

Title	律動運動を制御する中枢パターン生成器の発生機構解明
Sub Title	Developmental mechanism of central pattern generator regulating rhythmic locomotion
Author	堀田, 耕司(Hotta, Kohji)
Publisher	慶應義塾大学
Publication year	2020
Jtitle	学事振興資金研究成果実績報告書 (2019.)
JaLC DOI	
Abstract	<p>本申請研究の事業計画の2年目の目標である「CPG 予定細胞をマニピュレーションにより単離し、RNAseq によりCPG 細胞特異的遺伝子発現プロファイルを得る。」をほぼ達成した。</p> <p>尾芽胚初期から尾芽胚後期までにおいて5対の運動神経細胞のうちA10.64細胞のみが70秒間隔のCa²⁺振動を示すこと、このCa²⁺振動は尾部の筋肉Ca²⁺と同期するようになること（ホヤ国際学会）から、尾芽胚期においてA10.64細胞がCa²⁺振動することが遊泳運動を引き起こす引き金となると考えられた。しかし、本Ca²⁺振動の分子機構は全く未知である。そのため、予備実験ではターゲットを絞ったアプローチではなく、1細胞由来の転写物を網羅的に同定可能な、single-cellRNAseq解析を試みた。そのためには、ホヤ尾芽胚を構成する約1600個の細胞の中からCa²⁺振動を示す細胞を単離する必要があるが、初期尾芽胚ではCa²⁺の濃度上昇がみられるのはこのCa²⁺振動細胞のみである（Akahoshi et al., 2017）。そこで、申請者はGCaMP6 mRNAを導入した初期尾芽胚を酵素処理により細胞ごとにバラバラにし、Ca²⁺動態を計測しながら、Ca²⁺振動する細胞を探索した。その結果、数十秒周期でCa²⁺振動しつづける細胞を単離することに成功した。このことは、ホヤCa²⁺振動細胞は細胞間の相互作用なしに細胞自律的にCa²⁺振動可能であることを意味する（動物学会、分子生物学会）。</p> <p>単離したCa²⁺振動細胞に由来する遺伝子発現情報をilluminaNovaSeqにより1細胞あたり約6000万リード得た（N=5、およびCa²⁺振動しないコントロール細胞N=2の計7細胞分）。群間比較解析によりCa²⁺振動細胞とネガコン細胞間で有意な差がみられた遺伝子のリストを得た。差異発現Top10にはCa²⁺振動を担うと考えられる膜電位依存性チャネルや小胞体輸送タンパク質等を含む候補遺伝子が含まれていた。これらの候補遺伝子が実際にCa²⁺振動を担うか確かめるため、ノックダウン実験準備を進めている。</p> <p>The second year goal of the project plan of this application research is to "isolate CPG-scheduled cells by manipulation and obtain CPG cell-specific gene expression profile by RNAseq.". This goal was successfully almost achieved.</p> <p>Only the cell lineage A10.64 cells out of the five pairs of motor neurons show Ca²⁺ + oscillations at 70-second intervals from the early stage of the tailbud embryo to the late stage of the tailbud embryo. Therefore, it was suggested that Ca²⁺ + oscillations of A10.64 cells in the tailbud embryo stage would trigger swimming movement. However, the molecular mechanism of how this cell exert Ca²⁺ + oscillation is completely unknown. For this reason, in preliminary experiments, single-cell RNAseq analysis was attempted, which is not a targeted approach but can comprehensively identify transcripts derived from one cell. For that purpose, it is necessary to isolate Ca²⁺ + oscillation cells from about 1600 cells constituting the tailbud embryo (Akahoshi et al., 2017). Accordingly, the applicant searched the cells that vibrated Ca²⁺ + while measuring the Ca²⁺ + dynamics while separating the initial tailbud embryos into which the GCaMP6 mRNA had been injected by enzymatic treatment. As a result, we succeeded in isolating cells that continued to oscillate Ca²⁺ + in tens of seconds. This means that ascidian Ca²⁺ + -oscillating cells are capable of cell-autonomously Ca²⁺ + -oscillating without cell-cell interaction (Animal Society 2019). About 60 million reads per gene of gene expression information derived from the isolated Ca²⁺ + oscillatory cells were obtained using illuminaNovaSeq (N = 5 cells and Ca²⁺ + non-oscillating control cells N = 2, 7 cells in total). A list of genes showing significant differences between Ca²⁺ + oscillatory cells and negative control cells. The differentially expressed Top10 contained candidate genes including membrane voltage-gated channels and ER transport proteins that are thought to be responsible for Ca²⁺ + oscillation. Preparations for knockdown experiments are underway to confirm that these candidate genes are actually responsible for the Ca²⁺ + oscillation.</p>
Notes	
Genre	Research Paper
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=2019000007-20190112

The copyrights of content available on the KeiO Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

