

甲南大学 博士学位論文

ホヤ幼生における GnRH 神経系と
グリア上衣細胞の機能解析

甲南大学大学院

自然科学研究科 生命・機能科学専攻

2023 年 3 月

32022001

大川 奈菜子

OKAWA Nanako

目次

要旨	p. 1
1. 序論	p. 3
1.1 脊椎動物の神経系	
1.2 神経伝達物質を用いたシナプス伝達	
1.3 脊椎動物のパターン運動を制御する神経系	
1.4 脊椎動物のグリア細胞	
1.5 ゴナドトロピン放出ホルモン (GnRH) 神経系	
1.6 カタユウレイボヤ <i>Ciona intestinalis</i> type A (<i>Ciona robusta</i>)	
1.7 カタユウレイボヤの神経系	
1.8 カタユウレイボヤ幼生の遊泳行動を制御する神経系	
1.9 カタユウレイボヤにおける GnRH 神経系	
1.10 <i>in vivo</i> カルシウムイメージング	
1.11 光遺伝学	
1.12 本研究の目的	
2. 結果	p. 20
2.1 ホヤ幼生の中樞神経系で <i>gnrh2</i> を発現する細胞種の同定	
2.2 コリン作動性ニューロンとドーパミン産生細胞の一部で <i>gnrh2</i> が発現する	
2.3 運動神経節内で <i>gnrh2</i> を発現するコリン作動性ニューロンの細胞種の同定	
2.4 <i>gnrh2</i> 発現感覚ニューロン、aATENs のカルシウム濃度変化	
2.5 運動神経節と尾部神経索前方におけるカルシウム濃度変化と尾部運動の関係	

2.6	後期尾芽胚期における <i>gnrh2</i> 発現細胞の活動	
2.7	周期的なカルシウム応答を示す <i>gnrh2/vacht</i> 陽性ニューロンの細胞種の同定	
2.8	ホヤ幼生の光受容と尾部神経索のグリア上衣細胞の活動の関係	
2.9	コリン作動性ニューロンを活性化させたときの尾部神経索の <i>gnrh2</i> 発現グリア 上衣細胞の活動	
2.10	尾部神経索のグリア上衣細胞で発現している神経伝達物質受容体遺伝子の探 索	
3.	考察	p. 35
3.1	ホヤ幼生におけるカルシウムイメージングと光遺伝学	
3.2	ホヤ幼生の脳胞における <i>gnrh2</i> 発現ニューロン	
3.3	ホヤ幼生の運動神経節内の <i>gnrh2</i> 発現コリン作動性ニューロン	
3.4	原始プラコード由来 <i>gnrh2</i> 発現 aATENs の活動	
3.5	運動神経節や尾部神経索の <i>gnrh2</i> 発現細胞の活動と尾部運動の関係	
3.6	ホヤ幼生の遊泳行動とグリア細胞の活動	
3.7	尾部神経索グリア上衣細胞と運動神経節内コリン作動性ニューロンの相互作用	
3.8	ホヤ幼生における尾部神経索グリア上衣細胞の役割	
4.	結語	p. 48
5.	材料と方法	p. 50
6.	引用文献	p. 60
7.	図・表	p. 76
8.	謝辞	p. 110

要旨

ゴナドトロピン放出ホルモン (GnRH) は、下垂体からゴナドトロピンを放出させる神経ペプチドであり、脊椎動物の生殖機能の重要な調節因子である。また、GnRH は神経修飾因子として脳の各所や嗅上皮などの活動の調節を行っていると考えられている。以前の研究で、カタユレイボヤ幼生において、GnRH をコードする *gnrh2* 遺伝子が脊椎動物の後脳・脊髄の相同器官である運動神経節と神経索で発現し、その受容体が筋肉細胞で発現していることが明らかにされた。ホヤ幼生は生殖活動とは無関係な発生段階であるため、GnRH の新奇生理機能が推測された。本研究では、ホヤ幼生における GnRH および *gnrh2* 発現細胞の生理機能を明らかにすることを目的として、*gnrh2* を発現する細胞を同定し、蛍光 Ca^{2+} センサータンパク質を用いて、これらの細胞の活動をリアルタイムで可視化した。その結果、(1) *gnrh2* を発現する特定のコリン作動性ニューロンが尾芽胚期に周期的な活動を示す、(2) *gnrh2* を発現する尾部神経索のグリア上衣細胞で幼生の遊泳運動や眼点への光刺激と連動した Ca^{2+} 濃度変化が起こる、という2つの新しい現象を発見した。運動に伴うグリア細胞の活動は過去に知られていない現象であるため、この現象のしくみと生理機能を明らかにすることを目的として、光活性化イオンチャネルを用いた光遺伝学的手法とカルシウムイメージングを併用し、運動神経節のニューロンの活動とグリア上衣細胞の活動の相関性を解析した。その結果、コリン作動性ニューロンを活性化した後、グリア上衣細胞内の Ca^{2+} 濃度が上昇した。また、単一細胞トランスクリプトーム解析の結果、ニコチン性アセチルコリン受容体をはじめとする複数種類の神経伝達物質受容体がグリア上衣細胞に発現していることが明らか

になった。これらの結果より、ホヤ幼生において、コリン作動性ニューロンからの情報をグリア上衣細胞が受け取り、相互作用していることが示唆された。以上、本研究では、*gnrh2*発現細胞の解析を通して、ホヤ幼生のいくつかのニューロンのユニークな性状を明らかにするとともに、グリア細胞の活動およびニューロンとの相互作用に関する新たな知見を得た。脊椎動物においても、グリア細胞がニューロンと情報交換を行い、脳機能に重要な役割をもつことが明らかになりつつあるが、詳細は未解明である。本研究では、ホヤ幼生において、ニューロンだけでなく、グリア細胞が神経や筋肉の活動の制御に能動的に関与している可能性が示され、グリア細胞の機能と役割の理解に貢献することが期待される。

1. 序論

1.1 脊椎動物の神経系

ヒトはどのようにして見る、聞くなどの五感を操り、どのようにして喜怒哀楽の感情をよび起こすのか。走ったり投げたり眠ったり、いちいち考えなくても自然と心臓は拍動し、血はめぐり続ける。これらの行動と運動はどこから生み出されるのか。思考や学習、記憶と忘却は何がどのように管理しているのか。これらはすべて脳のはたらきである。脳のはたらきの謎を神経科学の知見から解明するために古くから多くの研究がおこなわれている。近年では、神経科学の発展により、さまざまな脳疾患や精神疾患の背景にある分子・細胞レベルの現象の理解が進み、こうした病気の予防法や治療法の開発に貢献している。しかし、脳の機能にはまだ多くの謎が残されており、その解明には、技術的な革新や未知の分子・細胞機構の解明など、さらなる神経科学の研究の進展が必要である。

脊椎動物の神経系は、中枢神経系と末梢神経系に分けることができ、ニューロンとグリア細胞で構成されている。中枢神経系はニューロンの細胞体が多く集まっている脳と脊髄から構成され、神経系のうち脳と脊髄を除くすべての部分を末梢神経系とよぶ。中枢神経系が、全身に分散している末梢神経と、感覚などの情報を交換し処理することで、さまざまな生命活動を制御している。神経系の中でも最も多くの情報を処理し、生命活動の制御の大部分を担っていると考えられているのが脳である。脳の基本構成単位である神経細胞はニューロンともよばれ、ニューロン同士で情報交換を行うことで神経回路を形成している。ニューロンは、核を含む細胞体から多数の枝分かれした樹状突起を伸

ばし、他のニューロンからの情報を受け取っている。また、1つのニューロンに対し通常1本の軸索を伸ばし、これが細胞体からの情報を伝える電線のような役割を果たす。軸索の先端は、他のニューロンや筋肉細胞と接触しており、この接触部位はシナプスとよばれる。シナプスで接続する細胞のうち、情報を入力する細胞をシナプス前細胞、受容する細胞をシナプス後細胞とよび、シナプスにおける2つの細胞の間の空間をシナプス間隙とよぶ (Bear et al., 2007)。シナプスで起こる、ニューロンから他のニューロンや細胞へ情報を伝えることはシナプス伝達とよばれている。シナプス伝達には、電気シナプスと化学シナプスの2種類がある。電気シナプスは構造が比較的単純であり、シナプス前からシナプス後に直接イオンが流れるものである。電気シナプスはギャップ結合で連結されている。コネクシンタンパク質6個が結合し、コネクソンとよばれるチャンネルを形成し、隣接する細胞のコネクソン同士が連結することでギャップ結合チャンネルが形成される。ギャップ結合部位では、前後両方向に等しくイオンが流れる両方向性をもつ。電気シナプスの伝達速度は非常に速く、シナプス前細胞で生じた活動電位を瞬時にシナプス後細胞に伝達し、活動電位を引き起こすことができる。電気シナプスは脊椎動物の脳内にも存在しており、隣接するニューロンどうしが高度に同期することが必要な部位でしばしばみられる。もうひとつのシナプスである化学シナプスは多くのニューロン間や神経筋接合部でみられる、化学信号を用いた伝達である。ニューロンが受け取った情報が活動電位として電気信号の形で軸索を伝わり、軸索終末で化学信号に変換され、シナプス間隙に化学物質を放出することで次のニューロンへ情報を渡す。化学信号はシナプス後膜で再び電気信号に変換され、次の細胞へ伝達される。化学信号としてシナプス間隙に放出される化学物質を神経伝達物質という。神経伝達物質には、後に述べるようにさまざまな種類があり、ニューロンによって使い分けられている。それぞれのニュー

ーロンによってこのような電気信号と多様な化学信号の伝達が行われ、脳の複雑なネットワークが形成されている。ヒトの脳には約 1000 億個のニューロンがあり (Herculano-Houzel, 2012)、この膨大な数のニューロンがつくり出す複雑な脳のネットワークは全宇宙のなかで最も複雑なものといわれている (Bear et al., 2007)。

1.2 神経伝達物質を用いたシナプス伝達

化学シナプス間の情報伝達には、神経伝達物質が用いられている。神経伝達物質は、アミノ酸、モノアミン、ペプチドの大きく 3 種類に分類することができる。主な神経伝達物質として、アミノ酸には興奮性のグルタミン酸や抑制性の γ -アミノ酪酸 (GABA)、グリシンなどが、モノアミンにはアドレナリン、ドーパミン、セロトニンなどが、ペプチドにはゴナドトロピン放出ホルモン (GnRH)、バソプレシン、オキシトシン、ソマトスタチン、ニューロペプチド Y などが知られている。これらの他にアセチルコリンも主要な興奮性神経伝達物質の一つである。神経伝達物質はニューロンの終末または細胞体で生成され、シナプス小胞で貯蔵される。シナプス前終末に活動電位が到達し、脱分極が起こると、電位依存性カルシウムチャネルが開く。軸索終末内にカルシウムイオンが流れ込み、シナプス小胞の細胞膜とシナプス前膜が融合することで神経伝達物質がシナプス間隙に放出される。放出された神経伝達物質はシナプス後膜上にある神経伝達物質受容体で受容される。

神経伝達物質受容体は、イオンチャネル型受容体と G タンパク質共役型受容体の大きく 2 種類に分けられる。イオンチャネル型受容体は、中心に小孔を形成する 4~5 個のサブユニットから成る膜貫通性タンパク質であり、アミノ酸、モノアミンに属する神経伝達物質とアセチルコリンがこの型の受容体をもつ (Bear et al., 2007)。神経伝達物

質が結合すると、サブユニットが変形し小孔が開く。そこから、陽イオンの Na^+ や Ca^{2+} 、または陰イオンの Cl^- が細胞内に流入する。 Na^+ や Ca^{2+} が流入した場合、その細胞は脱分極を起こし、興奮性の効果をもたらす。 Cl^- が流入した場合、その細胞は過分極を起こし、抑制性の効果をもたらす。また陽イオンでも K^+ チャンネルの場合には、チャンネルが開くと K^+ が細胞内から細胞外へ流出し、 Cl^- の流入と同様に抑制性の効果をもたらす。

G タンパク質共役型受容体は、7 回膜貫通型ポリペプチドであり、アミノ酸、モノアミン、ペプチドに属する神経伝達物質とアセチルコリンがこの型の受容体をもつ (Bear et al., 2007)。神経伝達物質が結合すると、G タンパク質が活性化され、酵素などのエフェクタータンパク質を活性化することで二次メッセンジャーカスケードが起こり、細胞内のカルシウムイオン小胞からカルシウムイオンが放出されたり、タンパク質のリン酸化または脱リン酸化が起こる。そして、さらに下流にある酵素や他のチャンネルなどが刺激されることで、細胞内の物質代謝が変化する。この反応は複雑かつ比較的緩徐で長時間持続する。神経伝達物質の多くは、イオンチャンネル型と G タンパク質共役型受容体の両方に作用する。よって、同じ神経伝達物質でも結合する受容体の種類によって、シナプス後細胞で異なる作用が起こる。このように、多様な神経伝達物質の放出と受容によって情報交換が行われ複雑な神経回路が構成されている。

1.3 脊椎動物のパターン運動を制御する神経系

ヒトにおいて、歩行運動や呼吸などのリズムカルなパターン運動を脳や感覚入力から独立して引き起こすことができる神経回路網のことを中枢パターン発生器 (central pattern generator: CPG) という。運動制御を行う CPG は脊髄にある。CPG 制御機構は祖先的な形質を保持する脊椎動物であるヤツメウナギでも報告されている (Grillner

et al., 1998)。ヤツメウナギの尾を左右交互に動かすことで生まれる遊泳行動制御機構に注目した研究において、ヤツメウナギの脊髄を取り出し、軸索断片に電気刺激を与えると、泳ぐときに起こるような交互の律動的な活動が脊髄内で発生し、脊髄内の介在ニューロンがCPG制御機構に関与していることが明らかになった(Grillner et al., 1998)。運動制御を行うCPGは興奮性ニューロンと抑制性ニューロンの交互の活性化により構成されている。概要は以下のとおりである。筋収縮を制御する興奮性ニューロンが脳からの一定のシグナルにより活性化し、筋肉と抑制性ニューロンが活性化される。活性化された抑制性ニューロンは反対側の興奮性ニューロンを抑制し、筋肉の収縮を抑制する。2つの興奮性ニューロンは互いに別の抑制性のニューロンを介して抑制し合っているため、活性化が交互に起こる。この交互に起こる活性化によって歩行や遊泳のパターン運動が生成されている(Kiehn, 2006)。このようなパターン運動を形成するCPGは、ヤツメウナギやヒトを含むすべての脊椎動物に存在する(Kiehn, 2006)。

1.4 脊椎動物のグリア細胞

ヒトの脳には約1000億個のニューロンが存在しているが、それと同数ほどのグリア細胞が存在しており、脳の体積の多くを占めている(Herculano-Houzel, 2012; Gabi et al., 2010)。グリア細胞には主に、アストロサイト、オリゴデンドロサイト、ミクログリア、上皮細胞の4種類が存在する。

アストロサイトは多数に分岐した樹状突起をもち、これをシート状に広げている(Hama et al., 2004)。アストロサイトの突起の一部は血管と接触しており、血管とアストロサイト間に網目状の空間が構成されている。ニューロンのネットワークはこの空間内に配置され、アストロサイトはニューロンの構造やニューロン間の空間を維持して

いる (Nedergaard et al., 2003)。また、アストロサイトは血流からニューロンへグルコースなどの栄養物質を供給する役割も担っている (Tsacopoulos and Magistretti, 1996; Magistretti and Pellerin, 1999)。さらに、アストロサイトは複数種類の神経伝達物質受容体を発現していることが明らかになっている (Benveniste et al., 1987)。そして、アストロサイトは膜電位変化を示さないが、複数の神経伝達物質に対してカルシウム応答を示すことが明らかになった (Cornell-Bell et al., 1990; Barry et al., 1991; Cornell-Bell and Finkbeiner, 1991)。これらの発見は、アストロサイトがニューロンと情報交換を行い、脳の高次機能の制御に積極的に関与していることを示唆する。

オリゴデンドロサイトも突起をもち、これがニューロンの軸索に巻き付き髄鞘 (ミエリン) を形成する。軸索に巻き付いている髄鞘はニューロンの活動電位効率を上昇させる役割をもつ。髄鞘をもつ神経線維は有髄神経線維、もたないものは無髄神経線維とよばれ、中枢神経系の神経線維の多くは有髄神経である。オリゴデンドロサイトのミエリン形成により、神経伝達速度が促進され、迅速な情報伝達が可能となっている (工藤, 2015)。

ミクログリアは、他のグリア細胞に比べて小さく、突起も少ない。正常な脳内のミクログリアは突起を伸ばした形 (静止型) をしているが、何か異常が生じると、突起を縮め、細胞体部分が大きくなる「活性型」となり、アメーバ状に形を変えて異常部周辺を動くという性質をもつ (Davalos et al., 2005)。これにより、ミクログリアはマクロファージのように細胞貪食活動を示し、損傷を受けた細胞を除去している可能性が示されている。このように、ミクログリアは、脳内の保守点検と清掃システムの役割を担っていると考えられている (Davalos et al., 2005)。

上皮細胞は、脳室と脊髄中心管を覆っており、脳室と髄液を隔てる壁の役割をしてい

る。また、上皮細胞は繊毛をもち、脳髄液の流れを調節し、老廃物の除去など、恒常性と代謝に関与していると考えられている。上皮細胞の異常は、神経変性疾患や発達障害を引き起こすことが示されているが、そのメカニズムや機能の詳細は不明である (Del Bigio, 1995; Nelles and Hazrati, 2022)。

このように、グリア細胞はニューロンへの栄養供給や構造の維持など、神経活動を補助する細胞であると考えられてきた。しかし、近年の研究により、従来考えられていたよりも能動的に神経系の機能を制御している可能性があることが明らかにされつつある (Araque et al., 2014; Fields et al., 2015)。しかし、グリア細胞がどの程度、どのようなくみで複雑な神経活動の制御に関与しているかはまだ不明な点が多い。

1.5 ゴナドトロピン放出ホルモン (GnRH) 神経系

脊椎動物において、ゴナドトロピン放出ホルモン (GnRH) は生殖機能の制御に関与する重要な神経ペプチドホルモンである。脊椎動物における GnRH 神経系は、視床下部 GnRH 系、中脳 GnRH 系、終神経 GnRH 系の 3 種類がある (市川ほか, 1998)。視床下部 GnRH は視床下部のニューロンで産生され、下垂体前葉から生殖腺刺激ホルモン (ゴナドトロピン) の放出を促進させる (市川ほか, 1998)。ゴナドトロピンには、黄体形成ホルモン (LH) と卵胞刺激ホルモン (FSH) がある。下垂体から放出されたゴナドトロピンは生殖腺 (卵巣や精巣) に作用し、テストステロンやエストロゲンなどの性ホルモンを分泌させ、この性ホルモンの分泌により生殖活動が調節される。この一連のシステムは視床下部—下垂体—生殖腺軸とよばれ、この中でも GnRH は生殖機能を制御する重要な調節因子としての役割を担っている (市川ほか, 1998)。中脳 GnRH 系と終神経 GnRH 系は脳内に広く投射しており、神経修飾作用をもつと考えられてい

る (市川ほか, 1998)。これらの GnRH 系は下垂体には投射しておらず、フェロモン受容や性行動の制御に関わることが示唆されているが詳細は不明な点が多い (Oka and Matsushima, 1993)。また、視床下部の GnRH ニューロンの前駆体は鼻原基 (鼻プラコード) から生じ、発生が進むとともに、嗅神経をたどって脳内に移動する (Schwanzel-Fukuda and Pfaff, 1989; Wray et al., 1989)。

GnRH 受容体は G タンパク質共役型受容体ファミリーの一員である。GnRH ペプチドを受容すると、G タンパク質である Gq と G₁₁ タンパク質が活性化され、PLC β 1 を特異的に活性化する。そして PIP2 が IP3 と DAG に加水分解され、IP3 を介して細胞内のカルシウムイオン小胞からカルシウムイオンが放出され、細胞の代謝が調節される (市川ほか, 1998)。GnRH 受容体やその mRNA の発現が、下垂体や生殖腺の他に、海馬や前帯状回皮質、視床下部の GnRH ニューロンなど、脳内のさまざまな部位で確認されている (Millan et al., 1986; Jennes and Conn, 1994)。また、多くの腫瘍性組織で GnRH 受容体が発現し、細胞増殖抑制に関与している可能性が報告されており、GnRH の臨床的利用の面でも研究がおこなわれている (Ackerman et al., 1994; Dondi et al., 1994; Miller et al., 1985; Pati and Habibi, 1993)。このように、脊椎動物において、GnRH 神経系は脳の広範囲に分布し、生殖機能や嗅上皮の活動の調節に重要な役割を担っていることに加え、GnRH とその受容体の発現パターンの多様性などから、GnRH 神経系が非生殖性生理機能ももつ可能性が示されている。

1.6 カタユウレイボヤ *Ciona intestinalis* type A (*Ciona robusta*)

海産無脊椎動物であるホヤは脊索動物門尾索動物亜門に分類され、ヒトを含む脊椎動物に最も近縁な生物である (Delsuc et al., 2006; Putnam et al., 2008; 図 1)。本研究で

用いたカタユウレイボヤ *Ciona intestinalis* type A (近年はしばしば *Ciona robusta* として扱われる)の成体は雌雄同体であり、自然界では光の明暗により放卵と放精を制御している (Lambert and Brandt, 1967)。カタユウレイボヤの受精卵は 18°C飼育下では受精後約 18 時間 (18 hpf) でオタマジックシ型の幼生が孵化する。このホヤ幼生は、尾部をもっており、海中を遊泳することができる。また、ホヤ幼生は平衡器と眼点を持ち、重力と光を感知し、遊泳行動をおこなっている (Tsuda et al., 2003a; Sakurai et al., 2004; 日下部 2009; Kusakabe, 2017; 図 2A)。ホヤ幼生は卵巣や精巣が未分化であり生殖機能をもたない。幼生は受精後約 25 時間で岩場などに付着、変態し、幼若体期を経て生殖機能をもつ成体となる。

ホヤ幼生は体を構成する細胞が約 2600 個と非常に少なく、単純な構造をしている。しかし、基本的な身体の構造、ボディプランは脊椎動物と類似している (図 2B)。ニューロンの数も約 330 個と非常に少なく単純であるが、ホヤのもつ中枢神経系は脊椎動物の神経系と相同であり、発生パターンや神経系の構成や機能に共通性がみられる (Meinertzhagen and Okamura, 2001)。また、カタユウレイボヤにおいて、2002 年に全ゲノム配列が解読され、ゲノムサイズが 160Mb、遺伝子数が約 15500 個であることが明らかになった (Dehal et al., 2002)。さらに、ホヤ胚の細胞系譜の詳細な解析がおこなわれており、この情報を利用できる点や、遺伝子導入や遺伝子発現阻害実験なども簡単に行うことができるため、発生過程における遺伝子制御の研究や神経系の機能解析の研究が行われている (Satoh et al., 2003; Kusakabe et al., 2005; Horie et al., 2011)。また、ホヤ幼生のからだは透明であるため、蛍光タンパク質遺伝子などを導入することで、特定の遺伝子が発現している細胞種の同定やタンパク質の局在を生きている個体内 (*in vivo*) で可視化し観察することができる。さらに、細胞内のカルシウム濃度変化を蛍光

タンパク質により可視化し、細胞の活動を間接的に計測することができるカルシウムイメージング法を用いることで、*in vivo* でニューロンや他の細胞の挙動を観察することができる。これは、組織切片や培養細胞を用いた (*in vitro* の) 神経生理解析と比較して、動物個体における細胞本来の挙動を観察できると考えられる。したがって、カタユウレイボヤは神経系の成り立ちや生理機能を理解するためのシンプルで優れたモデル生物である。

1.7 カタユウレイボヤの神経系

カタユウレイボヤ幼生の神経系も脊椎動物と同様に、中枢神経系と末梢神経系に分けることができ、中枢神経系はニューロンとグリア細胞で構成されている。中枢神経系は大きく3つの領域に分けることができる。眼点と平衡器の2つの感覚器官を含む脳胞、脳胞と尾部の間に存在する運動神経節、尾部全体におよぶ神経索である (図 2A)。脳胞内の眼点は光を、平衡器は重力を感知する (Sakurai et al., 2004; 日下部 2009; Kusakabe, 2017)。運動神経節内には、幼生の尾部筋肉を神経支配し、遊泳運動を制御しているニューロンが含まれている (Bone, 1992; Meinertzhagen and Okamura, 2001; Okada et al., 2001; Meinertzhagen et al., 2004; Imai and Meinertzhagen, 2007)。神経索は、背腹左右4列、3種類のグリア上衣細胞 (蓋板、底板、側壁細胞) で構成されており、これらの細胞は繊毛をもつ (Katz, 1983; Crowther and Whittaker, 1992, 1994)。また、左右のグリア上衣細胞 (側壁細胞) に沿って体幹部から神経軸索が走行している (Crowther and Whittaker, 1994; 図 2B 右、図 12C)。グリア上衣細胞は脳胞や運動神経節にも存在している。脳胞は脊椎動物の前脳と中脳、運動神経節は後脳、神経索は脊髄に相同する器官であると考えられている (Kusakabe, 2017; 図 2A)。ホヤ幼生の末梢神経は、幼生前端

の付着突起や体幹部および尾部の表皮に存在しており、主に感覚ニューロンであると考えられている (Horie et al., 2008)。

カタユレイボヤ幼生の神経系も脊椎動物と同じ神経伝達物質を放出するニューロンをもつ。特に、コリン作動性ニューロン、グルタミン酸作動性ニューロン、ドーパミン産生細胞、GABA/グリシン作動性ニューロンは、ホヤ幼生内での分布も明らかになっている (Yoshida et al., 2004; Horie et al., 2008; Razy-Krajka et al., 2012; Kusakabe, 2017)。これらの分布様式は、各種ニューロンを区別するために得られた特異的な抗体の作製や遺伝子プロモーター解析によって明らかになった。各種ニューロンを、シナプス小胞に存在する小胞型神経伝達物質輸送体に特異的な抗体や、特異的遺伝子プロモーターを用いた蛍光レポータータンパク質の発現によって標識することで、その数や分布が解明されている (Yoshida et al., 2004; Horie et al., 2008, 2010; Kusakabe, 2017)。また、ホヤ幼生の神経回路のコネクトーム解析も行われており、ニューロン間の接続に関して詳細な情報が得られている (Ryan et al., 2016, 2017)。これらの研究により、ホヤ幼生における、さまざまなニューロンを介した神経回路の全貌が明らかになりつつある。しかし、これまでの研究の対象はほぼすべてニューロンであり、ホヤの神経系におけるグリア細胞の生理機能や役割については、中枢神経系の構造に寄与すること以外は明らかになっていない。

1.8 カタユレイボヤ幼生の遊泳行動を制御する神経系

脊椎動物は、歩行などのリズムカルなパターン運動を制御する中枢パターン発生器 (CPG) を脊髄にもつ (図 3 上)。カタユレイボヤ幼生もこの CPG に類似した機能をもつと考えられている。ホヤ幼生の運動神経節内には、興奮性のコリン作動性ニュー

ロンが、尾部神経索の前方には抑制性の GABA/グリシン作動性ニューロン (anterior caudal inhibitory neuron: ACIN) が存在している (Horie et al., 2010)。コリン作動性ニューロンの軸索は尾部の筋肉に投射し、筋肉収縮を制御しており、ACIN は前方に軸索を伸ばし、反対側のコリン作動性ニューロンを抑制していると考えられている (Horie et al., 2010; 図 3 下)。この、コリン作動性ニューロンと ACIN のはたらきにより、ホヤ幼生の左右にリズムカルな尾部運動がうまれる。これは、脊椎動物の CPG 回路に類似した機能であると考えられる (Horie et al., 2010)。

このようなホヤ幼生の尾部運動を制御する神経回路に重要である、運動神経節内のコリン作動性ニューロンは少なくとも 6 対 12 個存在しており、それぞれ特異的な転写因子が発現することが明らかになっている (Horie et al., 2010; Stolfi and Levine, 2011; Navarrete and Levine, 2016; 図 7)。また、これらのコリン作動性ニューロンには、運動ニューロンや介在ニューロンが含まれている (Ryan et al., 2016)。これらのニューロンは特異的遺伝子の発現や細胞や軸索の形態、位置を指標として、それぞれ区別することができる (図 7)。しかし、これら個々のニューロンの役割は明らかになっていない。

1.9 カタユウレイボヤにおける GnRH 神経系

カタユウレイボヤの成体において、GnRH は放卵放精を促進し、生殖機能の制御に関与していることが示唆されている (Terakado, 2001)。カタユウレイボヤのゲノムには 2 つの GnRH 前駆体遺伝子 (*gnrh1*, *gnrh2*) と 4 つの GnRH 受容体遺伝子 (*GnRHR1*, *GnRHR2*, *GnRHR3*, *GnRHR4*) が存在する (Kusakabe et al., 2003; Adams et al., 2003; Tello et al., 2005; Sakai et al., 2010)。2 つの GnRH 前駆体遺伝子はそれぞれ構造の異なる 3 つの GnRH ペプチドをコードしている。*gnrh1* 遺伝子は tGnRH3, tGnRH5, tGnRH6

を、*gnrh2* 遺伝子は tGnRH4, tGnRH7, tGnRH8 をコードしている。よって、結果的にカタユレイボヤには 6 種類の GnRH が存在すると考えられている (Kusakabe et al., 2003; Adams et al., 2003; Tello et al., 2005)。さらに、これらの GnRH 前駆体遺伝子や GnRH 受容体遺伝子が、生殖機能をもたない発生段階である幼生期でも発現していることが明らかになっている (Kusakabe et al., 2012)。GnRH 前駆体遺伝子は脳胞や運動神経節、神経索の中枢神経系や、末梢神経系である付着突起と神経系で広く発現している。GnRH 受容体遺伝子は、中枢神経系や尾部の筋肉細胞、脊索で発現が報告されている (Kusakabe et al., 2012)。生殖機能をもたないホヤ幼生でこれらの GnRH 遺伝子が発現していることから、GnRH 神経系が生殖機能とは無関係な機能をもつ可能性が示唆された。また、メダカの稚魚でも生殖とは直接関わりのない後脳や脊髄で GnRH 遺伝子が発現していることが報告され、非生殖性 GnRH 系は脊椎動物にもみられる可能性が示されている (Kusakabe et al., 2012)。しかし、生理機能や役割についてはまだ明らかになっていない。ホヤ幼生におけるこれまでの研究で、幼生から成体への変態過程の制御に GnRH が関与していることが報告されているが (Kamiya et al., 2014; Hozumi et al., 2020)、遺伝子の多様性や発現パターンより、他にも新奇機能があると考えられる。本研究では、脳胞、運動神経節、尾部神経索の中枢神経系で顕著な発現がみられた *gnrh2* 遺伝子を研究対象とした (図 4)。

1.10 *in vivo* カルシウムイメージング

ニューロンや骨格筋は細胞膜上にカルシウムイオンチャネルをもっており、カルシウムイオンを細胞内のメッセンジャーとして利用する。例えば、カルシウムイオンは、ニューロンでは活性化による神経伝達物質の遊離を、骨格筋では筋細胞の収縮を引き起こ

す。細胞外液中には細胞内の1万倍以上の濃度のカルシウムイオンが存在している。カルシウムイオンチャネルに刺激が加わると活性化し、チャネルが開口する。このとき、細胞外液中のカルシウムイオンが細胞内に一気に流入し、細胞内のカルシウムイオン濃度が上昇する。このような細胞内の劇的なカルシウムイオン濃度変化が、さまざまな生命現象の引き金となっている。

この細胞内のカルシウムイオン濃度の変化を利用して、細胞の活性を間接的に測定することができる、蛍光カルシウム指示薬や蛍光カルシウムセンサータンパク質を用いたカルシウムイメージング法が開発された。本研究では、蛍光カルシウムセンサータンパク質である G-CaMP の一種である G-CaMP8 (Ohkura et al., 2012) を用いた。G-CaMP は GFP 構造の中にカルモジュリン (CaM) とミオシン鎖 (M13) が組み込まれた蛍光タンパク質である (Nakai et al., 2001)。カルシウムイオン非存在下では G-CaMP はほとんど蛍光を発しないが、カルシウムイオンがカルモジュリンに結合すると、GFP の発色団が形成され蛍光を発する。カルシウムイオン濃度に応じて GFP の蛍光強度が変化するため、細胞の活動を示すカルシウム濃度の変化を GFP の蛍光強度変化として可視化し間接的に計測することができる。G-CaMP 遺伝子を特定のプロモーターと連結させ、生物個体に導入することが可能であり、ニューロンや骨格筋など、細胞特異的に発現させ解析することができる。本研究では、G-CaMP8 を用いたカルシウムイメージング法をホヤ幼生に適用し、光刺激や行動解析を組み合わせた解析を行った。これにより、個体レベルで *gnrh2* 発現細胞の活動や他の細胞種との相互作用を明らかにすることを旨とした。

1.11 光遺伝学

光遺伝学とは、光によって活性化されるタンパク質（光活性化タンパク質）を遺伝子導入法などで特定の細胞に発現させ、光照射によって細胞の活性化または抑制を人工的に操作する技術である。この技術の開発により、目的のニューロンの活動を自由に操作し、その行動への影響など観察することで、目的のニューロンの役割や神経回路の機能を解析することができるようになった。光活性化タンパク質の多くは微生物オプシンから同定され、代表的なものとして、チャンネルロドプシン (ChR) やハロロドプシン (HR) が挙げられる (Nagel et al., 2002; Matsuno-Yagi and Mukohata, 1977)。緑藻クラミドモナス *Chlamydomonas reinhardtii* 由来のチャンネルロドプシン 2 (ChR2) は陽イオンチャンネルであり、470 nm 付近の青色光を照射することで開口する。ChR2 を発現した細胞に青色光を照射することで、 Na^+ や Ca^{2+} が細胞内に流入し、脱分極を起し活性化させることができる (Nagel et al., 2003)。高度好塩性アルカリ古細菌 *Natronomonas pharaonis* 由来のハロロドプシン (NpHR) は陰イオンチャンネルであり、590 nm 付近の黄色光を照射することで開口する。NpHR を発現した細胞に黄色光を照射することで、塩化物イオンが細胞内に流入し、過分極を起し抑制させることができる (Lanyi and Duschl, 1990)。これらの光活性化タンパク質は人為的に変異させることによって、効率や機能を改良する試みも行われている。

光活性化タンパク質として ChR2 を用い、G-CaMP8 を用いたカルシウムイメージングと併用する際の問題は、ChR2 の刺激光と G-CaMP8 の励起光がどちらも青色光であり、G-CaMP8 の励起光によって ChR2 が活性化されてしまう可能性がある点である。本研究では、光活性化タンパク質としてクリムゾンを用いることによってこの問題を解消した。クリムゾンは、緑藻クラミドモナス *Chlamydomonas noctigama* 由来の光依存

性陽イオンチャネルタンパク質である。590 nm の赤色光を照射するとチャネルが開き、細胞内に陽イオンを流入させることによって細胞を脱分極させ活性化させることができる (Klapoetke et al., 2014)。本研究では、作用スペクトルを変更せずに感度を向上させた K176R 変異をもつクリムゾン R を使用した (Oda et al., 2018)。

1.12 本研究の目的

これまでの研究で、生殖機能をもたないホヤ幼生で GnRH 遺伝子やその受容体が発現していることが明らかになっている (Kusakabe et al., 2012)。GnRH が生殖とは無関係なはたらきをもつことが予想され、この非生殖性 GnRH 系は脊椎動物でもみられる可能性が示されているがその詳細は不明である。

