

課題番号 1

棘皮動物（ナマコ）胚における 繊毛運動制御神経系構造の解析-1

[1] 組織

代表者：清本 正人

（お茶の水女子大学 基幹研究院自然科学系
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 10 万円

[2] 研究経過

本研究計画は「ナマコ胚・幼生の体表繊毛運動を制御する神経系の分子発生的解明」を目的として進められた。そのために、これまで申請者のグループが明らかにしてきたウニ胚、幼生での GABA 作動性繊毛運動調節機構 (Katow et al, 2013, 2015, 2016, 2020a, 2020b, 2021) が同じ棘皮動物のナマコでも該当するかを明らかにすることを含めた本プロジェクトをスタートした。ナマコの GABA 合成酵素 (*Apostichopus japonicus* glutamic acid decarboxylase: GAD: Aj-GAD) の構造は Zhang 等によるゲノムプロジェクトの成果として報告され (PLOS Biol. 15 (10), 2017), 本研究計画での抗体作製に用いた。本研究計画の初年度解析はここに示す免疫化学的解析に焦点を置いた。また、本研究計画の対応者の小椋利彦教授と随時連絡を E メール等で取りながら遂行した。

以下、研究活動状況の概要を記す。

[3] 成果

(3-1) 研究成果

Aj-GAD 抗体は Aj-GAD の一部 (NH₂-C⁺³⁴⁷MIDLFERLAQEIEI³⁶⁰-COOH (Zhang et al. 2017) のアミノ酸配列であり、免疫ブロッティングによると、抗原部位は約 60 kDa のシングルバンドとして見られる (図 1A)。これは想定される脊椎動物等の 65, 67 kDa に近い。組織の分化が比較的進んだ初期オーリクラリア幼生では細胞質中に GAD を発現した間充織細胞が多数見られ (図 1B)、これ等の細胞の間を縫って神経細胞特異蛋白 (1E11) 繊維を発達させた細胞突起をもつ間充織細胞のネットワークがある (図 1C)。

さらに発生が進んだオーリクラリア幼生では体表にアセチル化チューブリンを持つ繊毛帯が形成され、先の GAD 細胞は繊毛帯下の胞胚空中に配列されている (図 1D)。従って、神経繊維束は体表面側に偏在している (図 2)。

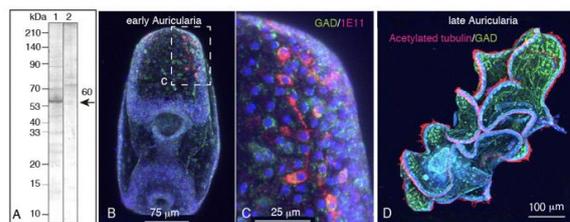


図 1.(A) オーリクラリア幼生における Aj-GAD 抗体幼生バンドが 60kDa 領域に一本見られる (レーン 1 矢印)。免疫前血清ではこのバンドは見られない (レーン 2)。 (B) 初期オーリクラリア幼生の GAD (緑) 陽性間充織細胞および神経繊維 (1E11) 陽性細胞の免疫組織化学。 (C) 同幼生の頭部領域の拡大図。 (D) 後期オーリクラリア幼生におけるアセチル化チューブリン線維束を持つ繊毛帯 (赤) 直下の間充織細胞に GAD (緑) 発現が見られる。

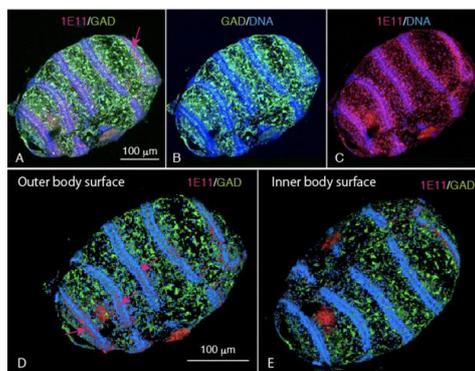


図 2. 受精 2 ヶ月後のドリオラリア幼生の体表神経繊維帯と Aj-GAD 陽性間充織細胞の分布図。幼生の体表における GAD 陽性間充織細胞群 (緑) (A, B) に囲まれる五条の 1E11 陽性神経繊維束 (A, C, 赤)。体外表面から見たときに 1E11 陽性線条が明瞭に見える (D, 赤矢印) が、体腔内部からの観察では 1E11 線条部は見えない (E) ことから、この繊毛は体表側に形成されている点で、図 1D のオーリクラリア幼生と同じ局在極性を維持している。

