

バフンウニ幼生におけるアセチルコリン神経の発生

鎌田 真衣 (筑波大学 生物学類) 指導教員: 谷口 俊介 (筑波大学 生命環境系)

【背景・目的】

ウニやヒトデを含む棘皮動物は、成体を採集しやすく配偶子も大量に確保できるため、古くから発生生物学や細胞生物学の研究材料として利用されてきた。その中でも代表的なモデル生物であるウニの胚・幼生を用いて、神経外胚葉領域の特異化や神経細胞分化の分子メカニズムに関する研究が近年数多く報告されるようになった[1, 2]。しかし一方で、各種の神経が実際にどのような機能を果たしているのかについてはあまり報告されていない。これまで解読されたウニのゲノム上には、セロトニン、アセチルコリン、ドーパミン、ノルアドレナリンなどの神経伝達物質を合成したり代謝したりする酵素の存在が確認されているが、それぞれの神経系やその支配下の組織・器官が幼生の発生・成長過程にどのような影響を及ぼすのかは不明のままである。この疑問を解決するためには、まず各神経伝達物質を合成・分泌する神経細胞の分布を可能な限り明らかにする必要がある。

これまで、セロトニン神経の分布や発生がウニ胚・幼生研究の中で唯一詳細に報告されており、1986年にアメリカムラサキウニで[3]、2000年にはバフンウニでその分布が免疫組織化学的に明らかにされている[4]が、他の神経伝達物質に関しては数えるほどしか報告されていない[5, 6]。例えばアセチルコリン神経に関しては、アメリカムラサキウニにおいてその分化に必要な転写因子が特定されている[7]が、神経の機能を知るために最も重要な細胞体の位置や数、軸索の伸長パターンは不明のままである。さらに、バフンウニにおけるアセチルコリン神経の分化にアメリカムラサキウニと同様の転写因子が関与しているかも不明である。

今回は、コリンとアセチル CoA からアセチルコリンを合成する酵素であるコリンアセチル転移酵素 (ChAT) を指標として、アセチルコリン神経の時空間的な分布を明らかにすることを目的に実験を行った。

【方法】

● *in situ* hybridization

受精後 24-72h の各発生段階におけるバフンウニ幼生を 3.7%ホルマリン海水で一晩固定(4℃)した後 MOPS 溶液で洗浄し、DIG (digoxigenin) で標識された ChAT 特異的 RNA プローブを 50℃で5日間、幼生の ChAT mRNA とハイブリダイゼーションさせた。洗浄後、2.5% skim milk で1時間 Blocking し POD (peroxidase) を付けた抗 DIG 抗体と1時間反応させた。POD によって活性化される蛍光色素 TSA-FITC を加えて10分間反応させた後洗浄し、DAPI を加えて核 DNA を染色してから蛍光顕微鏡で観察した。

● 免疫組織化学

100%メタノールで10分間固定した後 PBS-T 溶液で洗浄し、3% BSA 溶液で1時間 Blocking した。一次抗体としてマウスまたはウサギ由来の anti-ChAT IgG を加えて一晩反応(4℃)させた後洗浄し、一次抗体種特異的な二次抗体

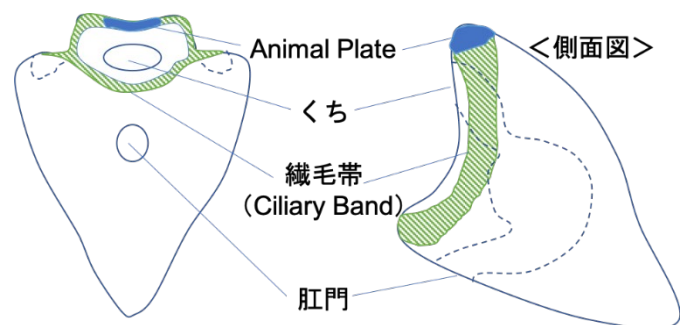
(Alexa488 結合)を加えて2時間反応させた。洗浄後、DAPI を加えて核 DNA を染色してから蛍光顕微鏡で観察した。

● 抗体精製

純度の高い抗体を得るため、ウニ ChAT 遺伝子を導入したプラスミドベクターからチオレドキシシン (Trx) タグ配列を除き、より純粋な ChAT タンパク質 (ChAT-Trx) を誘導して精製した。この精製タンパク質を結合させた Affinity Column を作成し、所属研究室で過去に作成されている既存の抗 ChAT 抗体を通して抗体精製を行った。また、より特異性の高い抗体を得るために、今回精製した ChAT-Trx をマウス及びウサギに注射し血清を得た。

【結果・考察】

in situ hybridization の結果から、バフンウニ幼生の ChAT mRNA は受精後 36h の原腸胚期から口側外胚葉に発現し始め、その後 Ciliary Band、肛門、Animal Plate でも発現することが明らかになった。また、受精後4日目以降の幼生での免疫組織化学の結果はこの *in situ* hybridization の結果とほぼ一致していた。これらのデータから、ウニ幼生におけるアセチルコリン神経系は遊泳のための繊毛を動かす働きや、消化管の機能制御に関与している可能性が示唆された。



受精後 48h の前期 4 腕プルテウス幼生模式図

(Angerer et al (2011) を参考に描写)

【今後の方針】

アセチルコリン神経がセロトニン神経などの他の神経とどのように接続しており、どのような機能を果たすのか調べるため、引き続き抗体作成を試みるほか、遺伝子の翻訳を阻害する Morpholino を用いて神経伝達物質の合成を阻害したり、試薬を用いて受容体の機能を抑えたりすることで、この神経の機能をより詳細に解析する。

【参考文献】

1. S. Yaguchi et al (2006) *Development* 133(12), 2337-2346
2. D. Mellott et al (2017) *Development* 144(19), 3602-3611
3. Bisgrove and Burke (1986) *Development* 28(6), 569-574
4. S. Yaguchi et al (2000) *Develop Growth Differ* 42(5), 479-488
5. Bisgrove and Burke (1987) *Cell Tissue Res* 248, 335-343
6. H. Katow et al (2010) *J Exp Biol* 213, 2808-2819
7. L. Slota et al. (2018) *Development* 435(2), 138-149