

## 初期新口動物ウニの GABA 作動性神経系の構造と その形成機構：幼生から成体まで

### [1] 組織

代表者：清本 正人

(お茶の水女子大学 湾岸生物教育研究センター)

対応者：小椋 利彦

(東北大学加齢医学研究所)

分担者：

加藤秀生 (東北大学名誉教授)

研究費：旅費 36,000 円 設備使用料 64,000 円

### [2] 研究経過

ウニが属する棘皮動物門は初期新口動物として、ヒトに至る動物進化系統樹に属している。ウニ胚及び幼生の構造は比較的単純でありながら、2006年に終了したゲノムプロジェクト後に進められている annotation 作業により 1,000 近くの脊椎動物の神経形成遺伝子と構造的、機能的に共通する遺伝子の存在が明らかとなっている (Burke et al, 2006; SpBase, <http://www.spbase.org/SpBase/search/>)。この点から、神経発生を含む種々の形態形成機構の分子生物学的解析モデルとして、より複雑な脊椎動物に対する類似解析に優れて貢献できるとする理解が欧米の研究者に強く認識され、ウニ胚、幼生の神経形成研究が近年特に注目されてきている。本研究はウニゲノムプロジェクトの成果に立って、近年我々が明らかにしてきた、幼生の GABA 神経系の存在とその構造と機能の解明を基に、成体にいたるまでの形成過程を明らかにすることを目的とする。手法は我々が開発してきたウニ神経特異抗体を中心とする全胚免疫組織化学解析と関連する特異 RNA をプローブとして whole mount fluorescence *in situ* hybridization を用いる。

本研究は研究代表者と分担者が夫々の研究室で実験・調整した試料を加齢医学研究所の共通機器管理室に持ち寄り、小椋教授と事前打ち合わせをし、TCS SP8 共焦点レーザー顕微鏡観察とそのデータの AVIZO による 3D 解析を行う形で実施した。

### [3] 成果

(3-1) 研究成果

本年度は、以下に示す研究成果を得た。

まず第1に、GABA 及び GABA 合成酵素 (glutamate decarboxylase: GAD)、GABA<sub>A</sub> 受容体等への抗体を用いて、変態前の成体原基から変態後の稚ウニまでのこれら抗原の発現動態を解析した。受精 45 日後の 8 腕プルテウス幼生の成体原基の周辺には GAD 発現繊維のネットワークが密に形成され、その一部は成体原基内に入り込み、幼生神経系が成体神経系と繋がっている (図1)。

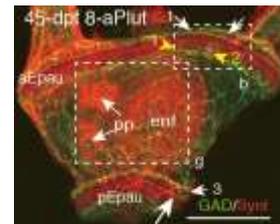


図1.白線は 100 μm。GAD 神経繊維 (緑)。

さらに、成体原基の 5 本の一次管足 (Primary podia; PP) の管壁には GAD, GABA<sub>A</sub> 受容体タンパク (GABA<sub>A</sub>R) (図2)、トロポミオシンが現れる。このすぐ後の変態 3 日後の稚ウニでは PP はシナプトタグミン発現神経繊維層がトロポミオシン層の外側に、その更に外側に GABA<sub>A</sub>R が、最外層には GABA が認められる (図3)。

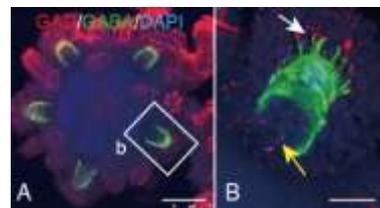


図2.稚ウニ管足。(A) 5本のPP (緑)。白線は 25 μm, (B) (A)の四角(b)の AVIZO 解析像。白線は 20 μm。GAD (赤)。

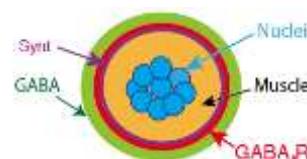


図3. 稚ウニ一次管足断面模式図。

### 「様式3」

稚ウニは5本のPPを使って、活発に歩き回ることができるが、GAD機能阻害3-MPA処理はこの運動を可逆的に阻害する。しかし、3-MPA処理を受けたPP内トロポミオシン層に近接しているGABA免疫反応は減少しない。一方、PPに入り込んでいるシナプトタグミン発現周口神経環からの放射神経繊維に近接してGABAを強く発現する別の放射神経（GABA放射神経）とこれが口の周りで環状回路を形成するGABA周口神経環を発見した。

