

課題番号 5

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
 (お茶ノ水女子大学 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5万8千円、旅費 5万1千円

[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^{1,2}、2016年の国際動物会議(沖縄)においてもGABA神経系がウニ幼生の主要な神経系であることが他の研究者たちから表明されるに至っている。今年度は本研究の第3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)ウニ幼生は青色光(461-473 nm)に正の走光性を示すが、遊泳運動を開始してから、変態して着床するまでの反応性に变化があるか否かは不明であった。そこで、発生段階によって走光性に变化があるか否かを明らかにする。(2)ウニ幼生は光受容タンパク、エンセファロプシン(ECPN)を発現しているが、ECPNが青色光受容を担っているか否かをこの遺伝子をノックアウトして明らかにする。(3) 幼生におけるECPN発現部位(光受容器)及びECPNからの受容信号の伝達経路を解明する。

本研究の遂行は実施研究代表者と分担者が各々の研究室において実験と試料作成を行い、分担者が加齢医学研究所共通機器管理室の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像作成と解析を行い、適宜小椋教授とメールまたは面接

によって打ち合わせを行い実施した。以下、研究活動状況の概要を記す。

[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、青色光に対する正の走光性は図1Aにまとめたように、発生の進行にしたがって強化され、変態が始まる8腕プルテウス幼生期に極大になる。しかし、それより若い発生段階に注意すると2つの境目が認められる。最初の大きな変化はプリズム幼生からプルテウス幼生に移行するとき(図1B)次いで、4腕プルテウスから8腕プルテウスに移るとき(図1C)である。

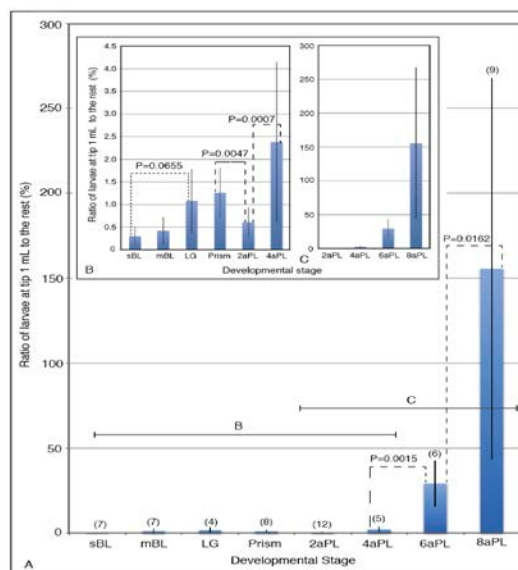


図1 発生段階による青色光への正の走光性上昇。

第2に ECPN が幼生のどこで強く発現しているかを免疫組織化学によって観察すると、主要な運動器官である繊毛帯(CB)に沿って存在する GABA 合成酵素 GAD を発現する細胞からなる繊毛帯随伴線状体 (CBAS) であることが分かった。ECPN 発現を紫外線で活性化させる Photo-ECPN morpholino を顕微注入した幼生では、この部位での ECPN の発現が著しく阻害され(図2; 4-6)、幼生の正の走光性は有意に減少した(図3; Activated MASO)。

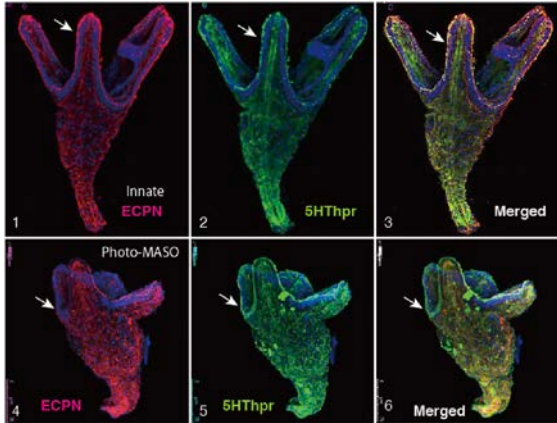


図2 Photo-ECPN morpholinoによるECPN遺伝子のノックダウンはCBAS(矢印)でのECPN発現を抑制する。(1-3)正常幼生。(4-6) Photo-morpholino注入幼生。CBASはセロトニン受容体(5HTHpr)を発現。

