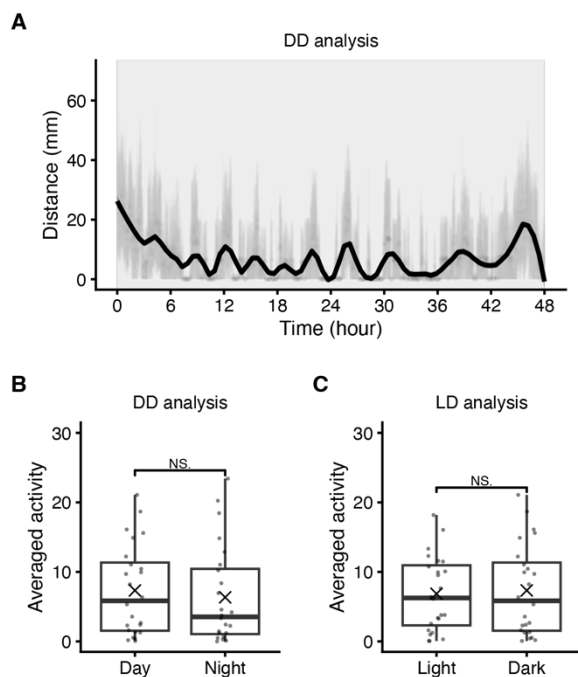


図 1. プラナリアのウルトラディアンリズムの自発運動。(A) 恒暗条件下での周期運動。(B) 昼時間帯と夜時間帯の運動量の差。(C) 明暗サイクル条件下での明期と暗期の運動量の差。

48 時間 1 分毎にその動きを追跡した。その結果、プラナリアは外部からの刺激がないにも関わらず、活動と休止の期間が交互に現れることが確認された (図 1A)。

次に、観察された運動が環境のサイクルとどのように関連しているかを調べるため、12 時間毎の明暗サイクル条件下での活動量を明期と暗期で比較した。しかし、明期と暗期での活動量には差が認められなかった (図 1B)。恒暗条件下において、昼時間帯と夜時間帯とを仮定して比較した場合にも、活動量には違いが見られなかった (図 1C)。明暗サイクル条件下および恒暗条件下でのプラナリアの運動について様々な比較を行ったが、いずれのケースでも差異は認められなかった。これらの結果から、プラナリアの自発運動は環境の光刺激や周期とは独立し、概日リズムとは別の内因性のメカニズムによって制御されていることが示唆された。

2. 脳がウルトラディアンリズムを駆動している

プラナリアの卓越した再生能力を利用して、脳とウルトラディアンリズムにおける自発運動との関連性について解析した。頭部を切断した個体が、再生過程において、どのように自発運動を回復していくのかを検討した。その結果、再生後 1 日目から 5 日目までは活動はほぼ消失していたが、再生 7 日目からは数分間程度の周期性を持つ自発運動の回復が始まり、観察することができた。再生 9 日目には、個体の約 9 割で数十分から 1 時間程度の断続的な活動と休止を繰り返す周期性自発運動が観察された。頭部の再生日数と周期性自発運動の回復を、1 分当たりの移動距離の頻度と活動量で比較した。頭部再生後 1 日目から 5 日目までは 1 分間に長距離を移動する活動はほとんど見られず、頻度は低かった。しかし、長距離の活動が検出されるようになるのは 7 日目からであり、全体として長距離の活動の頻度の回復は再生 9 日目から見られた。活動量については、頭部再生後 9 日目には正常個体と有意な差が見られなくなった。これらの結果から、プラナリアの周期性自発運動は頭部再生後 9 日目以降に回復することが示唆された (図 2A)。

さらに、RNAi 法を用いて、シナプス小胞の放出に必要なシナプトタグミンをコードする遺伝子の発現を脳特異的に阻害した個体を作成し、その個体を用いてウルトラディアンリズムの自発運動を解析した。

