

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 13 日現在

機関番号：12102

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2012～2016

課題番号：24687008

研究課題名(和文) 遺伝学的技術を用いたホヤ幼生の光感覚入力から行動出力に至る神経回路の機能解析

研究課題名(英文) Genetic approach to the neural pathway mediating the photic behavior of the ascidian larva: from sensory input to motor output

研究代表者

堀江 健生 (HORIE, TAKEO)

筑波大学・生命環境系・助教

研究者番号：10455925

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 21,100,000円

研究成果の概要(和文)：ホヤ幼生の光感覚入力から行動出力に至るまでの神経回路について、その全貌を細胞レベルで解明することを目的として研究を行った。トランスポゾン技術を応用した遺伝学的技術、ニューロンの活動を測定するライブイメージング、ニューロンの機能を解析するための光遺伝学的技術を取り入れて研究を行った。その結果、光受容細胞を起点とする神経回路は(1)光受容細胞からの入力を受け、ごく少数の2次ニューロン、(2)2次ニューロンからの入力を受け、筋肉を駆動する運動神経回路によって構成されることが明らかとなった。さらに、光受容細胞特異的に遺伝子を発現させるメカニズムや光受容細胞の分化機構についても新たな知見を得た。

研究成果の概要(英文)：This study aimed to understand the neural pathway from sensory input (photoreceptor cells) to motor output (motor neurons and tail muscle) at the single cell level. To achieve this aim, I adopted innovative technology, such as transposon mediated transgenesis technique, transsynaptic labeling of specific neurons, live imaging of neuron activity and optogenetics for analyzing neuronal function. Here we showed that photoreceptor cells input into a few 2nd order neurons located in the posterior brain and the 2nd order neurons input into motor system that regulate swimming locomotion of the ascidian larva. We also found that novel gene regulatory mechanisms underlying photoreceptor specific gene expression and novel differentiation mechanisms of photoreceptor cells in ascidian embryo.

研究分野：神経生物学

キーワード：ホヤ 神経回路 光受容細胞 行動 光遺伝学

## 1. 研究開始当初の背景

動物は外界からの様々な刺激を眼や耳などの感覚器で受容し、その情報を脳・中枢神経系で適切に処理・統合した後に筋肉を駆動させることにより、動物が置かれている環境に最も適した行動を行う。動物の行動が生まれる仕組みを理解するためには、感覚入力から行動出力に至るまでの神経回路を同定し、その神経回路における個々のニューロンの機能を一つ一つの細胞レベルで解明することが重要である。しかしながら、高等動物では中枢神経系を構成する細胞の多さから、感覚入力から行動出力に至るまでの神経回路についてその全貌を解明することは困難である。私はこの問題を解明するために尾索動物ホヤの幼生を用いて研究を進めている。ホヤ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の脳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100個と非常に少数のニューロンから構成されている。私は神経特異的な抗体を用いた免疫染色やトランスポゾン技術を用いた遺伝学的な技術によりニューロンを可視化したトランスジェニック系統を用いて、ホヤ幼生に存在するほぼ全てのニューロンを同定している。最近、光制御型チャネル/ポンプを用いた光遺伝学的技術を利用することにより、ホヤ幼生のニューロンの機能を人為的にコントロールすることが出来る実験系を構築した。これにより、行動中のホヤ幼生において神経回路におけるニューロンの機能を解析することが可能となった。

## 2. 研究の目的

ホヤ幼生は暗刺激により遊泳運動を開始し、明刺激により遊泳運動を停止させる。本研究はホヤ幼生の光感覚入力から行動出力に至るまでの神経回路について、その全貌を細胞レベル、遺伝子レベルで解明することを目指す。具体的には研究期間内に以下のことを明らかにすることを目的とする。

(1) 神経系で蛍光タンパク質や経シナプストレーサー (WGA) を発現するトランスジェニック系統を用いて、光感覚入力から行動出力に至るまでの神経回路を構成するニューロンについて、その特性(興奮か抑制性か)、軸索の投射部位、神経終末の形成部位を明らかにする。