脊椎動物において、グリア細胞が神経活動の制御に重要であることが示唆されているが (Araque et al., 2014; Fields et al., 2015)、その役割やしくみは明らかになっていない。そこで、脊椎動物と相同であるが構造が単純な神経系をもつカタユウレイボヤ幼生を用いた解析を試みた。ホヤ幼生は神経回路の全貌が明らかにされつつあるが (Ryan et al., 2016, 2017)、これまでの研究は専らニューロンに焦点を当てた研究であり、グリア細胞については調べられていない。

以上の背景をふまえ、本研究では、ホヤ幼生のグリア細胞を含む中枢神経系で顕著に発現している *gnrh2* に注目し、カタユウレイボヤにおける非生殖性 GnRH 系やグリア細胞の機能を明らかにすることを目的とした。

本研究では、*gnrh2* 遺伝子上流のシス発現調節領域 (以後「プロモーター」とよぶ) を用いて蛍光タンパク質を発現させ、カタユウレイボヤ胚または幼生の *gnrh2* 発現細胞を可視化した。各種ニューロン特異的遺伝子マーカーまたは抗体を用いて二重免疫染

色を行い、*gnrh2*を発現している細胞の種類を同定した。また、G-CaMP8を*gnrh2*プロモーターにつないだ*gnrh2*>G-CaMP8コンストラクトをエレクトロポレーション法でカタユレイボヤに導入し、*gnrh2*発現細胞の活動をリアルタイムで可視化した。その結果、複数種類のニューロンやグリア細胞で*gnrh2*が発現していた。さらに、尾部運動や光に対する遊泳行動と*gnrh2*発現細胞の活動に相関性がみられた。そこで、尾部神経索の*gnrh2*発現グリア上衣細胞に注目し、光遺伝学とカルシウムイメージングを併用した解析を行った。ホヤ幼生の尾部運動を制御しているコリン作動性ニューロンにクリムゾンを発現させ、光遺伝学操作により活性化させたときの*gnrh2*発現グリア細胞の活動を記録した。さらに、単一細胞トランスクリプトーム解析を用いて、*gnrh2*発現グリア上衣細胞で発現している神経伝達物質受容体を探索した。その結果、神経索のグリア上衣細胞で複数の神経伝達物質受容体が発現しており、グリア上衣細胞がコリン作動性ニューロンからの入力を受けている可能性が示された。これは、ニューロンだけでなくホヤ幼生のグリア細胞が遊泳行動の制御に関与していることを示唆する。これらの結果をもとに、カタユレイボヤにおける*gnrh2*発現グリア細胞の役割やGnRHの新奇生理機能について議論する。

2. 結果

2.1 ホヤ幼生の中樞神経系で *gnrh2* を発現する細胞種の同定

本研究では、*gnrh2* 発現細胞を可視化するために、*gnrh2* の上流 4.3 kb と蛍光レポータータンパク質 G-CaMP8 をつないだ DNA コンストラクト、*gnrh2*>G-CaMP8 を作製した。このコンストラクトの発現パターンを免疫染色法で確認したところ、*gnrh2* はホヤ幼生の中樞神経系で広く発現しており、内在性の *gnrh2* の発現パターンを再現できた (図 4B, C; Kusakabe et al., 2012)。このコンストラクトを以降の各実験に用いた。ホヤ幼生の中樞神経系のどのような細胞で *gnrh2* が発現しているのかを明らかにするために、ホヤ幼生の細胞特異的マーカーを用いた二重免疫染色法によって細胞種を同定した。

はじめに、グルタミン酸作動性ニューロンのマーカーとして小胞型グルタミン酸輸送体 (VGLUT) 遺伝子のプロモーター (Horie et al., 2008) に Kaede コード配列をつないだ *vglut*>Kaede コンストラクト (Horie et al., 2011; Razy-Krajka et al., 2012) を用いて、グルタミン酸作動性ニューロンで *gnrh2* が発現するかを調べた。ホヤ幼生において、付着突起や体幹部、表皮の末梢神経や光受容体細胞の多くはグルタミン酸作動性ニューロンである (Horie et al., 2008)。ホヤ幼生の脳胞後部のいくつかの介在ニューロンもグルタミン酸作動性である (Horie et al., 2008)。したがって、グルタミン酸は中枢と末梢の両方の神経系におけるホヤ幼生の感覚ニューロンの主要な神経伝達物質であると考えられている (Horie et al., 2008)。二重免疫染色の結果、眼点の背側にある 2 つの *gnrh2* 発現細胞がグルタミン酸作動性ニューロンであった (図 5A、矢印)。この 2 つの

細胞は、始原プラコード由来の *gnrh2* 発現表皮感覚ニューロン (aATENs: anterior apical trunk epidermal neurons) であり、以前の研究結果に一致する (Abitua et al., 2015)。 *gnrh2* 発現 aATENs のはたらきについてはあとで詳しく述べる。また、脳胞後部の腹側のグルタミン酸作動性ニューロンの一部で *gnrh2* が発現していた (図 5B、矢印)。

次に、細胞内レチナール結合タンパク質 (CRALBP) 抗体を用いて、*gnrh2* 発現細胞との関係を調べた。CRALBP はホヤ幼生の脳胞内のグリア細胞と運動神経節に特異的に存在する (Tsuda et al., 2003b; Kusakabe et al., 2009)。二重免疫染色の結果、CRALBP 陽性細胞と *gnrh2* 発現細胞は重ならなかった (図 5C、矢印)。これにより、脳胞内の *gnrh2* 発現細胞はグリア細胞ではなくニューロンであることが示された。

次に、マーカーとして小胞型 GABA/グリシン輸送体 (VIAAT) 抗体を用いて、GABA/グリシン作動性ニューロンが *gnrh2* を発現するかを調べた。ホヤ幼生の GABA/グリシン作動性ニューロンは、付着突起、運動神経節、尾部神経索の前方部、尾部中央の背側表皮に分布しており、これらは抑制性のニューロンであると考えられている (Yoshida et al., 2004)。免疫染色の結果、体幹部と尾部のどちらでも VIAAT 陽性細胞と *gnrh2* 発現細胞は重ならなかった (図 5D, E、矢印)。ホヤ幼生の尾部前方ある VIAAT 陽性ニューロンは ACIN (anterior caudal inhibitory neuron) とよばれる抑制性のニューロンである (図 5E、矢じり)。ACIN は尾部神経索の側壁のグリア上衣細胞と並列していることがわかっている (Horie et al., 2010; Nishitsuji et al., 2012)。ACIN で *gnrh2* は発現していなかったが、ACIN の周囲のグリア上衣細胞で *gnrh2* が発現していた (図 5E)。神経索の側壁のグリア上衣細胞で *gnrh2* が発現することは、以前に報告された *in situ* ハイブリダイゼーションの結果と一致する (Kusakabe et al., 2012)。

2.2 コリン作動性ニューロンとドーパミン産生細胞の一部で *gnrh2* が発現する

コリン作動性ニューロンのマーカーとして、小胞型アセチルコリン輸送体(VACHT) 遺伝子のプロモーター (Yoshida et al., 2004) の下流に藍色蛍光タンパク質 CFP をコードする配列をつないだ *vacht*>CFP コンストラクト (Horie et al., 2011) を使用し、可視化した。二重免疫染色法を用いて *gnrh2* 発現細胞との関係を調べた。アセチルコリンはホヤ幼生の神経と筋肉の接合部の主要な興奮性の神経伝達物質であり、尾部筋肉の収縮を制御している (Yoshida et al., 2004; Horie et al., 2010)。このアセチルコリンを放出するコリン作動性ニューロンは、脳胞の一部、運動神経節、尾部神経索に分布している (Yoshida et al., 2004)。のちに詳しく述べるが、運動神経節には少なくとも 6 対 12 個のコリン作動性ニューロンが存在しており、尾部運動を制御していると考えられている (Yoshida et al., 2004; Horie et al., 2010)。二重免疫染色の結果、脳胞と運動神経節の *vacht* 陽性細胞の一部で *gnrh2* が発現していた (図 6A、矢印、図 8B、矢印)。また、後期尾芽胚期の運動神経節内の *vacht* 陽性ニューロンの一部でも *gnrh2* が発現していた (図 8A、矢印)。さらに、尾部神経索にコリン作動性ニューロンの細胞体が左右対になって存在していることが報告されている (Horie et al., 2010)。これらのコリン作動性ニューロンのいくつかは *gnrh2* を発現することが示された (図 6B、矢印)。

ドーパミン産生細胞の可視化には *fer2*>mCherry コンストラクトを用いた。*fer2* はドーパミン産生細胞特異的遺伝子であり (Razy-Krajka et al., 2012; Horie et al., 2018)、*fer2* のシス調節領域の下流に mCherry をコードする配列をつないで作製した。bHLH 転写因子をコードする *fer2* は、以前に *Ptf1a* とよばれていたものであるが、分子系統解析の結果 *fer2* オーソログファミリーに属することが示されている (Gyoja and Satoh, 2013)。ドーパミン産生細胞は、ホヤ幼生の脳胞の腹側に存在しており、ここから放出

されるドーパミンは光に対する遊泳行動の制御に関与している神経伝達物質であると考えられている (Moret et al., 2005; Razy-Krajka et al., 2012; Horie et al., 2018)。二重免疫染色の結果、*fer2*陽性細胞の一部で *gnrh2* が発現することが示された (図 6C、矢印)。

これらの結果から、*gnrh2* は、脳胞後部腹側のグルタミン作動性ニューロンの一部と aATENs、運動神経節、脳胞、尾部神経索にあるコリン作動性ニューロンの一部、脳胞内のドーパミン産生細胞の一部、尾部神経索のグリア上衣細胞で発現することが明らかになった (図 5, 6)。

2.3 運動神経節内で *gnrh2* を発現するコリン作動性ニューロンの細胞種の同定

ホヤ幼生の運動神経節内には、少なくとも 6 対 12 個のコリン作動性ニューロンが存在する (Yoshida et al., 2004; Horie et al., 2010)。これらのコリン作動性ニューロンについて、それぞれの細胞に特異的な遺伝子 (*Dmbx*, *Vsx*, *Nk6*, *Islet*, *Pitx*) のエンハンサーが同定されている (Stolfi and Levine, 2011)。また、前方から 4 番目の *vsx* 陽性細胞でのみ *pitx* 遺伝子が発現することも報告されている (Stolfi and Levine, 2011)。このように、運動神経節内のコリン作動性ニューロンは特異的遺伝子の発現や形態、位置関係や軸索の形状を指標として区別することができる (図 7)。前述の結果より、ホヤ幼生の運動神経節内のコリン作動性ニューロンの一部で *gnrh2* が発現していたため (図 6A、矢印、図 8 A, B、矢印)、この 6 対の細胞のうちどれにあたるのかを調べた。同定されているエンハンサーに蛍光レポーター mCherry をつないだコンストラクトを用いてそれぞれ可視化し、二重免疫染色法を用いて細胞種の同定を試みた。また、後期尾芽胚期においても同様に調べた。

運動神経節内の一番前方にあるニューロンは *Dmbx* を特異的に発現する (図 7, Stolfi and Levine, 2011)。このニューロンの軸索は X 字形に反対側へ交差して投射している下行性ニューロン (descending decussating neuron: ddN) であると考えられている (Takamura et al., 2010; Ryan et al., 2016, 2017)。この ddN は脊椎動物のマウスナー細胞のホモログであり、逃避行動に関与している可能性があることが提唱されている (Takamura et al., 2010; Ryan et al., 2017)。 *dmbx>mCherry* コンストラクトを用いて、ddN を可視化し、 *gnrh2* 発現細胞と比較した結果、発生時間にかかわらず、 *dmbx* 陽性細胞と *gnrh2* 発現細胞は重ならず、隣接もしていなかった (図 8C, D、矢印)。

Nk6 は前から 3 番目、 *Islet* は前から 5, 6 番目のコリン作動性ニューロンで特異的に発現する (図 7; Stolfi and Levine, 2011)。これらのニューロンは興奮性の運動ニューロンであると考えられている (Ryan et al., 2016, 2017)。二重免疫染色の結果、発生時間にかかわらず、 *nk6* 陽性細胞と *islet* 陽性細胞は両方とも *gnrh2* を発現していなかった (図 8E-H)。また、 *gnrh2* 発現細胞は、 *nk6* 陽性細胞の後方 (図 8F、矢印)、 *islet* 陽性細胞の前方 (図 8H、矢印) で隣接していた。

ホヤ幼生の運動神経節内には下行性の介在性ニューロンが存在する。リズムカルな尾部運動や眼点からの入力による遊泳行動の調節に関与していると考えられている (Kourakis et al., 2019; Ryan et al., 2016)。これらのニューロンは *vsx* の発現によって標識できる (図 7; Stolfi and Levine, 2011)。 *vsx* 発現細胞と *gnrh2* 発現細胞をそれぞれ可視化したところ、発生時間にかかわらず、 *vsx* 陽性細胞で *gnrh2* が発現していた (図 9A, B、矢印)。また、 *vsx* で標識できる 2 つの細胞のうち、後方にある *vsx* 陽性細胞でのみ、 *pitx* が発現することが報告されている (図 7; Stolfi and Levine, 2011)。 *pitx* と *gnrh2* を蛍光レポータータンパク質で蛍光標識し、可視化した。その結果、後期尾芽胚

期では、*pitx*のシグナルが検出されなかったが(図9C)、幼生期において、*pitx*陽性細胞と*gnrh2*発現細胞が重なった(図9D、矢印)。

細胞の位置や形態を含めたこれらの結果より、運動神経節内のコリン作動性ニューロンのうち、前方から4番目の*vsx/pitx*陽性細胞で*gnrh2*が発現していると考えられる。

2.4 *gnrh2*発現感覚ニューロン、aATENsのカルシウム濃度変化

ホヤ幼生のさまざまなニューロンやグリア上衣細胞で*gnrh2*が発現していることが明らかになった。そこで、カルシウムセンサータンパク質G-CaMP8を用いたカルシウムイメージング法を用いて、ホヤ幼生の*gnrh2*発現細胞の活動を記録した。その結果、aATENs、運動神経節、尾部神経索で自律的で活発なカルシウム濃度変化が観察された(図10, 13)。

ホヤ幼生の眼点の背側に2つの*gnrh2*陽性aATENsがあり、これらはグルタミン酸作動性ニューロンである(図5A; Horie et al., 2008; Abitua et al., 2015)。このaATENsは脊椎動物の鼻プラコードによく似た組織から生じ、繊毛性の化学感覚センサーとGnRH産生の両方の機能をもつ、二重機能型ニューロンであることが示唆されている(Abitua et al., 2015)。本研究では、2つのaATENsとその繊毛をG-CaMP8で可視化することに成功した(図10A, B、点線内、矢じり)。さらに、両方のaATENsで顕著なカルシウム濃度変化がみられた(図10C, 図11A, B)。この2つのaATENsのカルシウム濃度変化の同調性を調べたところ、中程度の正の相関を示した(図11C)。

2.5 運動神経節と尾部神経索前方におけるカルシウム濃度変化と尾部運動の関係

運動神経節から神経索にかけての神経回路は、尾部の筋収縮を制御していると考えら

れている (Nishino et al., 2010; Horie et al., 2010; Kusakabe, 2017)。また、運動神経節内にあるコリン作動性ニューロンは尾部神経索に沿って尾部後方に軸索を伸ばしている (Horie et al., 2010)。*gnrh2*を発現する尾部神経索のグリア上衣細胞とコリン作動性ニューロンの軸索の位置関係を調べたところ、*gnrh2*発現グリア上衣細胞と軸索が接触していることが明らかになった (図 12B、矢印)。また、カルシウムイメージングの結果、*gnrh2*発現細胞の活発な活動が運動神経節や神経索で観察されたため、尾部運動と*gnrh2*発現細胞の活動の時間的な相関性を調べた。その結果、尾部の動きが止まったときにカルシウム濃度が上昇し、尾部運動はカルシウム濃度変化のピークに先行することが多くみられた (図 13)。このパターンは、運動神経節内の*gnrh2*発現細胞 (図 13、緑) より、尾部神経索の細胞 (図 13、マゼンタ、水色) のほうが顕著であった。神経索の*gnrh2*発現細胞は、位置や形態から上衣グリア細胞であると考えられる (図 13、マゼンタ、水色)。さらに、尾部運動とカルシウム濃度変化の動向の相関性を詳しく調べたところ、尾部の停止により細胞内カルシウム濃度が上昇し、次に尾部が動く前にカルシウム濃度が低下することが示された (図 14)。これらの結果は、尾部運動の制御に運動神経節や尾部神経索の*gnrh2*発現細胞が関与していることを示唆する。

2.6 後期尾芽胚期における *gnrh2*発現細胞の活動

前述の結果より、*gnrh2*発現細胞が尾部運動の制御に関与していることが示唆されたため、尾部運動が始まる前の発生段階である、後期尾芽胚期における*gnrh2*発現細胞の活動を調べた。*vacht*プロモーターを蛍光レポーターmCherryにつないだコンストラクト、*vacht*>mCherryを用いてコリン作動性ニューロンを標識しながら、*gnrh2*発現細胞の活動を記録した。カルシウムイメージングの結果、後期尾芽胚期では、*gnrh2/vacht*

陽性ニューロンで周期的なカルシウム濃度変化がみられた (図 15A, B, E、黄色、マゼンタ)。この周期的なカルシウム濃度変化ピークは、14 hpf の胚では 5 分間で 7 回観察された (図 15B)。一方で、尾部神経索の *gnrh2* 発現グリア上衣細胞では、顕著なカルシウム濃度変化はみられなかった (図 15A, C, E、水色、緑、オレンジ)。

以前の研究で、初期から中期尾芽胚期で周期的なカルシウム応答がみられる細胞が報告されている (Akahoshi et al., 2017, 2021)。中期尾芽胚期 (11 hpf) では、80 秒間隔のピークが観察されている (Akahoshi et al., 2021)。本研究で観察した後期尾芽胚期 (14 ~16 hpf) のカルシウム応答ピークは、15.5 hpf では 45 秒間隔、16 hpf では 41 秒間隔と、ピーク間隔が短くなっていた (図 16)。したがって、周期的なカルシウム応答ピークの間隔は発生が進むにつれて狭まることが示された。

カタユウレイボヤは受精後約 18 時間で孵化し、左右にリズムカルな尾部運動をすることで海中を遊泳する (Nishino et al., 2010)。孵化する直前の発生段階である 15 hpf 以降の後期尾芽胚期では、左右どちらか片側の尾部筋肉を収縮する運動がみられる (Shimai 未発表, Akahoshi et al., 2021)。本研究では、16 hpf の後期尾芽胚期において、片側の尾部運動が観察されたため、*gnrh2/vacht* 陽性ニューロンの活動との関係を調べた。その結果、*gnrh2/vacht* 陽性ニューロンは周期的なカルシウム濃度変化を示し、ピークとピークの間で尾部運動がみられた (図 17)。

2.7 周期的なカルシウム応答を示す *gnrh2/vacht* 陽性ニューロンの細胞種の同定

前述したとおり、二重免疫染色の結果、運動神経節内で *gnrh2* を発現するコリン作動性ニューロンは *vsx/pitx* 陽性細胞であることが示された。そのため、後期尾芽胚期において周期的なカルシウム応答がみられた *gnrh2* 発現コリン作動性ニューロンの細胞種

を調べた。*vacht*陽性細胞を蛍光レポーターmCherryで標識しながら、カルシウムイメージング法を用いて*gnrh2*発現細胞の活動を記録した。図18の個体では、2つの隣接した*gnrh2/vacht*陽性細胞を可視化することができた(図18A, B、マゼンタ、黄色矢じり)。それぞれ蛍光強度変化率をグラフ化したところ、マゼンタ矢じりで示した細胞では周期的なカルシウム応答がみられたが、黄色矢じりで示した細胞では顕著なカルシウム応答がみられなかった(図18A, C, D)。位置や細胞形態より、黄色矢じりで示した細胞は*vsx*陽性細胞、マゼンタ矢じりで示した細胞は*islet*陽性細胞であると考えられた。

より詳細に調べるために、*vsx*陽性細胞を蛍光レポーターmCherryで標識しながら、カルシウムイメージング法を用いて*gnrh2*発現細胞の活動を記録した。その結果、周期的なカルシウム応答を示した細胞は*vsx*陽性細胞のmCherryシグナルと重ならず(図19B, B')、*vsx*陽性細胞の後方に隣接した細胞であることが示された(図19)。

次に、*islet*陽性細胞を蛍光レポーターmCherryで標識しながら、*gnrh2*発現細胞の活動を記録した。カルシウムイメージングの結果、周期的なカルシウム応答を示す*gnrh2*陽性細胞で*islet*が発現していることが示された(図20)。これらの結果から、後期尾芽胚期において周期的なカルシウム応答を示す細胞は、*gnrh2/vacht/islet*陽性細胞であることが示唆された。しかしながら、前述した二重免疫染色の結果では、運動神経節内で*gnrh2*を発現するコリン作動性ニューロンは*vsx/pitx*陽性細胞であることが示されている(図9)。後期尾芽胚期における*islet*陽性細胞では*gnrh2*がごく弱く発現しており、発生が進み幼生期になると*islet*陽性細胞での*gnrh2*発現はさらに弱くなる可能性が考えられる。

2.8 ホヤ幼生の光受容と尾部神経索のグリア上衣細胞の活動の関係

カタユレイボヤ幼生は、光受容器である眼点をもち、孵化後約4時間（受精後約22時間）で光に反応し始め、光を受容すると遊泳を停止し、暗所になると遊泳を開始する（Nakagawa et al., 1999; Tsuda et al., 2003a）。このように、光受容は遊泳運動の制御に関与することが示唆されている。本研究では、尾部神経索で顕著なカルシウム濃度変化が観察されたことから、光受容と *gnrh2* 発現細胞の活動の関係性を調べた。眼点に、30秒間隔で10秒間ずつ455nmの青色光を照射しながらカルシウムイメージングを行い、尾部神経索の *gnrh2* 発現細胞の活動を記録した。光があたっていないときに *gnrh2* 発現細胞のカルシウム濃度の上昇が顕著にみられ、光を照射するとカルシウム濃度変化が抑制されるようであった（図21）。したがって、尾部神経索の *gnrh2* 発現細胞は光依存的な遊泳運動の制御に関与することが示唆された。また、このようなカルシウム濃度変化パターンがみられた *gnrh2* 発現細胞は、位置や形態から、グリア上衣細胞であると考えられる（図21、黄色、水色、マゼンタ）。

2.9 コリン作動性ニューロンを活性化させたときの尾部神経索の *gnrh2* 発現グリア上衣細胞の活動

ホヤ幼生の尾部神経索のグリア細胞は主に構造維持のための細胞であると思われていたが、これまでの結果より、尾部運動や光に対する遊泳行動の制御に、尾部神経索のグリア上衣細胞が関与しており、ニューロンや筋肉細胞と積極的に相互作用している可能性が考えられた（図12-14, 21）。そこで本研究では、尾部神経索の *gnrh2* 発現グリア上衣細胞とコリン作動性ニューロンの相互作用について注目した。運動神経節内のコリン作動性ニューロンが活性化したときの神経索グリア上衣細胞の活動を調べるために、

光遺伝学とカルシウムイメージングを併用した解析を行った。光遺伝学的操作には赤色光で人工的に細胞を活性化させることができるクリムゾン R を用いた。クリムゾン R をコリン作動性ニューロンに発現させるために、*vacht* プロモーターの下流に、クリムゾン R と蛍光レポータータンパク質 mCherry を連結させた配列をつないだ DNA コンストラクト、*vacht*>ChrimsonR:mCherry を作製した (図 22)。コリン作動性ニューロンを活性化させるための *vacht*>ChrimsonR:mCherry コンストラクトと、グリア細胞の活動を記録するための *gnrh2*>G-CaMP8 コンストラクトの両方をホヤ卵に導入し、幼生期まで発生させた。ChrimsonR:mCherry を発現している運動神経節内のコリン作動性ニューロンに 640 nm の赤色光を照射しながら、尾部神経索の *gnrh2* 発現グリア細胞の活動を記録した (図 22)。

はじめに、*vacht*>ChrimsonR:mCherry コンストラクトを用いて、コリン作動性ニューロンでクリムゾン R を発現させることができるかを二重免疫染色法により確認した。*vacht*>CFP はコリン作動性ニューロンを CFP で標識できることがすでに明らかになっているため (Horie et al., 2011)、*vacht*>CFP と *vacht*>ChrimsonR:mCherry の発現パターンを比較した (図 23A, B)。その結果、運動神経節内の少なくとも 5 つのコリン作動性ニューロンが CFP で標識され (図 23A、緑)、すべてで ChrimsonR:mCherry を発現させることに成功した (図 23A、マゼンタ)。また、尾部に伸長しているコリン作動性ニューロンの軸索でも ChrimsonR:mCherry が発現していた (図 23B)。さらに、*gnrh2* の発現パターンと比較したところ、運動神経節内の ChrimsonR:mCherry を発現するコリン作動性ニューロンの一部で *gnrh2* が発現していた (図 23C、矢じり)。この結果は、前述した結果と一致する (図 6A、図 8A, B)。これらの結果より、運動神経節内のコリン作動性ニューロンで特異的にクリムゾン R を発現できることが確認できたため、以

降の実験の光遺伝学的操作には、この *vacht>ChrimsonR:mCherry* コンストラクトを用いた。

次に、光遺伝学とカルシウムイメージングを併用し、ホヤ幼生のコリン作動性ニューロンを一定の間隔で活性化したときのグリア細胞の活動を記録した。運動神経節内でクリムゾン R を発現しているコリン作動性ニューロンのうち、位置と形態から *nk6* 陽性細胞と考えられるニューロンに (図 24A、赤色円)、30 秒間隔で 10 秒間ずつ 640 nm の赤色光を照射しながら、尾部神経索の *gnrh2* 発現グリア上衣細胞のカルシウム濃度変化を記録した (図 24)。コリン作動性ニューロンを活性化させてから 3~5 秒後にグリア細胞内のカルシウム濃度が上昇し始め、赤色光を消灯したあとにピークがみられた (図 24B、矢じり)。次にコントロールとして、同一の個体で、クリムゾン R 発現コリン作動性ニューロンに 470 nm の青色光を同様の間隔で照射した (図 25)。青色光の照射とグリア細胞内のカルシウム濃度変化に関連性はみられなかった (図 25B)。青色光では、クリムゾン R 発現コリン作動性ニューロンを活性化できないため、*gnrh2* 発現グリア上衣細胞の活動が運動神経節への光照射自体の影響でないことを確認した。

次に、コリン作動性ニューロンを活性化するための赤色光の照射パターンを変更してカルシウムイメージングを行った。運動神経節内でクリムゾン R を発現しているコリン作動性ニューロンに、最初の 3 回は 30 秒間隔で 10 秒間ずつ、次の 3 回は 30 秒間隔で 30 秒間ずつ 640 nm の赤色光を照射しながら、尾部神経索の *gnrh2* 発現グリア上衣細胞のカルシウム濃度変化を記録した (図 26)。赤色光照射により光遺伝学的に活性化させたコリン作動性ニューロンは、位置と形態から *nk6* 陽性ニューロンであると考えられる (図 26A、赤色円)。赤色光の照射パターンにかかわらず、グリア上衣細胞内のカルシウム濃度は、コリン作動性ニューロンを活性化してから 3~5 秒後に上昇しはじ

め、13~15 秒後にピークに到達し、その後減少した (図 26B、矢じり)。すなわち、コリン作動性ニューロンを活性化し続けても、グリア細胞内のカルシウム濃度が上昇し続けるわけではなく、一定時間でピークに到達しその後減少することが示された。さらに、コントロールとして、同じ個体を用いて、クリムゾン R を発現していない体幹部に同様のパターンで赤色光を照射したときのカルシウムイメージングを行った (図 27)。コリン作動性ニューロンの活性化パターンとグリア細胞のカルシウム濃度変化に顕著な関連性はみられなかった (図 27B)。これらの結果より、尾部神経索のグリア上衣細胞がコリン作動性ニューロンからの入力を受けている可能性が示された。

2.10 尾部神経索のグリア上衣細胞で発現している神経伝達物質受容体遺伝子の探索

コリン作動性ニューロンは神経伝達物質としてアセチルコリンを放出する。アセチルコリン受容体は、イオンチャネル型ニコチン性アセチルコリン受容体 (nAChR) と G タンパク質共役型ムスカリン性アセチルコリン受容体 (mAChR) の 2 種類がある。カタユレイボヤにおいて、10 種類の nAChR サブユニット遺伝子がこれまでに同定されている (Okamura et al., 2005; Nishino et al., 2011)。これらの nAChR 遺伝子は筋肉、中枢神経系、表皮で発現することが報告されている (Nishino et al., 2011)。特に、*Ci-A1*, *Ci-B2/4*, *Ci-BGDE3* の 3 つは筋肉細胞で発現し、3 つのサブユニットが多量体を形成し、機能的な nAChR としてはたらき、アセチルコリンによる尾部の筋収縮に関与していることが示されている (Nishino et al., 2011)。前述の結果より、コリン作動性ニューロンと神経索のグリア上衣細胞が相互作用していることが示唆された。そこで、これらの nAChR 遺伝子が尾部神経索のグリア細胞で発現しているかを、単一細胞トランスクリプトーム解析を用いて調べた。すでに同定されている 10 種類のうち、カタユレイ

ボヤの遺伝子情報データベースである、Ghost Database に Gene ID が記載されている、7 種類の nAchR 遺伝子について調べた。これら 7 種類の発現パターンと *gnrh2* の発現パターンを、後期尾芽胚期のトランスクリプトームマップ (Cao et al., 2019) の尾部神経索の細胞クラスター上で比較した。*gnrh2* は尾部神経索で顕著に発現することがトランスクリプトームマップ上でも示された (図 28A)。筋肉で発現、機能している *Ci-A1*, *Ci-B2/4*, *Ci-BGDE3* は神経索でも発現しており、*gnrh2* 陽性グリア細胞でも発現していることが示された (図 28C-E、矢じり)。*Ci-BGDE2*, *Ci-oB*, *Ci-A7/8-2* も神経索で発現していたが (図 28F-H)、*Ci-A7/8-1* は発現していなかった (図 28I)。これらの結果より、*Ci-A7/8-1* を除く、6 種類の nAchR サブユニット遺伝子が神経索のグリア細胞で発現していることが示唆された。また、尾部の筋収縮の制御に関与している *Ci-A1*, *Ci-B2/4*, *Ci-BGDE3* の 3 種類が神経索のグリア細胞でも発現していることより、神経索のグリア細胞でも nAchR が機能し、コリン作動性ニューロンからの入力を受けている可能性を支持する結果となった。

次に、グルタミン酸受容体遺伝子が神経索のグリア細胞で発現しているかを調べた。グルタミン酸は、興奮性の神経伝達物質であり、2 種類のイオンチャネル型受容体、AMPA 型グルタミン酸受容体と NMDA 型グルタミン酸受容体で受容される。カタユウレイボヤにおいても、AMPA 型と NMDA 型の両方が同定されている (Okamura et al., 2005; Hirai et al., 2017, 2018; Krasovec et al., 2022)。本研究では、Ghost Database に Gene ID が記載されている、NMDA 型グルタミン酸受容体サブユニット遺伝子である、*Ci-GluN1* と *Ci-GluN2* について調べた。*Ci-GluN1* は運動神経節と表皮、*Ci-GluN2* は運動神経節、表皮、感覚小胞後部で発現することが報告されている (Krasovec et al., 2022)。トランスクリプトーム解析の結果、*Ci-GluN1* は神経索での発現がみられなか

ったのに対し、*Ci-GluN2*は神経索で発現していることが示された(図 29B, C)。また、*Ci-GluN2*は *gnrh2*陽性細胞でも発現している可能性が示された(図 29C、矢じり)。

最後に、GABA 受容体とグリシン受容体について調べた。脊椎動物において GABA とグリシンは主に抑制性の神経伝達物質としてはたらく。脊椎動物の GABA 受容体にはイオンチャンネル型 GABA_A 受容体 (GABA_AR) と代謝型 GABA_B 受容体 (GABA_BR) の 2 種類があり、ホヤでもその遺伝子が同定されている (Okamura et al., 2005; Zega et al., 2008)。カタユレイボヤにおいて GABA_AR サブユニット遺伝子として *Ci-GABAAR α* と *Ci-GABAAR β* の 2 種類が同定されている (Okamura et al., 2005)。また、GABA_BR サブユニット遺伝子として *Ci-GABABR1* と *Ci-GABABR2* の 2 種類が同定されており、どちらも運動神経節や脳胞後部で発現していることが報告されている (Okamura et al., 2005; Zega et al., 2008; Hozumi et al., 2020)。本研究では、Ghost Database に Gene ID が記載されていた、*Ci-GABAAR β* と *Ci-GABABR1* の発現パターンをトランスクリプトームマップ上で調べた。その結果、両方とも神経索での発現がわずかにみられ、*gnrh2*陽性細胞でも発現している可能性が示された(図 29D, E、矢じり)。カタユレイボヤにおいて、グリシン受容体遺伝子として *Ci-GlyR* が同定されており、運動神経節と尾部筋肉細胞で発現することが報告されている (Okamura et al., 2005; Nishino et al., 2010)。トランスクリプトーム解析の結果、*Ci-GlyR* は神経索では発現しないことが示された(図 29F)。

これらの結果より、カタユレイボヤの尾部神経索のグリア細胞では、アセチルコリン受容体、グルタミン酸受容体、GABA 受容体の 3 種類の神経伝達物質受容体遺伝子が発現しており、遊泳行動の制御に関わる複数のニューロンが含まれた神経回路に関与していることが示唆された。

3. 考察

3.1 ホヤ幼生におけるカルシウムイメージングと光遺伝学

本研究では、カタユレイボヤ幼生において、*gnrh2*が発現している細胞の種類を網羅的に同定し、これらの細胞の活動をカルシウムイメージング法によりリアルタイムで記録することに成功した（図 30）。これまでに、ホヤ胚にカルシウムイメージング法が適用され、細胞の活動が解析されている（Hackley et al., 2013; Abdul-Wajid et al., 2015; Akahoshi et al., 2017, 2021）。しかし、これらの研究は胚における発生機構に注目した研究であり、本研究のようにカルシウムイメージング法を幼生の神経系に適用し、神経回路や神経機能との関わりを解析した研究は他にはない。加えて、ホヤ幼生において、カルシウムイメージング法と光刺激や行動解析を組み合わせた解析を行ったのは本研究が初めてである。

本研究では、クリムゾン R を用いた光遺伝学的操作とカルシウムイメージング法の併用をホヤ幼生に適用した新たな神経生理機能解析手法も確立した。特定の細胞を人工的に活性化させるための光遺伝学ツールとしては ChR2 が多く用いられており、ホヤ幼生に ChR2 を適用した研究も報告されている（Akahoshi et al., 2021）。しかし、本研究では、光活性化タンパク質としてクリムゾン R を使用した。クリムゾンを用いた光遺伝学的操作をホヤに適用した研究は過去に報告されていない。ChR2 ではなくクリムゾンを用いた理由は、背景でも述べたように、G-CaMP8 の励起光である青色光により、ChR2 が意図せず活性化されてしまうのを防ぐためである。励起光が青色光ではないカルシウムセンサータンパク質も存在しているが、それらのタンパク質を用いてカルシウム

