

ホヤ幼生の重力を感知する神経回路の解析

一寸木 明日香 (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・目的】

ホヤは脊索動物門の尾索動物亜門に分類される、脊椎動物に最も近縁な無脊椎動物の1つである。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の神経系の基本設計を備えているが、その中枢神経系はわずか177個の神経細胞で構成されている。ホヤ幼生はこの177個の神経細胞からなる神経回路を駆使して、重力、光などの環境刺激を受容し、自身が一生を過ごす場所を探し求めて遊泳運動を行う。脳内には2つの感覚器官、平衡器と眼点を有しており、平衡器が重力感知に、眼点が光受容に関係することが知られている。平衡器にはアンテナ細胞と呼ばれる神経細胞が付随しており、このアンテナ細胞が重力を感知すると考えられている。

孵化直後のホヤ幼生は、負の重力応答を示し、上向きの遊泳運動を行うが、孵化後4~8時間目には光忌避応答を示すようになり、一転して海底方向へと向かう。幼生が海底や岩などに固着すると、その固着刺激がトリガーとなり変態を開始することが知られている。孵化後4~8時間目の遊泳方向の変化には、光忌避応答の発達だけでなく、重力を感知する神経回路の変化が関わっている可能性が考えられるが、この神経回路の構造と機能については不明な点が多く残されている。そこで本研究では、ホヤ幼生の重力を感知する神経回路の構造と機能を解明することを目的として、アンテナ細胞特異的に外来遺伝子を発現させる実験系の構築を行った。

これまでの研究から、アンテナ細胞にはグルタミン酸作動性ニューロンのマーカーである小胞型グルタミン酸トランスポーター(*VGLUT*)が発現することが報告されている。一方で、AMPA型グルタミン酸受容体(*GluA*)が発現するという報告もある。そのため、本研究では*VGLUT*と*GluA*の両方のプロモーター領域の解析を行い、アンテナ細胞特異的なエンハンサー領域の同定を試みた。さらに、得られたエンハンサー領域を利用して、アンテナ細胞を蛍光タンパク質で標識し、GCaMPによるグルタミン酸作動性ニューロンの神経活動イメージングも行った。

【材料・方法】

実験にはカタユウレイボヤ *Ciona intestinalis* を使用した。

(1) アンテナ細胞特異的なエンハンサー領域の解析

*GluA*の開始Metから上流約2.6kb、下流約2.5kb、*VGLUT*の開始Metから上流約2.8kbを単離し、それぞれ蛍光タンパク質*Kaede*と連結させたコンストラクトを作製した。顕微注入法によってホヤ卵へと遺伝子導入を行い、幼生期に固定・免疫染色をして*Kaede*の蛍光パターンの観察を行った。その後、上流領域を5側から段階的に欠失させたコンストラクトを作製し、同様の手順でホヤ卵に導入して、*Kaede*の蛍光パターンの解析を行った。

(2) GCaMPを用いたアンテナ細胞の神経活動イメージング

(1)で同定したアンテナ細胞特異的なエンハンサー領域を、基本プロモーターおよび蛍光タンパク質 *mCherry* に連結したコンストラクトを作製した。同時に *VGLUT* 上流領域約2.8kbをCa²⁺

指示蛍光タンパク質である *GCaMP* に連結したコンストラクトも作製し、顕微注入によって両者を共にホヤ卵に導入した。幼生期に30分ずつ間隔をあげながら神経活動の測定を行った。

【結果・考察】

(1) アンテナ細胞特異的なエンハンサー領域の解析

*GluA*の開始Metから上流約2.6kbおよび下流約2.5kbをそれぞれ*Kaede*に連結したコンストラクトを導入した個体では、*Kaede*の蛍光はアンテナ細胞では観察されなかった。そこで、もう1つの候補である*VGLUT*の開始上流約2.8kbを*Kaede*に連結したコンストラクトを導入すると、*Kaede*の蛍光はアンテナ細胞を含む多数の細胞で観察された。このことから、*VGLUT*の上流約2.8kbにアンテナ細胞における遺伝子発現を制御するエンハンサー領域が含まれていることが確認された。次に、*VGLUT*上流領域を5側から欠失させたコンストラクトを作製し、ホヤ卵に導入したところ、上流300bpを*Kaede*に連結したコンストラクトを導入した個体では42個体中40個体(95.2%)でアンテナ細胞における蛍光が観察されたのに対し、200bpを*Kaede*に連結したコンストラクトを導入した個体ではアンテナ細胞における*Kaede*の蛍光は消失した。従って、目的のエンハンサー領域は*VGLUT*の上流300~200bpに存在することが示唆された。さらに、*VGLUT*の上流300~200bpを単離し、基本プロモーターと*Kaede*に連結したコンストラクトを作製・導入したところ、*Kaede*の発現は85個体中81個体(95.3%)でアンテナ細胞に特異的であった。以上の結果から、*VGLUT*の上流300~200bpはアンテナ細胞特異的な遺伝子発現に必要なかつ十分なエンハンサー領域であることが示された。

(2) GCaMPを用いたアンテナ細胞の神経活動イメージング

*mCherry*を用いてアンテナ細胞を特異的に標識した上で、GCaMPによりグルタミン酸作動性ニューロン全体の神経活動を計測することを試みたが、今回の実験では*mCherry*の蛍光が判別できず、期待したような明確な結果は得られなかった。位置関係をもとにした観察によれば、光受容細胞や脳胞後部の神経細胞は孵化後20時間以上経ってから神経活動が強まるのに対し、アンテナ細胞の神経活動は時期によって大きく変化することはなかった。今後は*mCherry*を連結したコンストラクトの作製を見直すとともに、より多くのサンプルで再現性を確かめる必要がある。

本研究では、(1)のエンハンサー解析により、アンテナ細胞特異的に外来遺伝子を発現させる実験系を構築することに成功した。これを用いて、現在、アンテナ細胞を標識した個体での単一細胞トランスクリプトーム解析を行い、アンテナ細胞の遺伝子発現プロファイル作成に取り組んでいる。今後は(2)の神経活動イメージングに加えて、光遺伝学による神経活動の人為的な操作実験も行い、アンテナ細胞の機能解析を進めるとともに、アンテナ細胞から筋肉の駆動に至るまで重力感知の神経回路の全貌を解明したい。