その結果、コントロール個体は正常個体と同様の周期性自発運動を示したが、脳機能を障害した個体では、周期性自発運動の頻度が低下し、また長距離移動の頻度も低下した (図 2B)。以上の結果から、ウルトラディアンリズムの自発運動が脳によって制御されていること、そしてその振動子が脳内に存在する可能性が示唆された。

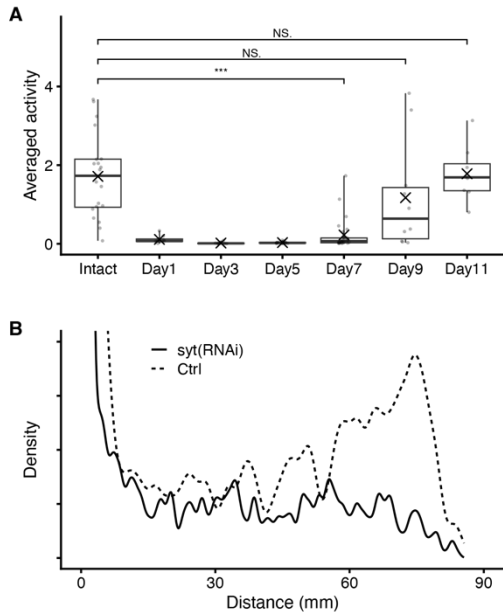


図 2. 脳が自発運動を駆動する。(A) 頭部再生過程における自発運動の回復過程。(B) syt (RNAi) による脳の活動抑制個体における自発運動。

3. 環境刺激を脳で統合して内因性のウルトラディアンリズムを長期化する

ウルトラディアンリズムの周期時間を解析したところ、複数の時間 (約 30 分、60 分、90 分、120 分) を示し、特に、30 分を基本とした倍数の時間が確認された。周期時間と環境刺激の関連を解明するため、長期間 (2 ヶ月以上) 恒暗条件で飼育されたプラナリアを用いて、再度、明暗サイクル (12L/12D) 条件下あるいは恒暗 (24D) 条件下で 48 時間観察した。その結果、恒暗条件下で飼育・観察したプラナリアでは、約 30 分の周期が残る一方で、60 分以上の周期は徐々に消失することが観察された (図 3A)。しかし、恒暗条件で飼育した個体を明暗サイクル下で観察した場合、長周期の運動が再現することが確認された。この結果は、長期間光刺激が無い状態では、長周期の運動が低下するものの、一度光刺激が入るとその活動が再び活性化することを示唆している。このことから、環境刺激が基本周期である 30 分の運

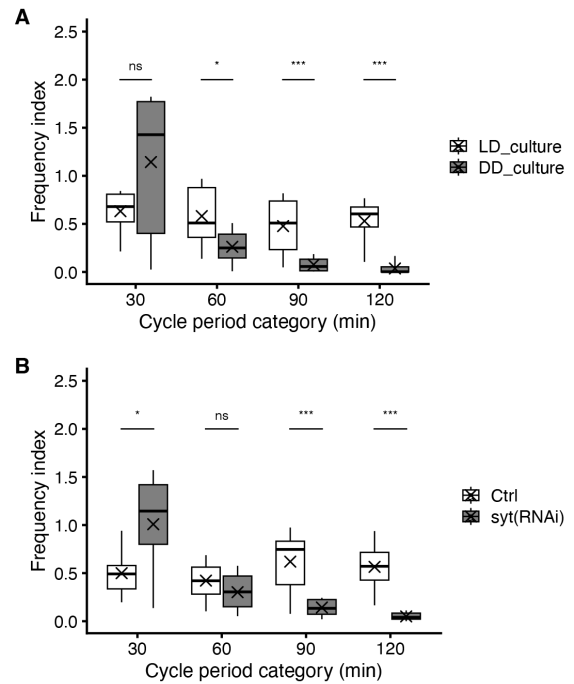


図 3. 環境刺激を脳が統合して自発運動を倍数化する。(A) 明暗サイクル (LD) 飼育と恒暗飼育 (DD) による周期時間の出現頻度。(B) syt (RNAi) による脳の活動抑制個体における周期時間の出現頻度。