ムイメージングを行うためには、再度、測定機器の仕様や条件検討から行う必要がある。G-CaMP8 はホヤ幼生の細胞の活動を十分な蛍光強度で解析できることが確認できていたため、カルシウムイメージングはG-CaMP8を用いることとし、ChR2の代わりに、赤色光で刺激できるクリムゾンを使用した。線虫ではクリムゾンを用いるために全トランス型レチナール (*all-trans*retinal) を投与する必要がある (Schild and Glauser, 2015) が、ホヤ幼生においては全トランス型レチナールの投与なしにクリムゾンを機能させることができた。ホヤ幼生には多くのレチナールタンパク質が光受容タンパク質として存在していることから、内在性の全トランス型レチナールが豊富に存在すると考えられる。これまで他の生物種においてもクリムゾンとカルシウムイメージングを組み合わせた解析は報告例がほとんどない。本研究で新たに確立した手法では、1細胞に絞った光遺伝学的操作や細胞内カルシウム濃度の解析を行うことができ、個体まるごとかつ1細胞レベルでの解析が可能である。ホヤ幼生に適用したカルシウムイメージング法や光遺伝学、行動解析を組み合わせた解析手法を用いることにより、神経系の機能や役割の解明に貢献することが期待できる。

3.2 ホヤ幼生の脳胞における *gnrh2* 発現ニューロン

本研究により、ホヤ幼生の脳胞内には、*gnrh2* を発現するグルタミン酸作動性ニューロン、コリン作動性ニューロン、ドーパミン産生細胞が存在することが示された (図 30A, C)。

ホヤ幼生において、グルタミン酸作動性ニューロンは付着突起や表皮に存在しており、感覚末梢神経細胞であると考えられている (Horie et al., 2008)。これに加え、脳胞内に

もグルタミン酸作動性ニューロンが存在しており、大きく2つのグループに分けられる (Horie et al., 2008)。ひとつは、視細胞 (眼点) や平衡器のニューロンで脳胞後部に投射しており、光や重力の情報を伝達する役割をもつと考えられている。もうひとつのグループは、脳胞後部に細胞体があり、運動神経節に軸索を伸ばしている。これらの脳胞後部に存在するニューロンは、眼点や平衡器で受容された光や重力の情報を統合し、運動神経節内のニューロンに伝達し、尾部運動を制御している可能性が示されている (Horie et al., 2008)。本研究で示された *gnrh2* 陽性グルタミン酸作動性ニューロンは、位置や形態から、脳胞後部にあり、運動神経節に投射しているニューロンであると考えられる。これにより、重力や光の情報の統合や伝達に GnRH が関与している可能性が示された。脳胞内のコリン作動性ニューロンは運動神経節に軸索を伸ばしていることが報告されている (Horie et al., 2010)。これらのコリン作動性ニューロンの一部で *gnrh2* が発現していた。脳胞内のコリン作動性ニューロンの役割はまだ明らかになっていないが、GnRH が運動神経節内のニューロンの調節に関与している可能性がある。これまでの研究で、脳胞内のドーパミン産生細胞はホヤ幼生の暗所での遊泳行動を制御することが示唆されているため (Razy-Krajka et al., 2012)、GnRH が暗所での遊泳行動の制御にも関与している可能性がある。したがって、脳胞内の *gnrh2* 発現ニューロンは明暗所両方での遊泳行動の制御に関与する可能性がある。光や重力などの情報伝達や運動神経節内のニューロンの調節に実際に GnRH が関与しているかどうかを調べることや、GnRH 受容体の詳細な分布を解析する必要があると考える。本研究で新たに確立した神経生理機能解析手法を用いて、脳胞内で *gnrh2* を発現しているコリン作動性ニューロンやグルタミン酸作動性ニューロン、ドーパミン産生細胞の機能を明らかにすることが期待できる。

3.3 ホヤ幼生の運動神経節内の *gnrh2* 発現コリン作動性ニューロン

運動神経節内のコリン作動性ニューロンは、尾部前方の筋肉細胞に投射しており、尾部筋肉の収縮を制御している。二重免疫染色の結果と細胞の位置や形態より、運動神経節内のコリン作動性ニューロンのうち、前方から4番目の *vsx/pitx* 陽性細胞で *gnrh2* が発現していることが示された (図 30A, C)。これまでの研究で、*vsx/pitx* 陽性ニューロンは軸索を尾部後方に伸ばしており、樹状突起をもつことが報告されている (Stolfi and Levine, 2011)。しかし、運動神経節内の各ニューロンがそれぞれどのような役割を果たすのかは明らかになっておらず、*vsx/pitx* 陽性ニューロンの機能も不明のままである。本研究で確立した光遺伝学とカルシウムイメージングを組み合わせた解析手法を用いることにより、未解明である *gnrh2/vsx/pitx* 陽性ニューロンの役割を明らかにできることが期待される。また、尾部神経索の中部から後方にかけて存在しているコリン作動性ニューロンでも *gnrh2* が発現していた (図 30A, C)。このコリン作動性ニューロンは、尾部の中部から後方にかけての筋収縮を調節していることが示唆されている (Horie et al., 2010; Imai and Meinertzhagen, 2007)。運動神経節内の *gnrh2/vsx/pitx* 陽性ニューロン、尾部神経索の *gnrh2* 発現コリン作動性ニューロンとグリア細胞が遊泳運動を制御している神経回路に関与し、ホヤ幼生の遊泳行動の制御に GnRH が重要な役割を担っている可能性が考えられる。

二重免疫染色の結果では、*islet* 陽性コリン作動性ニューロンでの *gnrh2* の発現は支持されなかったが、後期尾芽胚期に行ったカルシウムイメージングにおいて、周期的な活動を示すコリン作動性ニューロンが、*islet* 陽性ニューロンであることが示唆された (図 30A, B)。*islet* 陽性細胞で *gnrh2* の発現が確認されたのは、後期尾芽胚期におけるカルシウムイメージングの結果のみであったことから、発生が進むにつれて *islet* 陽性

細胞内での *gnrh2* の発現が弱くなり、幼生期での免疫染色では検出されなかったと考えられる。この尾芽胚期に周期的な活動を示すコリン作動性ニューロンの役割については、後で詳しく議論する。

GnRH はカタユレイボヤの変態制御に関与することが報告されている (Kamiya et al., 2014; Hozumi et al., 2020)。脳胞と運動神経節内にある GnRH ニューロンから分泌された GnRH が、尾部退縮を誘発し、変態を促進することが示唆されている (Hozumi et al., 2020)。そのため、前述した脳胞内の *gnrh2* 発現ニューロンも含め、本研究で同定した *gnrh2* 発現細胞のすくなくとも一部は変態過程の調節にも関わると考えられる。

3.4 原始プラコード由来 *gnrh2* 発現 aATENs の活動

脊椎動物の GnRH ニューロンは鼻プラコードから生じ、嗅神経をたどって脳内に移動する (Schwanzel-Fukuda and Pfaff, 1989; Wray et al., 1989)。そのため、脊椎動物の鼻プラコードに類似した組織から生じ、*gnrh2* を発現するホヤ幼生の aATENs は、脊椎動物の嗅神経細胞との類似性が指摘されている (Abitua et al., 2015)。しかし、ホヤにおける嗅覚受容体は同定されておらず、aATENs を活性化させる化学物質もまだ明らかになっていない。

本研究では、aATENs で活発な細胞内カルシウム濃度変化が観察され、2つの aATENs 間の活性パターンは大きく同調しておらず、独立して活動していることが示された (図 30A, C)。aATENs では脊椎動物の嗅細胞と同様の環状ヌクレオチド感受性イオンチャンネル (CNG チャンネル) が発現していることが明らかになっている (Abitua et al., 2015)。CNG チャンネルは、視覚や嗅覚など、感覚伝達に重要な非選択的陽イオンチャンネルである。脊椎動物の嗅細胞において、嗅覚受容体で匂い物質が受容されると CNG

チャンネルが開口し、細胞外の Ca^{2+} や Na^{+} が流入し、活動電位が生じる (Kaupp and Seifert, 2002)。ホヤ幼生の aATENs の細胞内カルシウム濃度変化はこの CNG チャンネルの開口によるものであると考えられる。以前の研究で、ゼブラフィッシュにおいて、嗅球の近くに存在する GnRH 発現終神経が CO_2 を受容して逃避行動を引き起こすことが示された (Koide et al., 2018)。ホヤ幼生の aATENs もこのような GnRH 発現終神経と類似した役割をもつ可能性がある。aATENs はどのような化学物質を受容するのか、嗅覚受容体は存在しているのか、CNG チャンネルはどのようなしくみで活性化されるのかを明らかにすることが今後の課題である。*gnrh2*>G-CaMP8 コンストラクトを用いたカルシウムイメージング法は、これらの課題を解決するのに役立つと考えられる。

3.5 運動神経節や尾部神経索の *gnrh2* 発現細胞の活動と尾部運動の関係

本研究では、運動神経節や尾部神経索の *gnrh2* 発現細胞の活動と尾部運動に相関性があることを明らかにした。運動神経節内の *gnrh2* 発現細胞は尾部運動が起こったあとにカルシウム濃度が上昇したため、運動ニューロンではないと考えられる。また、尾部運動との相関性がより顕著であった尾部神経索の *gnrh2* 発現細胞は、位置や形態からグリア上衣細胞であると考えられる。これは、グリア上衣細胞が運動に伴って活動するという新たな知見であり、ニューロンだけでなく、グリア上衣細胞が尾部運動の制御に関与していることを示唆する。筋収縮または運動ニューロンの軸索の興奮によって、神経索グリア上衣細胞のカルシウム濃度上昇、すなわち活性化が誘発されている可能性がある。

尾部運動が始まっていない後期尾芽胚期において、尾部神経索のグリア上衣細胞では活動がみられなかった (図 30A, B)。これは、尾部神経索の *gnrh2* 発現グリア上衣細胞

が、尾部筋肉の収縮やこれを制御している運動ニューロンの活動に関与している可能性を支持する結果と考えられる。

その一方で、後期尾芽胚期において *gnrh2/islet* 陽性コリン作動性ニューロンで周期的なカルシウム濃度変化がみられた (図 30A, B)。脊椎動物において、神経系の発生過程で自発周期的なカルシウム濃度変化を示す細胞があることが報告されている (Gu et al., 1994; Wong et al., 1995; Feller, 1999; Zhou, 1998; Kerr et al., 2005; Chang and Spitzer, 2009)。発生過程での周期的な神経活性は、中枢神経系や網膜の神経回路の形成に重要であると考えられている (Zhou, 1998; Spitzer et al., 2000; Feller, 1996)。このような発生過程で起こる周期的なカルシウム濃度変化を示す細胞が、カタユレイボヤの初期から中期尾芽胚期でも報告されている (Akahoshi et al., 2017, 2021)。この細胞は運動神経節内にある MN2 (motor neuron 2、本研究では *islet* 陽性ニューロンと考察) であることが示されており、神経発生および成熟や筋収縮制御に関与している可能性が示されている (Akahoshi et al., 2017, 2021)。MN2 (*islet* 陽性ニューロン) は尾部前方の筋肉に軸索を投射しており、筋収縮に直接関与していると考えられている (Stolfi and Levine, 2011; Ryan et al., 2016)。本研究において、後期尾芽胚期で観察された周期的なカルシウム応答を示す細胞は、位置や形態、特異的プロモーターによる蛍光タンパク質の発現解析結果より、以前に報告された細胞 (Akahoshi et al., 2017, 2021) と同じ MN2 であると考えられる。また、脊椎動物において、終神経 GnRH ニューロンが自発的なペースメーカー活動を示し、神経修飾作用をもつ可能性が示されている (Oka et al., 1993)。本研究で明らかになった周期的なカルシウム応答を示す *gnrh2/islet* 陽性ニューロンが、ペースメーカーとしてはたらくことが示唆された。脊椎動物の終神経 GnRH ニューロンは発生の過程で神経板と表皮の境界部から生じる神経堤に由来する (Whitlock, 2008)。

本研究で見出した *gnrh2* を発現する *islet* 陽性ニューロンも予定表皮細胞に接する神経板周縁部から生じる (Navarrete and Levine, 2016) ことから、進化的な観点からも興味深い。*gnrh2/islet* 陽性ニューロンにおいて、発生が進むにつれて周期的カルシウム応答の間隔が狭くなることや、尾部の筋収縮とカルシウム応答の関係が明らかになったことから、MN2 の神経発生や成熟、リズムカルな筋収縮を制御する神経回路の形成に GnRH が関与している可能性が考えられる。

3.6 ホヤ幼生の遊泳行動とグリア細胞の活動

本研究では、24 hpf 以降の幼生において、光応答と尾部神経索の *gnrh2* 発現グリア上衣細胞のカルシウム濃度変化パターンに相関性がみられた (図 30A, C)。これまでの研究で、ホヤ幼生は孵化後数時間で光応答性を獲得し、明条件下では遊泳が抑制され、明条件から暗条件に移行したときに遊泳運動が起こることが報告されている (Nakagawa et al., 1999; Tsuda et al., 2003a)。したがって、本研究の結果より、グリア上衣細胞が光環境に応答した遊泳行動に関与していることが示唆された。ホヤ幼生において、神経索の構造を維持することが主な役割だと考えられていたグリア上衣細胞が、ニューロンや筋肉と相互作用し、尾部運動や光に対する遊泳行動を制御している可能性が考えられる。

脊椎動物において、さまざまな種類のグリア細胞がカルシウム濃度変化を生じ、神経活性や神経機能の制御に関わっている可能性が以前の研究で示されている (Reist and Smith, 1992; Newman and Zahs, 1997; Robitaille, 1998; Haydon, 2001; Araque et al., 2014; Martín et al., 2015; Cui et al., 2018)。グリア細胞の機能は尾索動物と脊椎動物の間で進化的に高い保存性がある可能性があり、ホヤ幼生の尾部神経索のグリア上衣細胞

もこれに似た制御機能をもつことが考えられる。これまでの研究結果より、ホヤ幼生のグリア細胞の役割について仮説を立てた。1つ目は、グリア細胞とニューロンの相互作用である。コリン作動性ニューロンの軸索とグリア上衣細胞が接触していることや、グリア上衣細胞が尾部運動と連動した活動を示すことから、尾部神経索のグリア上衣細胞がコリン作動性ニューロンからの情報を受け取り、グリア上衣細胞がニューロンの活動を調節している可能性がある。2つ目は、グリア細胞と筋肉の相互作用である。尾部の筋肉の収縮によってグリア上衣細胞が活性化されたり、グリア上衣細胞が筋肉細胞の活動を制御している可能性がある。これらの仮説を検証するために、尾部神経索のグリア上衣細胞のカルシウム濃度変化の上流または下流にある現象を明らかにする必要がある。

3.7 尾部神経索グリア上衣細胞と運動神経節内コリン作動性ニューロンの相互作用

前述したグリア細胞の役割の仮説の1つ目である、グリア細胞とコリン作動性ニューロンの相互作用について検証したところ、神経索のグリア上衣細胞がアセチルコリンを受容し、コリン作動性ニューロンからの入力を受けている可能性が示された。本研究では、クリムゾン R を発現している複数のコリン作動性ニューロンのうちの *nk6* 陽性ニューロン1つに光を照射し、グリア上衣細胞の活動を記録した。*nk6* 陽性ニューロンは尾部前方の筋肉に軸索を投射する運動ニューロンであることが示唆されている (Stolfi and Levine, 2011; Ryan et al., 2016)。神経索のグリア上衣細胞は、*nk6* 陽性ニューロンからアセチルコリンを受容している、または、*nk6* 陽性ニューロンを介して収縮した筋肉から何らかの司令を受けている可能性がある。また、尾部中央付近に4~6対のコリン作動性ニューロン細胞体が存在している (Horie et al., 2010)。グリア上衣細胞はこれ

らの細胞体からアセチルコリンを受容している可能性もある。本研究で確立した神経生理機能解析手法を用いれば、運動神経節内に存在する6対のコリン作動性ニューロンそれぞれと *gnrh2* 発現グリア上衣細胞の活動の関係を明らかにできることが期待される。また、コリン作動性ニューロンの活動に誘発されるグリア上衣細胞内のカルシウム濃度の上昇と減少にかかる時間はほぼ一定であった。この現象の生理学的意義は不明である。これを解明するためには、グリア上衣細胞内のカルシウム濃度上昇が細胞外由来か、または細胞内由来であるかを明らかにする必要があると考える。*Ci-A1*, *Ci-B2/4*, *Ci-BGDE3*の3つから成るアセチルコリン受容体はカルシウムイオン透過性であることが報告されている (Nishino et al., 2011)。グリア上衣細胞がこのアセチルコリン受容体を介して細胞外からカルシウムイオンを流入している場合、細胞内のカルシウム濃度が一定値まで上昇すると、アセチルコリン受容体を不活性化させ、カルシウムイオンがそれ以上流入するのを妨げる機構が存在するのかもしれない。一方、グリア上衣細胞のカルシウム濃度上昇が、IP₃ 活性による小胞体からの放出である場合も考えられる。この場合、カルシウム濃度が上昇すると、カルシウムイオン自体が小胞体の細胞膜上の Ca²⁺ チャネルを不活性化させるフィードバックが起こる。これは、G タンパク質共役型受容体を介して起こることが多い。本研究で明らかになった、神経索のグリア上衣細胞に存在する G タンパク質共役型受容体は GABA_B 受容体のみである。GABA は抑制性の因子だと考えられている (Horie et al., 2010) のに加え、発現量やパターンから、GABA_B 受容体がどの程度関与しているのかは未知数である。グリア上衣細胞内のカルシウム濃度変化のしくみや機能を明らかにすることは今後の課題である。

神経索のグリア上衣細胞はグルタミン酸と GABA も受容していることが示唆された。ホヤ幼生において、グルタミン酸は感覚入力に関与している興奮性の神経伝達物質と考

えられている (Horie et al., 2008)。ホヤ幼生の脳胞で得られた重力や光の情報や、表皮ニューロンによる感覚情報が神経索のグリア上衣細胞に入力されている可能性がある。GABA は抑制性の神経伝達物質としてはたらくと考えられているため (Horie et al., 2010)、GABA が神経索のグリア上衣細胞の活動を抑制している可能性も考えられる。ホヤ幼生には、抑制性と考えられる神経伝達物質として、グリシンも存在しているが (Horie et al., 2010)、神経索のグリア上衣細胞ではグリシン受容体は発現していなかった。神経索のグリア上衣細胞では、抑制性因子としては GABA のみを受容していると考えられる。これまでの研究で、ホヤ幼生の変態過程において、GABA が GnRH の放出を促進し、興奮性の因子としてはたらく可能性が示されている (Hozumi et al., 2020)。発生段階の遅い時期では、神経索のグリア上衣細胞はホヤ幼生の変態促進にも関与している可能性がある。

神経索のグリア上衣細胞は複数種類のニューロンからの入力を受けており、遊泳行動を制御する神経回路に、より多面的に関与していることを示唆する。グルタミン酸や GABA の受容とグリア上衣細胞の活動の相関性は未解明である。今後、各種ニューロンや神経伝達物質とグリア上衣細胞の活動の相互作用や生理機能を明らかにする必要がある。

3.8 ホヤ幼生における尾部神経索グリア上衣細胞の役割

本研究では、尾部神経索の *gnrh2* 発現グリア上衣細胞の活動と遊泳行動に相関性がみられ、コリン作動性ニューロンからの入力を受けている可能性が示された。これは、ニューロンだけでなく、グリア上衣細胞が遊泳行動の制御に積極的に関与しており、*gnrh2* 発現グリア上衣細胞を含む神経回路が存在することを示唆する。そこで、神経索

のグリア細胞—コリン作動性ニューロン—尾部筋肉細胞間の制御機構モデルについて仮説を立てた。尾部に伸びているコリン作動性ニューロンの軸索や細胞体からアセチルコリンが放出され、神経索の *gnrh2* 発現グリア上衣細胞が受容し活性化する。これにより、GnRH ペプチドが放出される。運動神経節で GnRH 受容体 (GnRHR1, GnRHR2, GnRHR3) が発現しているため (Kusakabe et al., 2012)、GnRH ペプチドが運動神経節内のコリン作動性ニューロンの活性を調節している可能性がある。また、尾部の筋肉細胞でも、GnRH 受容体 (GnRHR1, GnRHR2) が発現しているため (Kusakabe et al., 2012)、*gnrh2* 発現グリア上衣細胞から分泌された GnRH によって、筋収縮が制御されている可能性も考えられる。しかしながら、GnRH ペプチドが遊泳運動に関与しているかは明らかになっていない。この仮説を立証するためには、光遺伝学的操作により *gnrh2* 発現グリア上衣細胞を活性化または抑制したときのコリン作動性ニューロンや筋肉細胞の活動を解析し、グリア上衣細胞の下流にある現象を明らかにする必要がある。

脊椎動物には、形態も役割も異なる 4 種類のグリア細胞が存在する。一方で、ホヤ幼生のグリア細胞は、形態的には神経索の内壁を構成する上衣細胞の一種のみである。しかし、本研究の結果から、ホヤ幼生の上衣細胞が脊椎動物のオリゴデンドロサイトとアストロサイトと似た特徴を持つことが明らかになった。本研究で、ホヤ幼生の神経索のグリア上衣細胞がコリン作動性ニューロンの軸索と接触しており、包み込む様子が観察された。これは、軸索を包む髄鞘をつくり、情報伝達速度の促進に関わるオリゴデンドロサイトに類似している (工藤, 2015)。また、ホヤ幼生の上衣細胞は複数種類の神経伝達物質受容体をもち、神経活動に連動してカルシウム応答を示す。これは、多くの神経伝達物質受容体をもち、カルシウム応答を示すことが報告されている脊椎動物のアストロサイトに類似している (Benvenga et al., 1987; Cornell-Bell et al., 1990; Barry et al.,

1991; Cornell-Bell and Finkbeiner, 1991)。ホヤ幼生のグリア細胞は、形態的には上衣細胞の一種類のみであるが、機能的には上衣細胞に加えてアストロサイトとオリゴデンドロサイトの性質を兼ね備えた祖先的な細胞である可能性が考えられる。

ホヤ幼生のグリア細胞の役割を解明することで、これまで見逃されていたグリア細胞が関与する神経および筋肉活動の制御機構が明らかとなり、ホヤ幼生の神経系の機能の完全な解明に近づくことが期待される。また、神経索の *gnrh2* 発現グリア上衣細胞の役割を追求することで、生殖とは無関係な GnRH の新奇生理機能の解明につながる可能性がある。脊椎動物と同じ脊索動物門に属するホヤで得られた知見は、脊椎動物のグリア細胞や非生殖性 GnRH 系の新奇機能と役割の理解にも貢献することが期待される。

4. 結語

本研究では、ホヤ幼生において *gnrh2* を発現する細胞を網羅的かつ詳細に同定し、カルシウムイメージング法と光遺伝学を駆使して細胞の活動を可視化することにより、GnRH 発現細胞の生理機能にせまった。カルシウムイメージングによりホヤ幼生の細胞活動を可視化したのは、本研究が最初の報告であり、またホヤ幼生において光遺伝学とカルシウムイメージングを同時に組み合わせた解析もこれまで報告されていない。さらに本研究を通じて、ホヤと脊椎動物の新たな類似点が明らかになった。ホヤ幼生における GnRH 発現細胞の同定は、脊椎動物でも存在が予想される非生殖性 GnRH 神経系の新奇機能の解明に向けての大きな一歩であり、今後、個体レベルかつ個々の細胞レベルでの解析が可能なホヤを用いた進展が期待される。

本研究では *gnrh2* 発現細胞のカルシウムイメージングにより、(1)運動神経節の特定のコリン作動性ニューロンが尾芽胚期に周期的な活動を示す、(2)尾部神経索のグリア上衣細胞で幼生の遊泳運動や眼点の光受容と連動したカルシウム濃度変化が起こる、という2つの新しい現象を発見した。さらに、脊椎動物の嗅神経との関連が指摘されている *gnrh2* を発現する頭部感覚ニューロン (aATENs) の活動記録に成功した。運動神経節で周期的活動を示す *gnrh2* 発現コリン作動性ニューロンは、尾部運動を担う神経回路の形成に関与している可能性がある。このニューロンは、発生学的起源においても脊椎動物で自発的ペースメーカー活性を示す終神経 GnRH ニューロンとの共通性があり、GnRH ニューロンのペースメーカー機能の起源がホヤと脊椎動物の共通祖先まで遡れる可能性がある。

グリア上衣細胞の尾部運動や感覚受容と連動した活動の発見により、これまで、もっぱら構造を維持するための細胞と考えられていたグリア上衣細胞が、神経や筋肉の活動の制御に関与している可能性を示した。光遺伝学とカルシウムイメージングを併用した解析手法を確立し、運動神経節内のコリン作動性ニューロンの活性化によって、尾部のグリア上衣細胞が活動することを明らかにした。単一細胞トランスクリプトーム解析によりアセチルコリン受容体をはじめとする神経伝達物質受容体がグリア上衣細胞で発現していることを明らかにし、グリア上衣細胞が各種ニューロンから情報を受け取っている可能性が高いことを示した。本研究により、ホヤ幼生のグリア上衣細胞と脊椎動物のグリア細胞の類似性が明らかになった。脊椎動物において、さまざまな種類のグリア細胞が細胞内カルシウム濃度変化を示し、神経機能の制御に関与していることが報告されているが、いずれも培養細胞や脳スライス標本を用いた実験であり、*in vivo*での役割やメカニズムの詳細は未解明である。ホヤ幼生ではグリア細胞の生理機能を *in vivo*で、かつ1細胞レベルで、個体の神経回路全体の中に位置付けて解析することが可能である。本研究で得られた知見に基づいて、本研究で確立した手法を用いることにより、今後、グリア細胞の神経活動や運動制御における未知の役割が明らかになり、脊椎動物のグリア細胞の生理機能の解明にも貢献することが期待される。

5. 材料と方法

カタユウレイボヤ成体の入手と飼育

カタユウレイボヤの成体は、兵庫県神戸市東灘区神戸大学深江キャンパスで採集したもの、または、ナショナルバイオリソースプロジェクト (NBRP) カタユウレイボヤを利用して主に京都府舞鶴市の京都大学舞鶴水産実験所及び神奈川県三浦市三崎町の東海大学三崎臨海実験所で養殖されたものを取り寄せて使用した。成体は抗生物質の入っていない人工海水を入れた循環型水槽で、水温 17~19°C、恒明下で飼育した。餌は、市販の珪藻類キートセラス・カルシトランス濃縮液 (サンカルチャー、マリンテック株式会社) を用い、カタユウレイボヤの状態や個体数に応じて 10 ℓ の海水に対して 10~90 ml 与えた。

カタユウレイボヤ卵の受精および個体発生

二個体以上のカタユウレイボヤ成体からそれぞれ卵と精子を取り出し、卵は抗生物質入り人工海水 [マリンアート BR (富田製薬)、0.05 g/l 硫酸ストレプトマイシン (SIGMA-ALDRICH, St. Louis, MO, USA)] の入ったシャーレに、精子はシャーレの蓋に乾燥しないように回収した。精子を一部シャーレに移し、人工海水で薄めて卵の入ったシャーレに数滴加え、受精させた。暗状態、18°C に設定したインキュベーター [TG-190CCFL-3L (E)、株式会社日本医化器械製作所] 内で適当な時間発生させた。

エレクトロポレーション法

Corbo et al. (1997)を参考に行った。数個体のカタユレイボヤ成体から卵を人工海水の入ったシャーレに回収した。精子は別のシャーレに回収した。卵をスピッツ管に集め、手回し遠心機で卵を落として人工海水を抜いた。1 g/l アクチナーゼ E (科研製薬株式会社)、10 g/l チオグリコール酸ナトリウム (和光純薬工業株式会社) を人工海水に溶かした卵膜処理液 4 ml を 37°C に設定したインキュベーター (EYELA SLI-220、東京理化工械) で温めた。温めた卵膜処理液に 1N NaOH を 7 滴加えてタッピングで攪拌し、卵の入ったスピッツ管に全量加えて 3~4 分間置き、卵膜を除去した。人工海水を 6 ml 加えて卵膜処理反応を止め、静置し、卵を沈殿させて上清の処理液を抜き、そこに新たな人工海水を入れて洗浄した。この洗浄を 3 回繰り返した。卵をゼラチンコートシャーレ (0.01% ゼラチン液でコートしたもの、以下 G コートシャーレ) に移し、人工海水で薄めた精子を加えて受精した。キュベットに 80 μ l の DNA 溶液 (60 μ g/80 μ l) と 420 μ l の 10% 海水マンニトール (0.77 M マンニトール 9 ml、人工海水 1 ml) を入れた。受精 20 分後の卵をスピッツ管に移し、人工海水を抜いて 300 μ l \times エレクトロポレーション回数分の 10% 海水マンニトールを加えた。ここから 300 μ l 分の卵をキュベットに入れた (キュベット内全量 800 μ l)。Gene Pulser Xcell (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) にキュベットをセットし、電気パルス (VOLTS: 50 V, TC: 20.0 ms, Cuvette: 4 mm) をあてた。キュベット内の卵を人工海水の入った G コートシャーレに移し、18°C、暗状態に設定したインキュベーター [TG-190CCFL-3L (E)、株式会社日本医化器械製作所] で適当な時間発生させた。

DNA コンストラクトの作製及び調製

本研究で用いた DNA コンストラクトと作製の際に使用したプライマーと制限酵素の情報は表 1 にまとめた。

vglut>Kaede コンストラクトは以前の研究で作製されたものを使用した (Horie et al., 2011; Razy-Krajka et al., 2012)。

gnrh2>mCherry は、以前の研究でクローニングされた *gnrh2* 遺伝子上流 4.3-kb 配列 (Kusakabe et al., 2012) を pSP-mCherry ベクターの *Xho*I/*Not*I サイトに挿入して作製した。*gnrh2*>G-CaMP8 は、*gnrh2* プロモーター配列を PrimeSTAR HS (TaKaRa, Japan) で増幅し、*Bam*HI と *Not*I で処理した後、DNA Ligation Kit (TaKaRa, Japan) を用いて G-CaMP8 配列とつないで作製した。

vacht>CFP は、*vacht* 上流 3.8-kb 配列 (Yoshida et al., 2004) を *Sa*I と *Bam*HI を用いて pSP-CFP に挿入することで作製された (Horie et al., 2011)。この *vacht* プロモーター配列を、pSP-mCherry の *Sa*I と *Not*I サイトに挿入して *vacht*>mCherry を作製した。

以前の研究でクローニングされた *fer2* プロモーターを pSP-CFP に挿入することで *fer2*>CFP が作製された (Razy-Krajka et al., 2012)。これを用いて *Eco*RI と *Not*I で *fer2* プロモーター配列を切り出し、DNA Ligation Kit (TaKaRa, Japan) を用いて mCherry 配列とつなぐことで *fer2*>mCherry を作製した。

pSP-bgFOG>mCherry, *dmbx*>mCherry, *nk6*>mCherry, *islet*>mCherry, *vsx*>mCherry プラスミドは本研究室で島井光太郎博士によって作成された。ベクターとして pSP-bgFOG>mCherry を作製するために、bgFOG 配列をカタユウレイボヤ精子 DNA から表 1 のプライマーを用いて、PrimeSTAR HS (TaKaRa, Japan) で増幅し、pSP-mCherry

の *Bam*HI と *Nod*I サイトに挿入した (Roure et al., 2007)。 *dmbx*, *nk6*, *islet*, *vsx* のエンハンサー配列をカタユウレイボヤ精子 DNA から各プライマー (表 1) を用いて PrimeSTAR HS (TaKaRa, Japan) で増幅し、それぞれ pSP-mCherry の *Xho*I と *Bam*HI サイトに挿入することで *dmbx*>mCherry, *nk6*>mCherry, *islet*>mCherry, *vsx*>mCherry を作製した (Shimai 未発表)。

pitx>mCherry プラスミドは大阪大学の堀江健生博士からいただいた。以前の研究でクローニングされている *pitx* プロモーター配列 (Christiaen et al., 2005; Stolfi and Levine, 2011) をカタユウレイボヤゲノム DNA からプライマー (表 1) を用いて PCR 法で増幅し、pSP-mCherry の *Sa*I サイトに挿入して作製された。(Horie 未発表)。

vacht>ChrimsonR:mCherry を作製するために、Addgene (Watertown, MA, USA) から TRE>ChrimsonR:mCherry プラスミドを購入した。このプラスミドから ChrimsonR:mCherry を精製する際、ChrimsonR-mCherry 間の制限酵素サイトを変異させるためのプライマーを作製した [表 1、ChrR:mC_BamHImut_Fw (*Nod*I)、ChrR:mC_BamHImut_Rv (*Nod*I)]。はじめに、Full ChrR:mC_Fw (CMV) と ChrR:mC_BamHImut_Rv (*Nod*I) のプライマーセットと、ChrR:mC_BamHImut_Fw (*Nod*I) と Full ChrR:mC_Rv (*Eco*RI) のプライマーセットを用いて、それぞれ PrimeSTAR HS (TaKaRa, Japan) で ChrimsonR:mCherry を増幅し、ChrimsonR-mCherry 間の制限酵素サイトを変異させた DNA 断片を作製した。次に、この DNA 断片を等量混合し、Full ChrR:mC_Fw (*Bam*HI) と Full ChrR:mC_Rv (*Eco*RI) のプライマーセットを用いて PrimeSTAR HS (TaKaRa, Japan) で ChrimsonR:mCherry 全長を増幅した。上記の *vacht*>mCherry の *vacht* プロモーター配列を用い、*Bam*HI と *Eco*RI サイトに挿入し、*vacht*>ChrimsonR:mCherry を作製した。各プライマーの配列情報は表 1 に記載する。

各種 DNA コンストラクトを大腸菌 XL1-Blue に形質転換し、LB/Amp 液体培地、37°Cで培養し、得られた培養液から QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN, Hilden, Germany) を用いてプラスミド DNA を調製した。

その後、Nucleobond PC500 (MACHEREY-NAGEL, Düren, Germany) を用いてプラスミド DNA の大量調製を行った。このとき、各コンストラクトを持つ大腸菌からグリセロールストック (50%グリセロール 450 µl、培養液 1050 µl) を作製した。

ホヤ胚および幼生の固定

エレクトロポレーション法によって任意の DNA コンストラクトを導入したカタユレイボヤを後期尾芽胚期 (受精後 14~17 時間) または幼生期 (受精後 18~26 時間) まで発生させた。ホヤ胚または幼生をガラスピペットで 1.5 ml チューブに集め、10%ホルマリン人工海水を 1 ml 加えた。4°Cで 1 時間、振盪固定し、T-PBS [10×PBS 100 ml (NaCl 80 g/Na₂HPO₄•12H₂O 29 g/KCl 2 g/KH₂PO₄ 2 g/Mili-Q water 1000 ml) •5% Triton X-100 20 ml (Triton X-100 13.4 g/Mili-Q water 250 ml) •Mili-Q water 880 ml] で 2 回洗浄した。その後、50%エタノール、80%エタノールの順に置換し、次の実験に使用するまで -20°Cで保存した。

蛍光免疫染色法

固定後、80%エタノール、-20°Cで保存していたサンプルの 80%エタノールを 50%エタノールに置き換え、遮光し 10 分間 4°Cで振盪した後、T-PBS 1 ml に置き換え、遮光し 10 分間 4°Cで振盪して洗浄した。この洗浄を 2 回繰り返した。T-PBS を 10% ヤギ血清 [ヤギ血清 1 ml•2%アジ化ナトリウム (NaN₃) 50 µl•T-PBS 9 ml] 1 ml に置き

