

課題番号 34

# 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：物件費 11 万 6 千円，旅費 3 万 4 千円

## [2] 研究経過

ヒトに至る初期新口動物を構成する棘皮動物では感覚神経系は受容器を含めてほとんど解明されていない。これまでの一連の本研究から、ウニ幼生の GABA 神経系は感覚器官の一部を構成している可能性が示され、海外の研究者からも棘皮動物感覚神経系の詳細な解明への期待が表明されるようになった。今年度は本研究の第2年度に当たり、以下の3項目を目的とする研究を行った。

- (1) 免疫組織化学解析を中心とする GABA 作動性神経節の存在の検証。
- (2) 透過型電子顕微鏡(TEM)観察と免疫組織化学観察を対照しながら解析する GABA 作動性神経系(GABA 神経系)のシグナル伝達構造の解明。
- (3) Caged-morpholino antisense oligonucleotide (C-MASO)による GABA 神経系の機能解析の開始。この項目は本研究中に明らかとなった幼生体表面の GABA 神経系での光受容タンパク、エンセファロブシン(ECPN: AB458218; Ooka et al, 2010)の同時発現を基に、バフンウニ ECPN 遺伝子の特定発生段階におけるノックダウンを 特定波長の UV 照射で活性化する C-MASO を用いて実施し、その結果を免疫組織化学による同タンパク発現解析と行動解析で評価した。

本研究の実施研究代表者と分担者が各々の研究室または、分担者が代表者の研究室において実験と試料作成を行い、さらに、分担者が TEM 像解析を行

い、加齢医学研究所の共通機器管理室の TCS SP8 共焦点レーザー顕微鏡観察と共に画像解析ソフト Amira による 3D 像作成と解析を加えながら、小椋教授と打ち合わせを適宜行って実施した。

## [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、本研究において GABA 神経節構造は幼生体内には認められなかった。また、幼生の口葉先端部にはシナプトタグミン (SynT) を発現するセロトニン神経節があり、初期の2腕プルテウス幼生期には2本の幼生腕の付け根にも左右一対の体側神経節内に SynT 発現細胞群現れるが、これらの神経節にも GABA 発現細胞は検出されなかった。

第2に、幼生の主要な運動器官である繊毛帯は幼生の口周辺(口側上皮)から幼生腕に沿って存在し、GABA 合成酵素 (glutamate decarboxylase, GAD) を発現する細胞群が直鎖状に配置される (GAD 発現細胞線条体, GADC-S; Katow et al, 2013)。今回 GADC-S が繊毛上皮細胞に接して口側上皮側に存在することを明らかにした (図1)。

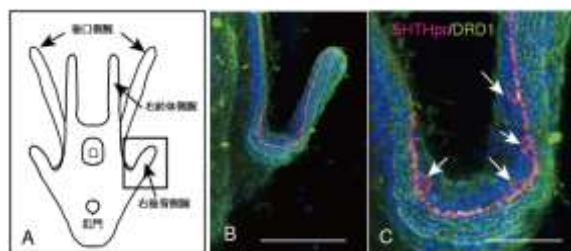


図1 繊毛帯に沿った GADC-S の共焦点レーザー顕微鏡像。(A)反口側から見た6腕プルテウス幼生の模式図。(B) (A)の四角で囲った後背側腕部分の共焦点レーザー顕微鏡像。(C) (B)の拡大図。

今回の多重免疫組織化学像解析は GADC-S が繊毛上皮に接して幼生腕長軸に沿って位置することを示した (図2A)。さらに、TEM 像の連続切片から構築した Amira 3D 像から、GADC は口側扁平上皮細胞と繊毛上皮細胞の間にその上端面を体表に表して配置されている (図2B-D、矢印)。

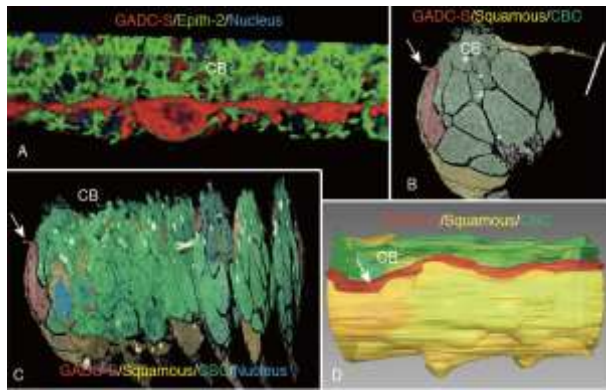


図2 Amira 画像処理による後口側腕部分 (図1A) の GADC-S (赤) の三次元構築像。(A) 三重染色免疫組織化学の共焦点レーザー顕微鏡光学切片の Amira 像。(B) 後口側腕の GADC-S を含む厚さ 110 nm の横断面 TEM 像。人為的に部域着色を施している。(C) (B) を含めた TEM 切片を重ね合わせた立体像。各切片の間隔は 4 $\mu$ m。(D) (C) を Amira 画像処理で smooth 処理して立体構築した像。CB; 繊毛帯。(B)-(D) の矢印; GADC-S。

