

I ゼブラフィッシュをモデルとした 脳神経系と神経堤由来器官の発生・機能の 分子遺伝学およびイメージング解析

Imaging and molecular genetic analyses of development and function of the nervous system
and neural crest-derived organs in the zebrafish

八田公平・池永隆徳・中川将司
Hatta K, Ikenaga T, Nakagawa M

ゼブラフィッシュは胚が透明で発生が早く、遺伝学的手法に優れた、ヒトを含む脊椎動物のモデルである。本年度は、魚類後脳に存在し、逃避行動の制御に関わるマウスナー細胞におけるグリシンや GABA などの抑制メカニズムについて、組織化学的な解析を行った。その結果、脊髄からマウスナー細胞へと入力する、新たなタイプのグリシン作動性ニューロンを同定した。次に、カルシウム指示タンパク質 GCaMP3 をゼブラフィッシュの胚で発現させ、発生初期における自発的なカルシウム応答や、運動に伴う神経や筋肉でのカルシウム動態について研究を行った。また、熱ショックタンパク質の制御配列を持つトランスジェニックゼブラフィッシュにおいて、局所的に赤外レーザーを照射することによって外来遺伝子を誘導する方法 (IR-LEGO) によって、特定波長の光によって神経細胞の興奮性を制御できるチャンネルロドプシンや光転換蛍光タンパク質 Kaede をゼブラフィッシュ幼生の脳に発現させる「多段階光遺伝学」をもちいたゼブラフィッシュの神経系の機能と発達の解析も引き続き行っている。さらに、ガラス電極を用いた単一細胞へのエレクトロポレーション法による遺伝子導入を行い、単一のマウスナー細胞でのチャンネルロドプシンの発現に成功した。また、SPring-8 におけるマイクロ CT や高速 X 線撮影によってサメの鋸歯の形成過程、様々な硬骨魚類の咽頭歯の形態と機能を解析した。

II ホヤをモデルとした 神経回路解析および左右非対称形成の研究

Neural network analysis and study of the establishment of left-right asymmetry in the
ascidian larva

中川将司・八田公平
Nakagawa M, Hatta K

ホヤは脊椎動物と同じ脊索動物門に属し、脊椎動物に最も近縁な動物である。ホヤ幼生の神経系はたった 200 個足らずの細胞から構成されている。特定の神経細胞特異的に蛍光タンパク質を発現

するトランスジェニックホヤを用いて、神経回路の解析を行っている。今年度は GABA/グリシン作動性ニューロンに着目して、解析を行った。脳胞部では、GABA/グリシン作動性ニューロンは、幾つの領域にクラスターを形成し、後方部へ軸索を投射していることが分かった。一方、運動神経節の背側に存在する GABA/グリシン作動性ニューロンの軸索は、一度腹側へ伸びた後、前方の脳胞側へ投射していることを明らかにした。ホヤ幼生は右側にのみ視細胞が存在する等、顕著な左右非対称性を示す。卵を一過的に希釈海水処理すると、その非対称的形質が乱れることを見出した。希釈海水処理により卵膜内側を裏打ちするテスト細胞が死亡し、卵膜から剥がれることが分かった。そのことが、神経胚期における一方向性胚回転が阻害し、左右非対称性崩壊を引き起こしたと考えられる。