換え、遮光し1時間常温で振盪し、ブロッキングを行った。ブロッキング後、一次抗体（表2）1 μ l を10% ヤギ血清とサンプルの入ったエッペンチューブに入れ、6時間4°Cで振盪した。その後、T-PBSに置き換え、遮光し10分間4°Cで振盪し洗浄した。この洗浄を3回繰り返した。新しいT-PBSに置き換え、遮光し一晩4°Cで振盪して洗浄した。その後、新しいT-PBS 1 mlに置き換え、二次抗体（表2）1 μ l を加え、遮光し6時間4°Cで振盪した。一次抗体のときと同様に、T-PBSに置き換え洗浄した。DAPI染色する際は、新しいT-PBS 1 mlに置き換え、DAPI染色液（1 \times PBS 1 ml、DAPI 1 μ g）1 μ l を加え、遮光し10分間4°Cで振盪した。その後、T-PBS 1 mlに置き換え、遮光し10分間4°Cで振盪して洗浄した。この洗浄を2回繰り返した。80%グリセロール/T-PBSで試料をプレパラートに封入し、蛍光顕微鏡（BX50 DP73: Olympus, Japan）または共焦点顕微鏡（FV1200 IX83: Olympus, Japan）で観察した。

in vivo カルシウムイメージング

本研究では、蛍光カルシウムセンサータンパク質として G-CaMP8 (Ohkura et al., 2012) を用いた。G-CaMP は、GFP の構造の中にカルモジュリン (CaM) とミオシン軽鎖フラグメント (M13) を挟み込んだ蛍光タンパク質である。カルシウムイオンがカルモジュリンに結合すると構造が変化し、それに伴い GFP の構造も変化することで、GFP の蛍光強度が変化する。したがって、カルシウムイオン濃度に応じて GFP の蛍光強度が変化するため、細胞の活性を GFP の蛍光強度変化として間接的に測定することができる (Nakai et al., 2001)。G-CaMP は遺伝子でコードされているため、生物個体に外来遺伝子として任意の細胞特異的に導入することが可能である。本研究では、*gnrh2>G-CaMP8* コンストラクトをエレクトロポレーションによりホヤ胚に導入し、

ホヤ幼生の *gnrh2* 発現細胞で特異的に G-CaMP8 を発現させることで、*gnrh2* 発現細胞の活動を可視化した。

ホヤ幼生のカルシウムイメージング (図 10、13) については、顕微鏡は Olympus IX81 microscope (Olympus Corporation, Japan)、カメラは EM-CCD カメラ EVOLVE512 (Photometrics, USA)、励起光光源は Spectra 4 LED light source (Lumencor, Beaverton, OR, USA)、ソフトウェアは MetaMorph image analysis software system (Molecular Devices, San Jose, CA, USA) を使用した。エレクトロポレーション法で遺伝子を導入し、発生させたホヤ胚または幼生を、蛍光実体顕微鏡下で蛍光シグナルを確認し、パスツールピペットを用いて、幼生を数匹ガラスボトムシャーレ (35 mm Glass Base Dish Glass 12 ϕ No.1-S: IWAKI, Japan) に移した。20 \times 対物レンズ (NA 0.80: Olympus) を使用し、GCaMP_Deconvo フィルターで 1 秒 \times 301 回、475 nm の励起光を照射した。510-550 nm 吸収フィルターを介して得られた画像を、16 秒程度の動画として記録した。

眼点への光照射を含めたイメージングでは (図 21)、カルシウムイメージング装置 (正立顕微鏡: Olympus BX81; CSU-W1: 横河電機) と光刺激装置 (青色光 455nm: 多点独立光刺激装置 MiLSS: アスカカンパニー株式会社)、ソフトウェアは MetaMorph image analysis software system を使用した。パスツールピペットを用いて、幼生を数匹スライドガラスに移し、カバーガラスで封入した。ホヤ幼生の眼点に、MiLSS で照射領域を設定し、青色光を 30 秒間隔で 10 秒間照射しながら、CSU_GCaMP フィルターで 1 秒 \times 300 回、470 nm の励起光を照射したときの画像を 17 秒程度の動画として記録した。

後期尾芽胚のイメージングについては (図 15-17, 19, 20)、顕微鏡は CSU-W1 (Olympus Corporation, Japan)、カメラは EM-CCD カメラ iXon Ultra (Andor

technology, Japan)、励起光光源は LDi laser diode illuminator (89 North, Williston, ND, USA)、ソフトウェアは MetaMorph image analysis software system を使用した。遺伝子導入したホヤ胚を、パスツールピペットを用いて数匹スライドガラスに乗せ、カバーガラスで封入した。40×対物レンズ (UPlanSApo 40×: Olympus, Japan) を使用し、1 秒×301 回、470 nm と 555 nm の励起光を照射した。520/35 nm と 641/75 nm の吸収フィルターを介して画像を取得した。また、図 18 については、下記に示す光遺伝学的操作で用いた顕微鏡等を使用して画像を取得した。

in vivo カルシウムイメージングと光遺伝学の併用

本研究では、光遺伝学的操作に光活性化タンパク質としてクリムゾンを用いた。クリムゾンは、*Chlamydomonas noctigama* 由来の光依存性イオンチャネルタンパク質であり、590 nm の赤色光に作用スペクトルピークをもつ。クリムゾンを発現する細胞に赤色光を照射するとチャネルが開き、細胞内に陽イオンを流入させることによって細胞を活性化させることができる (Klapoetke et al., 2014)。本研究で使用したクリムゾン R は、アミノ酸配列の 176 番目のリシンがアルギニンに置換され、作用スペクトルを変更せずに感度を向上させた変異をもつ (Oda et al., 2018)。本研究では、クリムゾン R の発現を可視化させるために蛍光レポーター mCherry を連結させたものをホヤ胚に導入した。*vact>ChrimsonR:mCherry* コンストラクトをエレクトロポレーションによりホヤ胚に導入し、幼生期まで発生させ、コリン作動性ニューロン特異的にクリムゾン R を発現させ、適当なインターバルで活性化させた。

光遺伝学とカルシウムイメージングの併用は (図 24-27)、顕微鏡は Olympus IX81 microscope、カメラは complementary metal oxide semiconductor (CMOS) camera

(ORCA-Fusion: Hamamatsu Photonics K.K., Japan)、励起光光源は Spectra III LED light source (Lumencor, Beaverton, OR, USA)、ソフトウェアは MetaMorph image analysis software system、光遺伝学的操作のための光刺激装置として Mosaic3 (Andor technology, Japan)を使用した。遺伝子導入したホヤ幼生を 24×50 mm カバーガラスに数匹のせ、24×24 mm カバーガラスで封入した。40×対物レンズ (UPlanXApo 40×: Olympus, Japan) を使用し、1 秒×301 回、475 nm と 575 nm の励起光を照射した。これと同時に、Mosaic3 を用いて照射領域を指定し、30 秒間隔で 10 秒間ずつ、または、30 秒間隔で 30 秒間ずつ、470 nm または 640 nm の光を照射した。分光器 (W-VIEW GEMINI-2C: Hamamatsu Photonics K.K., Japan) と吸収フィルター (520/35 nm、641/75 nm) を介して画像を取得した。

カルシウムイメージングデータの解析

取得したデータの解析には MetaMorph image analysis software system (Molecular Devices, San Jose, CA, USA) を用いた。蛍光強度の変化がみられた領域 (ROI) を画像上で囲み、蛍光強度を数値化した。また、取得したデータ上にバックグラウンド蛍光強度 (bgROI) を領域選択し、バックグラウンド補正を行った (ROI-bgROI)。バックグラウンド補正済みの蛍光強度の 5~10 フレーム分の平均値を算出し、F 値とした。補正済みの蛍光値 (ROI-bgROI) から F 値を引き、F 値で割った値を蛍光強度の変化率とした $[\Delta F/F(\%)]$ 。

単一細胞トランスクリプトーム解析

10x Genomics Chromium システムを用いて得られた後期尾芽胚期の公開された単一

細胞トランスクリプトームデータセット (Cao et al., 2019) を用いて、組織における遺伝子の発現プロファイルを解析した。データセットは GEO (GSE120035): <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE120035> から入手可能である。t 分布型確率的近傍埋め込み (t-SNE) 解析は、Loupe Browser 6.1.0 ソフトウェア (10x Genomics, Pleasanton, CA, United States) を使用して実施した。Loupe Browser 6.1.0 ソフトウェアで処理されたデータと t-SNE マップは、Loupe Cell Browser ファイル (.cloupe) または png ファイル (.png) として保存し、解析を行った。解析に用いたホヤ遺伝子の情報 (Gene ID) は Ghost Database (<http://ghost.zool.kyoto-u.ac.jp/cgi-bin/gb2/gbrowse/kh/>) より入手した (表 3)。

6. 引用文献

1. Abdul-Wajid, S., Morales-Diaz, H., Khairallah, S. M. & Smith, W. C. (2015) T-type calcium channel regulation of neural tube closure and EphrinA/EPHA expression. *Cell Rep.* **13**, 829-839.
2. Abitua, P. B., Gainous, T. B., Kaczmarczyk, A. N., Winchell, C. J., Hudson, C., Kamata, K., Nakagawa, M., Tsuda, M., Kusakabe, T. G. & Levine, M. (2015) The pre-vertebrate origins of neurogenic placodes. *Nature* **524**, 462-465.
3. Ackerman, R. C., Johnson, G. A., Kirk, E. A. V., Asirvatham, A. L. & Murdoch, W. J. (1994) Induction of apoptotic or lytic death in an ovarian adenocarcinoma cell line by antibodies generated against a synthetic N-terminal extracellular domain gonadotropin-releasing hormone receptor peptide. *Cancer Lett.* **81**, 177-184.
4. Adams, B. A., Tello, J. A., Erchegyi, J., Warby, C., Hong, D. J., Akinsanya, K. O., Mackie, G. O., Vale, W., Rivier, J. E. & Sherwood, N. M. (2003) Six novel gonadotropin-releasing hormones are encoded as triplets on each of two genes in the protochordate, *Ciona intestinalis*. *Endocrinology* **144**, 1907-1919.
5. Akahoshi, T., Hotta, K. & Oka, K. (2017) Characterization of calcium transients during early embryogenesis in ascidians *Ciona robusta* (*Ciona intestinalis* type A) and *Ciona savignyi*. *Dev. Biol.* **431**, 205-214.
6. Akahoshi, T., Utsumi, M. K., Oonuma, K., Murakami, M., Horie, T., Kusakabe, T. G., Oka, K. & Hotta, K. (2021) A single motor neuron determines the rhythm of early

- motor behavior in *Ciona*. *Sci. Adv.* **7**, eabl6053.
7. Araque, A., Carmignoto, G., Haydon, P. G., Oliet, S. H. R., Robitaille, R. & Volterra, A. (2014) Gliotransmitters travel in time and space. *Neuron* **81**, 728-739.
 8. Barry, J. D., Ogura, A. & Kudo, Y. (1991) Ca²⁺ mobilization in cultured rat cerebellar cells: astrocytes are activated by *t*-ACPD. *Eur. J. Neurol.* **3**, 1146-1154.
 9. Bear, M. F., Connors, B. W. & Paradiso, M. A. (2007) 神経科学—脳の探求—, 西村書店
 10. Benvenga, S., Caizi, L. L. & Robblns, J. (1987) Effect of free fatty acids and nonlipid inhibitors of thyroid hormone binding in the Immunoradiometric assay of thyroxin-binding globulin. *Clin. Chem.* **33**, 1752-1755.
 11. Bone, Q. (1992) On the locomotion of ascidian tadpole larvae. *J. Mar. Biolog. Assoc. U.K.* **72**, 161-186.
 12. Cao, C., Lemaire, L. A., Wang, W., Yoon, P. H., Choi, Y. A., Parsons, L. R., Matese, J. C., Wang, W., Levine, M. & Chen, K. (2019) Comprehensive single cell transcriptome lineages of a proto-vertebrate. *Nature* **571**, 349-354.
 13. Chang, L. W. & Spitzer, N. C. (2009) Spontaneous calcium spike activity in embryonic spinal neurons is regulated by developmental expression of the Na⁺, K⁺-ATPase β 3 subunit. *J. Neurosci.* **29**, 7877-7885.
 14. Christiaen, L., Bourrat, F. & Joly, J.-S. (2005) A modular cis-regulatory system controls isoform-specific *pitx* expression in ascidian stomodæum. *Dev. Biol.* **277**, 557-566.
 15. Corbo, J. C., Levine, M. & Zeller, R. W. (1997) Characterization of a

- notochord-specific enhancer from the Brachyury promoter region of the ascidian, *Ciona intestinalis*. *Development* **124**, 589-602.
16. Cornell-Bell, A. H., Finkbeiner, S. M., Cooper, M. S. & Smith, S. J. (1990) Glutamate induces calcium waves in cultured astrocytes: long-range glial signaling. *Science* **247**, 470-473.
 17. Cornell-Bell, A. H. & Finkbeiner, S. M. (1991) Ca²⁺ waves in astrocytes. *Cell Calcium* **12**, 185-204.
 18. Crowther, R. J. & Whittaker, J. R. (1992) Structure of the caudal neural tube in an ascidian larva: vestiges of its possible evolutionary origin from a ciliated band. *J. Neurosci.* **23**, 280-292.
 19. Crowther, R. J. & Whittaker, J. R. (1994) Serial repetition of cilia pairs along the tail surface of an ascidian larva. *J. Exp. Zool.* **268**, 9-16.
 20. Cui, Y., Yang, Y., Ni, Z., Dong, Y., Cai, G., Foncelle, A., Ma, S., Sang, K., Tang, S., Li, Y., Shen, Y., Berry, H., Wu, S. & Hu, H. (2018) Astroglial Kir4.1 in the lateral habenula drives neuronal bursts in depression. *Nature* **554**, 323-327.
 21. Davalos, D., Grutzendler, J., Yang, G., Kim, J. V., Zuo, Y., Jung, S., Littman, D. R., Dustin, M. L. & Gan, W. (2005) ATP mediates rapid microglial response to local brain injury *in vivo*. *Nat. Neurosci.* **8**, 752-758.
 22. Dehal, P., Satou, Y., Campbell, R. K., Chapman, J., Degnan, B., Tomaso, A. D., Davidson, B., Gregorio, A. D., Gelpke, M., Goodstein, D. M., Harafuji, N., Hastings, K. E. M., Ho, I., Hotta, K., Huang, W., Kawashima, T., Lemaire, P., Martinez, D., Meinertzhagen, I. A., Nacula, S., Nonaka, M., Putnam, N., Rash, S., Saiga, H., Satake,

- M., Terry, A., Yamada, L., Wang, H., Awazu, S., Azumi, K., Boore, J., Branno, M., Chin-Bow, S., DeSantis, R., Doyle, S., Francino, P., Keys, D. N., Haga, S., Hayashi, H., Hino, K., Imai, K. S., Inaba, K., Kano, S., Kobayashi, K., Kobayashi, M., Lee, B., Makabe, K. W., Manohar, C., Matassi, G., Medina, M., Mochizuki, Y., Mount, S., Morishita, T., Miura, S., Nakayama, A., Nishizaka, S., Nomoto, H., Ohta, F., Oishi, K., Rigoutsos, I., Sano, M., Sasaki, A., Sasakura, Y., Shoguchi, E., Shin-i, T., Spagnuolo, A., Stainier, D., Suzuki, M. M, Tassy, O., Takatori, N., Tokuoka, M., Yagi, K., Yoshizaki, F., Wada, S., Zhang, C., Hyatt, P. D., Larimer, F., Detter, C., Doggett, N., Glavina, T., Hawkins, T., Richardson, P., Lucas, S., Kohara, Y., Levine, M., Satoh, N. & Rokhsar, D. S. (2002) The draft genome of *Ciona intestinalis*: insights into chordate and vertebrate origins. *Science* **298**, 2157-2167.
23. Del Bigio, M. R. (1995) The Ependyma: a protective barrier between brain and cerebrospinal fluid. *Glia* **14**,1-13.
24. Delsuc, F., Brinkmann, H., Chourrout, D. & Philippe, H. (2006) Tunicates and not cephalochordates are the closest living relatives of vertebrates. *Nature* **439**, 965-968.
25. Dondi, D., Limonta, P., Moretti, R. M., Marelli, M. M., Garattini, E. & Motta, M. (1994) Antiproliferative effects of luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) agonists on human androgen-independent prostate cancer cell line DU 145: evidence for an autocrine-inhibitory LHRH loop. *Cancer. Res.* **54**, 4091-4095.
26. Feller, M. B., Wellis, D. P., Stellwagen, D., Werblin, F. S. & Shatz, C. J. (1996) Requirement for cholinergic synaptic transmission in the propagation of spontaneous retinal waves. *Science* **272**, 1182-1187.

27. Feller, M. B. (1999) Spontaneous correlated activity in developing neural circuits. *Neuron* **22**, 653-656.
28. Fields, R. F., Woo, D. H. & Basser, P. J. (2015) Glial regulation of the neuronal connectome through local and long-distant communication. *Neuron*. **86**, 374-386.
29. Gabi, M., Collins, C. E., Wong, P., Torres, L. B., Kaas, J. H. & Herculano-Houzel, S. (2010) Cellular scaling rules for the brains of an extended number of primate species. *Brain Behav. Evol.* **76**, 32-44
30. Grillner, S., Ekeberg, Ö., Manira, A. E., Lansner, A., Parker, D., Tegn era, J. & Wall en, P. (1998) Intrinsic function of a neuronal network — a vertebrate central pattern generator. *Brain Res. Rev.* **26**, 184-197.
31. Gu, X., Olson, E. C. & Spitzer, N. C. (1994) Spontaneous neuronal calcium spikes and waves during early differentiation. *J. Neurosci.* **14**, 6325-6335.
32. Gyoja, F. & Satoh, N. (2013) Evolutionary aspects of variability in bHLH orthologous families: insights from the pearl oyster, *Pinctada fucata*. *Zool. Sci.* **30**, 868-876.
33. Hackley, C., Mulholland, E., Kim, G. J., Newman-Smith, E. & Smith, W. C. (2013) A transiently expressed connexin is essential for anterior neural plate development in *Ciona intestinalis*. *Development* **140**, 147-155.
34. Hama, K., Arii, T., Katayama, E., Marton, M. & Ellisman, M. H. (2004) Tri-dimensional morphometric analysis of astrocytic processes with high voltage electron microscopy of thick Golgi preparations. *J. Neurocytol.* **33**, 277-285.
35. Haydon, P. G. (2001) Glia: listening and talking to the synapse. *Nat. Rev. Neurosci.* **2**, 185-193.

36. Herculano-Houzel, S. (2012) The remarkable, yet not extraordinary, human brain as a scaled-up primate brain and its associated cost. *PNAS* **109**, 10661-10668.
37. Hirai, S., Hotta, K., Kubo, Y., Nishino, A., Okabe, S., Okamura, Y. & Okado, H. (2017) AMPA glutamate receptors are required for sensory-organ formation and morphogenesis in the basal chordate. *PNAS* **114**, 3939-3944.
38. Hirai, S., Hotta, K. & Okado, H. (2018) Developmental roles and evolutionary significance of AMPA-type glutamate receptors. *BioEssays* **40**, e1800028.
39. Horie, T., Kusakabe, T. & Tsuda, M. (2008) Glutamatergic networks in the *Ciona intestinalis* larva. *J. Comp. Neurol.* **508**, 249-263.
40. Horie, T., Nakagawa, M., Sasakura, Y., Kusakabe, T. G. & Tsuda, M. (2010) Simple motor system of the ascidian larva: neuronal complex comprising putative cholinergic and GABAergic/glycinergic neurons. *Zool. Sci.* **27**, 181-190.
41. Horie, T., Shinki, R., Ogura, Y., Kusakabe, T. G., Satoh, N. & Sasakura, Y. (2011) Ependymal cells of chordate larvae are stem-like cells that form the adult nervous system. *Nature* **469**, 525-528.
42. Horie, T., Horie, R., Chen, K., Cao, C., Nakagawa, M., Kusakabe, T. G., Satoh, N., Sasakura, Y. & Levine, M. (2018) Regulatory cocktail for dopaminergic neurons in a protovertebrate identified by whole-embryo single-cell transcriptomics. *Genes Dev.* **32**, 1297-1302.
43. Hozumi, A., Matsunobu, S., Mita, K., Treen, N., Sugihara, T., Horie, T., Sakuma, T., Yamamoto, T., Shiraishi, A., Hamada, M., Satoh, N., Sakurai, K., Satake, H. & Sasakura, Y. (2020) GABA-induced GnRH release triggers chordate metamorphosis.

Curr. Biol. **30**, 1555-1561.e4.

44. Imai, J. H. & Meinertzhagen, I. A. (2007) Neurons of the ascidian larval nervous system in *Ciona intestinalis*: I. Central nervous system. *J. Comp. Neurol.* **501**, 316-334.
45. Jennes, L. & Conn, P. M. (1994) Gonadotropin-releasing hormone and its receptors in rat brain. *Front. Neuroendocrinol.* **15**, 51-77.
46. Kamiya, C., Ohta, N., Ogura, Y., Yoshida, K., Horie, T., Kusakabe, T. G., Satake, H. & Sasakura, Y. (2014) Nonreproductive role of gonadotropin-releasing hormone in the control of ascidian metamorphosis. *Dev. Dynam.* **243**, 1524-1535.
47. Katz, M. J. (1983) Comparative anatomy of the tunicate tadpole, *Ciona intestinalis*. *Biol. Bull.* **164**, 1-27.
48. Kaupp, U. B. & Seifert, R. (2002) Cyclic nucleotide-gated ion channels. *Physiol. Rev.* **82**, 769-824.
49. Kerr, J. N., Greenberg, D. & Helmchen, F. (2005) Imaging input and output of neocortical networks in vivo. *PNAS* **102**, 14063-14068.
50. Kiehn, O. (2006) Locomotor circuits in the mammalian spinal cord. *Annu. Rev. Neurosci.* **29**, 279-306.
51. Klapoetke, N. C., Murata, Y., Kim, S. S., Pulver, S. R., Birdsey-Benson, A., Cho, Y. K., Morimoto, T. K., Chuong, A. S., Carpenter, E. J., Tian, Z., Wang, J., Xie, Y., Yan, Z., Zhang, Y., Chow, B. Y., Surek, B., Melkonian, M., Jayaraman, V., Constantine-Paton, M., Wong, G. K. & Boyden, E. S. (2014) Independent optical excitation of distinct neural populations. *Nat. Methods* **11**, 338-346.

52. Koide, T., Yabuki, Y. & Yoshihara, Y. (2018) Terminal nerve GnRH3 neurons mediate slow avoidance of carbon dioxide in larval Zebrafish. *Cell Rep.* **22**, 1115-1123.
53. Kourakis, M. J., Borba, C., Zhang, A., Newman-Smith, E., Salas, P., Manjunath, B. & Smith, W. C. (2019) Parallel visual circuitry in a basal chordate. *Elife* **8**, e44753.
54. Krasovec, G., Hozumi, A., Yoshida, T., Obita, T., Hamada, M., Ahiraishi, A., Satake, H., Horie, T., Mori, H. & Sasakura, Y. (2022) D-serine controls epidermal vesicle release via NMDA receptor, allowing tissue migration during the metamorphosis of the chordate *Ciona*. *Sci. Adv.* **8**, eabn3264.
55. Kusakabe, T., Mishima, S., Shimada, I., Kitajima, Y. & Tsuda, M. (2003) Structure, expression, and cluster organization of genes encoding gonadotropin-releasing hormone receptors found in the neural complex of the ascidian *Ciona intestinalis*. *Gene* **322**, 77-84.
56. Kusakabe, T. (2005) Decoding *cis*-regulatory systems in ascidians. *Zool. Sci.* **22**, 129-146.
57. Kusakabe, T. G., Takimoto, N., Jin, M. & Tsuda, M. (2009) Evolution and the origin of the visual retinoid cycle in vertebrates. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* **364**, 2897-2910.
58. Kusakabe, T. G., Sakai, T., Aoyama, M., Kitajima, Y., Miyamoto, Y., Takigawa, T., Daido, Y., Fujiwara, K., Terashima, Y., Sugiuchi, Y., Matassi, G., Yagisawa, H., Park, M. K., Satake, H. & Tsuda, M. (2012) A conserved non-reproductive GnRH system in chordates. *PLoS One* **7**, e41955.
59. Kusakabe, T. G. (2017) Identifying vertebrate brain prototypes in deuterostomes.

Brain Evolution by Design: From Neural Origin to Cognitive Architecture (Springer), pp. 153-186.

60. Lambert, C. C. & Brandt, C. L. (1967) The effect of light on the spawning of *Ciona intestinalis*. *Biol. Bull.* **132**, 222-228.
61. Lanyi, J. K. & Duschl, A. (1990) The primary structure of a halorhodopsin from *Natronobacterium pharaonis*. *J. Biol. Chem.* **265**, 1253-1260.
62. Magistretti, P. J. & Pellerin, L. (1999) Cellular mechanisms of brain energy metabolism and their relevance to functional brain imaging. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* **354**, 1155-1163.
63. Martín, R., Bajo-Grañeras, R., Moratalla, R., Perea, G. & Araque, A. (2015) Circuit-specific signaling in astrocyte-neuron networks in basal ganglia pathways. *Science* **349**, 730-734.
64. Matsuo-Yagi, A. & Mukohata, Y. (1977) Two possible roles of bacteriorhodopsin; a comparative study of strains of *Halobacterium halobium* differing in pigmentation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **78**, 237-243.
65. Meinertzhagen, I. A. & Okamura, Y. (2001) The larval ascidian nervous system: the chordate brain from its small beginnings. *Trends Neurosci.* **24**, 401-410.
66. Meinertzhagen, I. A., Lemaire, P. & Okamura, Y. (2004) The neurobiology of the ascidian tadpole larva: recent developments in an ancient chordate. *Annu. Rev. Neurosci.* **27**, 453-485.
67. Millan, M., Aguilera, G., Wynn, P. C., Mendelsohn, F. A. O. & Catt, K. J. (1986) Autoradiographic localization of brain receptors for peptide hormones: angiotensin

- II, corticotropin-releasing factor, and gonadotropin-releasing hormone. *Meth. Enzymol.* **124**, 590-606.
68. Miller, W. R., Scott, W. N., Morris, R., Fraser, H. M. & Sharpe, R. M. (1985) Growth of human breast cancer cells inhibited by a luteinizing hormone-releasing hormone agonist. *Nature* **313**, 231-233.
69. Moret, F., Christiaen, L., Deyts, C., Blin, M., Joly, J.-S. & Vernier, P. (2005) The dopamine-synthesizing cells in the swimming larva of the tunicate *Ciona intestinalis* are located only in the hypothalamus-related domain of the sensory vesicle. *Eur. J. Neurosci.* **21**, 3043-3055.
70. Nagel, G., Ollig, D., Fuhrmann, M., Kateriya, S., Musti, A. M., Bamberg, E. & Hegemann, P. (2002) Channelrhodopsin-1: a light-gated proton channel in green algae. *Science* **296**, 2395-2398.
71. Nagel, G., Szellas, T., Huhn, W., Kateriya, S., Adeishvili, N., Berthold, P., Ollig, D., Hegemann, P. & Bamberg, E. (2003) Channelrhodopsin-2, a directly light-gated cation-selective membrane channel. *PNAS* **100**, 13940-13945.
72. Nakagawa, M., Miyamoto, T., Ohkuma, M. & Tsuda, M. (1999) Action spectrum for the photophobic response of *Ciona intestinalis* (Ascidiacea, Urochordata) larvae implicates retinal protein. *Photochem. Photobiol.* **70**, 359-362.
73. Nakai, J., Ohkura, M. & Imoto, K. (2001) A high signal-to-noise Ca²⁺ probe composed of a single green fluorescent protein. *Nature* **411**, 137-141.
74. Navarrete, I. A. & Levine, M. (2016) Nodal and FGF coordinate ascidian neural tube morphogenesis. *Development* **143**, 4665-4675.

75. Nedergaard, M., Ransom, B. & Goldman, S. A. (2003) New roles for astrocytes: redefining the functional architecture of the brain. *Trends Neurosci.* **26**, 523-530.
76. Nelles, D. G. & Hazrati, L. (2022) Ependymal cells and neurodegenerative disease: outcomes of compromised ependymal barrier function. *Brain Commun.* **4**, fcac288.
77. Newman, E. A. & Zahs, K. R. (1997) Calcium waves in retinal glial cells. *Science* **275**, 844-847.
78. Nishino, A., Okamura, Y., Piscopo, S. & Brown, E. R. (2010) A glycine receptor is involved in the organization of swimming movements in an invertebrate chordate. *BMC Neurosci.* **11**, 6.
79. Nishino, A., Baba, S. A. & Okamura, Y. (2011) A mechanism for graded motor control encoded in the channel properties of the muscle ACh receptor. *PNAS* **108**, 2599-2604.
80. Nishitsuji, K., Horie, T., Ichinose, A., Sasakura, Y., Yasuo, H. & Kusakabe, T. G. (2012) Cell lineage and *cis*-regulation for a unique GABAergic/glycinergic neuron type in the larval nerve cord of the ascidian *Ciona intestinalis*. *Dev. Growth. Differ.* **54**, 177-186.
81. Oda, K., Vierock, J., Oishi, S., Rodriguez-Rozad, S., Taniguchi, R., Yamashita, K. J., Wiegert, S., Nishizawa, T., Hegemann, P. & Nureki, O. (2018) Crystal structure of the red light-activated channelrhodopsin Chrimson. *Nat. Commun.* **9**, 3949.
82. Ohkura, M., Sasaki, T., Sadakari, J., Gengyo-Ando, K., Kagawa-Nagamura, Y., Kobayashi, C., Ikegaya, Y. & Nakai, J. (2012) Genetically encoded green fluorescent Ca²⁺ indicators with improved detectability for neuronal Ca²⁺ signals. *PLoS One* **7**,

e51286.

83. Oka, Y. & Matsushima, T. (1993) Gonadotropin-releasing hormone (GnRH)-immunoreactive terminal nerve cells have intrinsic rhythmicity and project widely in the brain. *J. Neurosci.* **13**, 2161-2176.
84. Okada, T., Stanley, M. S., Katsuyama, Y., Okamura, Y. & Meinerzhagen, I. A. (2001) Neuronal form in the central nervous system of the tadpole larva of the ascidian *Ciona intestinalis*. *Biol. Bull.* **200**, 252-256.
85. Okamura, Y., Nishino, A., Murata, Y., Nakajo, K., Iwasaki, H., Ohtsuka, Y., Tanaka-Kunishima, M., Takahashi, N., Hara, Y., Yoshida, T., Nishida, M., Okado, H., Watari, H., Meinerzhagen, I. A., Satoh, N., Takahashi, K., Satou, Y., Okada, Y. & Mori, Y. (2005) Comprehensive analysis of the ascidian genome reveals novel insights into the molecular evolution of ion channel genes. *Physiol. Genomics* **22**, 269-282.
86. Pati, D. & Habibi, H. R. (1993) Characterization of gonadotropin-releasing hormone receptors in goldfish ovary: variation during follicular development. *Am. J. Physiol.* **264**, R227-234.
87. Putnam, N. H., Butts, T., Ferrier, D. E. K., Furlong, R. F., Hellsten, U., Kawashima, T., Robinson-Rechavi, M., Shoguchi, E., Terry, A., Yu, J., Benito-Gutierrez, E., Dubchak, I., Garcia-Fernandez, J., Gibson-Brown, J. J., Grigoriev, I. V., Horton, A. C., DeJong, P. J., Jurka, J., Kapitonov, V. V., Kohara, Y., Kuroki, Y., Lindquist, E., Lucas, S., Osoegawa, K., Pennacchio, L. A., Salamov, A. A., Satou, Y., Sauka-Spengler, T., Schmutz, J., Shin, T., Toyoda, A., Bronner-Fraser, M., Fujiyama, A., Holland, L. Z., Holland, P. W. H., Satoh, N. & Rokhsar, D. S. (2008) The amphioxus genome

- and the evolution of the chordate karyotype. *Nature* **453**, 1064-1071.
88. Razy-Krajka, F., Brown, E. R., Horie, T., Callebert, J., Sasakura, Y., Joly, J.-S., Kusakabe, T. G. & Vernier, P. (2012) Monoaminergic modulation of photoreception in ascidian: evidence for a proto-hypothalamo- retinal territory. *BMC Biol.* **10**, 45.
 89. Reist, N. E. & Smith, S. J. (1992) Neurally evoked calcium transients in terminal schwann cells at the neuromuscular junction. *PNAS* **89**, 7625-7629.
 90. Robitaille, R. (1998) Modulation of synaptic efficacy and synaptic depression by glial cells at the frog neuromuscular junction. *Neuron* **21**, 847-855.
 91. Roure, A., Rothbacher, U., Robin, F., Kalmar, E., Ferone, G., Lamy, C., Missero, C., Mueller, F. & Lemaire, P. (2007) A multicassette gateway vector set for high throughput and comparative analyses in *Ciona* and vertebrate embryos. *PLoS ONE* **2**, e916.
 92. Ryan, K., Lu, Z. & Meinertzhagen, I. A. (2016) The CNS connectome of a tadpole larva of *Ciona intestinalis* (L.) highlights sidedness in the brain of a chordate sibling. *eLife* **5**, e16962.
 93. Ryan, K., Lu, Z. & Meinertzhagen, I. A. (2017) Circuit homology between decussating pathways in the *Ciona* larval CNS and the vertebrate startle-response pathway. *Curr. Biol.* **27**, 721-728.
 94. Sakai, T., Aoyama, M., Kusakabe, T. G., Tsuda, M. & Satake, H. (2010) Functional diversity of signaling pathways through G protein-coupled receptor heterodimerization with a species-specific orphan receptor subtype. *Mol. Biol. Evol.* **27**, 1097-1106.

95. Sakurai, D., Goda, M., Kohmura, Y., Horie, T., Iwamoto, H., Ohtsuki, H., & Tsuda, M. (2004) The role of pigment cells in the brain of ascidian larva. *J. Comp. Neurol.* **475**, 70-82.
96. Satoh, N., Satou, Y., Davidson, B. & Levine, M. (2003) *Ciona intestinalis*: an emerging model for whole-genome analyses. *Trends Genet.* **19**, 376-381.
97. Schild, L. C. & Glauser, D. A. (2015) Dual color neural activation and behavior control with Chrimson and CoChR in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* **200**, 1029-1034.
98. Schwanzel-Fukuda, M. & Pfaff, D. W. (1989) Origin of luteinizing hormone-releasing hormone neurons. *Nature* **338**, 161-164.
99. Spitzer, N. C., Lautermilch, N. J., Smith, R. D. & Gomez, T. M. (2000) Coding of neuronal differentiation by calcium transients. *BioEssays* **22**, 811-817.
100. Stolfi, A. & Levine, M. (2011) Neuronal subtype specification in the spinal cord of a protovertebrate. *Development* **138**, 995-1004.
101. Takamura, K., Minamida, N. & Okabe, S. (2010) Neural map of the larval central nervous system in the ascidian *Ciona intestinalis*. *Zool. Sci.* **27**, 191-203.
102. Tello, J. A., Rivier, J. E. & Sherwood, N. M. (2005) Tunicate gonadotropin-releasing hormone (GnRH) peptides selectively activate *Ciona intestinalis* GnRH receptors and the green monkey type II GnRH receptor. *Endocrinology* **146**, 4061-4073.
103. Terakado, K. (2001) Induction of Gamete Release by Gonadotropin-Releasing Hormone in a Protochordate, *Ciona intestinalis*. *Gen. Comp. Endocrinol.* **124**, 277-284.

