

課題番号 7

## 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-2

[1] 組織

代表者：清本 正人

(お茶の水女子大学 湾岸生物教育研究所)

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7万円 共益費3万円

[2] 研究経過

本研究計画は令和4年度に開始した募集テーマ(4)脳の発達・加齢に関する研究項目で採択された「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」で残された(1)幼生発生後期のドリオラリア幼生における体表繊毛帯での1E11/抗体陽性神経系とGAD発現部位の位置関係と(2)3-MPAによるGABA生成阻害が体表での渦流形成にどのように影響するかを中心に研究を行った。この過程で幼生体表における繊毛帯がどのように渦流形成に関与しているかについても解析を行った。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、これに回転運動を加えた解析も加えた。小椋教授とは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

今回の研究はオーリクラリア幼生からドリオラリア幼生における(1)繊毛帯を中心としたアセチル化チューブリンとGlutamic acid decarboxylase (GAD),及び1E11による免疫組織化学解析、(2)棘皮動物胚の繊毛帯が引き起こす渦流生成を担うGABA作動性繊毛運動の阻害剤(3-MPA)(Katow et al., 2020)による阻害効果解析をナマコ幼生で以下のような成果を得た。

(3-1) オーリクラリア幼生体表におけるGADの分布：幼生体表面の繊毛帯はGAD及びGABA発現帯を伴う。

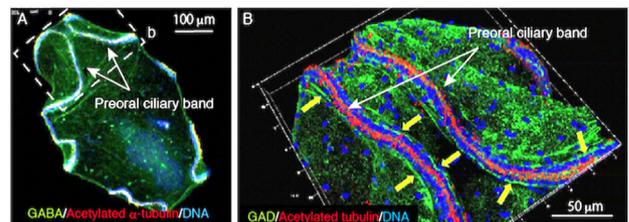


図1.受精後4日(4dpf)オーリクラリア幼生腹側面。(A) GABA(緑)、Acetylated  $\alpha$ -tubulin(赤)陽性繊毛帯に伴走するGABA陽性帯(矢印)。(B) (A)図の四角で囲まれた部分の立体構築共焦点レーザー顕微鏡像。GAD陽性領域は繊毛帯の両側に伴走している(黄色矢印)。

(3-2) 幼生最終期のドリオラリア幼生の体表繊毛帯の構造：体表の繊毛帯は5本のリング構造から成り、特に体前端部ではリング間の連結が生じている。一方でGAD/GABA発現細胞は繊毛帯から体表全体へと分散する。さらに、体内ではGAD陽性間充織細胞も見られる。

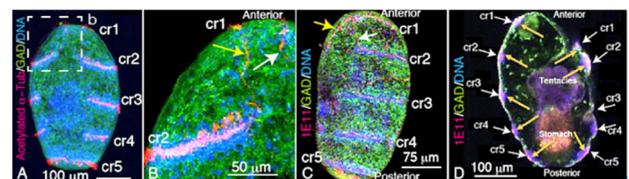


図2. 8dpf ドリオラリア幼生におけるAcetylated  $\alpha$ -tubulin(赤:A-C)、又は12dpf幼生での神経膜特異抗体1E11(赤:D)(Nakajima et al., 2004)とGAD(緑)の体表(A-C)又は光学切片による体内(D)における発現部位。いずれも図の上は体先端部、下が後端部。先端部のcr1とcr2は直径が2~4nmの繊維構造で結ばれている(B,C:矢印)。GAD陽性細胞は繊毛帯近傍から体表全体へ広く分布して見えるが、体内の間充織細胞にも見られる(D)。