(2) 神経回路を構成する各ニューロンにおいて  $Ca^{2+}$  センサータンパク質 GCaMP を発現するトランスジェニック個体を用いて、行動中の幼生における神経活動イメージングを行う。これにより、光感覚入力に対してどのニューロンが応答するのかを明らかにする。

(3) 各ニューロンで光制御型チャネル/ポンプを発現させ、ニューロンを活性化、または阻害した場合の行動パターンを解析することにより、行動における各ニューロンの機能を明らかにする。

(4) 感覚入力に対する行動変異体を単離し、その変異体の神経回路や原因遺伝子の解析から、順遺伝学の方から行動を生み出すメカニズムについて解析を行い、光感覚入力から行動出力に至るまでの神経回路について遺伝子レベルで明らかにする。

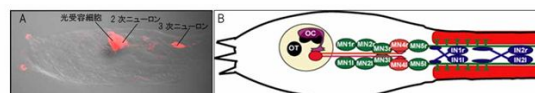
以上4つの実験を組み合わせることにより、ホヤ幼生の光感覚入力から行動出力に至るまでの神経回路について、その全貌を細胞レベル、遺伝子レベルで解明する。

## 3. 研究の方法

本研究では、神経系を可視化したトランスジェニック系統の作製や突然変異体の作製などのトランスポゾン技術を応用した遺伝学的な技術と、ニューロンの機能を解析するための光遺伝学的な技術を活用して研究を行った。

## 4. 研究成果

(1) トランスポゾン技術を応用した遺伝学的な技術により作製した、ニューロンを蛍光タンパク質により可視化したトランスジェニック系統を用いて光受容細胞を含むホヤ幼生に存在するほぼ全てのニューロンについて、細胞体の位置、軸索の投射部位、神経終末の形成位置を明らかにした。さらに、経シナプストレーサー (WGA) を光受容細胞に特異的に発現させることにより、光受容細胞を起点とする神経回路のトレース実験を行い、感覚入力から行動出力に至るまでの神経回路の全貌を明らかにした。光受容細胞を起点とする神経回路は、脳の後部において光受容細胞からの入力をうけるごく少数の2次ニューロン、2次ニューロンからの入力を受け筋肉を駆動する運動神経回路によって構築されることが明らかとなった。光受容細胞は、運動神経回路を構成するニューロンのうち後方に位置する楕円状の細胞に入力することを明らかにした。様々なマーカー遺伝子との2重染色の結果、この楕円状の細胞は転写因子 *Islet* を発現するニューロンであることが明らかとなった。光制御型チャネル/ポンプを用いた光遺伝学的な解析から、*Islet* を発現するニューロンは遊泳運動の開始や維持に必須の役割をすることが報告されている。以上の結果から、ホヤ幼生の光の状態による行動パターンの変化(暗状態で遊泳運動の開始、明状態で遊泳運動の停止)は、光受容細胞が *Islet* 発現ニューロンの活動パターンをコントロールすることによって制御されていることが示唆された。



ホヤ幼生の光感覚入力から行動出力に至る神経回路  
A: WGAによりトレースした光受容細胞を起点とした神経回路  
B: Aと運動神経回路を基に作成した光感覚入力から行動出力に至る神経回路の模式図  
赤: 光受容細胞, 青: 2次ニューロン, 緑: 3次ニューロン, 黒: モーターニューロン, 黄: 抑制性介在ニューロン