104. Tsacopoulos, M. & Magistretti, P. J. (1996) Metabolic coupling between glia and neurons. *J. Neurosci.* **16**, 877-885.
105. Tsuda, M., Kawakami, I. & Shiraishi, S. (2003a) Sensitization and habituation of the swimming behavior in ascidian larvae to light. *Zool. Sci.* **20**, 13-22.
106. Tsuda, M., Kusakabe, T., Iwamoto, H., Horie, T., Nakashima, Y., Nakagawa, M. & Okunou, K. (2003b) Origin of the vertebrate visual cycle. II. Visual cycle proteins are localized in whole brain including photoreceptor cells of a primitive chordate. *Vision Res.* **43**, 3045-3053.
107. Whitlock, K. E. (2008) Developing a sense of scents: plasticity in olfactory placode formation. *Brain Res. Bull.* **75**, 340-347.
108. Wong, R. O., Chernjavsky, A., Smith, S. J. & Shatz, C. J. (1995) Early functional neural networks in the developing retina. *Nature* **374**, 716-718.
109. Wray, S., Grant, P. & Gainer, H. (1989) Evidence that cells expressing luteinizing hormone-releasing hormone mRNA in the mouse are derived from progenitor cells in the olfactory placode. *PNAS* **86**, 8132-8136.
110. Yoshida, R., Sakurai, D., Horie, T., Kawakami, I., Tsuda, M. & Kusakabe, T. (2004) Identification of neuron-specific promoters in *Ciona intestinalis*. *Genesis* **39**, 130-140.
111. Zega, G., Biggiogero, M., Gropelli, S., Candiani, S., Oliveri, D., Parodi, M., Pestarino, M., Bernardi, F. D. & Pennati, R. (2008) Developmental expression of glutamic acid decarboxylase and of gamma-aminobutyric acid type B receptors in the ascidian *Ciona intestinalis*. *J. Comp. Neurol.* **506**, 489-505.

112. Zhou, Z. J. (1998) Direct participation of starburst amacrine cells in spontaneous rhythmic activities in the developing mammalian retina. *J. Neurosci.* **18**, 4155-4165.
113. 市川眞澄, 岡良隆, 小林牧人, 武内ゆかり, 東村博子, 西原真杉, 朴民根, 前多敬一郎, 村上志津子, 森裕司 (1998) 脳と生殖—GnRH 神経系の進化と適応. 学会出版センター.
114. 工藤佳久 (2015) グリア細胞. 脳科学辞典. DOI: 10.14931/bsd.4432
115. 日下部岳広 (2009) 第 10 章 ホヤの神経系と行動. 『動物の多様な生き方 5 さまざまな神経系をもつ動物たち：神経系の比較生物学』（比較生理生化学会編）共立出版, pp. 168-191.

7. 図・表

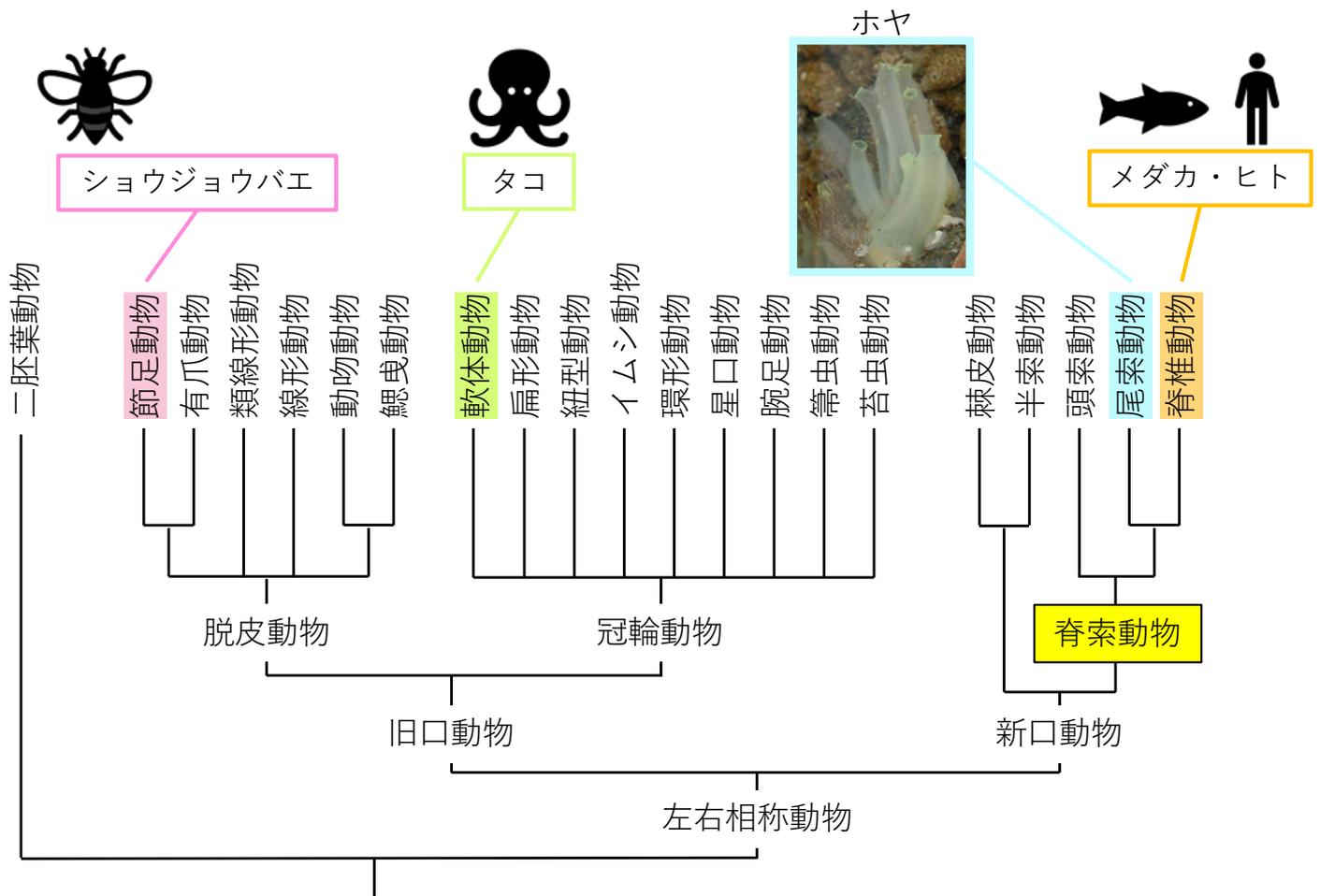


図1. 後生動物の進化系統樹

ホヤは尾索動物に属する、脊椎動物に最も近縁な無脊椎動物である。脊椎動物と尾索動物をまとめて脊索動物とよぶ。節足動物のシヨウジョウバエ、線形動物の線虫、軟体動物のタコよりも、ホヤは脊椎動物に近縁である。

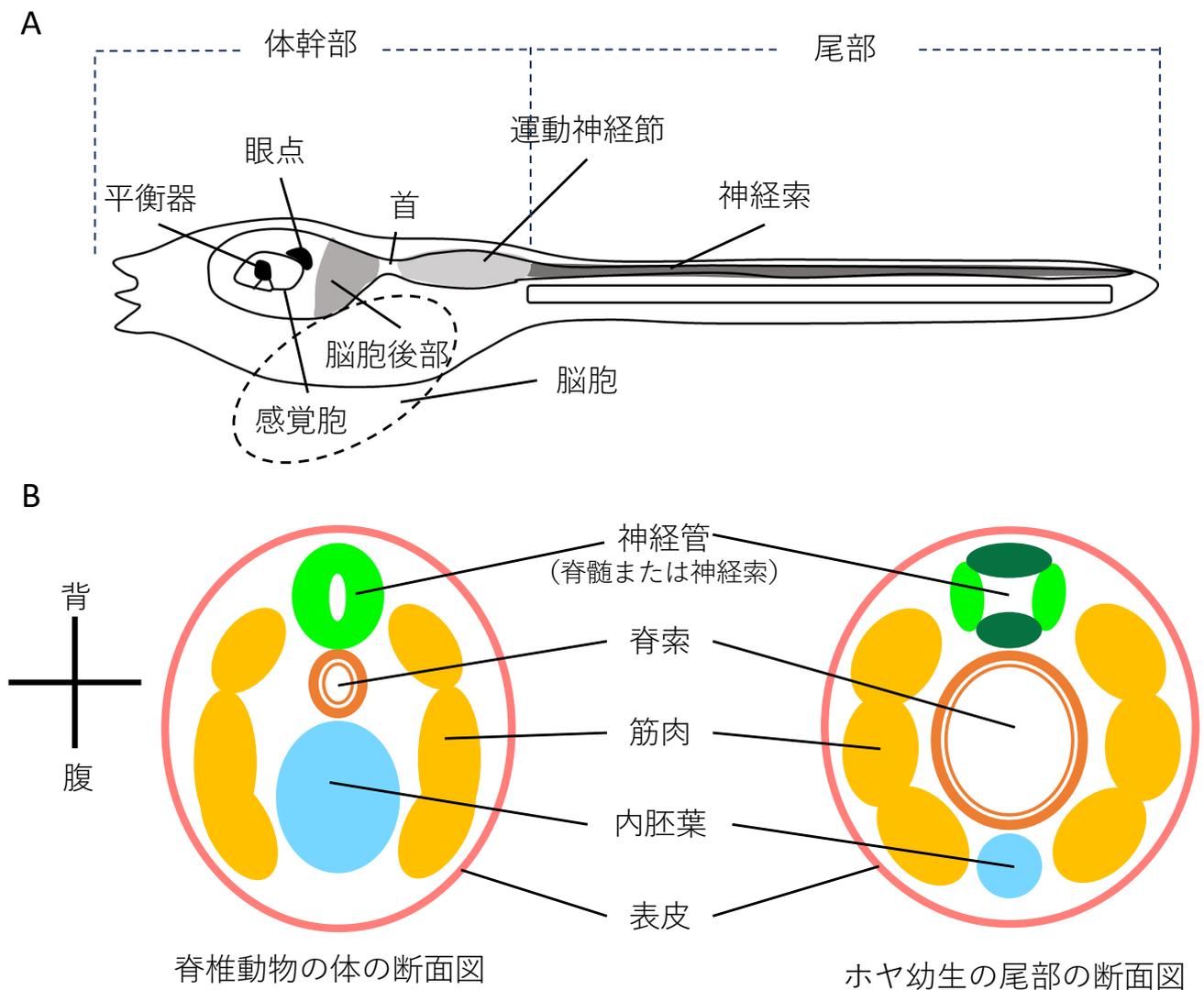


図2. ホヤと脊椎動物のボディプランの類似点

(A) カタユウレイボヤ幼生の模式図。カタユウレイボヤは、卵から体長約1mmのオタマジクシ型の幼生が孵化し、尾部を使って海中を遊泳する。光受容器である眼点、重力感知器である平衡器を含む脳細胞を体幹部にもつ。また、脊椎動物と類似した中枢神経系をもち、脳細胞、運動神経節、神経索はそれぞれ脊椎動物の前脳と中脳、後脳、脊髄に相当する。ホヤ幼生の中枢神経系は脊椎動物と同様に、ニューロンとグリア細胞で構成されている。(B) 脊椎動物の体の断面図(左)とカタユウレイボヤ幼生の尾部の断面図(右)。背側から、神経管、脊索、内胚葉が並び、左右に筋肉が存在する。その周囲を表皮が覆っている。このように、脊椎動物とカタユウレイボヤ幼生はボディプランが類似している。

脊椎動物の中枢パターン発生器 (CPG)

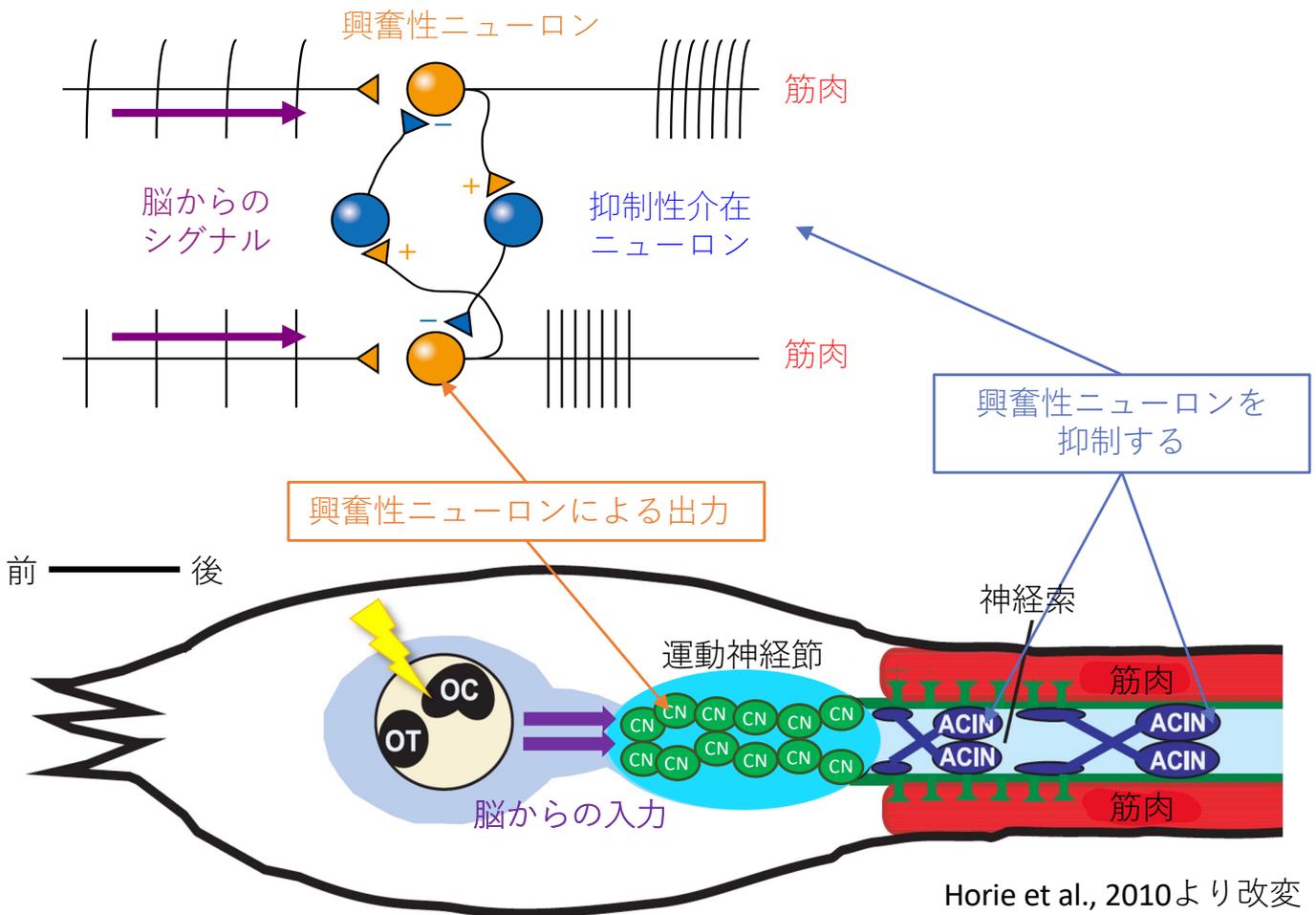


図3. カタユレイボヤ幼生の中枢神経系と中枢パターン発生器 (CPG)

脊椎動物のCPG回路 (上) とホヤ幼生の体幹部と尾部前方 (下、Horie et al., 2010より改変) の模式図。ヒトの歩行運動や呼吸などのリズムカルなパターン運動を制御している神経回路網のことを中枢パターン発生器 (central pattern generator: CPG) という。ホヤ幼生の運動神経節内には興奮性のコリン作動性ニューロン (CN) が、尾部神経索の前方には抑制性のGABA/グリシン作動性ニューロン (ACIN) が存在している。CNの軸索は尾部の筋肉に投射しており、筋肉収縮を制御している。ACINは前方に軸索を伸ばし、反対側のCNを抑制する。このCNとACINのはたらきにより、ホヤ幼生のリズムカルな尾部運動がうまれる。これは、脊椎動物のCPGに類似していると考えられている。CPG: central pattern generator; CN: cholinergic neuron; ACIN: anterior caudal inhibitory neuron; OT: otolith; OC: ocellus

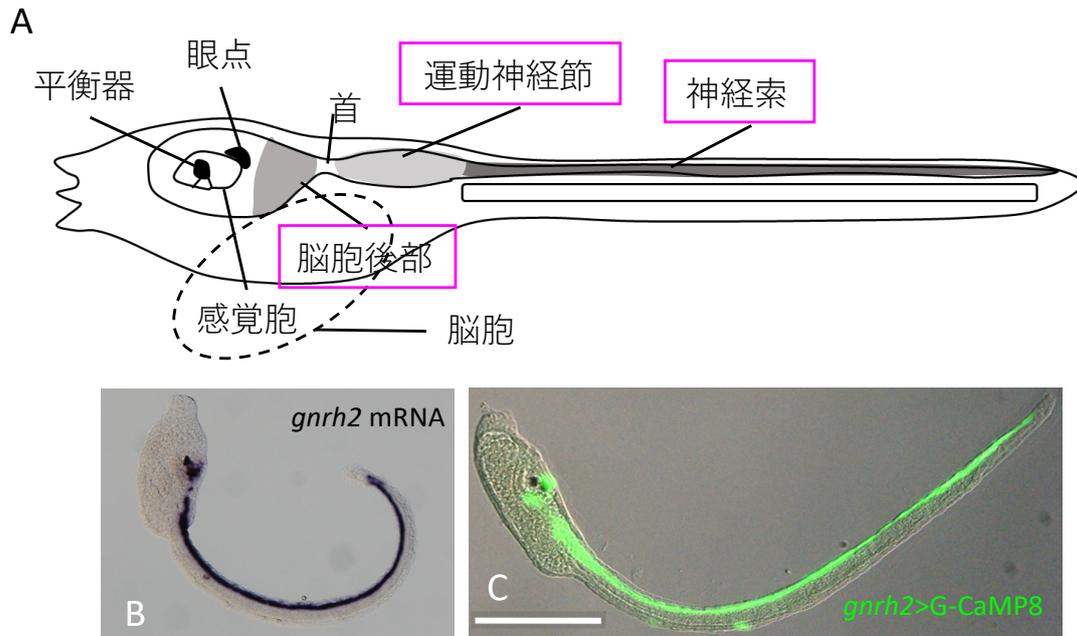


図4. カタユウレイボヤ幼生における *gnrh2* の発現パターン

(A) カタユウレイボヤ幼生の模式図。(B) *gnrh2* の *in situ* ハイブリダイゼーション。
 (C) *gnrh2* の上流領域配列の制御により発現したG-CaMP8 (*gnrh2*>G-CaMP8) の
 蛍光免疫染色画像。*gnrh2* はホヤ幼生の脳胞後部、運動神経節、神経索にかけて中枢
 神経系で広く発現する。スケールバー: 200 μ m

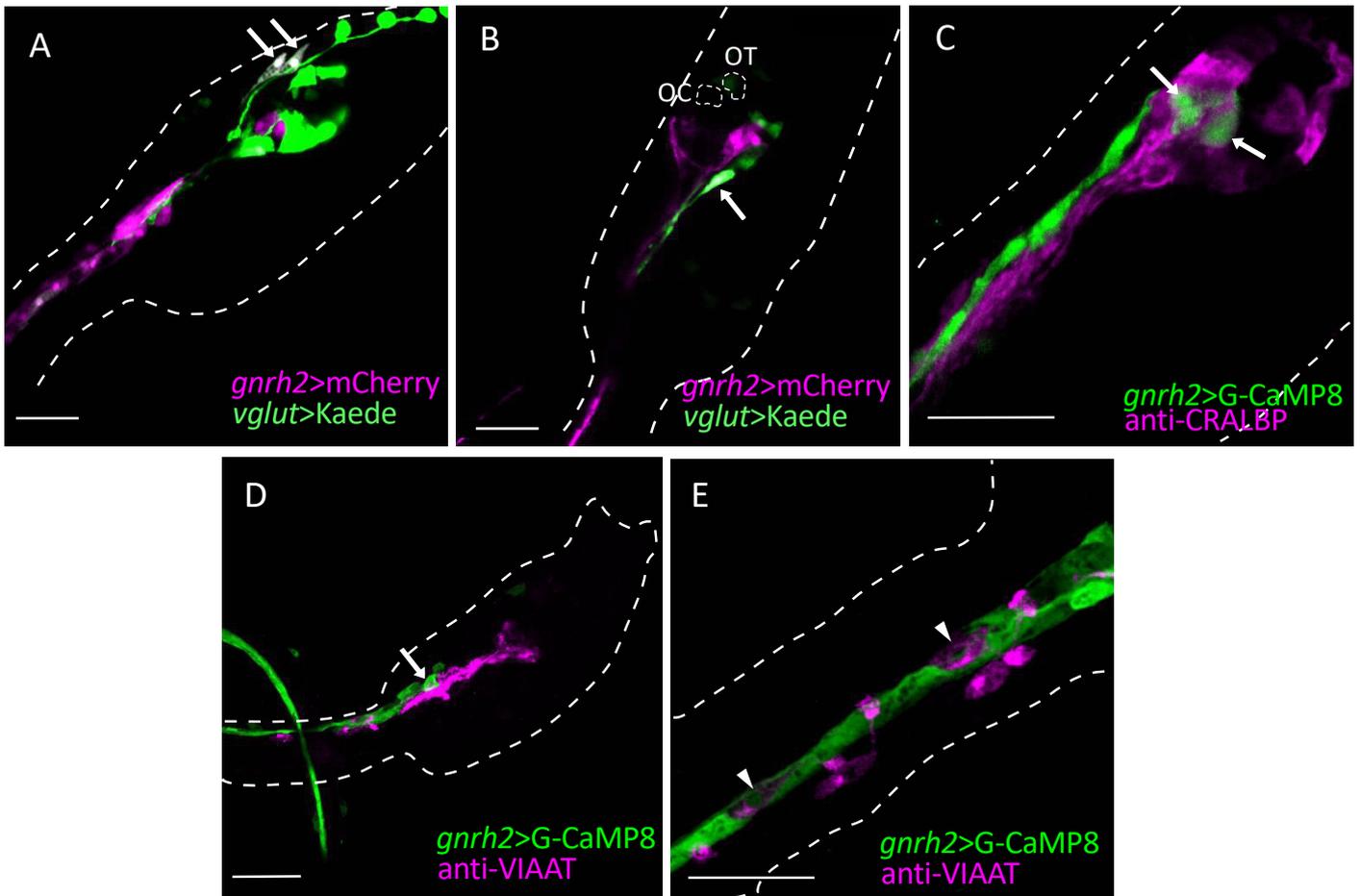


図5. 二重免疫染色法を用いた受精後21時間 (21 hpf) のカタユウレイボヤ幼生における *gnrh2* を発現する細胞種の同定

(A, B) グルタミン酸作動性ニューロンと *gnrh2* 発現細胞をそれぞれKaede (緑) と mCherry (マゼンタ) で可視化した。原始プラコード由来感覚ニューロン (aATENs) で *gnrh2* が発現する (A, 矢印)。脳後部の腹側のグルタミン酸作動性ニューロンで *gnrh2* が発現する (B, 矢印)。(C) 細胞内レチナール結合タンパク質 (CRALBP) を抗体により可視化した (マゼンタ)。*gnrh2* 発現細胞はG-CaMP8 (緑) で可視化した。CRALBP 陽性細胞と *gnrh2* 発現細胞は重ならなかった (矢印)。(D, E) 抗VIAAT抗体を用いて、GABA/グリシン作動性ニューロンを可視化した (マゼンタ)。*gnrh2* 発現細胞はG-CaMP8 (緑) で可視化した。体幹部のVIAAT陽性細胞と *gnrh2* 発現細胞は重ならなかった (D, 矢印)。Eは尾部前方の拡大図。VIAAT陽性細胞であるACIN (E, 矢じり) で *gnrh2* は発現しておらず、その周囲のグリア上衣細胞で *gnrh2* が発現していた (E)。

aATENs : anterior apical trunk epidermal neurons; OT: 平衡器; OC: 眼点; ACIN: anterior caudal inhibitory neuron; hpf: hours post fertilization (受精後時間); スケールバー : 30 μ m

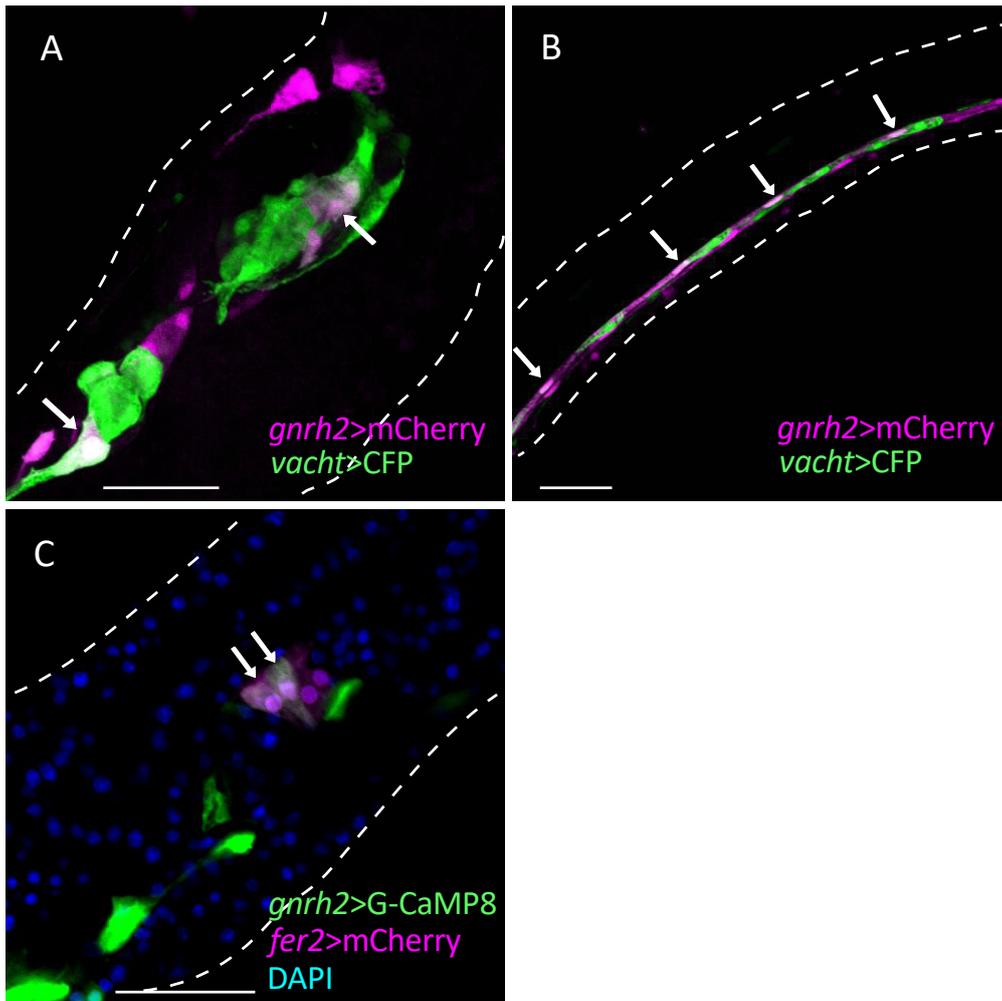


図6. コリン作動性ニューロンとドーパミン産生細胞の一部で *gnrh2* が発現する
 (A, B) コリン作動性ニューロンと *gnrh2* 発現細胞をそれぞれ CFP (緑) と mCherry (マゼンタ) で可視化した。脳胞と運動神経節 (A、矢印)、尾部神経索 (B、矢印) の一部で *vacht* 陽性細胞と *gnrh2* 発現細胞が重なっていた。(C) ドーパミン産生細胞と *gnrh2* 発現細胞をそれぞれ mCherry (マゼンタ) と G-CaMP8 (緑) で可視化し、細胞核を DAPI (青) で可視化した。一部のドーパミン産生細胞で *gnrh2* が発現していた (矢印)。サンプルはすべて 21 hpf の幼生である (A-C)。hpf: hours post fertilization (受精後時間) ; スケールバー : 30 μm

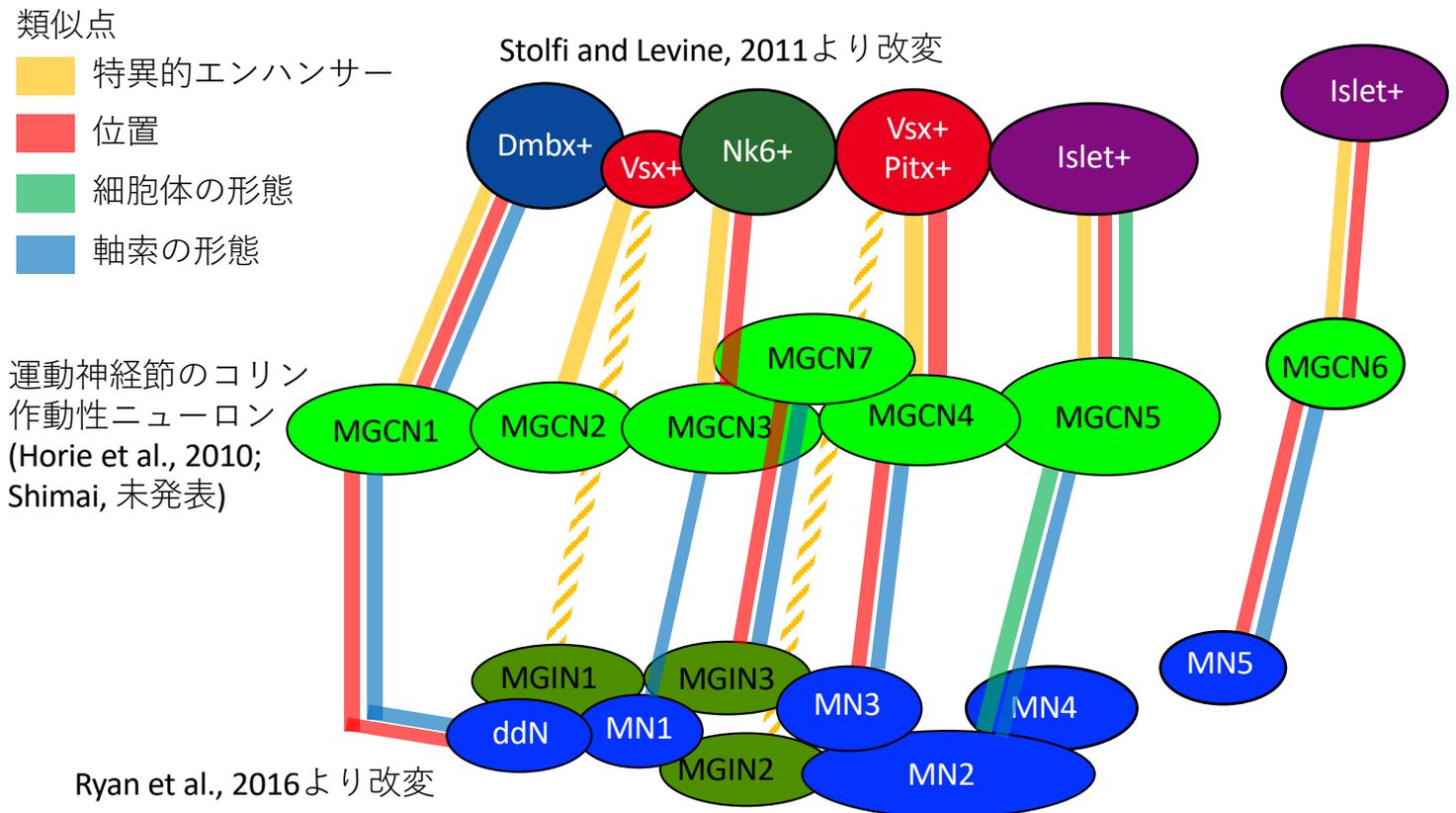


図7. カタユレイボヤ幼生の運動神経節内のコリン作動性ニューロンの細胞種の同定
 運動神経節のニューロンの同定に関する過去の3つの研究の比較検討を行なった。各楕円は1つのニューロンを示し、上段、中段、下段はそれぞれの研究で報告された運動神経節のニューロンの配置を、左を前方、右を後方として示した模式図である。各ニューロンは左右1対存在するが、片側1個のみを示す。上段は、特異的な転写因子のエンハンサー (*Dmbx*, *Vsx*, *Nk6*, *Pitx*, *Islet*) によるレポーターの発現と形態により同定されたホヤ幼生の運動神経内の6つのニューロンを示す (Stolfi and Levine, 2011; Navarrete and Levine, 2016)。中段は、コリン作動性ニューロンのマーカー遺伝子である *vacht* 遺伝子上流の転写調節領域をCFPレポーターに連結した *vacht*>CFPコンストラクトの導入によって標識されたコリン作動性ニューロンを示す (Horie et al., 2010、Shimai, 未発表、MGCN1-7)。これらのコリン作動性ニューロンと特異的転写因子の発現パターンを比較し、それぞれのニューロンの細胞種が同定された (Shimai, 未発表、黄色線)。下段は、連続超薄切片の透過型電子顕微鏡像に基づくコネクトーム解析において軸索の形状や位置関係を指標として区別された、運動ニューロンと介在ニューロンを示す (Ryan et al., 2016)。3つの報告間で同一と推定される細胞を、細胞特異的エンハンサーによる標識、位置、細胞体や軸索の形態の類似性に基づいて、カラーの線 (黄色、ピンク、緑、青) で繋いだ。MGCN: motor ganglion cholinergic neuron; MGIN: motor ganglion interneuron; MN: motor neuron; ddN: descending decussating neuron

