

令和元年6月17日現在

機関番号：34506

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K15130

研究課題名(和文) 脳の細胞系譜からひも解く、発生過程でプログラムされた行動変化を生み出す神経回路

研究課題名(英文) Studies on the neural network generating the programmed behavioral change through the development of Ciona larva based on analysis of the cell lineage of the brain

研究代表者

大沼 耕平 (Onuma, Kouhei)

甲南大学・理工学部・研究員

研究者番号：70774876

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：中枢神経系の細胞がたった数百しかないホヤ幼生は、行動を生み出す神経回路の形成と働きを、個々の細胞レベルで理解できる優れたモデルである。しかし、ホヤ研究の一般的な胚操作である卵膜除去が脳の発生を乱すため、幼生の脳にある細胞の数や種類は不明であり、神経回路の構成ですら未解明である。本研究では、開発した技術による細胞系譜解析を通して、ホヤ幼生の脳(脳胞)の細胞数を明らかにした。また、脳胞にある各種類のニューロンが運動を司る運動神経節のどの細胞に投射するかを調べた。脳胞から運動神経節だけでなく、運動神経節から脳胞への神経投射があることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、ホヤ胚の卵膜除去による脳胞構造の異常という技術的な問題を解決し、今までできなかった正常な脳胞の細胞数を明らかにした。また、いくつかの種類ニューロンについては、受精卵を起点とした細胞系譜を完全に明らかにした。これは、脊索動物の中枢神経系では細胞系譜が解明された最初の例である。これらの成果により、脳胞を作りだす分子基盤を個々の細胞レベルで調べるための土台が初めて作られた。今後、本研究の成果を基にした、単一細胞レベルでの神経回路形成の解析が期待される。

研究成果の概要(英文)：The ascidian Ciona larva is a good model organism for understanding the development and functions of the neural network at the single-cell resolution because the central nervous system of the Ciona larva consists of only a few hundred cells. However, it was unknown how many cells and what kind of cells are in the brain of the Ciona larva and what cells build the neural network because removal of the chorion, a commonly used technique for experimental manipulation of Ciona embryos, disrupts the structure of the brain. In this study, the precise number of cells and each neuron in the brain of the Ciona larva was determined by the cell lineage analysis using the developed technique in our laboratory. It was also investigated what neurons in the brain contact to cells in the motor ganglion that control the swimming behavior of the Ciona larva. I suggested the neural interaction between the brain and the motor ganglion in both directions.

研究分野：発生生物学

キーワード：ホヤ 脳 細胞系譜 神経回路

1. 研究開始当初の背景

動物は、様々な環境情報を受容・統合・処理・伝達して適切に行動する。この過程を制御する神経回路がどのように作られて機能するかは、脊椎動物において、中枢神経系の細胞集団レベルで理解されつつある。しかし、神経回路の形成と機能を個々の細胞レベルで解明し、さらにその働きを行動レベルまで連続的に理解するには、脊椎動物の神経系は複雑すぎる。

ホヤ幼生は、この問題を解決するための優れたモデルである。ホヤは、脊椎動物に最も近縁で、神経系の基本設計を脊椎動物と共有する。幼生の中枢神経系にある細胞はわずか300個で、脊椎動物と比べて圧倒的に少ない。つまり、ホヤを使うことで、脊椎動物と共通する神経回路の形成や機能を、単一細胞レベルで明らかにできる。

しかし、前中脳に相当する、脳胞の細胞の種類や数が一部しか分かっておらず、神経回路の構成ですら未解明である。主な原因は、ホヤ胚を用いた一般的な操作である卵膜除去が、脳胞の構造を大きく乱すことにある。後脳・脊髄に相当する、運動神経節から筋肉までの神経回路は解明されているため、卵膜を除去せずに、脳胞から運動神経節までの神経回路の構成を解明する必要がある。

2. 研究の目的

本研究の最終目的は、明確で定量化のしやすい環境応答を示すホヤ(カタコウレイボヤ)を材料に、行動を制御する神経回路がどのようにして作られ、機能するかを理解することである。ホヤ幼生の行動は、発生過程で重力応答から光応答に変わる。この過程を司るすべての細胞を明らかにし、時間軸に沿った神経回路の形成と機能発現のダイナミズムを解明することが目標である。その第1歩として本研究では、報告者が開発した技術を駆使して、正常な脳胞の細胞系譜を解明し、脳胞細胞や脳胞にある各種類のニューロンの数を明らかにする。次に、脳胞から運動神経節までの神経回路を調べ、これまでの知見と合わせて、脳胞から筋肉までの神経回路モデルの構築を目指す。