(2)  $Ca^{2+}$  センサータンパク質 GCaMP を発現

するトランスジェニック個体と高速共焦点顕微鏡を用いた  $\text{Ca}^{2+}$  イメージングにより、遊泳運動中の個体において神経活動のイメージングを行うことが出来る実験系を構築した。光受容細胞において、GCaMP8、G-GECO1.1 を発現させ、 $\text{Ca}^{2+}$  イメージングを行ったところ、光刺激依存的に細胞内の  $\text{Ca}^{2+}$  濃度が低下することが明らかとなった。この結果は、ホヤ幼生の光受容細胞は脊椎動物と同様に過分極応答を示すことを示している。また、この結果は、ホヤ幼生の光受容細胞で発現するオプシン遺伝子、光情報伝達系で働く遺伝子群が脊椎動物型であることと一致しており、ホヤ幼生の光受容細胞が生理学的な様々な側面において脊椎動物様の性質を備えていることを示している。また、様々な感覚器でGCaMP8を発現させ、 $\text{Ca}^{2+}$  イメージングを行ったところ、感覚器官の一つであるコロネット細胞が光に対して応答するデータを得ており、コロネット細胞が新奇の光受容細胞である可能性が示唆された。

光受容細胞が入力する2次ニューロンの候補として、脳胞の後部に位置する興奮性ニューロンであるグルタミン酸作動性ニューロンと抑制性ニューロンであるGABA作動性ニューロンを同定した。それぞれのニューロンについて、 $\text{Ca}^{2+}$  イメージングを行ったところ、暗状態から明状態にした場合に活動するニューロン、明状態から暗状態にした場合に活動するニューロンが観察された。ホヤ幼生は暗状態に遊泳運動を開始し、明状態において遊泳運動を停止させるという行動を示すが、この結果は光受容細胞からの入力を受けて、暗状態、明状態それぞれで異なるニューロンが働き行動を生み出している可能性を示唆している。

- (3) 光受容細胞が入力する2次ニューロンの候補であるグルタミン酸作動性ニューロンにおいて、ChR2を発現させ、人為的にその活動を活性化させる実験を行った。その結果、グルタミン酸作動性ニューロンの活性化によりホヤ幼生の遊泳運動は引き起こされた。一方で、GABA作動性ニューロンの活動を人為的に活性化したところホヤ幼生の遊泳運動は停止した。したがって、グルタミン酸作動性ニューロンは遊泳運動を引き起こし、GABA作動性ニューロンは遊泳運動の停止に関与すると予想された。この結果は、ホヤ幼生が暗状態において遊泳運動を開始する場合にはグルタミン酸作動性ニューロンが、明状態において遊泳運動を停止させる際にはGABA作動性ニューロンが関係している可能性が示唆される。しかしながら、グルタミン酸作動性ニューロン、GABA作動性ニューロンのうちの一部が光受容細胞からの入力を受けるため、今後は光受容細胞からの入力を受ける2次ニューロンの活動のみを特異的に活性化させる実験系の構築が必要である。
- (4) 光に対する行動の変異体を単離するこ

とを目的として、突然変異体のスクリーニングを行った。私たちは *Minos* トランスポゾンを用いた Gal4 エンハンサートラップ法を応用することによって、高い確率で遺伝子の近傍や内部にトランスポゾンが挿入されるトランスポゾンベクターを構築することに成功している。約3,000個の卵のスクリーニングにより、計48系統のGal4エンハンサートラップ系統を単離した。得られたGal4エンハンサートラップ系統について、トランスポゾンの挿入箇所を決定したところ神経特異的RNA結合タンパク質 *Musashi*、 $\text{Na}^{2+}$  チャンネル、カイニン酸受容体などいくつかの神経関連遺伝子を変異体の原因候補遺伝子として同定した。得られたGal4エンハンサートラップ系統について、ホモ個体を作製し表現型の解析を行ったが、明確に行動に異常のある変異体は得ることが出来なかった。しかしながら、今回の突然変異体のスクリーニングから心臓の拍動やエラの形成に異常のある変異体などいくつかの変異体を単離することは出来ており、今後はスクリーニングの数を増やすことにより遊泳運動の変異体を単離することが可能であると期待される。