後期尾芽胚期

幼生期

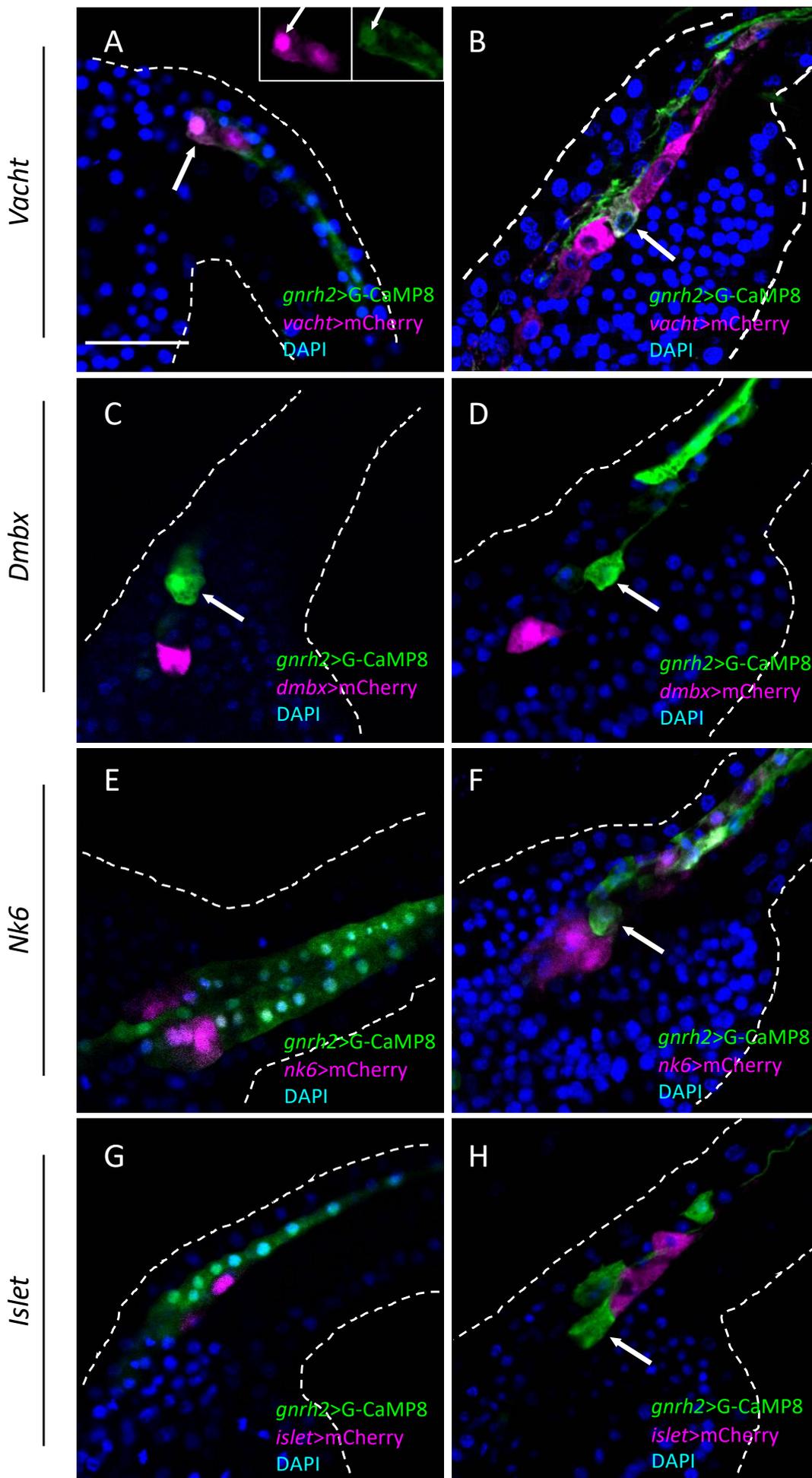


図8. カタユウレイボヤ胚と遊泳幼生における運動神経節内の *gnrh2* 発現コリン作動性ニューロンの同定

後期尾芽胚期 (A, C, E, G: 14 hpf) と遊泳幼生期 (B: 27 hpf; D, F: 21 hpf; H: 21.5 hpf) において、ニューロン特異的遺伝子 (*vacht*, *dmbx*, *nk6*, *islet*) と *gnrh2* の発現をそれぞれ mCherry (マゼンタ) と G-CaMP8 (緑) で可視化し比較した。また、細胞核を DAPI (青) で可視化した。(A, B) 発生段階にかかわらず、*gnrh2* は一部の *vacht* 陽性細胞で発現していた (矢印)。幼生期の運動神経節内では、5つの *vacht* 陽性ニューロンが可視化され (マゼンタ)、そのうちの前から4番目のニューロンで *gnrh2* が発現していた (B, 矢印)。Aの右上の図は、mCherryとG-CaMP8シグナルのそれぞれの画像。(C, D) 発生段階にかかわらず、*dmbx* 陽性細胞 (マゼンタ) と *gnrh2* 発現細胞 (緑、矢印) は重ならず、隣接もしていなかった。(E, F) 後期尾芽胚期と幼生期の両方で、*nk6* 陽性細胞 (マゼンタ) で *gnrh2* (緑) は発現していなかった。また、*nk6* 陽性細胞の後方に *gnrh2* 発現細胞が隣接していた (F, 矢印)。(G, H) 発生段階にかかわらず、*islet* 陽性細胞 (マゼンタ) と *gnrh2* 発現細胞 (緑) は重ならなかった。しかし、*islet* 陽性細胞の前方に *gnrh2* 発現細胞が隣接していた (G, 矢印)。hpf: hours post fertilization (受精後時間); スケールバー: 30 μ m

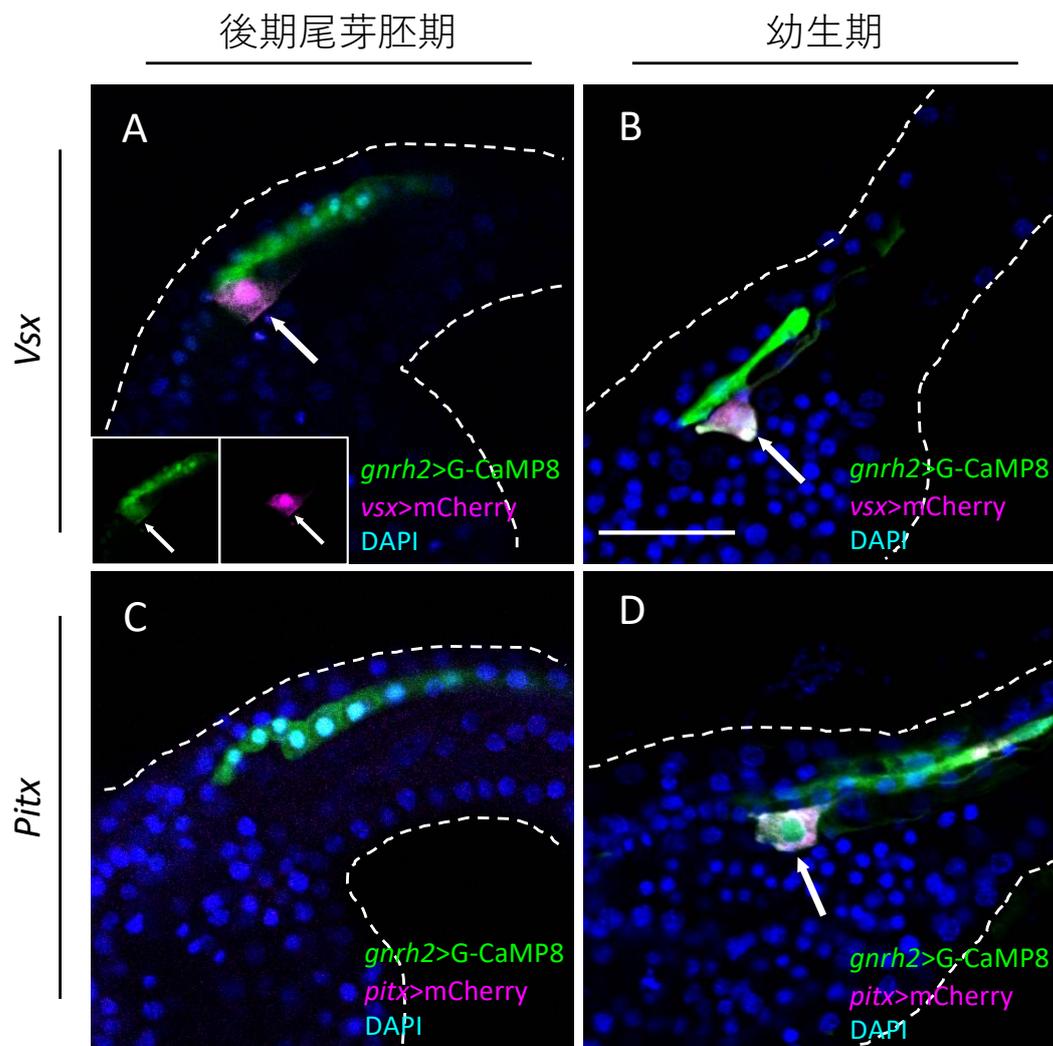


図9. 後期尾芽胚と遊泳幼生の運動神経節内における *vsx* または *pitx* と *gnrh2* の発現パターンの比較

後期尾芽胚期 (A, C: 14 hpf) と遊泳幼生期 (B: 21 hpf; D: 21.5 hpf) において、*vsx* または *pitx* と *gnrh2* の発現をそれぞれ mCherry (マゼンタ) と G-CaMP8 (緑) で可視化し比較した。また、細胞核を DAPI (青) で可視化した。(A, B) 発生段階にかかわらず、*gnrh2* 発現細胞と *vsx* 陽性細胞は重なっていた (矢印)。A の左下の図は、mCherry と G-CaMP8 シグナルのそれぞれの画像。(C) 後期尾芽胚期では、*pitx* 発現のシグナルが検出されなかった。(D) *pitx* 陽性細胞と *gnrh2* 発現細胞は重なっていた (矢印)。これらの結果より、運動神経節内の前から4番目の *vsx/pitx* 陽性細胞で *gnrh2* が発現することが示唆された。hpf: hours post fertilization (受精後時間) ; スケールバー: 30 μ m

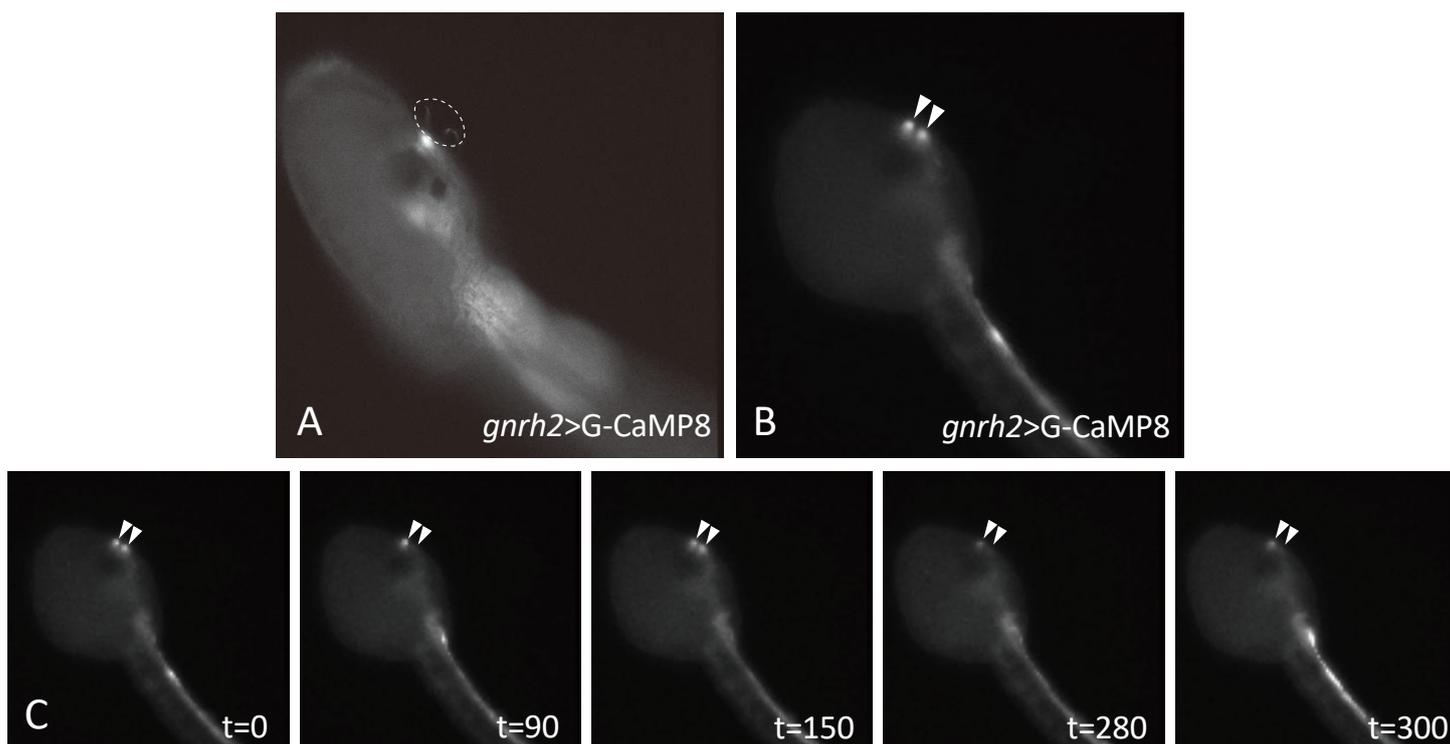


図10. *gnrh2*発現感覚ニューロンのカルシウムイメージング

*gnrh2*を発現する、原始プラコード由来の化学感覚頂端部表皮ニューロン (aATENs) を G-CaMP8で可視化した。(A) 21 hpfのホヤ幼生のG-CaMP8蛍光画像。aATENsの推定感覚繊毛がG-CaMP8蛍光で標識された (点線内)。(B) 19 hpfのホヤ幼生のカルシウムイメージング画像。aATENsで顕著なカルシウム濃度変化がみられた (矢じり)。(C) Bのカルシウムイメージング動画の各時点の画像。 hpf: hours post fertilization (受精後時間) ; t: 動画撮影開始からの経過時間。単位は秒。

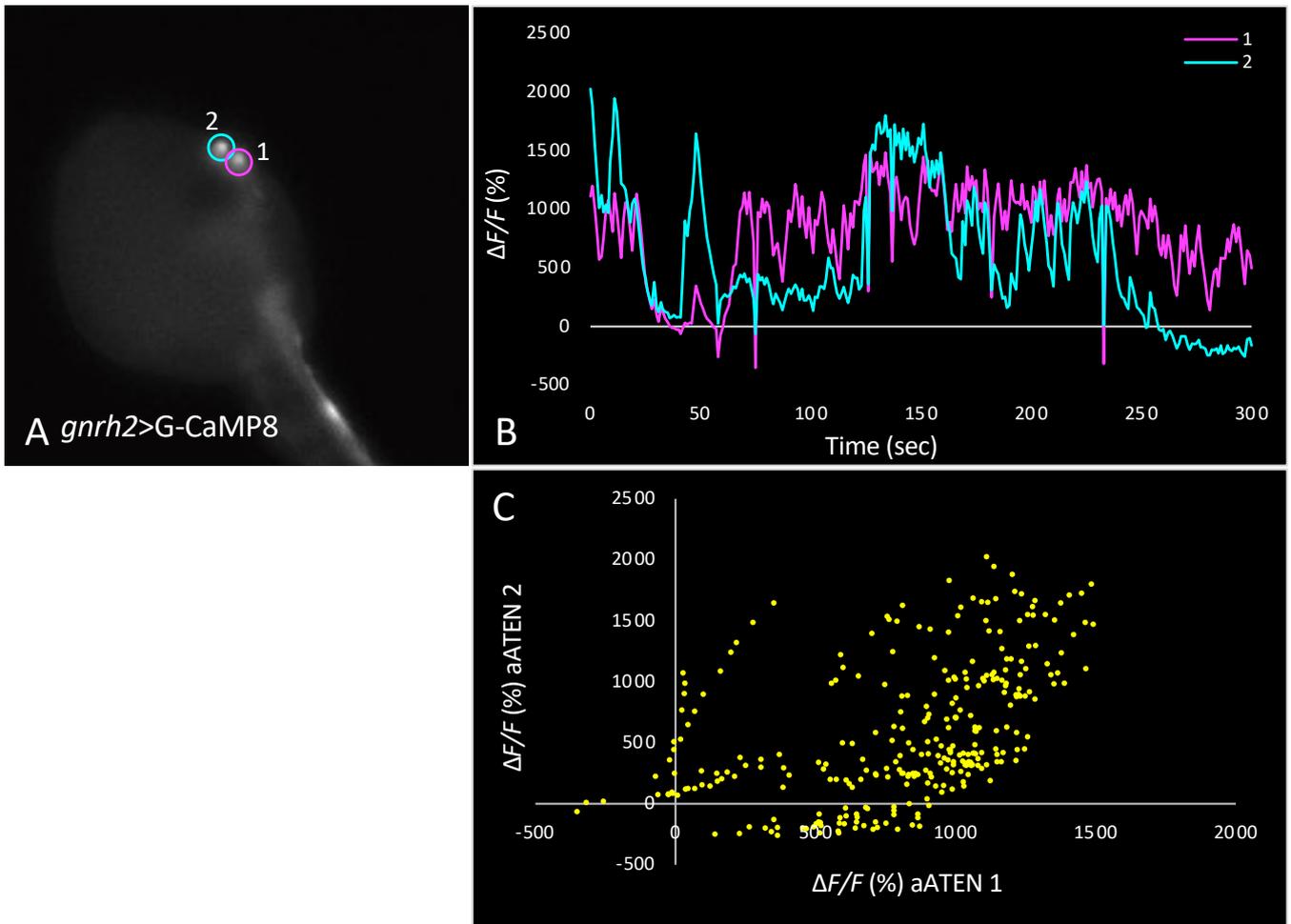


図11. *gnrh2*発現感覚ニューロンのカルシウム濃度変化の詳細

(A) 19 hpfのホヤ幼生のaATENs (マゼンタ、水色円) のカルシウムイメージング画像。図10と同じ個体。(B) Aの円で示した2つのaATENsの蛍光強度変化率をグラフ化したもの。顕著なカルシウム濃度変化がみられた。(C) Bに示した2つのaATENsの各時点における蛍光強度の関係を表した散布図。相関係数は0.478であった。統計処理はピアソンの相関係数を使用した。hpf: hours post fertilization (受精後時間)

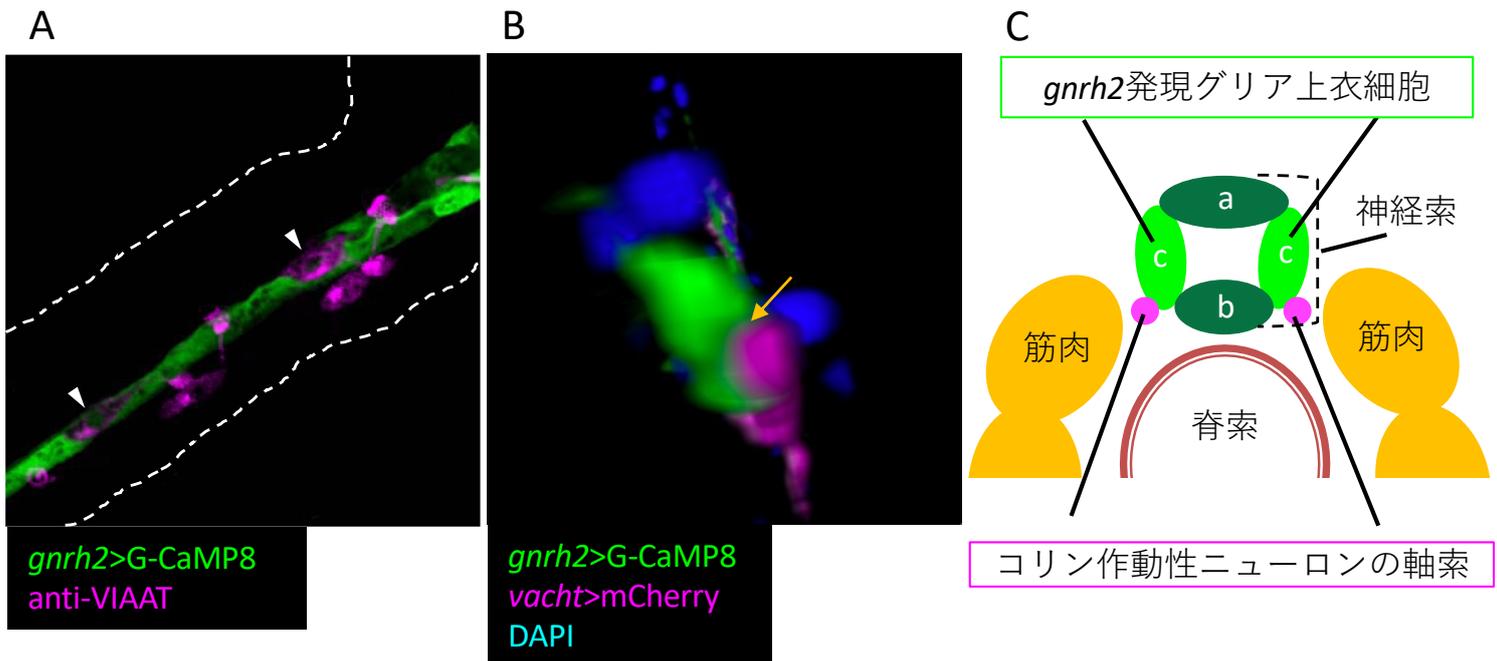


図12. *gnrh2*発現グリア上衣細胞とコリン作動性ニューロンの軸索の位置関係

(A) *gnrh2*発現細胞をレポータータンパク質G-CaMP8（緑）で、GABA/グリシン作動性ニューロンをanti-VIAAT（ACIN、マゼンタ、矢じり）で標識し、二重免疫染色を行った。*gnrh2*はACIN（矢じり）を囲うグリア上衣細胞で発現していた（図5Eと同一）。(B) ホヤ幼生の尾部の二重免疫染色画像を3D構築したものの断面図。G-CaMP8で*gnrh2*発現細胞（緑）を、mCherryで*vacht*発現コリン作動性ニューロン（マゼンタ）を標識し、細胞核をDAPI（青）で可視化した。*gnrh2*発現グリア上衣細胞と、コリン作動性ニューロンの軸索が接触していることが明らかになった（矢印）。(C) ホヤ幼生の尾部の断面の模式図。神経索は4つの細胞から構成されており、蓋板(a)、底板(b)、側壁細胞(c)の3種類が存在する。*gnrh2*は神経索の側壁細胞で主に発現しており、運動神経節から伸長しているコリン作動性ニューロンの軸索と接触している。運動神経節内のコリン作動性ニューロンの軸索は筋肉に投射して尾部運動を制御しているため、*gnrh2*を発現するグリア上衣細胞も尾部運動の制御に関与していることが示唆された。

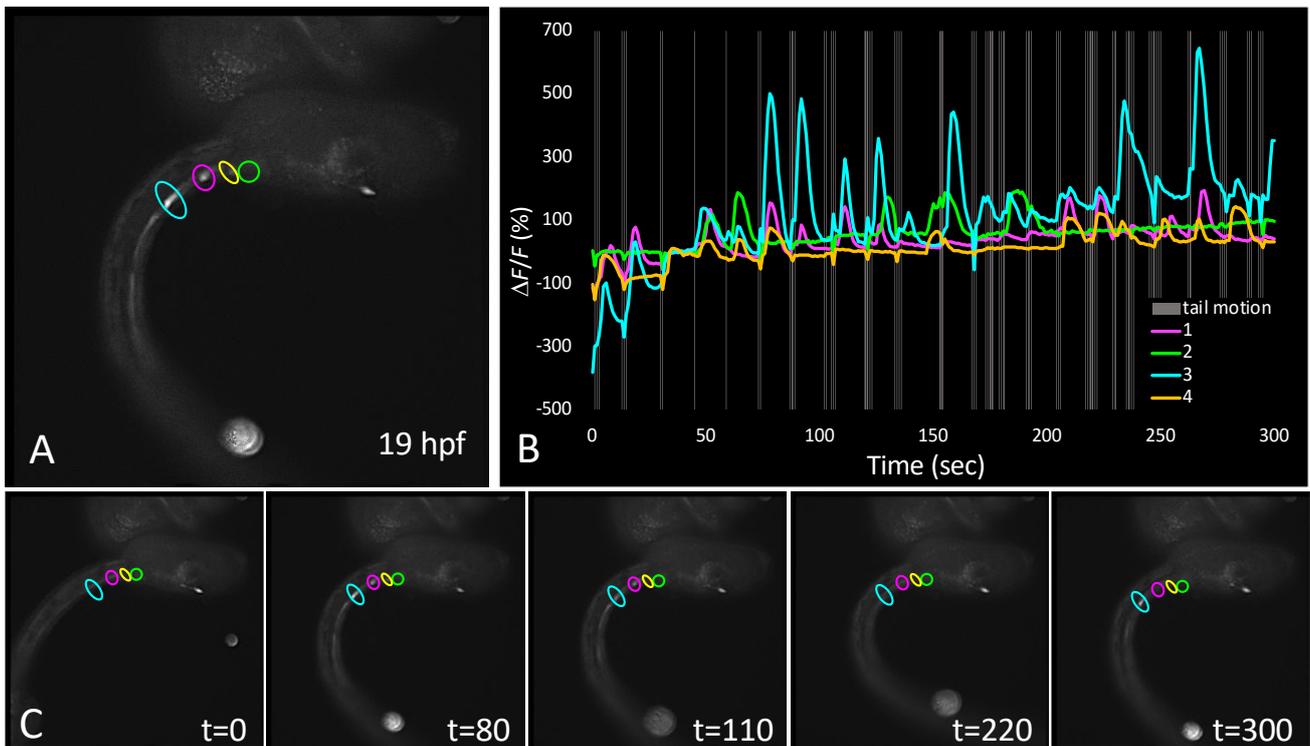


図13. 尾部運動と *gnrh2* 発現細胞の活動の相関性

(A) 遊泳幼生 (19 hpf) のG-CaMP8の蛍光画像。4つの円は *gnrh2* 発現細胞を示す (緑、黄色、マゼンタ、水色)。(B) A内の4つの円で示した領域の蛍光強度変化率をグラフ化したもの。横軸は時間、縦軸は蛍光強度の変化率を示す。グレーの縦線は尾部が動いている時間を示す。尾部が止まっているときに、*gnrh2* 発現細胞内のカルシウム濃度が上昇した。(C) Aのカルシウムイメージング動画の各時点の画像。 hpf: hours post fertilization (受精後時間) ; t: 動画撮影開始からの経過時間。単位は秒。

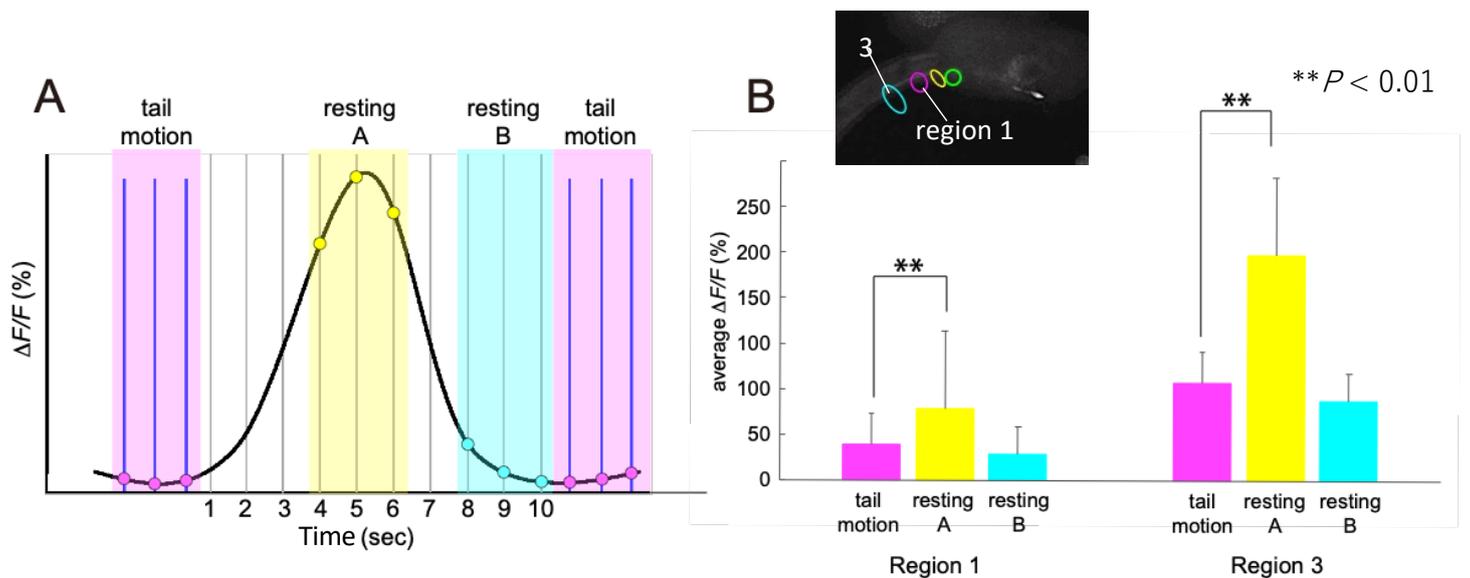


図14. 尾部運動と *gnrh2* 発現細胞のカルシウム濃度変化の関心の定量解析

尾部が運動しているとき (tail motion) の *gnrh2* 発現細胞のG-CaMP8蛍光強度と、尾部が停止しているとき (resting) の蛍光強度を比較し、相関を調べた (tail motion: n=52; resting A, B: n=39)。(A) 尾部が動いているときの蛍光強度 (tail motion、マゼンタ) と、尾部が止まっているときの蛍光強度 (resting A, resting B) を比較した。resting Aは尾部が止まってから4~6秒後までの3秒間を示し (黄色)、resting Bは尾部が動き出す直前の3秒間を示す (水色)。(B) tail motion, resting A, resting Bのそれぞれの蛍光強度の平均値をグラフ化したもの。Region 1とRegion 3は図13 A, Cのマゼンタとシアンの円で示す細胞に相当する。Region 1とRegion 3の両方で、resting Aの蛍光強度平均値がtail motionよりも有意に高かった。resting Bとtail motionでは有意差がなかった。よって、尾部が止まったのちに、*gnrh2* 発現細胞内のカルシウム濃度が上昇し、次に尾部が動く前に低下することが示された。統計解析はStudent t検定を用いた (** $P < 0.01$)。エラーバー: 標準誤差 (SE)

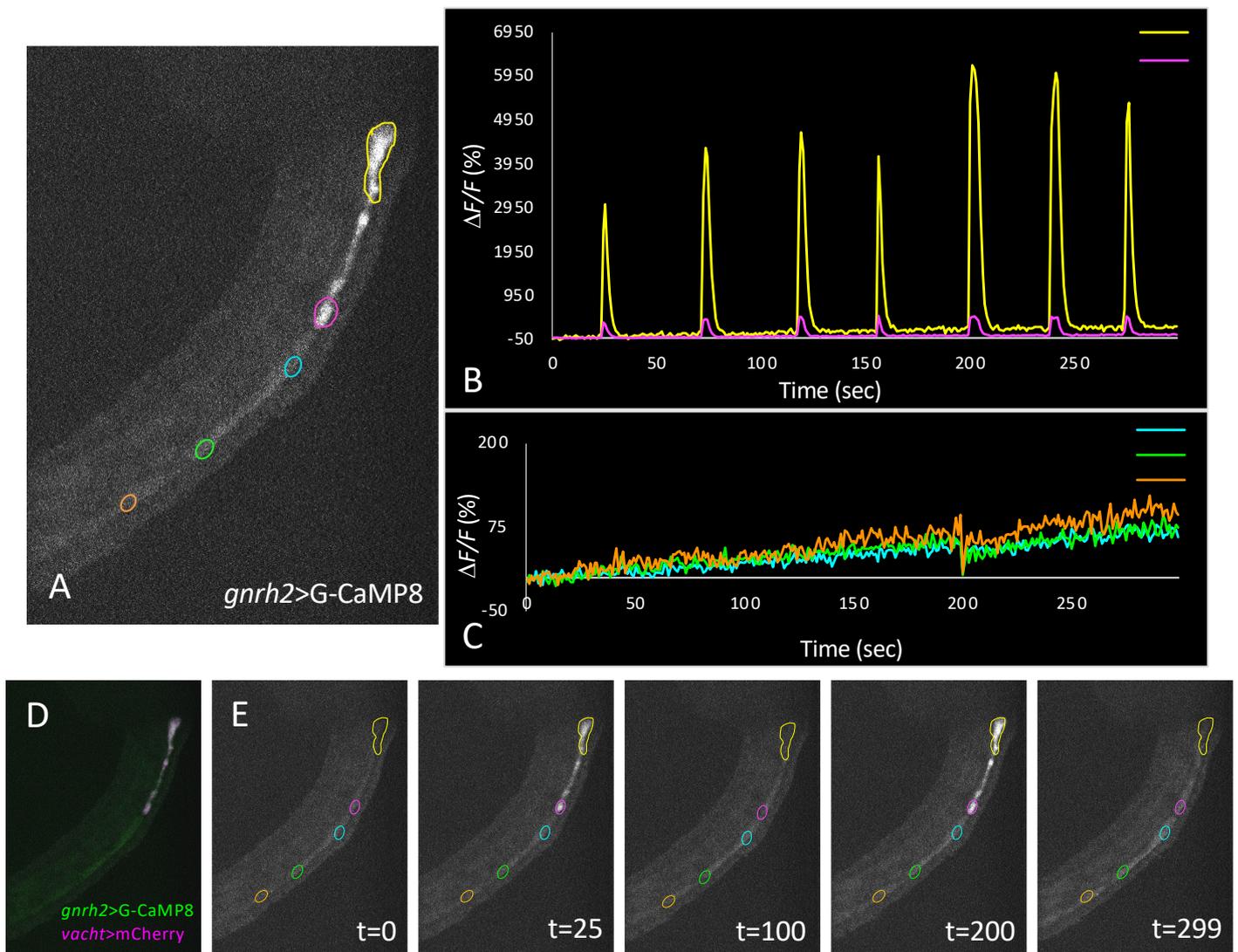


図15. 後期尾芽胚期における *gnrh2* 発現細胞の活動記録

尾部運動が始まる前の発生段階である後期尾芽胚期のホヤ胚（14 hpf）において、カルシウムイメージング法を用いた *gnrh2* 発現細胞の活動記録を行った。(A) 後期尾芽胚期における *gnrh2* 発現細胞の活動記録の例。コリン作動性ニューロン（黄色、マゼンタ）と神経索のグリア上衣細胞（水色、緑、オレンジ）で *gnrh2* が発現していた。(B) コリン作動性ニューロンの細胞体 (A、黄色) とその軸索の先端 (A、マゼンタ) の蛍光強度変化率をグラフ化したもの。 *gnrh2* 発現コリン作動性ニューロンで周期的なカルシウム濃度変化がみられた。(C) グリア上衣細胞 (A、水色、緑、オレンジ) の蛍光強度変化率をグラフ化したもの。 *gnrh2* 発現グリア細胞ではカルシウム濃度変化がみられなかった。(D) Aの個体における *gnrh2*>G-CaMP8 と *vacht*>mCherry の合成画像。(E) Aのカルシウムイメージング動画の各時点の画像。

hpf: hours post fertilization（受精後時間）； t: 動画撮影開始からの経過時間。単位は秒。

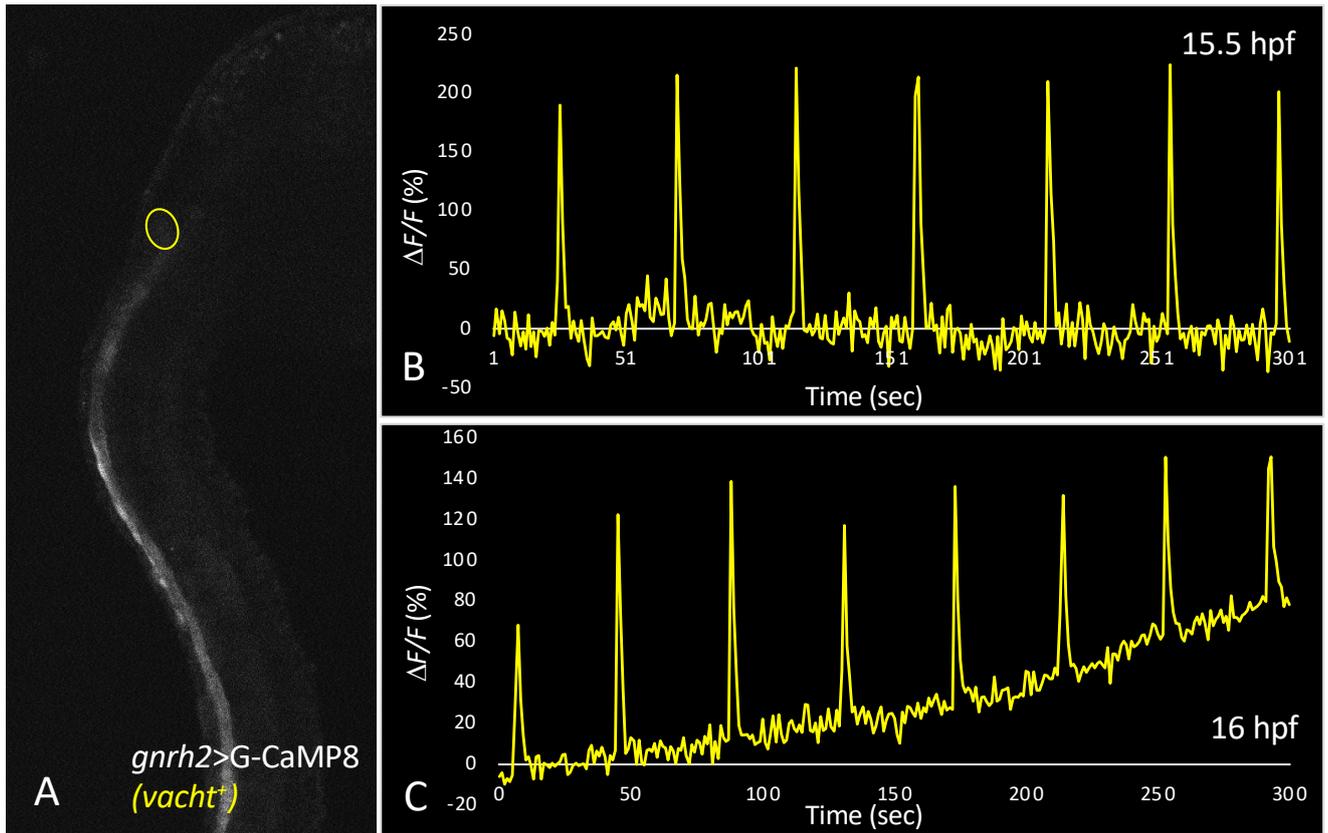


図16. 後期尾芽胚期における *gnrh2* 発現細胞の周期的なカルシウム濃度変化ピークの間隔
 (A) 後期尾芽胚期における *gnrh2* 発現細胞 の蛍光画像。コリン作動性ニューロン (*vacht⁺*、黄色) と神経索のグリア上衣細胞で *gnrh2* が発現していた。(B) 15.5 hpf のホヤ胚における *gnrh2* 発現コリン作動性ニューロン (A、黄色) の蛍光強度変化率をグラフ化したもの。5分間で7回のピークが観測され、ピークの間隔は平均45秒間であった。(C) 16 hpf のホヤ胚における *gnrh2* 発現コリン作動性ニューロン (A、黄色) の蛍光強度変化率をグラフ化したもの。5分間で8回のピークが観測され、ピークの間隔は平均41秒間であった。これらの結果より、発生時間が進むと、カルシウム濃度変化ピークの間隔が狭くなること が示された。hpf: hours post fertilization (受精後時間)