3. 研究の方法

(1) 細胞系譜の解析による、脳胞にある細胞の数と種類の解析

正確に細胞の数を知るには、発生を追って細胞系譜を明らかにした上で、数えるのが確実に効率が良いと考えた。カタコウレイボヤでは、神経板が形成された時期(神経板期)まで細胞系譜が解明されているため、神経板期以降の細胞系譜に注目した。光変換型蛍光タンパク質Kaedeを用いた細胞標識法により、神経板にある予定脳胞細胞(16個)がそれぞれ幼生期に何個になるかを明らかにし、それを基に幼生の脳胞細胞数を調べた。また同時に免疫染色法により、脳胞にある4種類の神経細胞(グルタミン酸作動性ニューロン、GABA・グリシン作動性ニューロン、コリン作動性ニューロン、ドーパミン作動性ニューロン)がそれぞれ神経板のどの細胞から生じるかを調べた。

神経板期から幼生期までの細胞の動態(いつ何回分裂するか等)については、胚が卵膜内で回転してしまい、当初計画していたタイムラプスで正確に追跡することができなかった。そのため神経板期以降については、ホールマウント *in situ* ハイブリダイゼーション(WISH)により、神経板の各細胞で働く遺伝子の発現を可視化し、それを指標にして発生を追って、各神経板細胞の追跡を試みた。またFITC 蛍光色素を用いた細胞系譜解析も行なった。

(2) 脳胞から運動神経節までの神経回路の解析

神経細胞間を移動するWGA因子を、脳胞にある各ニューロンに発現させることで、脳胞から運動神経節までの神経回路の解明を試みた。しかし、明確なWGAの移動が見られなかったため、各ニューロンのマーカー因子を免疫染色により検出し、そのニューロンの軸索を可視化することで、脳胞のどのニューロンが運動神経節に投射しているかを調べることにした。

4. 研究成果

(1) 細胞系譜の解析による、脳胞にある細胞の数と種類の解析

脳胞細胞の数

将来幼生の脳胞になる神経板の16個の細胞を、光変換後のKaedeによりそれぞれ標識した。幼生期に標識細胞の数を数えたところ、幼生の脳胞は約232個の細胞から構成されることがわかった。以前脳胞の細胞数は215個と報告されていたので、その数を改定することができた。また、脳胞は動物極由来と植物極由来の細胞から構成されるが、前者の細胞数は約111個、一方後者の細胞数は約121個であり、わずかに植物極由来の細胞が多いことがわかった。

脳胞にある各種ニューロンの細胞系譜

最初にドーパミン作動性ニューロン(DAニューロン)に注目した。上と同様にKaedeを用

いて神経板の各細胞を標識し、幼生期に DA ニューロンのマーカーを用いた免疫染色をすることで、DA ニューロンが神経板のどの細胞に由来するかを調べた。その結果、DA ニューロンは神経板の中央にある左右二つの細胞 (a9.37 と呼ばれる細胞) に由来することがわかった。また WISH により、DA ニューロンの発生に重要な転写因子 *Fer2* (以前は *Ptf1a/PTFb* と呼ばれていた) や DA ニューロンマーカー *Th* の発現を指標にして、a9.37 細胞の子孫細胞を追跡した。その結果、各 a9.37 細胞の片方の娘細胞から 8 個、左右計 16 個の細胞が生まれること、その 16 個の細胞から幼生の DA 細胞群が構成されることがわかった。以上から、受精卵から幼生期までの DA ニューロンの全細胞系譜を決定することができた。

次に、グルタミン酸作動性ニューロン (GL ニューロン)、GABA・グリシン作動性ニューロン (GG ニューロン)、コリン作動性ニューロン (CH ニューロン) の細胞系譜について調べた。動物極と植物極の細胞が分かれた時期 (8 細胞期) の各割球に FITC 蛍光色素を導入したところ、GL ニューロン数は約 38 個、GG ニューロン数は約 18 個、CH ニューロン数は約 8 個であることがわかった。また、GL ニューロンと GG ニューロンは左右の動植物細胞に由来すること、一方 CH ニューロンは左の植物極の細胞に由来することがわかった。さらに Kaede による細胞の標識と追跡の解析により、動物極由来の GL ニューロンと GG ニューロンは左右で対となる神経板細胞に由来することがわかり、左右非対称な発生メカニズムにより運命が分かれることが示唆された。