- (5) ホヤ幼生は2種類の光受容細胞、眼点光受容細胞、眼点外光受容細胞を有している。それぞれの光受容細胞で特異的に外来遺伝子を発現させるために、光受容細胞特異的な遺伝子であるオプシン遺伝子 (*Ci-opsin1*) のプロモーター/エンハンサー領域の解析を行い、それぞれの光受容細胞に特異的なエンハンサー領域の同定を試みた。翻訳開始点から上流300bp~150bpの150bp間に光受容細胞に特異的なシスエレメントが存在することを明らかにした。さらにこの光受容細胞に特異的なシスエレメントに結合し、光受容細胞特異的な遺伝子発現を制御する3つの転写因子の同定に成功した。しかしながら、この実験系では、眼点光受容細胞、眼点外光受容細胞を区別するエンハンサー領域を同定することは出来なかった。本研究期間中に、我々とは別のグループから眼点光受容細胞と眼点外光受容細胞は細胞系譜が異なっており、眼点光受容細胞は右側の割球から、眼点外光受容細胞は左側の割球から分化することが報告された。そこで2細胞期または8細胞期の片側の割球にマイクロインジェクション法により *Ci-opsin1* レポーターコンストラクトを導入したところ、眼点光受容細胞、眼点外光受容細胞を別々にラベルすることに成功した。この実験系を用いて、眼点光受容細胞、眼点外光受容細胞それぞれを起点とする神経回路を解析した。その結果、眼点光受容細胞が運動神経回路に入力していることが明らかとなった。したがって、ホヤ幼生に存在する2種類の光受容細胞のうち、主に眼点光受容細胞がホヤ幼生の光に対する行動を制御していることが示唆された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 7件)

1. Hozumi A, Horie T, Sasakura Y  
Neuronal map reveals the highly regionalized pattern of the juvenile central nervous system of the ascidian *Ciona intestinalis*. *Developmental Dynamics*, 査読有, 244 巻, 2015, 1375-1397,  
DOI: 10.1002/dvdy.24317.
2. Kamiya C, Ohta N, Ogura Y, Yoshida K, Horie T, Kusakabe TG, Satake H, Sasakura Y. Nonreproductive role of gonadotropin-releasing hormone in the control of ascidian metamorphosis. *Developmental Dynamics*, 査読有, 243 巻, 2014, 1524-1535,  
DOI: dvdy.24176
3. Hozumi A, Yoshida R, Horie T, Sakuma T, Yamamoto T, Sasakura Y. Enhancer activity sensitive to the orientation of the gene it regulates in the chordate genome. *Developmental Biology*, 査読有, 375 巻, 2013, 79-91,  
DOI: 10.1016/j.ydbio.2012.12.012
4. Razy-Krajka F, Brown ER, Horie T, Callebert J, Sasakura Y, Joly JS, Kusakabe TG, Vernier P. Monoaminergic modulation of photoreception in ascidian: evidence for a proto-hypothalamo-retinal territory. *BMC Biology*, 査読有, 10, 2012, 45,  
DOI: 10.1186/1741-7007-10-45
5. Sasakura Y, Kanda M, Ikeda T, Horie T, Kawai N, Ogura Y, Yoshida R, Hozumi A, Satoh N, Fujiwara S. Retinoic acid-driven Hox1 is required in the epidermis for forming the otic/atrial placodes during ascidian metamorphosis. *Development*, 査読有, 139 巻, 2012, 420-437,  
DOI: 10.1242/dev.080234
6. Sasakura Y, Mita K, Ogura Y and Horie T. Ascidiens as excellent chordate models for studying the development of the nervous system during embryogenesis and metamorphosis. *Development Growth and Differentiation*, 査読有, 54 巻, 2012 年, 420-437.  
DOI: 10.1111/j.1440-169X.2012.01343.x
7. Nishitsuji K, Horie T, Ichinose A,

