

ホヤ幼生における光受容細胞を起点とする神経回路の解析

小野寺 新 (筑波大学 生物学類) 指導教員: 堀江 健生 (筑波大学 生命環境系)

【背景と目的】

カタウレイボヤは脊索動物門に属しており、脊椎動物に最も近縁な無脊椎動物である。その幼生はオタマジャクシ型の形態をしており、背側に神経管が位置するなど脊椎動物と共通の体制を備えている。ホヤ幼生は約300個という少数の細胞からなる中枢神経系 (CNS) を持っている。そのうちニューロンは177個と半数程度である。このように中枢神経系を構成する細胞数の少なさを生かし、ホヤの幼生では全てのニューロンの位置やその接続を調べるコネクトーム解析が完了している。また、ホヤは遺伝子操作やイメージングが比較的容易であり、幼生までの発生時間も短いなど、脊索動物のニューロンの発生や生理機能を研究するうえで様々な利点を備えている。ホヤにはPR-I, PR-II, PR-IIIという3種類の光受容細胞の存在が示されており、PR-IとPR-IIが光刺激に応答すると考えられている。ホヤの光刺激に対する応答は大きく2種類に分けることができると考えられており、一つは負の走光性反応、もう一つは光強度が低下したときに運動性が上昇する反応である。光受容細胞から筋肉細胞に至る神経回路については、コネクトーム解析の情報やニューロンが放出する神経伝達物質の種類を示すマーカー遺伝子群の *in situ hybridization* による観察、薬剤処理による神経活動阻害と行動解析から報告されているが、その経路が実際にホヤ幼生の光応答で機能しているかどうかははっきりとしたことはわかっていない。今回の研究ではPR-IおよびPR-IIからの信号が筋細胞に伝達するまで、実際にどのニューロンを経由しているのかを明確にすることを目的とした。

【方法】

①光受容細胞を起点とする神経回路解析1

光受容細胞から筋細胞に至る神経回路を可視化するため、発現細胞からシナプスを介して輸送されるタンパク質であるWGA (小麦胚芽レクチン) を用いた実験系を利用した。光受容細胞特異的な発現を示す *Ci-Opsin1* のプロモーターにWGAまたはレポーター (*nGreen*) を連結したコンストラクト (*pCi-Opsin1 > WGA* および *pCi-Opsin1 > nGreen*) を作製した。これらを卵にマイクロインジェクションし、*Ci-opsin1* を発現する光受容細胞から輸送されたWGAを免疫染色によって観察した。

②光受容細胞を起点とする神経回路解析2

Arr (アレスチン) も幼生の光受容細胞で特異的に発現すると報告されている。①と同様に *Arr* のプロモーターにWGAまたはレポーター (GFP) を連結したコンストラクト (*pArr > GFP-pArr > WGA*) を卵にインジェクションし、*Arr* を発現する光受容細胞から輸送されたWGAを免疫染色によって観察した。

③ *Stum* 発現細胞の解析

Stum は光受容細胞のうちPR-IIで特異的に発現していると報告されている。*Stum* が光受容細胞のうち実際にPR-IIのみ

で発現している場合、PR-IIを起点とする神経回路の解析に利用できる可能性がある。今回は、光受容細胞全体で発現する *Ci-Opsin1 > nGreen* を利用して、*pStum > Kaede* と同時にインジェクションし、*Stum* がPR-IIに発現しているかどうかについて解析を行った。

【結果】

- ① *Ci-opsin1* のプロモーターに連結したレポーター (*nGreen*) の蛍光は期待どおりに光受容細胞で認められた。WGAの局在は光受容細胞で確認することができた。しかしながら、二次ニューロン以降に輸送されたWGAを確認することはできなかった。
- ② ①でみられた *nGreen* の蛍光に比べ、*Arr* のプロモーターに連結したレポーターの蛍光 (GFP) は、広い範囲で観察され、GFPは光受容細胞に加え、脳胞の別の細胞でも観察された。WGAの局在は、GFPの蛍光と一致しており、WGAの二次ニューロン以降への輸送を観察することはできなかった。
- ③ ①と同様に *Ci-opsin1* のプロモーターに連結したレポーター (*nGreen*) の蛍光は期待どおりに光受容細胞で観察された。一方で、*Stum* のプロモーターに連結したレポーター (*Kaede*) の蛍光は光受容細胞では観察されなかった。

【考察と展望】

①、②で二次ニューロン以降への輸送を検出することができなかったという結果についてはWGAの輸送が十分に起きない何らかの問題が生じていると考えられる。原因としては、WGA発現量の不足や、利用したWGAシグナル配列や構造の問題、ホヤの神経におけるWGAの輸送効率が低いこと、などが考えられる。今後はまず、実験条件を変えることで、目的の細胞でのWGAの発現量を増やしたり、WGAの輸送効率を改善したりできないか検討している。また、WGAの輸送効率の低さはほかの動物でも課題とされており、WGAにHRPを融合させたタンパク質を用いることなどで検出感度の改善が図られている。このような研究を参考にして、ホヤでもWGAの検出感度を向上できないかについても今後検討していきたい。

また、②でGFPおよびWGAが光受容細胞以外の細胞でも確認されたことについては、幼生より前の発生段階において発現したGFPおよびWGAが幼生で観察されている可能性が考えられる。①と②の結果を踏まえると、少なくとも、現在WGAを光受容細胞特異的に発現させる実験においては、①で用いた *pCi-Opsin1 > WGA* を用いるのが適切であると思われる。

③で、PR-II特異的な *Stum* の発現をレポーターコンストラクトでは再現できなかった結果については、今回単離したプロモーターにPR-IIでの発現に必要なエンハンサーが含まれていなかった可能性が考えられる。今後はさらに上流の領域や、イントロン内にエンハンサーが存在する可能性について検討する。