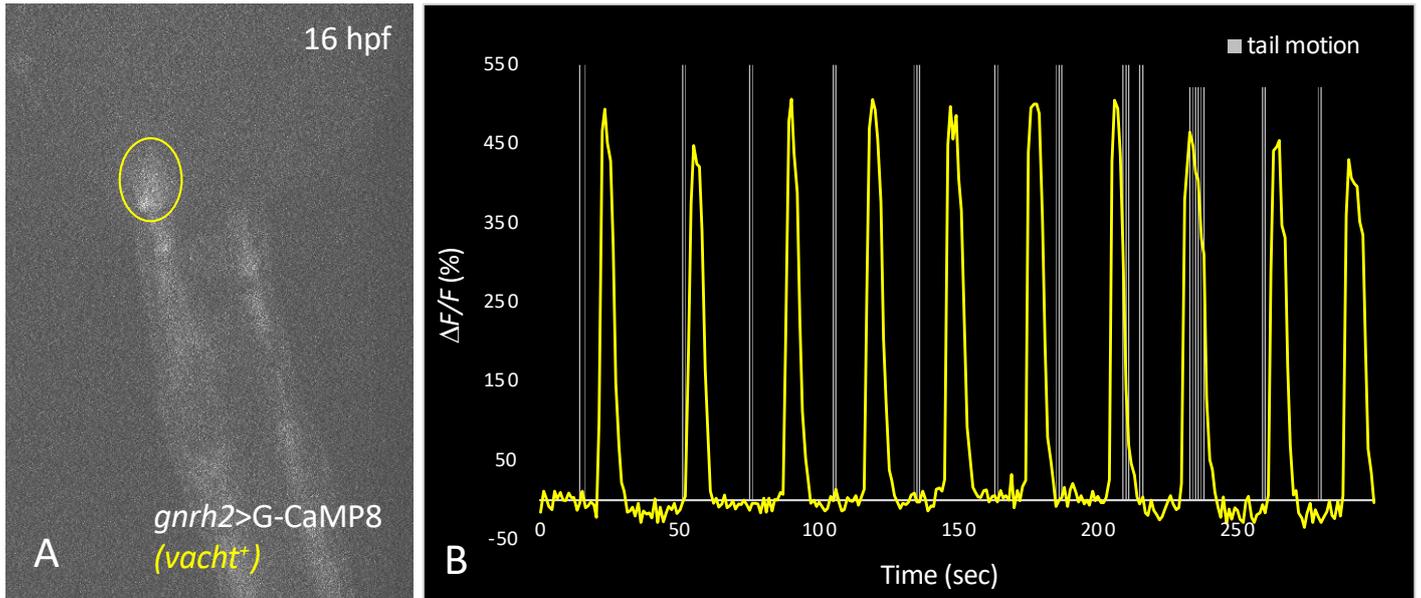


図17. 後期尾芽胚期における *gnrh2* 発現細胞の周期的なカルシウム濃度変化と尾部運動の関係

(A) 16 hpf の後期尾芽胚期における *gnrh2* 発現細胞 の蛍光画像。黄色の円は、*gnrh2* が発現しているコリン作動性ニューロン (*vacht⁺*) を示す。(B) *gnrh2* 発現 コリン作動性ニューロン (A、黄色) の蛍光強度変化率をグラフ化したもの。グレーの縦線は尾部が動いている時間を示す。周期的なカルシウム濃度変化がみられ、ピークとピークの間で尾部運動がみられた。hpf: hours post fertilization (受精後時間)

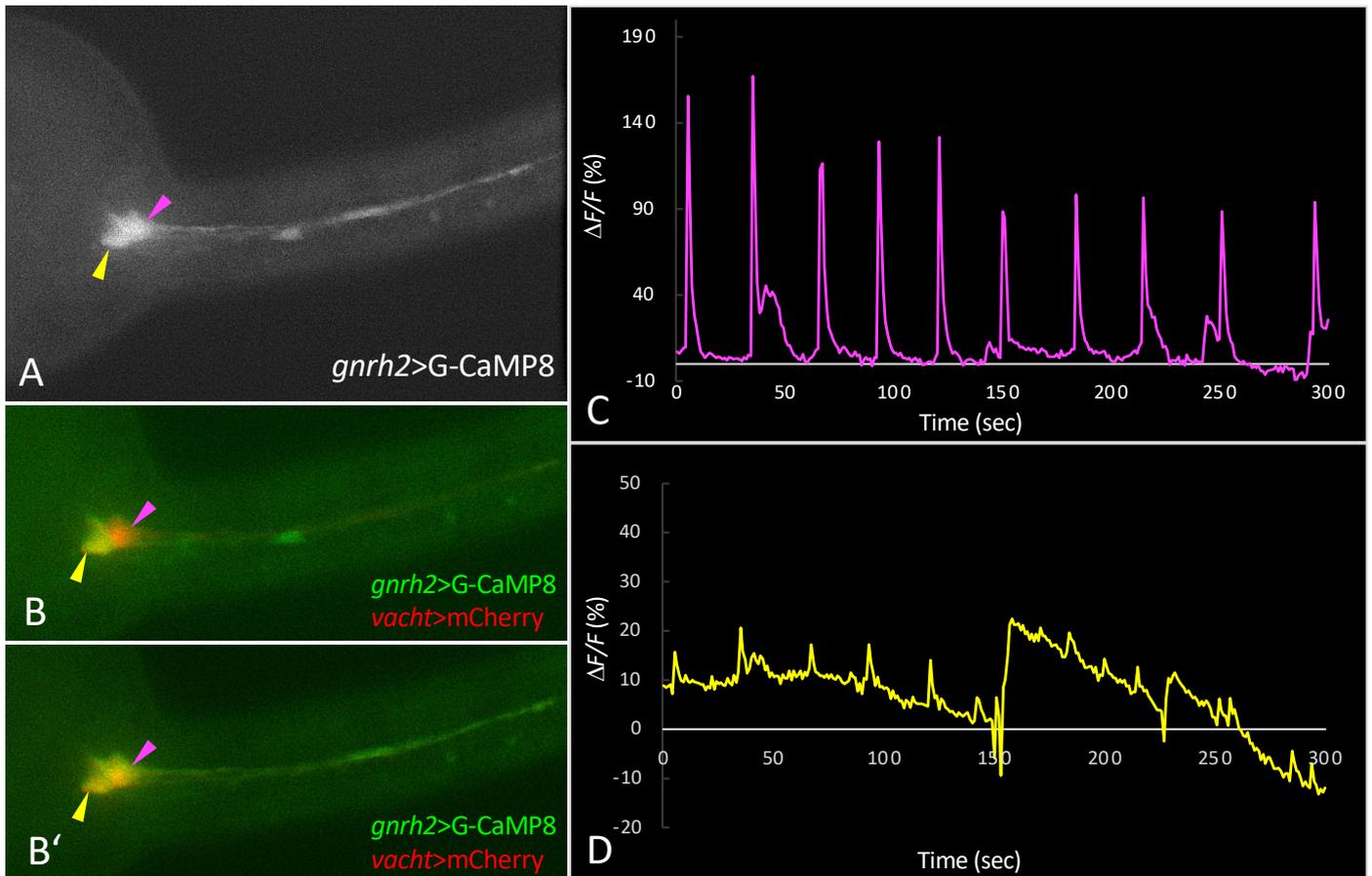


図18. 周期的なカルシウム濃度変化がみられる細胞種の同定1

(A) *gnrh2>G-CaMP8*と *vacht>mCherry*コンストラクトの両方をホヤ胚に導入し、カルシウムイメージングを行った (16 hpf、後期尾芽胚期)。画像の左側が胚の前方である。(B, B') *gnrh2>G-CaMP8* (緑) と *vacht>mCherry* (赤) の統合画像。矢じりで示した2つの細胞は、*vacht*陽性コリン作動性ニューロンである (黄色、マゼンタ)。黄色矢じりで示した細胞は蛍光強度がほぼ変化しなかったが、マゼンタ矢じりで示した細胞はカルシウム濃度変化がみられた。位置や細胞形態より、黄色矢じりは *vsx/pitx*陽性細胞、マゼンタ矢じりは *islet*陽性細胞であると考えられる。(C) Aのマゼンタ矢じりで示した細胞の蛍光強度変化率をグラフ化したもの。周期的なカルシウム濃度変化がみられた。(D) Aの黄色矢じりで示した細胞の蛍光強度変化率をグラフ化したもの。カルシウム濃度の変化はほぼなかった。 hpf: hours post fertilization (受精後時間)

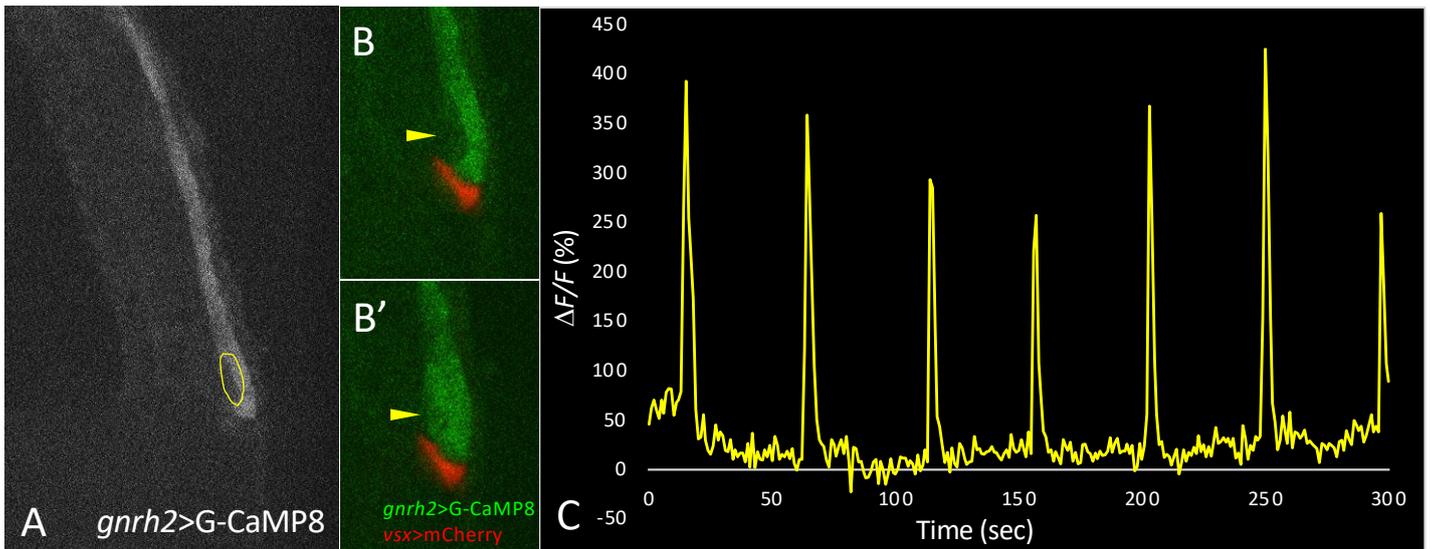


図19. 周期的なカルシウム濃度変化がみられる細胞種の同定2

(A) *gnrh2>G-CaMP8*と *vsx>mCherry* コンストラクトの両方をホヤ胚に導入し、カルシウムイメージングを行った (15 hpf、後期尾芽胚期)。黄色の円は周期的なカルシウム濃度変化がみられた細胞を示す。(B, B') *gnrh2>G-CaMP8* (緑) と *vsx>mCherry* (赤) のマージ画像。周期的なカルシウム応答がみられた細胞 (矢じり) では *vsx* は発現していなかった。(C) Aの黄色で示した細胞の蛍光強度変化率をグラフ化したもの。周期的なカルシウム濃度変化がみられた。 hpf: hours post fertilization (受精後時間)

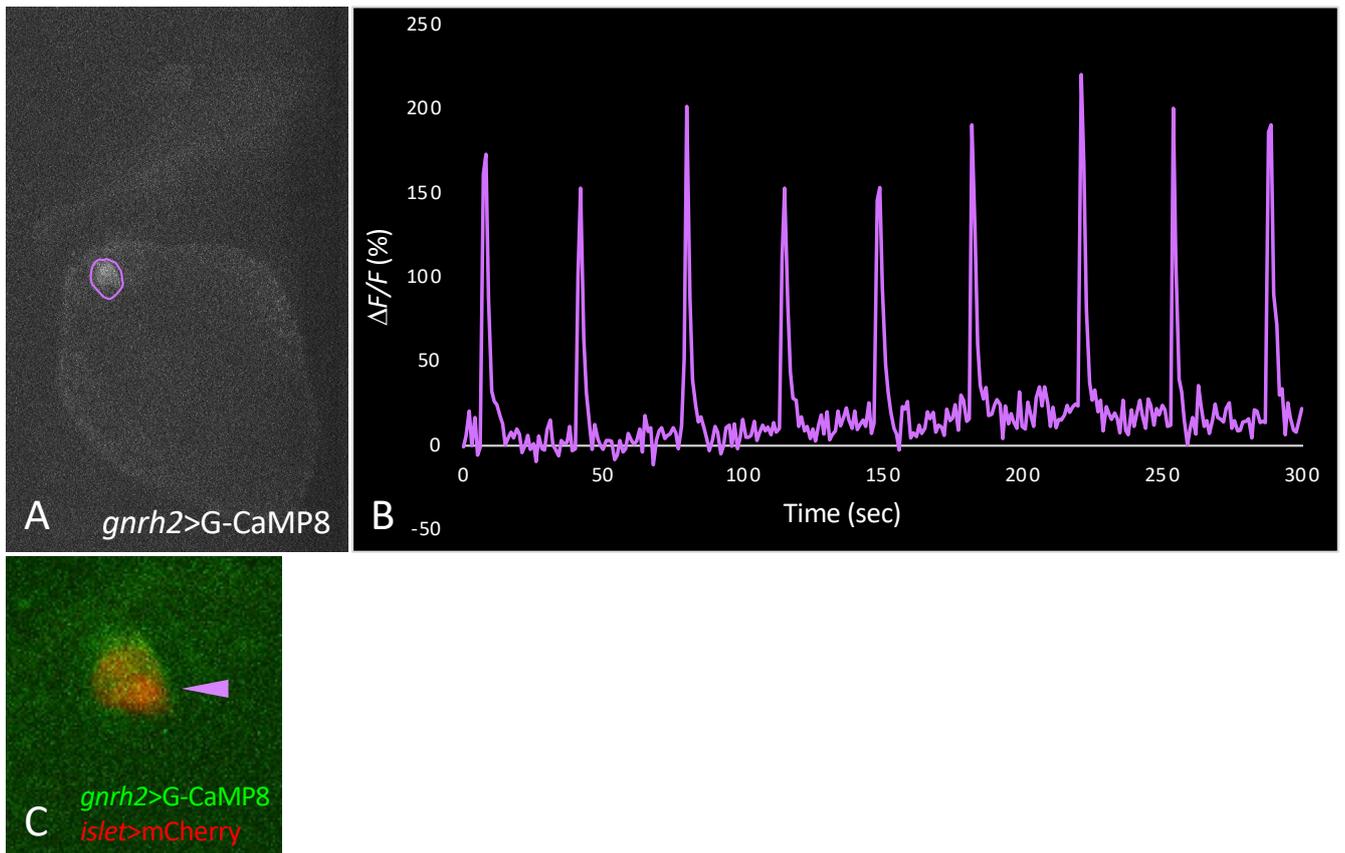


図20. 周期的なカルシウム濃度変化がみられる細胞種の同定3

(A) *gnrh2>G-CaMP8*と*islet>mCherry*コンストラクトの両方をホヤ胚に導入し、カルシウムイメージングを行った（15 hpf、後期尾芽胚期）。(B) Aの紫色で示した細胞の蛍光強度変化率をグラフ化したもの。周期的なカルシウム濃度変化がみられた。(C) *gnrh2>G-CaMP8*（緑）*islet>mCherry*（赤）の統合画像。周期的なカルシウム応答がみられた細胞（矢じり）で*islet*が発現していることが示された。これらの結果から、運動神経節内で周期的なカルシウム濃度変化を示す細胞は、*islet*陽性細胞であることが示唆された。hpf: hours post fertilization（受精後時間）

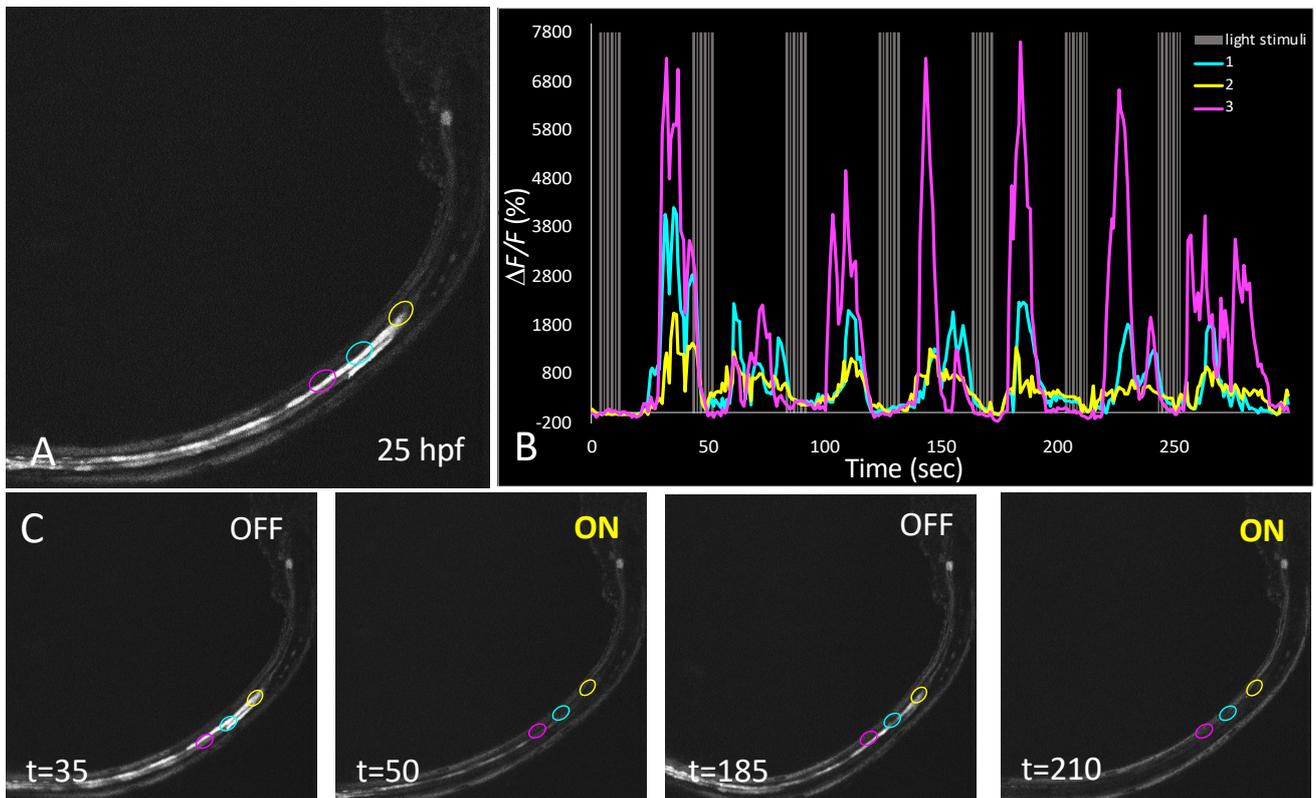


図21. 光に対する尾部運動と *gnrh2*発現細胞の活動

ホヤ幼生の光受容器である眼点に光を照射しながら *gnrh2*発現細胞の活動を記録した。(A) 25 hpfのホヤ幼生の眼点に30秒間隔で10秒間ずつ455 nmの光を照射したときの、*gnrh2*発現細胞のカルシウムイメージング。3つの円は *gnrh2*発現細胞を示す（黄色、水色、マゼンタ）。(B) A内の3つの円で示した領域の蛍光強度変化率をグラフ化したもの。横軸は時間、縦軸は蛍光強度の変化率を示す。グレーの縦線は、眼点に光を照射しているときの時間を示す。眼点に光を照射しているときはカルシウム濃度変化が抑制され、光刺激が消えた後に上昇した。(C) Aのカルシウムイメージング動画の各時点の画像。眼点への光刺激がONまたはOFFであることを右上に示す。 hpf: hours post fertilization (受精後時間) ; t: 動画撮影開始からの経過時間。単位は秒。

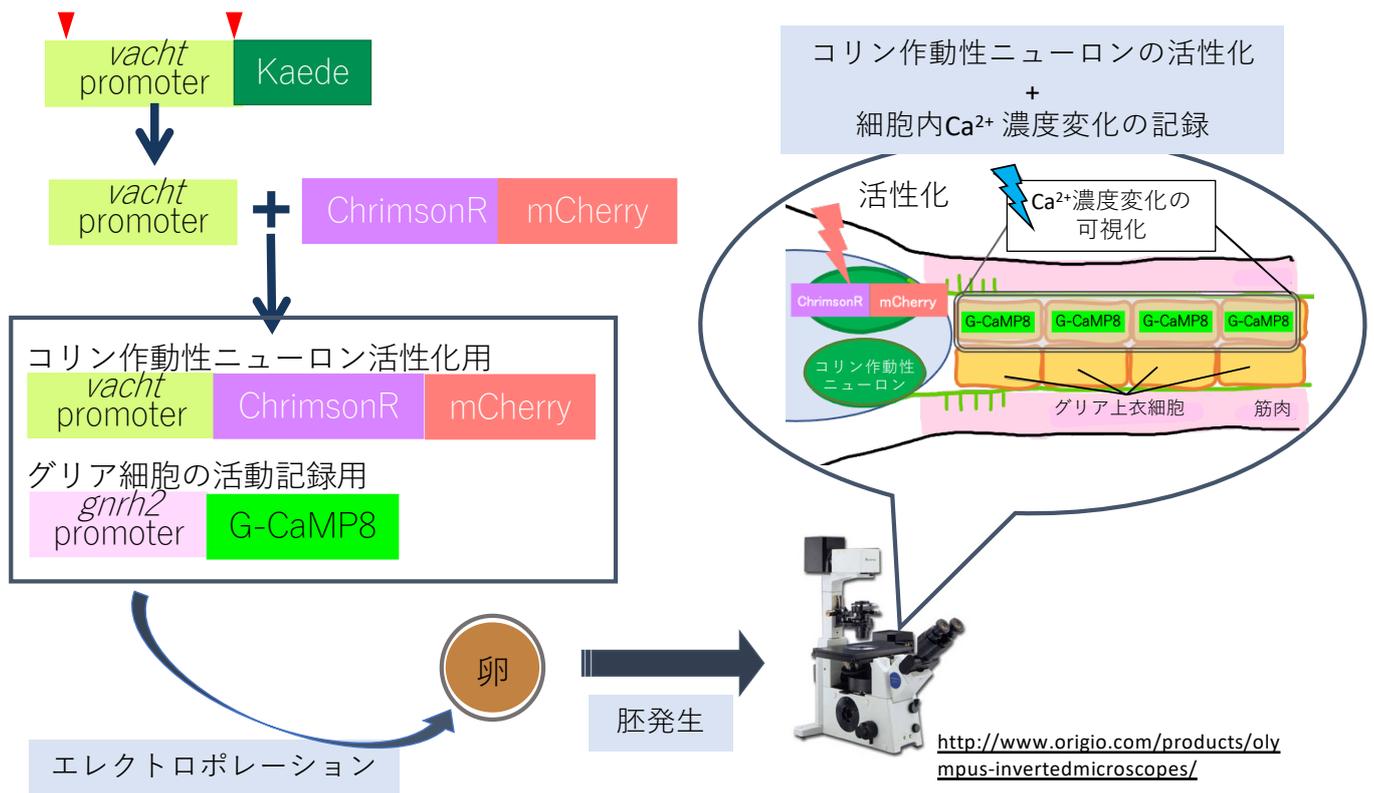


図22. ホヤ幼生を用いた光遺伝学とカルシウムイメージングの併用

コリン作動性ニューロンで発現することがわかっている *vacht*>Kaede コンストラクトから *vacht* プロモーター配列を切り出し、クリムゾンRと mCherry をコードした配列につなぎ、 *vacht*>ChrimsonR:mCherry コンストラクトを作製した。コンストラクト作製方法や使用した制限酵素などの詳細については材料と方法に記載する。コリン作動性ニューロンを活性化させるための *vacht*>ChrimsonR:mCherry とグリア細胞の活動を記録するための *gnrh2*>G-CaMP8 コンストラクトの両方をエレクトロポレーションによりホヤ卵に導入し、幼生期まで発生させた。クリムゾンRを発現している運動神経節内のコリン作動性ニューロンに適当な間隔で640 nmの赤色光を照射しながら、G-CaMP8の励起光である475 nmの青色光を幼生全体に照射し、尾部神経索の *gnrh2* 発現グリア細胞の活動を記録した。

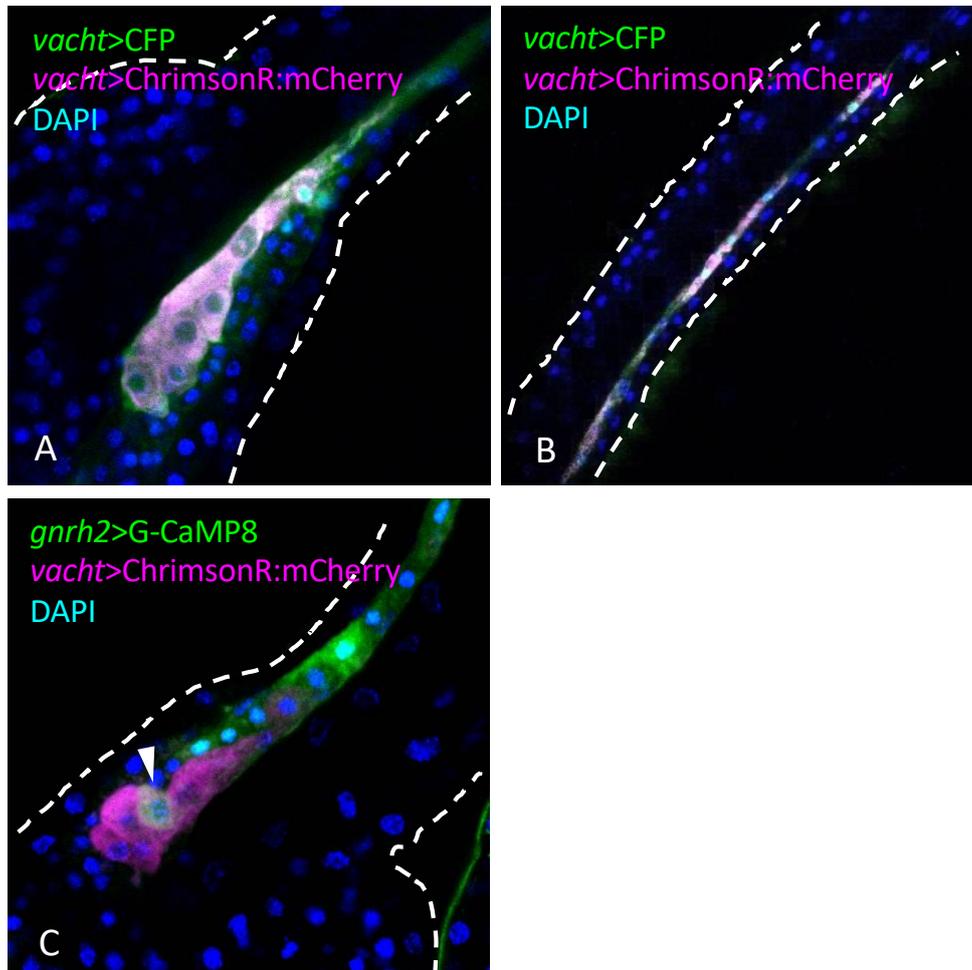


図23. 運動神経節のコリン作動性ニューロンで光活性化タンパク質クリムゾンRを発現させる

(A, B) *vacht*>CFP (緑) と *vacht*>ChrimsonR:mCherry (マゼンタ) コンストラクトの両方を導入したホヤ幼生 (21 hpf) の二重免疫染色の結果。また、細胞核をDAPI (青) で可視化した。運動神経節内の5つのコリン作動性ニューロンがChrimsonR:mCherryで標識された (A)。尾部に伸長しているコリン作動性ニューロンの軸索でもChrimsonR:mCherryが発現していた (B)。(C) *gnrh2*>G-CaMP8 (緑) と *vacht*>ChrimsonR:mCherry (赤) の発現パターンの比較。また、細胞核をDAPI (青) で可視化した。*vacht*陽性ニューロンのひとつで*gnrh2*が発現していた (矢じり)。これは、前述の結果と一致する (図6A、図8A, B)。hpf: hours post fertilization (受精後時間)

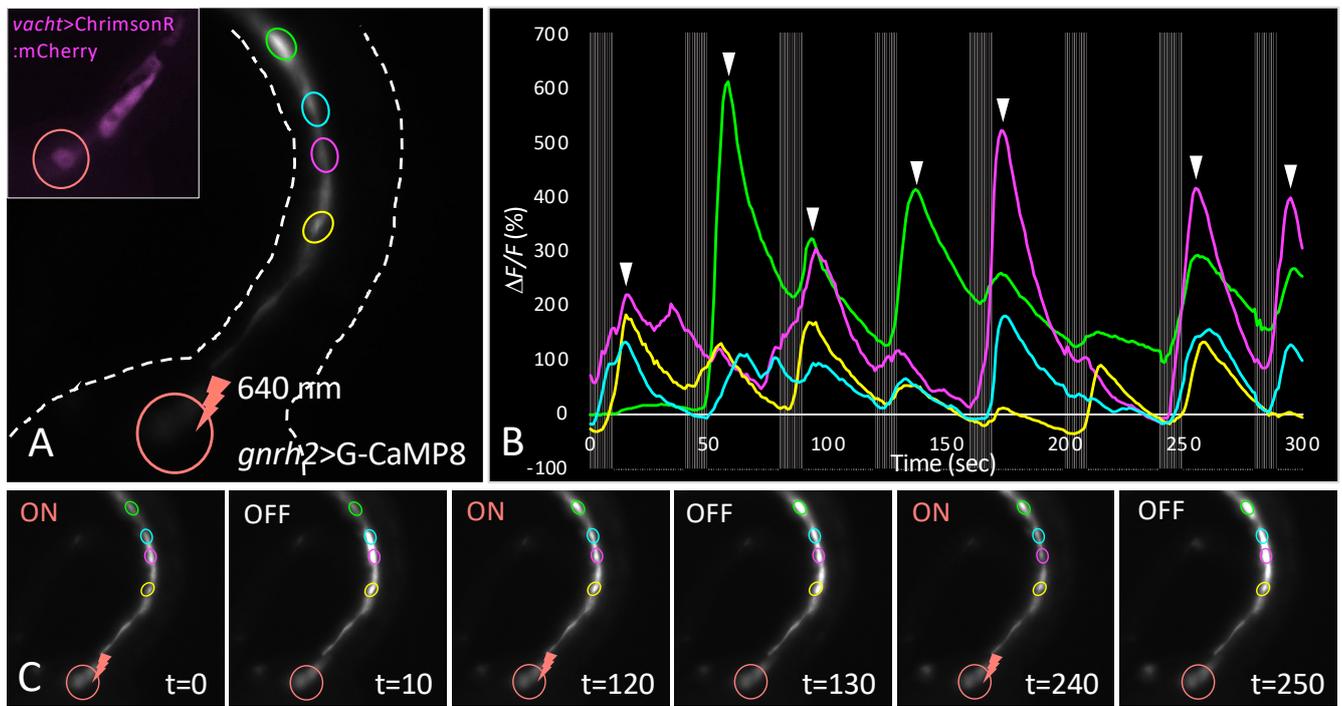


図24. 運動神経節のコリン作動性ニューロンを活性化させたときの尾部神経索グリア上衣細胞の活動記録1

クリムゾンR発現コリン作動性ニューロンに一定の間隔で赤色光を照射しながら、*gnrh2*発現グリア上衣細胞のカルシウムイメージングを行った。(A) 19.5 hpfのホヤ幼生のカルシウムイメージング画像。4つの円で示した領域はカルシウム濃度変化がみられた尾部神経索グリア上衣細胞を示す(黄色、マゼンタ、水色、緑)。クリムゾンRを発現するコリン作動性ニューロン(赤色円)に640 nmの赤色光を30秒間隔で10秒間ずつ照射した。左上の図は、運動神経節の拡大図で、*vacht*>ChrimsonR:mCherryの蛍光を示す(マゼンタ)。(B) Aに示した4つの蛍光強度変化をグラフ化したもの。グラフ内の色はAの円の色に対応している。横軸は時間、縦軸は蛍光強度の変化率を示す。グレーの縦線は、クリムゾンR発現コリン作動性ニューロン(A、赤色円)に赤色光を照射している時間を示す。赤色光を照射したとき、グリア細胞内のカルシウム濃度が上昇し始め、刺激光が消えたあとにピークが観察された(矢じり)。(C) Aのカルシウムイメージング動画の時間ごとの画像。左上に、クリムゾンR発現コリン作動性ニューロンへの赤色光のONまたはOFFを示す。hpf: hours post fertilization (受精後時間); t: 動画撮影開始からの経過時間。単位は秒。