発表論文 List of Publications

- I-1 Nakayama S, Ikenaga T, Kawakami K (国立遺伝学研究所), Ono F (NIH), Hatta K. A transgenic line with Gal4 insertion useful to study morphogenesis of craniofacial perichondrium, vascular endothelium-associated cells, floor plate, and dorsal midline radial glia during zebrafish development. *Development, Growth and Differentiation*, 54: 202-215. (2012)
- I-2 Park JY (NIH), Ikeda H (NIH), Ikenaga T, Ono F (NIH) Acetylcholine receptors enable the transport of rapsyn from the Golgi complex to the plasma membrane. *Journal of Neuroscience*. 32: 7356-7363. (2012)
- I-3 Hatta K, Harada T, Ikenaga T, Uesugi K, Fujita K, Yamamoto T: Movement of pharyngeal teeth during feeding in zebrafish and medaka revealed by high-speed X-ray microscopy at synchrotron SPring-8. 10th International Conference on Zebrafish Development and Genetics (Madison, USA, 2012年6月)
- I-4 Hatta K, Ikenaga T, Nagata A, Moly PK, Suzuki Y, Yakeuchi A, Uesugi K, Yamamoto T. Visualizing adult and larval zebrafish brains at single cell resolution by micro computed tomography at SPring-8. Zebrafish atlas workshop, 10th International Conference on Zebrafish Development and Genetics (Madison, USA, 2012年6月)
- I-5 Ikenaga T, Higashi T, Sumimoto T, Hatta K: GABAergic inputs and its development on the zebrafish Mauthner cells. 10th International Congress of Neuroethology. (College Park, USA, 2012年8月)
- I-6 Okamoto S, Nakagawa M, Hatta K: Imaging stochastic or behavior-related Ca²⁺ transients in non-neuronal tissues in zebrafish embryos microinjected with GCaMP3 mRNA. 第45回日本発生生物学会・第64回日本細胞生物学会合同大会 (神戸 2012年5月)
- I-7 Ushimura E, Goto M (鶴見大短大), Shimoda S (鶴見大学), Sasagawa I (日本歯科大学), Hatta K: Structure and formation of the serrated tooth margin of sharks. 第45回日本発生生物学会・第64回日本細胞生物学会合同大会 (神戸 2012年5月)
- I-8 Kamihagi C, Nakajima Y, Isoda E, Maekawa S, Hatta K: Behaviors of neurons migrating along axonal bundles that connect right and left halves of the brain in zebrafish. 兵庫県立大学—東亜大学 日韓国際学術交流会 (釜山、韓国、2012年8月)
- I-9 Ushimura E, Goto M (鶴見大短大), Shimoda S (鶴見大学), Sasagawa I (日本歯科大学), Hatta K: Microstructure of the serrated margin of sharks. 兵庫県立大学—東亜大学 日韓国際学術交流会 (釜山、韓国、2012年8月)
- I-10 池永隆徳: X線イメージングによる魚類の神経系の構造と運動の解析。日本動物学会第83回大会 (豊中、2012年9月)

- I-11 牛村英里、後藤仁敏（鶴見大短大）、下田信治（鶴見大学）、笹川一郎（日本歯科大学）、八田公平：イタチザメの歯の形成-鋸歯に着目して-。日本動物学会第 83 回大会（豊中、2012 年 9 月）
- I-12 Ikenaga T, Harada T, Morikawa S, Kamihagi C, Higashi T, Uesugi K (JASRI), Hatta K : High-speed X-ray imaging of pharyngeal teeth movement during feeding in teleost fish, 小型魚類研究会（京都、2012 年 9 月）
- I-13 Ushimura E : Microstructure of the serrated margin of extant and fossil sharks with orthodontine and osteodontine（2012 年 10 月）The 72th Annual meeting of the society of vertebrate paleontology SVP2012 Edwin H. Margaret M. Colbert Prize competition（North Carolina, USA）
- I-14 牛村英里、八田公平：化石および現生種における歯の機能形態発生：SPRING-8 における微細立体構造の X 線解析。平成 23 年度兵庫県立大学研究発表会（姫路 2012 年 11 月）
- I-15 牛村英里、後藤仁敏（鶴見大短大）、下田信治（鶴見大学）、笹川一郎（日本歯科大学）、八田公平：サメ類における鋸歯の形態・構造・形成について。日本板鰓類研究会（大阪 2012 年 12 月）
- II-1 高井健太、八田公平、堀江健生（筑波大学）、笹倉靖徳（筑波大学）、中川将司：カタユウレイボヤ幼生の神経ネットワーク。日本動物学会第 83 回大会（豊中 2012 年 9 月）
- II-2 Masashi Nakagawa, Takashi Fukano（理研 BSI）, Takeo Horie（筑波大学）, Yasunori Sasakura（筑波大学）, Atsushi Miyawak（理研 BSI）: Neuronal activity in Ciona embryo. 日本比較生理生化学会第 31 回大会（葉山 2012 年 7 月）

大学院生命理学研究科

博士後期課程

伊藤真理子：脳の新しい解析法としての多段階光遺伝学の開発と応用

勝本真平：ホヤ幼生の左右非対称性

博士前期課程

岡本晋一：ゼブラフィッシュ胚の脳でランダムにおこる局所的で一過的な Ca^{2+} 上昇波の研究

牛村英里：サメの鋸歯の形成機構

高井健太：ホヤ幼生における GABA/Glycine 作動性ニューロンの回路解析

上萩ちひろ：単一細胞光遺伝学の開発と逃避行動に関わる脳神経回路解析への応用

東毅：マウスナー細胞における GABA 入力の解析

科学研究費補助金等

1 兵庫県立大教育助成

研究課題 ゼブラフィッシュの遊泳行動へのモノアミンの関与

研究代表者 池永隆徳

2 日本学術振興会科学研究費補助金（平成 23～25 年度）基盤研究（C）課題番号 23570095

研究課題 ホヤ幼生視細胞の信号伝達系

研究代表者 中川将司

3 マリンバイオ共同推進機構 JAMBIO 共同利用・共同研究

研究課題 カタユウレイボヤ幼生の神経活動イメージング

研究代表者 中川将司