1PA097

ホヤの神経情報機能分子の解析 I :
マボヤ G 蛋白質遺伝子の発生にともなう組織発現
○三島幸子、千葉愛、岩佐達郎、津田基之
(姫路工業大学・理・生命)

ホヤは最も原始的な脊椎動物であるが、ヒトの脳の基本設計を有していると言われている。ホヤのオタマジャクシ型幼生はその神経系の細胞数が300程度、頭部の中枢ニューロンに限ると感覚細胞を入れても80個程度と簡単である。また胚発生の細胞系譜が決められているので、発生学的手法を用いた神経情報伝達系の研究に適している。当研究室では、ホヤ幼生におけるG蛋白質関連情報伝達系の形成とその機能解析を目指しており、既にマボヤから5種類のG蛋白質 α サブユニット遺伝子をクローニングし、それらはGn, Gi, Gs, Gq, Gxのクラスに属する事を示した。本報告では、G蛋白質が実際に機能する場所や時期を明らかにすることを目的として、*in situ*ハイブリダイゼーション法および免疫組織学的手法により、胚発生から幼生に至るまでの発現時期や発現部位特異性を比較検討している。

各G蛋白の抗血清を得るために、G蛋白質 α サブユニットの各クラスに特異的な配列を多く含むヘリカルドメインに着目した。このヘリカルドメインをコードする遺伝子部分をHisタグを持つベクターに組み込んで発現ベクターとし、各クラスのG蛋白質に特異的な部分ペプチドを大腸菌で発現させ、それを精製して抗原とすることで各クラスのG蛋白質に対するマウス抗血清を作製した。さらに、各種の脳神経系に対する抗体を用いた免疫染色の結果と比較することで、ホヤ幼生におけるG蛋白質の機能的な存在様式を明らかにし、各G蛋白質生理機能を検討している。

S.Mshima, A.Chiba, T.Iwasa, M.Tsuda:
Signal-Coupling Molecules in Ascidian Larva I:
Expression and Immunolocalization of The G-Proteins in Ascidians

1PA099

ホヤの神経情報機能分子の解析 III
: 情報機能分子可視化のためのプロモーター領域の検索
○渡利 綾子、岩佐達郎、津田基之
(姫路工業大学・理学部・生命科学科)

ホヤは最も原始的な脊椎動物で、脊椎動物の祖先型と考えられている。その脳神経系の基本設計は脊椎動物と同じであるが、ホヤ幼生の神経系の細胞数は、約300位と極めて少ない。また、胚発生過程における細胞系譜が完成していることから、発生学的手法を用いることができる。我々は、生体内の神経情報伝達に重要な役割を果たしている三量体G蛋白質に注目して、ホヤの脳神経系を研究している。これまでに、マボヤ幼生のcDNAライブラリーから、5種類のG蛋白質 α サブユニット遺伝子をクローニングし、胚発生時のそれらの発現部位を調べた。

本研究ではこれらのG蛋白質がホヤの脳神経系でどのような生理機能に關与しているかを明らかにするため、それらを生体内で可視化し、機能している時の動態をリアルタイムで調べることを目的としている。その為には、それらの遺伝子発現をコントロールすることのできるシステムを作ることと、GFP融合遺伝子をホヤ卵に導入し、目的遺伝子の生体内での働きを見ることが必要である。

各遺伝子の上流解析を行い、生体内で正しく機能するプロモーター領域を検索した。ホヤ幼生の脳神経系に分化する細胞に発現が認められた2種の新規なG蛋白質 HrGnおよび、HrGxについて、マボヤゲノムライブラリーのスクリーニングを行い、HrGnについては、上流1.7Kbp、3.5Kbp、と6.5Kbpを含むクローンが得られた。HrGxについても、得られたポジティブクローンを解析した。また、マボヤ脳・神経系で特異的に発現しているHrT882 (β チューブリン) 遺伝子のコーディング領域をPCRで得、それをプローブとしてゲノムライブラリーをスクリーニングし、上流プロモーター領域を検索した。遺伝子導入については、顕微注入や、エレクトロポレーションによる方法を試みており、予備的成果を得ている。

このように、生体内で正しく機能するプロモーターを特定し、遺伝子の過剰発現や、変異遺伝子などの導入により、我々の得たG蛋白質の生理機能を探りたい。

A.Watari, T.Iwasa, M.Tsuda:
Signal-Coupling Molecules in Ascidian Larva III:
Promoter Analysis in Ascidians

1PA098

ホヤの神経情報機能分子の解析 II
: ホヤ種間のGタンパク質遺伝子の比較
○岩佐達郎、吉田麗子、大東元就、津田基之
(姫路工業大学・理学部・生命科学科)