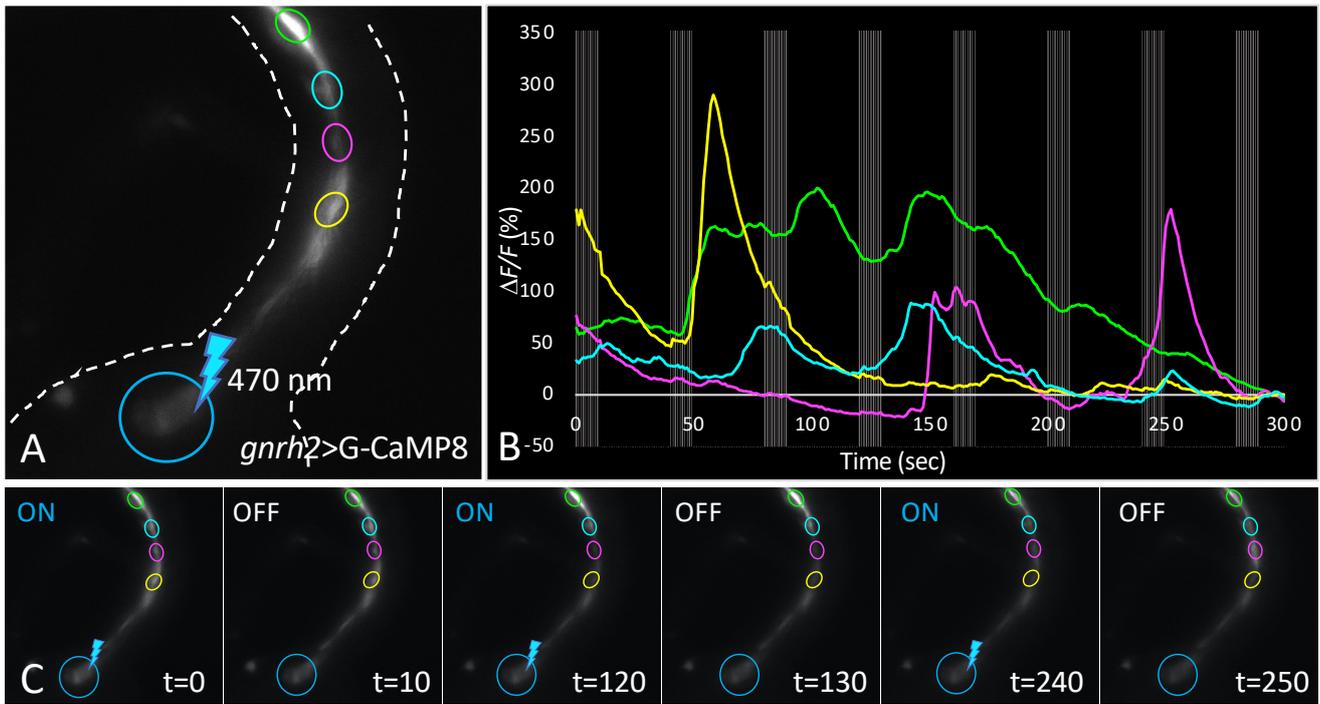


図25. 運動神経節のコリン作動性ニューロンを活性化させたときの尾部神経索グリア上衣細胞の活動記録2

コントロールサンプルとして、クリムゾンR発現コリン作動性ニューロンに一定の間隔で青色光を照射しながら、*gnrh2*発現グリア細胞のカルシウムイメージングを行った。(A) 図24と同じ個体である19.5 hpfのホヤ幼生のカルシウムイメージング画像。4つの円で示したグリア細胞は図24と同じものである(黄色、マゼンタ、水色、緑)。クリムゾンRを発現するコリン作動性ニューロン(青色円)に470 nmの青色光を30秒間隔で10秒間ずつ照射した。(B) Aに示した4つの蛍光強度変化をグラフ化したもの。グラフ内の色はAの円の色に対応している。グレーの縦線は、クリムゾンR発現コリン作動性ニューロン(A、青色円)に青色光を照射している時間を示す。青色光の照射とグリア細胞内のカルシウム濃度変化に関連はみられなかった。(C) Aのカルシウムイメージング動画の時間ごとの画像。左上に、クリムゾンR発現コリン作動性ニューロンへの青色光のONまたはOFFを示す。hpf: hours post fertilization (受精後時間); t: 動画撮影開始からの経過時間。単位は秒。

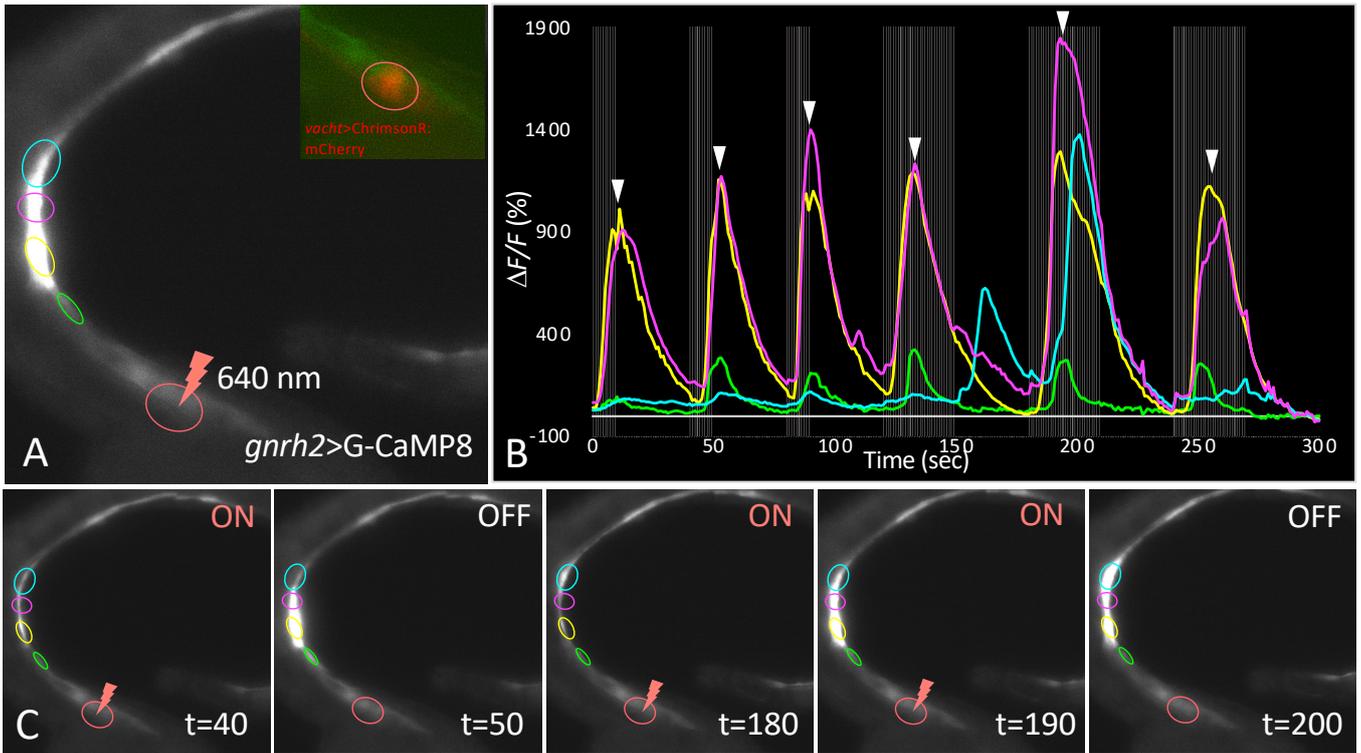


図26. 運動神経節のコリン作動性ニューロンを活性化させたときの尾部神経索グリア上衣細胞の活動記録3

クリムゾンR発現コリン作動性ニューロンに照射する赤色光の照射パターンを変化させ、*gnrh2*発現グリア細胞のカルシウムイメージングを行った。(A) 19.5 hpfのホヤ幼生のカルシウムイメージング画像。4つの円で示した領域はカルシウム濃度変化がみられた尾部神経索グリア上衣細胞を示す(緑、黄色、マゼンタ、水色)。クリムゾンRを発現するコリン作動性ニューロン(赤色円)に640 nmの赤色光を、最初の3回は30秒間隔で10秒間ずつ、次の3回は30秒間隔で30秒間ずつ照射した。右上の図は、運動神経節の拡大図で、*vacht*>ChrimsonR:mCherry(赤)と*gnrh2*>G-CaMP8(緑)の統合画像。(B) Aに示した4つの蛍光強度変化をグラフ化したもの。グラフ内の色はAの円の色に対応している。横軸は時間、縦軸は蛍光強度の変化率を示す。グレーの縦線は、クリムゾンR発現コリン作動性ニューロン(A、赤色円)に赤色光を照射している時間を示す。赤色光の照射パターンにかかわらず、グリア細胞内のカルシウム濃度はコリン作動性ニューロンを刺激して3~5秒後に上昇し始め、13~15秒後にピークに到達し、その後減少した(矢じり)。(C) Aのカルシウムイメージング動画の時間ごとの画像。右上に、クリムゾンR発現コリン作動性ニューロンへの赤色光のONまたはOFFを示す。hpf: hours post fertilization(受精後時間); t: 動画撮影開始からの経過時間。単位は秒。

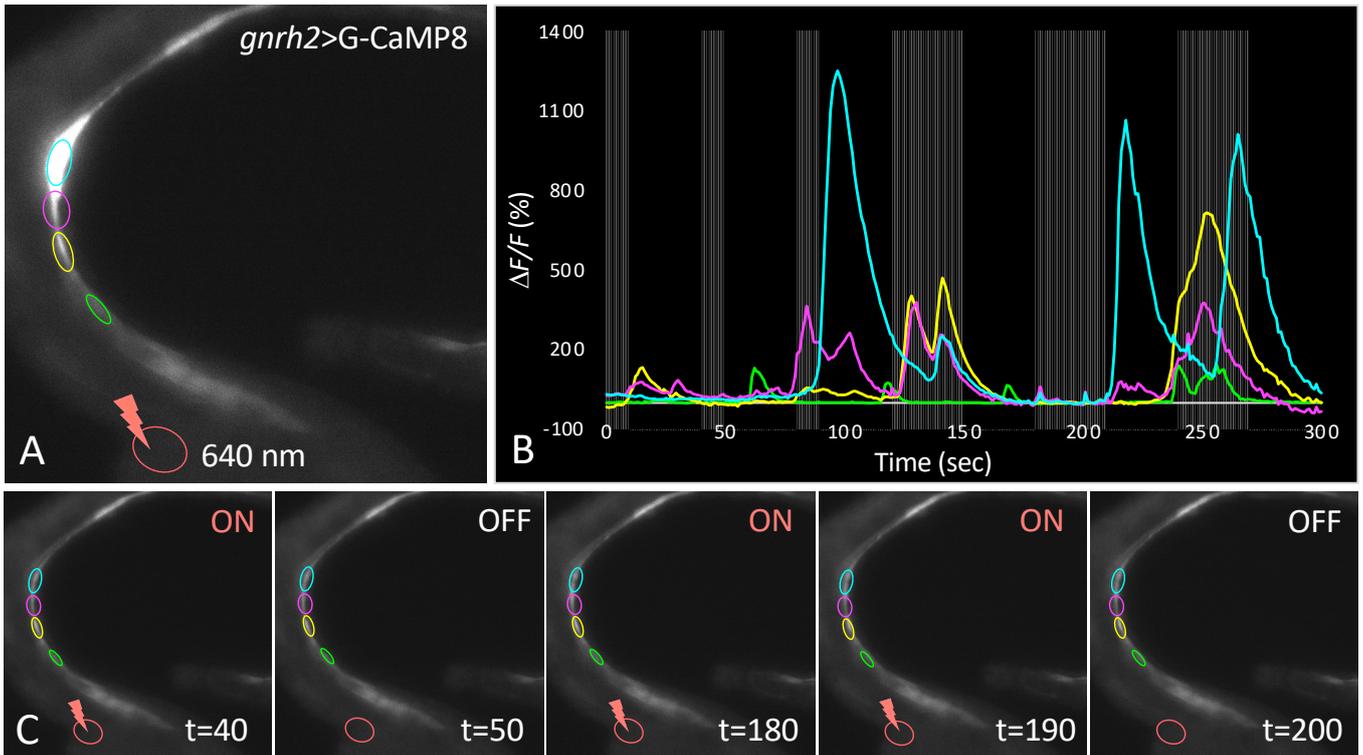
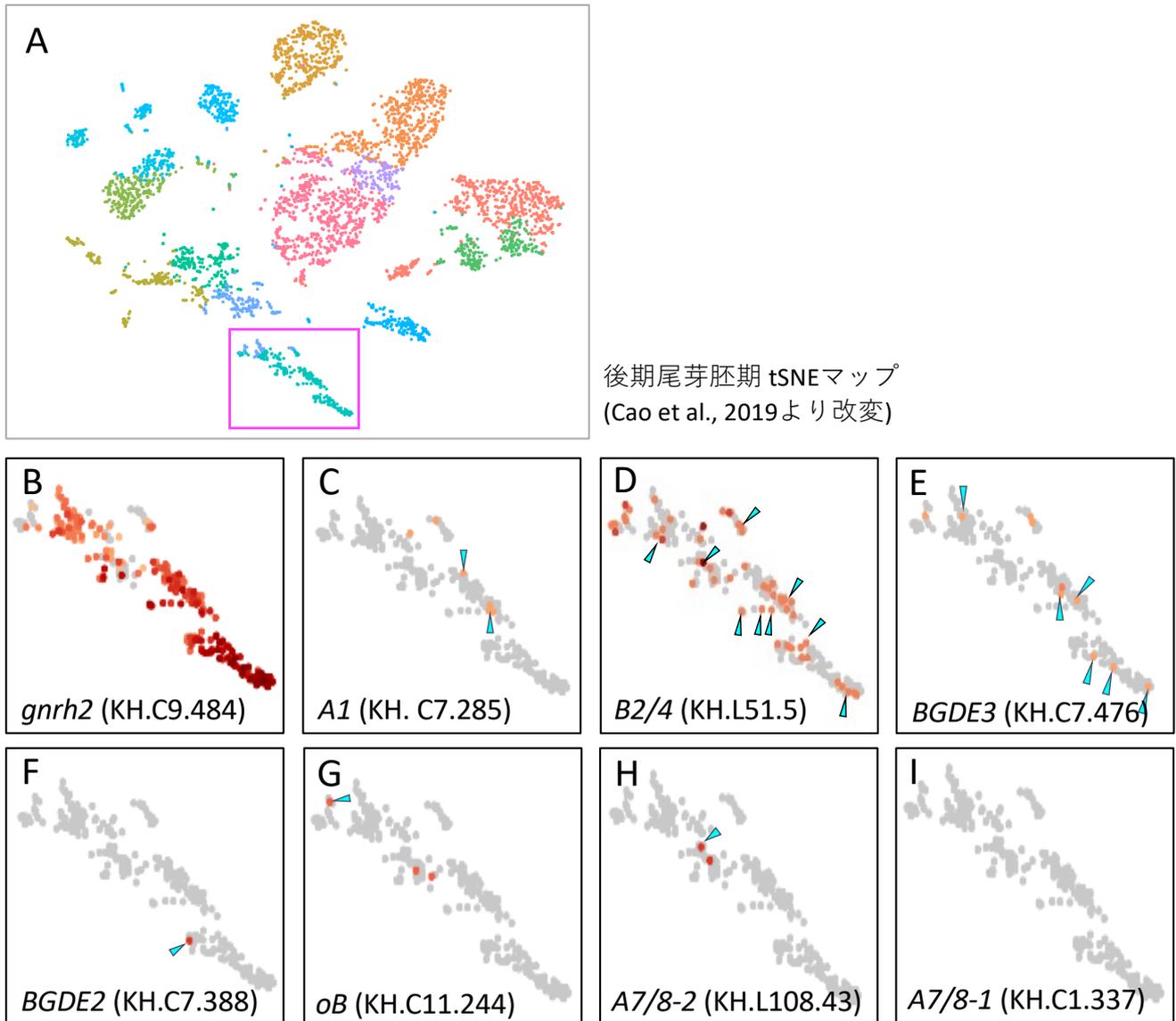


図27. 運動神経節のコリン作動性ニューロンを活性化させたときの尾部神経索グリア上衣細胞の活動記録4

コントロールサンプルとして、クリムゾンRを発現していない体幹部に赤色光を照射しながら、*gnrh2*発現グリア細胞のカルシウムイメージングを行った。(A) 図26と同じ個体である19.5 hpfのホヤ幼生のカルシウムイメージング画像。4つの円で示したグリア細胞は図26と同じものである(緑、黄色、マゼンタ、水色)。クリムゾンRを発現していない体幹部(赤色円)に640 nmの赤色光を、最初の3回は30秒間隔で10秒間ずつ、次の3回は30秒間隔で30秒間ずつ照射した。(B) Aに示した4つの蛍光強度変化をグラフ化したもの。グラフ内の色はAの円の色に対応している。横軸は時間、縦軸は蛍光強度の変化率を示す。グレーの縦線は、体幹部(A、赤色円)に赤色光を照射している時間を示す。赤色光の照射パターンにかかわらず、グリア細胞内のカルシウム濃度変化との顕著な関連性はみられなかった。(C) Aのカルシウムイメージング動画の時間ごとの画像。右上に、体幹部への赤色光のONまたはOFFを示す。hpf: hours post fertilization (受精後時間); t: 動画撮影開始からの経過時間。単位は秒。



後期尾芽胚期 tSNEマップ
(Cao et al., 2019より改変)

図28. 尾部神経索グリア上衣細胞で発現しているアセチルコリン受容体サブユニット遺伝子の探索

トランスクリプトーム解析を用いて、*gnrh2*を発現する尾部神経索のグリア上衣細胞でニコチン性アセチルコリン受容体 (nAChR) サブユニット遺伝子が発現しているかを調べた。(A)後期尾芽胚期のトランスクリプトームtSNEマップ (Cao et al., 2019)。マゼンタの四角は神経索のグリア上衣細胞のクラスターを示す。(B-I) Aのマゼンタで囲ったクラスターの拡大図。各種遺伝子の発現パターンを示す。グレーの細胞は目的の遺伝子が発現していないことを示し、赤くなるほど相対的に発現が強いことを示す。(B) *gnrh2*の発現パターン。神経索で強く発現している。(C-I)カタユウレイボヤ胚でこれまでに同定されたnAChR遺伝子の発現パターン。水色の矢じりは、*gnrh2*も発現する細胞を示す。*A7/8-1* (I)を除く、6種類のnAChR遺伝子が神経索の細胞で発現しており、*gnrh2*陽性グリア細胞でも発現していることが示された (C-H、水色の矢じり)。

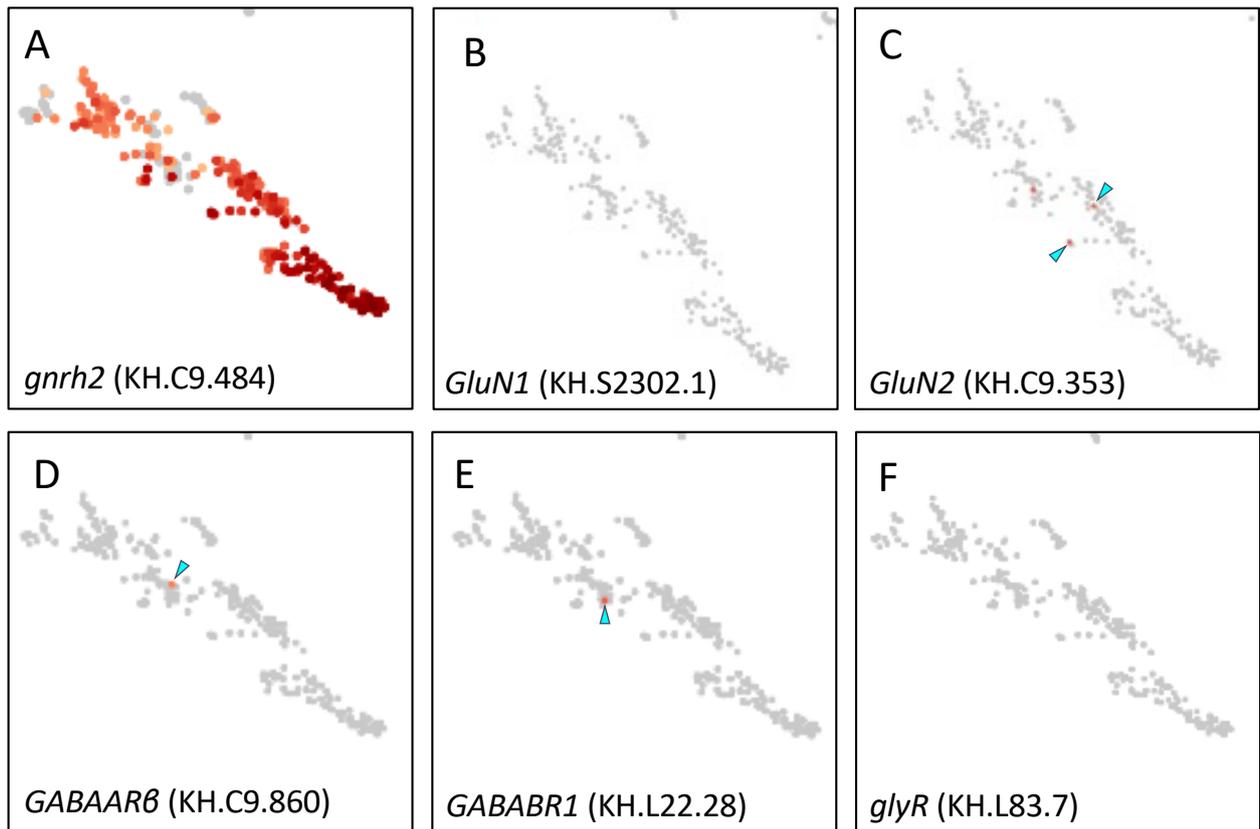
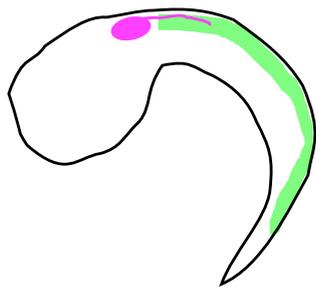


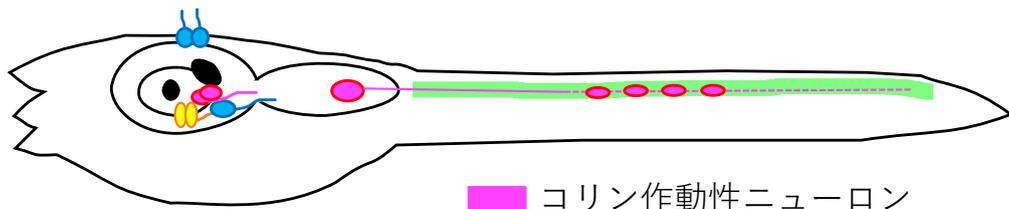
図29. 尾部神経索グリア上衣細胞で発現している神経伝達物質受容体遺伝子の探索
 トランスクリプトーム解析を用いて、*gnrh2*を発現する尾部神経索のグリア上衣細胞で神経伝達物質受容体遺伝子が発現しているかを調べた。tSNEマップは図28と同様のものである。(A) *gnrh2*の発現パターン。(B) NMDA型グルタミン酸受容体をコードする *GluN1* 遺伝子の発現パターン。シグナルは検出されなかった。(C) NMDA型グルタミン酸受容体をコードする *GluN2* 遺伝子の発現パターン。神経索で発現がみられ、*gnrh2*発現細胞でもシグナルが検出された(矢じり)。(D) GABA_A受容体をコードする *GABAARβ* 遺伝子の発現パターン。*gnrh2*発現細胞で発現していることが示された(矢じり)。(E) GABA_B受容体をコードする *GABABR1* 遺伝子の発現パターン。*gnrh2*発現細胞で発現していることが示された(矢じり)。(F) グリシン受容体をコードする *glyR* 遺伝子の発現パターン。シグナルは検出されなかった。

A

尾芽胚



幼生



- コリン作動性ニューロン
- グルタミン酸作動性ニューロン
- ドーパミン産生細胞
- グリア上衣細胞

B 尾芽胚

部位	細胞種	特徴
運動神経節	コリン作動性ニューロン	<i>islet</i> 陽性細胞。 周期的なCa ²⁺ 応答を示し、神経回路の発生や成熟に関与している可能性がある。
神経索	グリア上衣細胞	細胞内Ca ²⁺ 濃度変化を示さない。

C 幼生

部位	細胞種	特徴
脳胞	コリン作動性ニューロン グルタミン酸作動性ニューロン ドーパミン産生細胞	光や重力に対する遊泳行動制御に関与している可能性がある。
表皮	グルタミン酸作動性ニューロン	推定化学感覚ニューロン (aATENs)。 Ca ²⁺ 応答を示す。
運動神経節	コリン作動性ニューロン	<i>vsx/pitx</i> 陽性細胞。
神経索	コリン作動性ニューロン	中部から後方にかけての尾部筋肉の収縮を制御している可能性がある。
	グリア上衣細胞	尾部運動や光受容に連動したCa ²⁺ 応答を示す。 神経伝達物質受容体を発現する。 運動神経節のコリン作動性ニューロンからの入力を受けている可能性がある。

図30. カタユレイボヤにおける *gnrh2*発現細胞の分布と特徴

(A)後期尾芽胚期と幼生期における *gnrh2*発現細胞の細胞種と分布をまとめた模式図。幼生の *gnrh2*発現コリン作動性ニューロンの軸索はどこまで伸びているか不明であるため、後方は点線で示した。(B)尾芽胚における *gnrh2*発現細胞の分布、細胞種、特徴をまとめた表。(C) 幼生における *gnrh2*発現細胞の分布、細胞種、特徴をまとめた表。

表1. 本研究で使用したDNAコンストラクトと作製に用いた制限酵素とプライマー一覧

コンストラクト	制限酵素	コンストラクト作製に使用したPCRプライマー (5'-3')
pSP- <i>gnrh2</i> >G-CaMP8	<i>Bam</i> HI <i>Not</i> I	F-GAATCGGCCAACGCGGGATCCAGGAGCAGACGTCATAAGTA R-TGACGCGGCCGCTGTTACGTTATCTCTCTAGAAG
pSP- <i>gnrh2</i> >mCherry	<i>Xho</i> I <i>Not</i> I	-
pSP- <i>vacht</i> >CFP (Horie et al., 2011)	<i>Sal</i> I <i>Bam</i> HI	-
pSP- <i>vacht</i> >mCherry	<i>Sal</i> I <i>Not</i> I	-
pSP- <i>fer2</i> >mCherry	<i>Not</i> I <i>Eco</i> RI	-
pSP-bpFOG>mCherry (Shimai, 未発表)	<i>Bam</i> HI <i>Not</i> I	F-AGGAGGATCCCTCAAAATTCAGGAAACGGTCC R-CCATCGGCGGCCACATTATGTGTGTTATTTTTGTATAGACC
pSP- <i>dmbx</i> -bpFOG>mCherry (Shimai, 未発表)	<i>Xho</i> I <i>Bam</i> HI	F-CATCTCGAGCACTCATCTGCCTACATTAGC R-CCATGGATCCAGTACTATGACGTTACAATCCTTATTG
pSP- <i>nk6</i> -bpFOG>mCherry (Shimai, 未発表)	<i>Xho</i> I <i>Bam</i> HI	F-CATCTCGAGTCGCAAAAATGCGCCGACAAG R-CATGGATCCTGGAACCAAACCTACCAATGG
pSP- <i>islet</i> -bpFOG>mCherry (Shimai, 未発表)	<i>Xho</i> I <i>Bam</i> HI	F-CATCTCGAGCAAGTATACCACGCGAGTTAG R-CCATGGATCCACTCAATTCAACGGTTACAATACAC
pSP- <i>vsx</i> -bpFOG>mCherry (Shimai, 未発表)	<i>Xho</i> I <i>Bam</i> HI	F-CCATCTCGAGGTTTGTCAATTTTCGTTTCCTTGG R-CATGGATCCGAAAGAAGTAAAGGTCTCACC
pSP- <i>pitx</i> >mCherry (Horie, 未発表)	<i>Sal</i> I <i>Sal</i> I	F-GATCGTCGACAACCTAAACGGCGGAAAAG R-TGCGTCGACGTGTCGTCTAACTTGTTCTC
pSP- TRE>ChrimsonR:mCherry (Addgene, Watertown, MA, USA)	-	Full ChrR:mC_Fw(CMV): GTAGGCGTGTACGGTGGGAG Full ChrR:mC_Fw(<i>Bam</i> HI): CGGGATCCACCGGTCGCCACCAT Full ChrR:mC_Rv(<i>Eco</i> RI): GGAATTCTTACTTGTACAGCTCGTCCATGCC ChrR:mC_BamHI mut_Fw(<i>Not</i> I): CAGTGGCGGCCGCCATGGTGAGCAAGGGCGA ChrR:mC_BamHI mut_Rv(<i>Not</i> I): CCATGGCGGCCGCCACTGTGTCCTCGTCCTCCT
pSP- <i>vacht</i> >ChrimsonR:mCherry	<i>Bam</i> HI <i>Eco</i> RI	-

表2. 免疫染色で用いた抗体リスト

コンストラクト	一次抗体	二次抗体
<i>gnrh2</i> >G-CaMP8	anti-GFP (rabbit) A11122: Thermo Fisher Scientific	anti-rabbit IgG Alexa488 (goat) A11008: Thermo Fisher Scientific
<i>gnrh2</i> >mCherry	Anti-RFP (rat) 5f8-100: funakoshi	anti-rat IgG Alexa594 (goat) A11007: Thermo Fisher Scientific
<i>vacht</i> >CFP	anti-GFP (rabbit) A11122: Thermo Fisher Scientific	anti-rabbit IgG Alexa488 (goat) A11008: Thermo Fisher Scientific
<i>vglut</i> >Kaede	Anti-Kaede (IgG/rabbit) PM012M: Medical & Biological Laboratories	同上
<i>fer2</i> >mCherry	Anti-RFP (rat) 5f8-100: funakoshi	anti-rat IgG Alexa594 (goat) A11007: Thermo Fisher Scientific
<i>dmbx</i> >mCherry	同上	同上
<i>vsx</i> >mCherry	同上	同上
<i>nk6</i> >mCherry	同上	同上
<i>islet</i> >mCherry	同上	同上
<i>pitx</i> >mCherry	同上	同上
ターゲット	一次抗体	二次抗体
GABA/グリシン作動性ニューロン	anti-VIAAT (mouse) (Horie et al., 2010)	anti-mouse IgG Alexa594 (goat) A11005: Thermo Fisher Scientific
細胞内レチナール結合タンパク質 (CRALBP)	anti-CRALBP (rabbit) (Tsuda et al., 2003b)	anti-rabbit IgG Alexa594 (goat) A11012: Thermo Fisher Scientific

表3. 単一細胞トランスクリプトーム解析に用いた遺伝子のGene ID (KH2012モデル)

遺伝子名	Gene ID
<i>Ci-gnrh2</i>	KH2012:KH.C9.484
<i>Ci-nAchR-A1</i>	KH2012:KH.C7.285
<i>Ci-nAchR-B2/4</i>	KH2012:KH.L51.5
<i>Ci-nAchR-oB</i>	KH2012:KH.C11.244
<i>Ci-nAchR-BGDE2</i>	KH2012:KH.C7.388
<i>Ci-nAchR-BGDE3</i>	KH2012:KH.C7.476
<i>Ci-nAchR-A7/8-1</i>	KH2012:KH.C1.337
<i>Ci-nAchR-A7/8-2</i>	KH2012:KH.L108.43
<i>Ci-glyR</i>	KH2012:KH.L83.7
<i>Ci-GluN1</i>	KH2012:KH.S2302.1
<i>Ci-GluN2</i>	KH2012:KH.C9.353
<i>Ci-GABAARβ</i>	KH2012:KH.C9.860
<i>Ci-GABABR1</i>	KH2012:KH.L22.28

8. 謝辞

本研究を行うにあたり、丁寧かつ適切なご指導ご鞭撻を賜りました甲南大学 理工学部 発生学研究室 日下部岳広教授に深く感謝申し上げます。本研究で用いたカタユウレイボヤは、ナショナルバイオリソースプロジェクト (NBRP) 事業のもと、京都大学および東京大学より提供していただきました。京都大学大学院 理学研究科 動物学教室の佐藤ゆたか博士、吉田麗子博士 (現 大阪大学)、今泉智香子さん、東京大学大学院理学系研究科附属 三崎臨海実験所の吉田学博士、野澤亮さん、京都大学 舞鶴水産実験所と東京大学 三崎臨海実験所のスタッフのみなさまに、心より御礼申し上げます。大阪大学大学院 生命機能研究科の堀江健生教授には、DNA プラスミドを提供していただき、実験のアドバイスをいただきました。深く感謝申し上げます。カルシウムイメージングと光遺伝学的操作を行うにあたり、実験器具の提供や、丁寧にご指導していただき、多大なご協力をいただきました甲南大学 理工学部 生体調節学研究室の久原篤教授、三浦徹博士、岡畑美咲博士、大西康平博士、本村晴佳さん、生体調節学研究室のみなさまに、心より御礼申し上げます。甲南大学 理工学部 発生学研究室の行者蒨博士、圓尾綾菜さんには、実験の相談や研究以外の日常生活でも手厚くサポートしていただきました。心より感謝申し上げます。甲南大学 生物学科事務職員のみなさまには、研究に関するだけでなく、様々な点でサポートしていただきました。感謝申し上げます。また、本研究は日本学術振興会 特別研究員 DC2 に採用していただき、科研費提供 (研究課題番号: 22J11858) による研究支援をいただくことで遂行することができました。心より御礼申し上げます。そして、本学位論文の作成をご指導していただきま

した甲南大学 久原篤教授、向正則教授、本多大輔教授、渡辺洋平教授、岩月聡史教授、茶山健二教授に深く感謝いたします。最後に、ともに研究に励んできた甲南大学発生学研究室のみなさまに心より感謝申し上げます。

なお、本研究は、日本学術振興会 科研費助成事業 基盤研究 (B) (研究課題番号: 19H03213, 2019-2021 年度)、特別研究員奨励費 (DC2) (研究課題番号: 22J11858, 2022-2023 年度)、甲南学園平生太郎基金科学研究奨励助成金 (2021-2022 年度) によって行われました。