後期オーリクラリア幼生の繊毛帯は GAD 陽性帯が一条の繊毛帯を挟んでいることから (図 3)、GAD が繊毛帯機能に影響を及ぼしていることが推測される。幼

生の遊泳時には体表における渦流形成を伴う(図4)ことから、渦流の形成態様解析で繊毛の運動態様を識別できる。

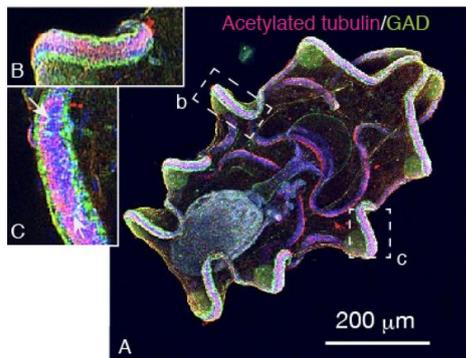


図3.後期オーリクラリア幼生における体表繊毛帯(A)はアセチル化チューブリン線維束を持つ繊毛帯(赤)がGAD陽性領域(緑)に挟まれている(B,C)。

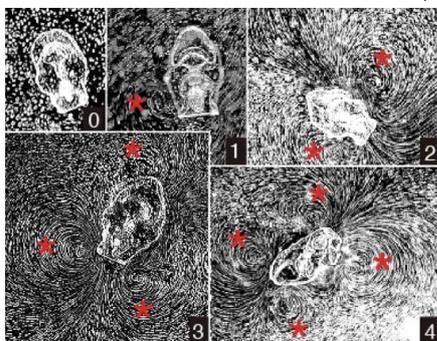


図4.オーリクラリア幼生繊毛帯による渦流(赤星)の形成状況。各図右下の数値は渦流の数。

次に、GAD 阻害剤の 3-MPA を作用させると、体表の渦流発生数は阻害剤濃度に依存して減少する(図5)。

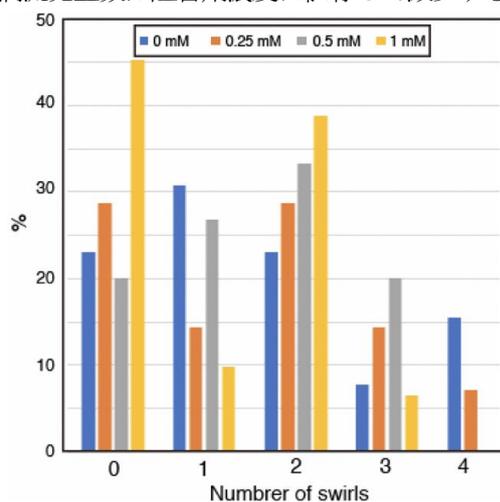


図5. 幼生体の周囲に形成される渦流数は 3-MPA 濃度に依存して減少する。0.25mM 程度の 3-MPA では総数ではあるが、4 個程度の渦流ができるが(図5)、1mM の 3-MPA では形成自体が大きく阻害され、(図中横軸(0)黄色棒)、0.5mM では渦流数は最大 3 個程度に減少する。

以上のことから、オーリクラリア幼生の遊泳運動に

は GAD 制御を受ける線毛運動によって生ずる体表渦流が大きく関与している。

(3-2) 波及効果と発展性など

ナマコを用いた研究は近年非常に多く、特に海外の研究機関・研究者から発表されている。しかし、本研究対象のような神経機能・形成疾患に関連したものは極めて少なく、その意味で本研究への関心は論文コピー請求の多さに示されている。また、国際会議への招待も多いが、経費の面で対応できていない。

[4] 成果資料

(1) Katow, H., Yoshida H., Kiyomoto, M. (2020) Initial report of γ -aminobutyric acidergic locomotion regulatory system and its 3- mercaptopropionic acid-sensitivity in metamorphic juvenile of sea urchin, *Hemicentrotus pulcherrimus*. **Scientific Reports** 10:778

(2) Katow, H., Abe, K., Katow, T., Yoshida, H., Kiyomoto, M. (2020) Involvement of Netrin/Unc-5 Interaction in Ciliary Beating and in Pattern Formation of the Ciliary Band-Associated Strand (CBAS) in the Sea Urchin, *Hemicentrotus pulcherrimus*. **International Journal of Molecular Sciences** 21, 6587; doi:10.3390/ijms21186587

(3) Katow, H., Yoshida, H., Kiyomoto, M. (2021) Spatiotemporal immunohistochemical expression pattern of Huntington disease protein and its involvement in ciliary beating at the larval ciliary band of the sea urchin, *Hemicentrotus pulcherrimus*. **International Journal of Molecular Sciences** 22,5116. <https://doi.org/10.3390/ijms22105116>

(4) 加藤秀生、清本正人、吉田裕美 (2023) ウニ変態前後の運動機構へのハンチントン蛋白(Huntingtin)の関与。第 93 回日本動物学会大会 (早稲田大学)