ホヤのオタマジャクシ型幼生の神経系を構成する細胞は300足らずであり、胚発生時の細胞系譜も明らかにされていることから、脳・神経系を発生学的に研究するには良い対象である。我々は三量体G蛋白質に注目し、マボヤ幼生から5種類のG蛋白質遺伝子をクローニングし、胚発生過程でのそれらの発現様式を明らかにした。次に、ホヤ卵にこれらの遺伝子を導入して、その生理機能を明らかにすることを計画しているが、マボヤは冬季の限られた期間しか受精できない。一方、ユウレイボヤは一年中受精できる点で有利である。ユウレイボヤでの研究にこれまでマボヤで得られた知見が適用できるかどうかを知るため、ユウレイボヤで発現しているGタンパク質遺伝子や、それらの発現様式をマボヤと比較することを目的とした。

まず、ユウレイボヤのcDNAライブラリーを作成し、PCRによって4種類の異なるGタンパク質cDNA断片を得た (CiG1~G4 : *Ciona intestinalis* G protein)。得られたアミノ酸配列をヒトGタンパク質と比較した結果、CiG3、CiG4はGiクラスに、CiG2はGqクラスに相同性を示した。CiG1はどのクラスとも明らかな相同性を示さなかった。次にマボヤのもの (HrGi, s, q, n, x) と比較した結果、CiG1がHrGxと、CiG2はHrGqと、CiG3はHrGiと対応するものであった。CiG4が、HrGnに対応するものかどうかは、今のところ結論できない。マボヤやヒトのGタンパク質を含めて作成した分子系統樹は上記の結果を支持した。得られたcDNA配列で幼生全RNAを用いてノザンブロットを行ったところ、CiG3が大量に発現していた。マボヤ幼生においてはクラス別でそれほど発現量の差は認められなかった。ユウレイボヤとマボヤGタンパク質間の相同性も高くなく、これらの結果はユウレイボヤでも詳細な解析が必要である事を示している。

そこで、現在、CiG3の遺伝子全長をクローニングし、ユウレイボヤ卵の発生に伴うその発現パターンをHrGiと詳細に比較している。
T.Iwasa, R.Yoshida, M.Daito, M.Tsuda:
Signal-Coupling Molecules in Ascidian Larva-II: G proteins of *Ciona intestinalis*.

1PA100

ホヤオタマジャクシ型幼生の明暗刺激に対する学習行動
○白石修平、川上功、中川将司、津田基之
(姫路工大・理・生命科学)

原索動物ホヤは最も原始的な脊椎動物であるが、ヒトの脳の基本設計を有していると言われている。ホヤの幼生はオタマジャクシ型で感覚細胞を入れてもその脳の神経細胞数は80個程度と簡単である。眼点・平衡器で受けた情報をもとに海底と水面をプログラム通りに遊泳し、孵化後10時間で着生し変態する。我々はすでにカタユウレイボヤ幼生の孵化から変態までの遊泳期における光に対する行動変化を解析した結果、孵化後4時間目以降に明刺激後の暗刺激で遊泳速度を上昇させ、明刺激で遊泳速度を減少させる行動を見いだした。この明暗刺激に対する応答速度は時間経過に伴い増加し、8時間目で最大値を示す。この光行動の作用スペクトルが502nmに極大を持つロドプシン様吸収曲線である事が分かった。また幼生に明暗の連続刺激を与えると、刺激回数に伴い明刺激による遊泳速度の抑制がなくなることを見いだした。これはホヤ幼生の光に対する慣れであると考えられる。そこで今回は幼生の光行動に対する慣れに注目して実験を行った。

ホヤ幼生の遊泳行動の画像は赤外感受性のCCDカメラで観測した。モニター光として、幼生には不感である700nm以上の遠赤光を使用した。刺激光として、プロジェクターに熱フィルター、干渉フィルター、減光フィルターを用いて、必要な波長・強度の光を得た。測定は18℃に保たれた暗室内 (インキュベータ) で行った。明暗の刺激時間とサイクルはコンピュータで制御し、遊泳行動はVTRに記録した後、Motion Analysis社のExpert Visionで解析した。孵化後4時間目前後と着生に近い8時間以降の幼生は明暗の連続刺激を与えても明刺激による速度の抑制が再現されるが、5~6時間目では回を重ねるに従い、明刺激による速度の抑制が見られなくなる。これは連続刺激を与えることで、ホヤ幼生に慣れが生じたためと考えられる。この慣れを種々の条件で調べた。刺激光の強度に関しては一定の強度が必要であることが分かった。ホヤ幼生の明暗刺激に対する慣れがどの程度継続するかを明らかにするため、明暗刺激を10回連続与えた後、一定時間暗順応させた後再び明暗刺激を与えた。その結果30秒後ではまだ慣れを示すが、1分後には慣れがなくなることが分かり、ホヤ幼生の明暗刺激に対する慣れは1分程度の短期記憶であることが分かった。今後は慣れのメカニズムを遺伝子レベルで解明していくことが課題になる。

S. Shiraiishi, I. Kawakami, M. Nakagawa, M. Tsuda: Habituation of photobehavior of ascidian larvae with repeated light-dark stimuli.