1D1045

ホヤ幼生の視覚・脳神経系回路網の可視化 1ー全体像の構築

○堀江 健生、中川 将司、日下部 岳広、津田 基之（姫路工大・院理・生命科学）

尾索動物ホヤは脊椎動物の祖先型であると考えられており、幼生期にはオタマジャクシ型の形態をしている。ホヤ幼生の神経系は神経管が背側中軸に位置し、その前方部が膨らみ脳のような構造をもつなど脊椎動物の脳神経系の基本構造を備えているが、構成する細胞数はわずか300個ほどと簡単である。連続切片の電子顕微鏡による観察や神経特異的抗体による免疫染色によりホヤ幼生の全体的な神経の構造が研究されているが、細胞レベルでの詳細な神経回路構造は明らかにされていない。我々は神経特異的マーカーを用いたホヤ幼生の神経回路マップの作成を目指している。今回、シナプス小胞に存在するシナプトタグミンをコードするcDNA (*Ci-syt*) を単離した。*in situ* ハイブリダイゼーションにより発現様式を調べたところ、*Ci-syt* は神経特異的に発現していることが確かめられた。シナプトタグミンに対する抗体を作製し免疫染色を行ったところ、神経が集中している3つの領域（付着突起、脳胞、運動神経節）が強く染色された。特に、脳胞では2つの感覚器（眼点、平衡器）からの軸索が脳胞後部に投射し、多数の神経軸索が集中し、ここで感覚器からの情報の統合が行われていることが示唆された。さらに、そこからの軸索はモーターニューロンがある運動神経節に向かって伸びていることが観察された。これらの全体像はβチューブリン抗体を用いた抗体染色像と概ね一致した。我々は既に視細胞に特異的に発現するアレスチン抗体を用いて軸索を含む視細胞を可視化した。今後はこのような特定の神経組織特異的な抗体を用いて、神経回路の特定を積み重ねてホヤ幼生の神経回路マップの作成を進めていく。

T.Horie, M.Nakagawa, T.Kusakabe and M.Tsuda : Visualization of visual and neural networks in the brain of ascidian larvae (1): Overall organization

1D1115

ホヤ幼生の感覚色素細胞と行動 1ーレーザーを用いた細胞破壊による機能解析

○櫻井 大介、合田 宗樹、津田 基之（姫路工大院・理学・生命科学）

脊椎動物の祖先型に近い動物とされるホヤ幼生は、脊索動物のボディプランの最も単純な構造をしており、ヒトの脳と共通の基本設計がみられる。幼生は全体で約2600個、頭部の神経細胞に限れば約100個程の細胞数からなる。頭部には黒色色素を備えた2つの感覚細胞があり、ここで光、重力などを感知して海底と海面の往復運動に対応していると考えられているが直接的な証明はない。ホヤ幼生の脳胞内にある2つの感覚細胞は、形態学的観点から前方が平衡器、後方が眼点とされている。平衡器は黒色の耳石を持つ細胞体が脳胞の内壁に結合し、その根元にある機械受容細胞が耳石の動きを受容し重力を感知すると考えられている。眼点は1個の色素細胞からなる眼胚と、3個のレンズ細胞、20程度の光受容細胞からなり、明暗を感知するとされている。本研究ではホヤ幼生の脳胞内の2つの黒色色素細胞をレーザーにより細胞破壊をし、それらの幼生の上昇運動、光応答を解析して、それぞれの色素細胞の機能を明らかにした。カタユウレイボヤはその幼生期前半（約4時間目まで）は明暗に関わらず上昇運動を行い、後半は明暗刺激に対して遊泳行動をしめす。孵化後の幼生に麻醉処理（MS-222）処理し対物レンズ100倍で前方黒色色素（耳石）はその根本にレーザー照射を行い耳石を脳胞内壁から脱離させた。後方黒色色素（眼胚）は対物レンズ20倍でその中心にレーザー照射した。ふ化後4時間までの上昇運動に関しては後方黒色色素照射幼生では影響を受けないが前方黒色色素照射幼生では上昇運動が消滅した。一方幼生期後半の明暗刺激に対する遊泳行動は前方黒色色素照射幼生は影響を受けないが、後方黒色色素照射幼生では光応答が消滅した。これらの結果から前方黒色色素は耳石、後方黒色色素は眼胚であることが行動実験で明らかとなった。

D.Sakurai, M.Goda and M.Tsuda : Role of sensory pigment cells in ascidian larvae (1): Studies by laser ablation