脳胞の右側にある光受容細胞 (視細胞) は、植物極細胞に由来する GL ニューロンと GG ニューロンから構成される。この細胞は神経板の中央の 1 個の細胞に由来する。WISH により、視細胞の発生に必須な転写因子 *Rx* の発現を指標にしてその細胞を追跡したところ、その 1 個の細胞が 4-5 回分裂することで 30 個になることを報告した (Oonuma and Kusakabe, 2019)。これは、脊索動物の中樞神経系において、受精卵から分化した細胞になるまでの細胞系譜を明らかにした最初の例である。

以上、細胞系譜解析を通して、脳胞細胞や各種類のニューロンの数を明らかにすることができた。CH ニューロンの細かな細胞系譜については今後の課題である。

(2) 脳胞から運動神経節までの神経回路の解析

CH ニューロンは脳胞だけでなく、ホヤ幼生の遊泳運動を制御する運動神経節にもある。CH ニューロンのマーカーを免疫染色により検出したところ、脳胞から運動神経節への投射に加え、運動神経節の CH ニューロンから脳胞の CH ニューロンへ軸索が伸びている様子が観察された。このことから運動神経節は、単に脳胞からの感覚シグナルを受け取って行動に反映させるだけでなく、脳胞へ何らかの情報を送っている可能性が見出された。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 1 件)

Oonuma, K. and Kusakabe, T. G. (共責任著者),

"Spatio-temporal regulation of *Rx* and mitotic patterns shape the eye-cup of the photoreceptor cells in *Ciona*.", *Developmental Biology*, 査読有, **445**(2), pp245-255, 2019.

doi: <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2018.11.011>

[学会発表] (計 8 件)

< 国際会議における発表 >

1. Kouhei Oonuma and Takehiro G. Kusakabe. (英語口頭発表)
"Mitotic patterns of photoreceptor lineage cells and the cell lineage of the coronet cells", The *Ciona* Connectome meeting, University of California, Santa Barbara, January 28 - 29, 2019.
2. Kouhei Oonuma and Takehiro G. Kusakabe. (英語口頭発表)
"The cell lineage and the patterns of cell division for photoreceptor cells of the left-right asymmetric ocelli in the *Ciona intestinalis* larva", 9th International Tunicate Meeting, New York, July 17 - 21, 2017.
3. Seiya Wada, Kotaro Shimai, Kouhei Oonuma, Masanori Funakoshi, ... (4 人の著者)... and Takehiro G. Kusakabe. (英語ポスター発表)
"SoxB1 plays a crucial role in development of the anterior caudal inhibitory neurons in the *Ciona intestinalis*", 9th International Tunicate Meeting, New York, July 17 - 21, 2017.
4. Kouhei Oonuma and Takehiro G. Kusakabe. (英語ポスター発表)
"Developmental shift of *Rx* expression from non-photoreceptor to photoreceptor lineage as a mechanism for photoreceptor cell specification in *Ciona intestinalis*", ISDB, #368, 18th International Congress of Developmental Biology, Singapore, June 18 - 22, 2017.

< 国内学会における発表 >

1. 和田聖矢, 大沼耕平, 舟越正憲, 堀江健生, 島井光太郎, 日下部岳広. (ポスター発表)

様 式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

- 『ホヤ幼生の遊泳運動制御に関わる神経細胞分化における Sox1/2/3 の役割』第 41 回日本分子生物学会年会、パシフィコ横浜、横浜市、2018. 11 月
2. 常深秀人、森継奈穂、玉井雅大、大沼耕平、日下部岳広。(口頭発表)
『胚の中軸組織に共通の遺伝子発現とヘッジホッグシグナルの役割』
第 4 回ホヤ研究会、東北大学青葉サイエンスホール、仙台市、2018. 10 月.
 3. 和田聖矢、大沼耕平、中込絵梨、原田瑞輝、日下部岳広。(口頭発表)
『神経回路の形成とニューロンの細胞系譜』
第 4 回ホヤ研究会、東北大学青葉サイエンスホール、仙台市、2018. 10 月.
 4. 村上誠、大沼耕平、日下部岳広。(ポスター発表)
『ホヤ幼生の運動制御神経回路を構成するニューロンの細胞系譜解析』
ComBio2017 生命科学系学会合同年次大会(第 41 回日本分子生物学会年会、第 90 回日本生化学会大会 合同大会)、神戸ポートアイランド、神戸市、
2017. 12 月

6 . 研究組織

(1)研究分担者

なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。