Sasakura Y, Yasuo H and Kusakabe TG. Cell lineage and cis-regulation for a unique GABAergic/glycinergic neuron type in the larval nerve cord of the ascidian *Ciona intestinalis*. *Development Growth and Differentiation*, 査読有, 54 巻, 2012 年, 177-186.  
DOI: 10.1111/j.1440-169X.2011.01319.x

[学会発表](計 10件)

1. Horie R, Levine M, Horie T. Specification of lateral border of the neural plate in the ascidian embryo. The 22<sup>nd</sup> International Congress of Zoology, 2016 年 11 月 17 日, Okinawa Convention Center, Ginowan, Okinawa, Japan
2. Horie T, Ohkura M, Shimai K, Horie R, Sasakura Y, Kusakabe TG, Nakai J, Levine M, Nakagawa M. Calcium imaging and single cell optogenetic analysis of neural circuit for generating swimming locomotion of the *Ciona intestinalis* larva. The 22<sup>nd</sup> International Congress of Zoology, 2016 年 11 月 15 日, Okinawa Institute of Technology, Onna-son, Okinawa, Japan.
3. Horie T, Ohkura M, Shimai K, Horie R, Sasakura Y, Kusakabe TG, Nakai J, Levine M, Nakagawa M. Structural and physiological analyses of a neural circuit for swimming locomotion of the *Ciona intestinalis* larva. The 8<sup>th</sup> International Tunicate Meeting. 2015 年 7 月 14 日, Aomori, Aomori City Cultural Hall, Aomori, Japan
4. 堀江健生, 大倉正道, 日下部岳広, 中井淳一, 中川将司. ホヤ幼生の遊泳運動神経回路の構造と生理機能の解析. 日本動物学会第 85 会仙台大会, 2014 年 9 月 11 日, 東北大学川内キャンパス, 宮城県, 仙台市
5. Horie T, Ohkura M, Sasakura Y, Kusakabe TG, Nakai J, Nakagawa M. Structural and physiological analyses of a neural circuit for swimming locomotion of the *Ciona intestinalis* larva. Decoding principle of neural circuits using model animal II. 2014 年 9 月 9 日, 名古屋大学東山キャンパス, 愛知県, 名古屋市
6. Horie T, Ohkura M, Kusakabe TG, Nakai J, Nakagawa M. Structural and physiological analysis of neural circuit for swimming locomotion of the ascidian larva. 第 91 回日本生理学会大会, 2014 年 3 月 17 日, 鹿児島大学群元キャンパス, 鹿児島県, 鹿児島市

7. Horie T, Ohkura M, Kusakabe TG, Nakai J, Nakagawa M. *In vivo* calcium imaging of neural circuit for swimming locomotion of the ascidian larva. 第36回日本分子生物学会年会, 2013年12月4日, 神戸国際会議場, 兵庫県, 神戸市
8. 堀江健生. ホヤ幼生における運動神経回路の発生とその動作原理. 第7回 Motor Control 研究会, 2013年9月6日, 東大農学部, 東京都, 文京区
9. Horie T, Ohkura M, Kusakabe TG, Nakai J, Nakagawa M. *In vivo* calcium imaging of neural circuit for swimming locomotion of the ascidian larva. 日本比較生理生化学会第35回大会, 2013年7月13日, イーグレ姫路, 兵庫県, 姫路市
10. Horie T, Sasakura Y. Ependymal cells of chordate larvae are stem-like cells that form the adult nervous system. 1<sup>st</sup> JAMBIO International Symposium, 2013年2月26日, 筑波大学東京キャンパス, 東京都, 文京区

〔図書〕(計 1 件)

1. 堀江 健生, 笹倉 靖徳, カタユウレイボヤの飼育, 研究者が教える動物飼育第3巻 2012年, 共立出版社, pp. 45-50.

〔その他〕

ホームページ等

[http://acafe.jp/Horie\\_Takeo/index.php](http://acafe.jp/Horie_Takeo/index.php)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

堀江 健生 (HORIE, TAKEO)

筑波大学・生命環境系・助教

研究者番号: 10455925