1D1100

ホヤ幼生の感覚色素細胞と行動 2；PTU処理と色素胞の金属分布

合田 宗樹¹、櫻井 大介¹、香村 芳樹²、伊藤 真義³、八木 直人³、○津田 基之¹（¹姫路工大院・理学・生命科学、²理研・播磨、³JASRI）

ホヤ幼生の脳胞には2つの黒色色素があり、組織学的研究から前方黒色色素は平衡器の耳石、後方黒色色素は眼点の眼パイとされている。しかしこれら組織の機能の証明は無い。前発表で、後方黒色色素の脳胞内壁との接続部をレーザーで焼き切り、その幼生の遊泳行動を観察した結果、上昇の遊泳行動を失うことから、耳石としての役割が示された。また後方黒色色素胞の中心をレーザー照射したホヤ幼生は上昇運動は影響されないが、光応答を失うことから、その中に光受容体があることが示された。この黒色色素はメラトニンで、受精後15時間頃にチロシナーゼにより合成される。またこの時期にチロシナーゼの合成酵素阻害剤チオウレア（PTU）を作用させると黒色色素を失った幼生が得られる。黒色色素の感覚受容機能、遊泳行動における役割を明らかにする目的でPTUを作用させた幼生の上昇運動、光応答を動画解析装置で解析した。ホヤの胚に作用させる発生時期、PTUの濃度により黒色色素の形成が異なる。色々な条件でPTU処理した幼生は黒色色素の有無に関わらず、光応答は正常であるが上昇運動が阻害された。PTUは金属キレート能があるにPTU処理前後のホヤ幼生の金属分布の変化をケイ光X線分析した。PTU処理前の幼生は前方黒色色素（耳石）にはカルシウムなどが、後方した幼生はカルシウムなどが局在していたが、PTU処理により、これらの金属の局在が失われたことが示された。これらの結果から、重しである耳石の金属が失われることにより耳石の比重が下がり、重力に応答なくなり、それに接触している機械受容細胞を刺激できなくなり、上昇運動を失うと考えられる。

M.Gouda, D.Sakurai, Y.Yoshiki, M.Itho, N.Yagi, M.Tsuda : Role of sensory pigment cells in ascidian larvae (2): Studies using PTU

1D1130

ホヤ幼生の視覚関連遺伝子の特異的機能阻害と光に対する行動変化

○稲田 京子、堀江 健生、中川 将司、日下部 岳広、津田 基之（姫工大院・理学・生命科学）

ホヤは原始的な脊索動物であり、その幼生は脊椎動物の脳の基本設計を有している。またホヤ幼生の細胞数はわずか2600個ほどで、そこには脊椎動物のボディプランを最も単純なたちでみることができる。我々も参加したカタユウレイボヤのcDNAプロジェクトも終了し、遺伝子の発現と配列に関する膨大な情報が蓄積されている。我々は特に視覚から運動ニューロンに至る神経系に焦点を合わせ、多くの神経特異的遺伝子を単離、同定している。これらの遺伝子の働きを明らかにするためには、ホヤ幼生の個体レベルでの遺伝子機能の解析方法を確立することが重要である。そこで本研究では、動物細胞内で、特異的かつ強力な翻訳制御作用をもつ核酸類似化合物であるアンチセンスモルフォリノオリゴ（MO）を用いて、視覚系特異的遺伝子の機能解析を試みた。カタユウレイボヤの視物質（Ci-opsin1）と、視細胞の脱感作に関与するアレスチン（Ci-arr）に対するMOを設計し、マイクロインジェクションによりホヤ胚へ導入した。MOが導入された幼生を、アレスチンに対する抗体により免疫染色を行った結果、アレスチンの合成がMOによって阻害されたことがわかった。視物質についても、MOによって、タンパク質の合成が阻害されていた。我々は動画解析装置により、ホヤの幼生が孵化後4時間目以降に暗刺激で遊泳を開始し、明刺激で遊泳を停止することを明らかにしている。この解析は100匹程度の集団を対象とした測定であるが、本研究では遺伝子操作した1個体の行動を解析できるシステムを構築した。この手法を用いて、MOにより視物質、アレスチンの翻訳が阻害されたホヤ幼生の光応答を解析する。

K.Inada, T.Horie, M.Nakagawa, T.Kusakabe, M.Tsuda : Targeted 'knockdown' of photoreceptor genes in the ascidian larva