動を倍数化し、より長期化させる可能性があることが示された。さらに、周期時間に焦点を当てて、RNAi 法を用いてシナプトタグミン遺伝子を脳特異的に阻害した個体の解析を行った。その結果、神経活動が阻害された個体では約 30 分の運動が見られた一方で、長時間の運動の頻度は低下していた (図 3B)。これらの結果から、自律的な周期と環境情報が脳内で統合され、基本的な約 30 分の周期が倍数化して長周期化するメカニズムが存在することが示唆された。

4. ウルトラディアンリズムを駆動する分子の探索

活動期と休止期のプラナリアの脳から RNA を抽出し、周期性自発運動を制御する遺伝子を網羅的に探索した。まず、1 時間以上休止状態にあった個体が活動を開始し、その 10 分後を活動初期と定義した。同様に、1 時間以上活動した後、休止状態に移行し、その 10 分後を休止初期と定義した。それぞれの時点で個体を回収し、氷冷麻酔を速やかに施した後、脳を含む頭部と脳を含まない体幹部に分割した。頭部断片から RNA を抽出し、それを元に RNA-Seq 解析を行った。活動初期、休止初期のそれぞれから 10 個体ずつを回収し、切断片を 1 つのサンプルとした。これにより、各状態で独立に 3 つのサンプルを得た。各サンプル間の遺伝子発現を比較し、体幹部よりも頭部で高発現している分子の中から、活動初期と休止

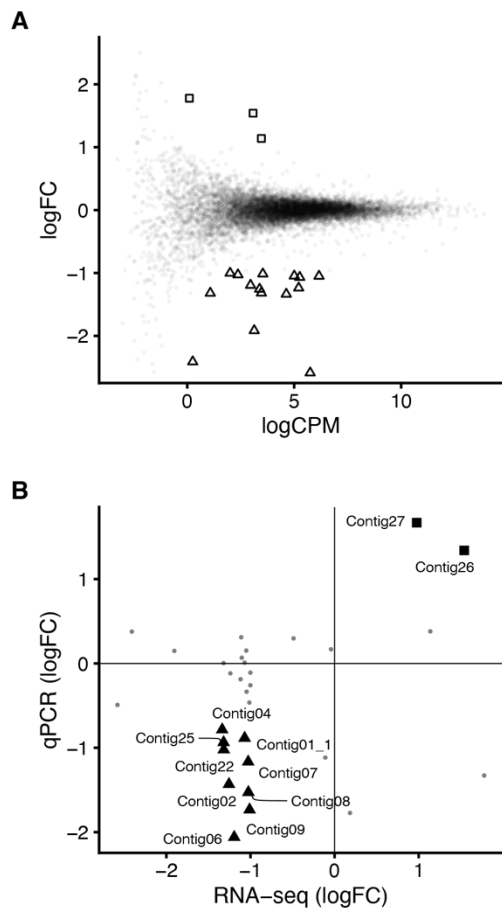


図4. RNA-seq 解析. (A) 活動初期(△)と休止初期(□)の MA プロット. (B) RNA-seq 解析と qPCR 解析の再現性検証.

初期で発現変動が大きく、活動期と休止期で相反する発現変動を示す分子を探索した。詳細にスクリーニングした結果、活動初期の方が休止初期より発現量が高かった遺伝子が 15 遺伝子、休止初期の方が活動初期より発現量の方が高かった遺伝子は 3 遺伝子を得た (図 4A)。

発現量の再現性を検証するために、得られた 33 遺伝子について、リアルタイム PCR による解析を行った。その結果、活動初期の方が休止初期より発現量が高かった遺伝子について 9 遺伝子、休止初期の方が活動初期より発現量の方が高かった遺伝子について 2 遺伝子が RNA-Seq 解析と高い再現性のある発現パターンを示した (図 4B)。現在、11 遺伝子の詳細な時空間的発現パターンを解明するための解析を進めている。同時に、これら遺伝子の機能解析も行っている。