AVIZO解析像によると、PPのGABA<sub>A</sub>R層とGABA層の間には稚ウニ体中央にある周口GABA神経環から伸びるGABA放射神経が入り込んでいる[図4、5A]。この部分のGABA免疫反応は3-MPA処理で大きく減少するが(図5B)、3-MPAを除去すると稚ウニの運動活性とGABA免疫反応が回復する。このことから、稚ウニのPP運動は周口GABA神経環とGABA放射神経が関与していると推測できる。

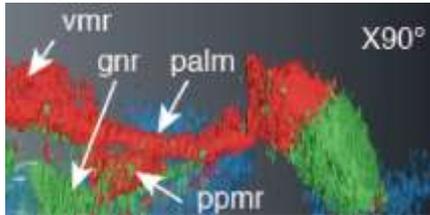


図4. 一次管足AVIZO処理像。GABA(緑)。トロポミオシン(赤)。

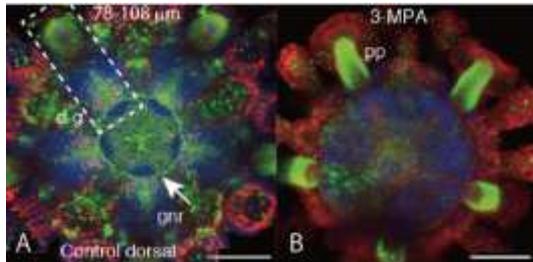


図5. 稚ウニ一次管足。(A) 正常個体。(B) 3-MPA処理個体。GABA(緑)。トロポミオシン(赤)

以上、GABA周口神経環とGABA放射神経は管足運動制御に関わっていることを明らかにした。これは変態後セロトニン神経系がなくなることから、謎とされてきた稚ウニの運動の神経制御にGABA作動性神経系が深く関わっていることを示した最初の報告となる。

第2に、GABA神経系に、セロトニン神経系に見られるような、中枢構造または神経節構造があるか否かを解明することである。これまでの観察からは細胞体が集積している構造は見当たらない。これは、GAD細胞が分化多能性中胚葉起源であること

(Katow et al, 2014)を考慮すると、脊椎動物の神経冠細胞のように、GABA神経系は末梢神経系的な機能を持っていると考えられる。

#### (3-2) 波及効果と発展性など

本研究の成果は幼生から稚ウニへと変態を超えて存在するGABA神経系が運動制御に深く関わっていることを明らかにしたことにある。幼生では神経節を持つセロトニン神経系が繊毛運動制御を通じて幼生の遊泳運動を制御するが、この神経系は変態によって消失する。一方、変態後の稚ウニは幼生よりも長い期間種々の環境変化に適切に対応しながら生存する。これがどのような神経系によって可能であるのかこれまで謎であった。今回のGABA神経系の発見とその機能解析の成果は更なる多様な神経系の存在と関与を予想させる。このことは脊椎動物の神経系研究に重要な知見をもたらせ得る有用なモデル動物の出現を意味している。

まさに新しい研究領域の開拓(萌芽的研究の発見)に結びつき、今後の発展が期待されている。

#### 引用文献

- Burke et al. A genomic view of the sea urchin nervous system. *Developmental Biology* 2006; 300: 434-460.
- Katow et al. Mesomere-derived glutamate decarboxylase-expressing blastocoelar mesenchyme cells of the sea urchin larvae. *Biology Open* 2014; 3: 94-102.

#### [4] 成果資料

##### 学会発表

- (1) Katow, H., Katow, T., Ooka, S., Abe, K., Zamani, A., Kiyomoto, M., Yoshida, H. (2014) Structure and role of GABAergic nervous system in locomotion of sea urchin juvenile. *Comparative Physiology and Biochemistry* 2014; 31(4):158. (Abstract of 2014 ICN/JSCP Meeting, Sapporo, July 22-26)
- (2) 加藤秀生、加藤知子、阿部幸喜、大岡嗣欧、清本正人、吉田裕美 (2014) Unc-5/Netrin 相互作用制御によるウニ幼生 GABA 作動性体表神経回路パターン形成。第84回日本動物学会大(仙台; 平成26年9月11日-13日)

#### 論文

現在国際誌への投稿を準備中。