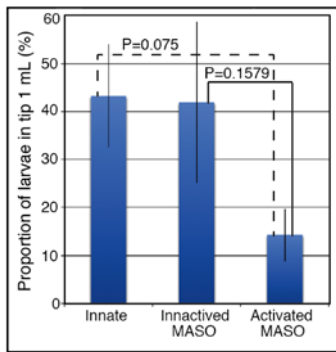


図3 Photo-morpholinoによるECPN遺伝子のノックダウンによる青色光への正の走光性の減少。

したがって、幼生が示す青色光への反応にはCBAS中のECPNタンパクが関わっていると考えられる。

第3にECPNがどのようにCBへシグナルを送っているかをCBASに存在するGADの分布形態から調べた。免疫組織化学によるとGADはCBAS内ではpuncta構造を伴っていた(図4、1-2,矢印)。GABA作動性神経細胞内には数種のシグナル伝達タンパクがPDZドメイン構造を持つTjp1に結合してpunctumを形成する³。ウニのゲノムデータ検索からPDZドメイン(Glu³⁴-Leu¹²⁴)を持つTjp1遺伝子の存在が認められた²ことから、本研究期間に抗ウニTjp1抗体を作成し、免疫組織化学に用いた。その結果CBAS中にGADと一緒にこのタンパクの存在が観察された(図4、3,4)。さらに、Tjp1発現CABSとCBの基底側にGABAが検出され(図4 5-6)、GABA A受容体(GABA_AR)がCB内に発現していた(図4、9)。さらに、このpunctaには神経分泌機能を持つSynaptophysinも含まれて

いる²ことから、ウニCBの運動性制御はCBAS中でTjp1が仲介するGABA作動性神経信号伝達タンパク群のpunctum構造に担われていると考えられる。

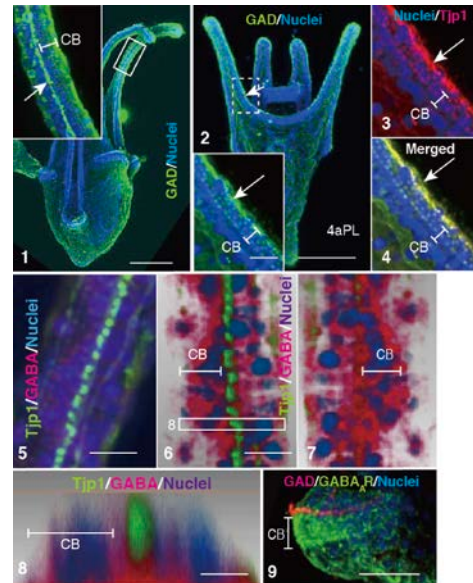


図4 CBASに発現するTjp1とGAD及びGABAとGABA_ARが発現しているCB域。(1)6腕ブルテウスのCBASに発現するGAD。(2)4腕ブルテウスCBAS発現するGADとTjp1。

(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proteomicな構造が明らかとなり、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重要な位置にあることが示された。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として(萌芽的研究の発見)2016年の国際会議でも認識され、今後さらなる発展が期待される。

引用文献

- (1) Katow, H., Katow, T., Yoshida, H., Kiyomoto, M & Uemura, I. (2016). Immunohistochemical and ultrastructural properties of the larval ciliary band-associated strand in the sea urchin *Hemicentrotus pulcherrimus*. *Frontiers in Zoology* 13:27 DOI 10.1186/s12983-016-0159-8.
- (2) Hideki Katow, Tomoko Katow, Hiromi Yoshida, Isao Uemura and Masato Kiyomoto (2017) Tjp1 and GABAergic signaling system expression pattern during the larval ciliary band-associated strand (CB) formation in sea urchin. (投稿中)
- (3) Hartssock, A & Nelson, WJ. (2008). Adherens and tight junctions: structure, function and connections to the actin cytoskeleton. *Biochim Biophys Acta* 1778: 660-669.

[4] 成果資料

論文発表 引用文献(1), (2)と重複