考察

すべての生物には、概日リズム (サーカディアンリズム) を始めとするさまざまな時間スケールの生

体リズムが存在する。だが、その生体リズムの起源は何であったのだろうか？

脳を持たないヒドラ (刺胞動物) は、20~30 分間隔のウルトラディアンリズムで行動の休止・活動を繰り返すことが報告されている。また、ヒドラのゲノム中には主要な時計遺伝子が見つかっていない。これらの事実から、進化の初期段階における生体リズムはウルトラディアンリズムであったのではないかと考えられる。例えば、多くの動物が概日リズムを示すよりも前の個体発生の段階では、ウルトラディアンリズムを示すことが分かっている。さらに、ヒトでも胎児期や乳児期には覚醒・睡眠周期や摂食周期が 2~4 時間であるという事実がよく知られている。これらのことから、生体リズムの起源はウルトラディアンリズムであり、そこから概日リズムなどの長周期リズムが派生した可能性が考えられる。この仮説が正しいと仮定するならば、長周期リズムの位相応答の機構も説明することが可能になる。つまり、長周期リズムを構成する各ウルトラディアンリズムを調節することにより、全体を素早く調整することが可能になる。このコンセプトは、哺乳類の視交叉上核の中核時計の神経細胞が電氣的にサイレンシングされたり、細胞が個々に分離されたりした場合でも分子時計活動は維持するが同期性が失われるという報告、また視交叉上核での時計遺伝子 (Per1、Per2、Bmal1) の発現が概日リズムに重なる約 3 時間のウルトラディアンリズムとして変動するという報告など、多くの研究結果からも支持されている。

本研究では、プラナリアにおいて、複数の周期時間 (約 30 分、60 分、90 分、120 分) のウルトラディアンリズムを示すことが分かった。さらに、環境同調因子を除去したり、RNAi 法を用いて脳の神経活動を阻害したりすると、約 30 分の最も短い周期だけが残り、60 分以上の長い周期は消失することが観察された。これは、ウルトラディアンリズムの周期情報と環境情報を脳で統合することで、約 30 分の基本周期を倍数化して長周期化していることを示唆している。また、プラナリアのゲノムには Period や Clock といった時計遺伝子が存在しないため、周期の長周期化は概日リズムとは異なる機構によって調節されている可能性が示唆される。加えて、本研究で実施した RNA-Seq 解析においても、Bmal1 など、プラナリアのゲノムに存在する遺伝子の発現変動は認められなかったこととも一致する。

以上のことに基づいて、高等動物においては視交叉上核に位置する中枢時計単独で概日リズムを維持しているわけではなく、ウルトラディアン型の新規脳内振動子からの信号入力を得ている可能性が推測される。さらに、環境因子によるウルトラディアンリズムの長周期化メカニズムにより、生体リズムの位相同期が達成され、このことにより生体の各種生理機能が最適化されると推測される。将来的に、プラナリアにおけるウルトラディアンリズムを制御する神経基盤及び分子基盤が明確になれば、生物リズムの進化過程を理解する可能性が高まるとともに、生体時計の異常に起因する疾患の治療にも寄与することが可能になると期待される。

研究の発表

口頭発表

1. 澤本美香, 梅園良彦, 井上武, "プラナリア咽頭における摂食調節に関わる神経細胞種同定", 日本動物学会第92回大会, 2021年9月
2. 宇島金太郎, 能登翔大, 青沼春花, 阿形清和, 松尾聡, 井上武, "プラナリアの匂い定位行動に関する定量的解析", 日本動物学会第93回大会, 2022年9月
3. Takeshi Inoue, Kiyokazu Agata, Satoshi Matsuo, "The integrated understanding of the brain function - Lesson from the planarian possessing the basic design of the brain-", 日本生理学会第100回記念大会, 2023年3月

誌上発表

1. Inoue T, Agata K (2022) Quantification of planarian behaviors. *Dev. Growth Differ.* 64: 16-37