また、TEM 観察では GADC-S 細胞は隣接する繊毛帯細胞との間に接着結合構造(Adherens junction, AJ)を形成していた。

第3にバフンウニ ECPN 遺伝子(*Hp-ecpn*; Ooka et al, 2010)をノックダウンする C-MASO の一種 Photo-MASO を受精直後の卵に顕微注入し、GADC-S 形成直前に UV 照射をして活性化させた実験では、GADC-S での ECPN タンパク発現は免疫組織化学的には検出されなかった。同時に ECPN の制御を受けている幼生の遊泳運動は正常幼生では青色に対して正の走光性を示すが、これが著しく減少した。一方、赤色光への反応に有意な減少は認められない (図3)。

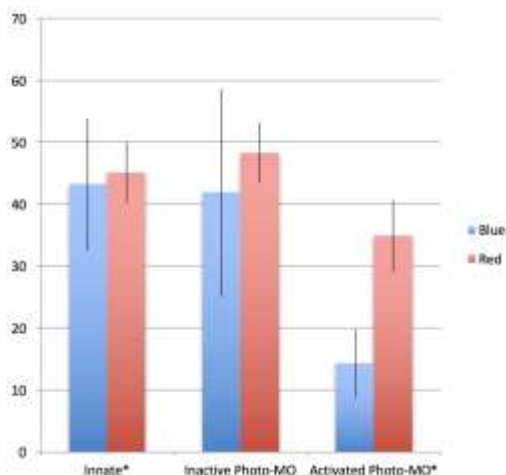


図3 幼生走光性解析。青色棒; 青色光への正の走光性を示した幼生の割合 (%)。赤色棒; 赤色光への正の走光性を示した幼生の割合。Innate; Photo-MASO を

注入していない正常幼生群。Inactive Photo-MASO; UV 照射をしない陰性対照幼生群。Activated Photo-MASO; UV 照射した Photo-MASO 活性化幼生群。各棒の縦線は標準誤差を示す。グラフ縦軸は%を示す。

したがって、GADC-S に発現する ECPN は隣接する繊毛帯の青色光に反応する繊毛運動制御に関わっていると考えられる。このとき、AJ 周辺に存在する幾つかのシグナル伝達物質の関与が予想される。

### (3-2) 波及効果と発展性など

本共同研究で GABA 神経系がウニ幼生の繊毛運動制御に関与する可能性が示されたことは新口動物進化における本神経系の構造的、機能的理解を促進するモデル生物としてウニ幼生が貢献できることを示している (Katow, 2015)。これにより、初期新口動物モデルを用いた神経系進化の解明という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

- Ooka et al. Spatiotemporal expression pattern of an encephalopsin orthologue of the sea urchin *Hemicentrotus pulcherrimus* during early development, and its potential role in larval vertical migration. *Develop Growth Differ*, 2010; 52: 195-207.
- Katow et al. Development of the GABA-ergic signaling system and its role in larval swimming in sea urchin. *J Exp Biol*, 2013; 216; 1704-1716.

### [4] 成果資料

#### 学会発表

- (1) 加藤秀生、加藤知子、吉田裕美、清本正人、大岡嗣政、阿部幸喜、上村伊佐緒 (2015) ウニ幼生の GABA 作動性神経性回路の構造解析。第 85 回日本動物学会大会 (新潟; 平成 27 年 9 月 17 日-1 日)

#### 発表論文

- (1) Katow H. Evolution and adaptation of tissue barriers: The quest for new models and mechanisms. Mechanism of the epithelial-to-mesenchymal transition in sea urchin embryos. *Tissue Barriers*, 2015; 3;4 e1059004-1-23.
- (2) Katow H, Katow T, Yoshida H, Kiyomoto M, Uemura I. Immunohistochemical and ultrastructural properties of the ciliary band-associated strand of glutamate decarboxylase-expressing cells in the sea urchin *Hemicentrotus pulcherrimus*. (投稿準備中)