(3-3) 幼生体表面の繊毛帯の機能：体表繊毛帯は渦流を発生させる起点となる。

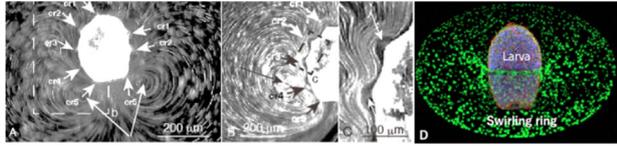


図 3.12 dpf ドリオラリア幼生体表での遊泳のための渦流発生部域は繊毛帯と密接に対応している(A,B,C)が、それぞれが独立した渦流ではなく、繊毛帯 cr1-cr5 が担う幼生体を囲む 1 から数個の渦流を生成する(D)。また、5 対の繊毛帯の渦流はそれぞれ独立に作動し、これによって複雑なパターンを作る。したがって、ナマコ幼生の繊毛運動は図2で示した神経細胞の連携によっていることが分かる。

(3-4) 渦流形成は GAD 阻害剤の 3-mercaptopropionic acid (3-MPA) によって濃度依存的に阻害される(Hartley et al. 2022) (図 4)。

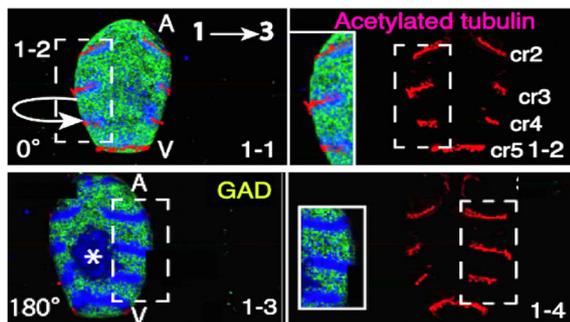


図 4. ドリオラリア幼生体表繊毛帯基部に繊毛細胞核(青)が位置している。(1-1~1-2 は体表面)、(1-3~1-4 は体表面の基部側)。(1-3)の※はレーザー光が到達できなかった部分。

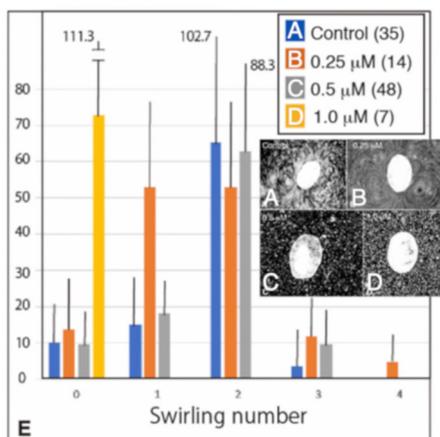


図 5. 12-dpf (A) 及び 13dpf (B-D) ドリオラリア幼生の渦流形成(A-D)は GAD 活性阻害剤の 3-MPA によって、濃度依存的に阻害される(E)。

[4] 成果資料

(1) Katow, H., Katow, T., Yoshida, H. & Kiyomoto, M. (2024) GABAergic neural control system involved in the ciliary movement during larval development of the sea cucumber, *Apostichopus japonicus*. (投稿中)

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

<https://doi.org/10.1038/s41598-020-57567-w>

(3) Katow, H., Katow, T., Yoshida, H. & Kiyomoto, M. (2021) Involvement of Huntingtin in Development and Ciliary Beating Regulation of Larvae of the Sea Urchin, *Hemicentrotus pulcherrimus*. **Int. J. Mol. Sci.** 2021, 22, 5116. <https://doi.org/10.3390/ijms22105116>

(4) 加藤秀生、加藤知子、清本正人、吉田裕美 (2023) 「マナマコ, *Apostichopus japonicus* 幼生発生における繊毛運動に関わる GABA 作動性神経制御系の解析」 (第 94 回 日本動物学会大会 (山形大学))。

参考文献：

Nakajima Y, Kaneko H, Murray G, Burke RD (2004) Divergent patterns of neural development in larval echinoids and asteroids. **Evol Dev** 6:95–104.

Hartley, N.; McLachlan, C.S. (2022) Aromas Influencing the GABAergic System. **Molecules** 27: 2414. <https://doi.org/10.3390/molecules27082414>