研究代表者	所属	理工学部	職名	准教授	補助額	1,000 (特A)千円
	氏名	堀田 耕司	氏名 (英語)	Kohji Hotta		
研究課題 (日本語)						
律動運動を制御する中枢パターン生成器の発生機構解明						
研究課題 (英訳)						
Developmental Mechanism of Central Pattern Generator Regulating Rhythmic Locomotion						
1. 研究成果実績の概要						
<p>本申請研究の事業計画の2年目の目標である「CPG 予定細胞をマニピュレーションにより単離し、RNAseq により CPG 細胞特異的遺伝子発現プロファイルを得る。」をほぼ達成した。</p> <p>尾芽胚初期から尾芽胚後期までにおいて5対の運動神経細胞のうちA10.64細胞のみが70秒間隔のCa²⁺振動を示すこと、このCa²⁺振動は尾部の筋肉Ca²⁺と同期するようになること(ホヤ国際学会)から、尾芽胚期においてA10.64細胞がCa²⁺振動することが遊泳運動を引き起こす引き金となると考えられた。しかし、本Ca²⁺振動の分子機構は全く未知である。そのため、予備実験ではターゲットを絞ったアプローチではなく、1細胞由来の転写物を網羅的に同定可能な、single-cellRNAseq解析を試みた。そのためには、ホヤ尾芽胚を構成する約1600個の細胞の中からCa²⁺振動を示す細胞を単離する必要があるが、初期尾芽胚ではCa²⁺の濃度上昇がみられるのはこのCa²⁺振動細胞のみである(Akahoshi et al., 2017)。そこで、申請者はGCaMP6 mRNAを導入した初期尾芽胚を酵素処理により細胞ごとにバラバラにし、Ca²⁺動態を計測しながら、Ca²⁺振動する細胞を探索した。その結果、数十秒周期でCa²⁺振動しつづける細胞を単離することに成功した。このことは、ホヤCa²⁺振動細胞は細胞間の相互作用なしに細胞自律的にCa²⁺振動可能であることを意味する(動物学会、分子生物学会)。</p> <p>単離したCa²⁺振動細胞に由来する遺伝子発現情報をilluminaNovaSeqにより1細胞あたり約6000万リード得た(N=5、およびCa²⁺振動しないコントロール細胞N=2の計7細胞分)。群間比較解析によりCa²⁺振動細胞とネガコン細胞間で有意な差がみられた遺伝子のリストを得た。差異発現Top10にはCa²⁺振動を担うと考えられる膜電位依存性チャネルや小胞体輸送タンパク質等を含む候補遺伝子が含まれていた。これらの候補遺伝子が実際にCa²⁺振動を担うか確かめるため、ノックダウン実験準備を進めている。</p>						
2. 研究成果実績の概要 (英訳)						
<p>The second year goal of the project plan of this application research is to "Isolate CPG-scheduled cells by manipulation and obtain CPG cell-specific gene expression profile by RNAseq.". This goal was successfully almost achieved.</p> <p>Only the cell lineage A10.64 cells out of the five pairs of motor neurons show Ca²⁺ + oscillations at 70-second intervals from the early stage of the tailbud embryo to the late stage of the tailbud embryo. Therefore, it was suggested that Ca²⁺ + oscillations of A10.64 cells in the tailbud embryo stage would trigger swimming movement. However, the molecular mechanism of how this cell exert Ca²⁺ + oscillation is completely unknown. For this reason, in preliminary experiments, single-cell RNAseq analysis was attempted, which is not a targeted approach but can comprehensively identify transcripts derived from one cell. For that purpose, it is necessary to isolate Ca²⁺ + oscillation cells from about 1600 cells constituting the tailbud embryo (Akahoshi et al., 2017). Accordingly, the applicant searched the cells that vibrated Ca²⁺ + while measuring the Ca²⁺ + dynamics while separating the initial tailbud embryos into which the GCaMP6 mRNA had been injected by enzymatic treatment. As a result, we succeeded in isolating cells that continued to oscillate Ca²⁺ + in tens of seconds. This means that ascidian Ca²⁺ + -oscillating cells are capable of cell-autonomously Ca²⁺ + -oscillating without cell-cell interaction (Animal Society 2019). About 60 million reads per gene of gene expression information derived from the isolated Ca²⁺ + oscillatory cells were obtained using illuminaNovaSeq (N = 5 cells and Ca²⁺ + non-oscillating control cells N = 2, 7 cells in total). A list of genes showing significant differences between Ca²⁺ + oscillatory cells and negative control cells. The differentially expressed Top10 contained candidate genes including membrane voltage-gated channels and ER transport proteins that are thought to be responsible for Ca²⁺ + oscillation. Preparations for knockdown experiments are underway to confirm that these candidate genes are actually responsible for the Ca²⁺ + oscillation.</p>						
3. 本研究課題に関する発表						
発表者氏名 (著者・講演者)	発表課題名 (著書名・演題)	発表学術誌名 (著書発行所・講演学会)	学術誌発行年月 (著書発行年月・講演年月)			
堀田耕司、赤星太一、岡浩太郎	scRNA-Seqによるホヤ運動神経節に位置するCa ²⁺ 振動細胞の遺伝子発現解析	第90回日本動物学会	2019年9月14日			
Maiki Wakai, Mitsuru J. Nakamura, Satoshi Sawai, Kohji Hotta, and Kotaro Oka	ホヤ付着器に対する機械刺激は2段階のCa ²⁺ 濃度上昇を介し変態を誘導する Two-step Ca ²⁺ transients of ascidian palps responding to mechanical stimuli induce metamorphosis	第42回分子生物学会年会	2019年12月6日			

<p>Taichi Akahoshi, Kohei Oonuma, Makoto Murakami, Takeo Horie, Takehiro G. Kusakabe, Kohji Hotta and Kotaro Oka</p>	<p>A single pair of A10.64 motor neuron showing Ca oscillation is an essential component of central pattern generator for ascidian swimming locomotion. カルシウム振動を示す単一運動ニューロン A10.64 細胞はホヤ遊泳運動における中枢パターン生成器に不可欠である</p>	<p>第 42 回分子生物学会年会</p>	<p>2019 年 12 月 4 日</p>
<p>Taichi Akahoshi, Kohji Hotta, and Kotaro Oka:</p>	<p>Relationship between Tail Beating and Ca²⁺ Oscillation in the Motor Ganglion of Developing Ascidian Embryo.</p>	<p>10th International Tunicate Meeting</p>	<p>2019 年 7 月 8 日</p>