

I 脳と神経堤由来器官（咽頭歯、腸神経系）の発生・機能・進化の、ゼブラフィッシュとホヤをモデルとした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 (pharyngeal teeth, enteric nervous system) in the zebrafish and the ascidian

八田公平・二階堂昌孝・中川将司
Hatta K, Nikaido M, 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。私たちは、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 作動性の抑制メカニズムについて、組織化学的、分子遺伝学、および、イメージング技術を用いた解析を行ってきた。今年度は、Cre 組み替え技術を用いて、マウスナー細胞に投射する複数の GABA 作動性のシナプス末端を、生きた個体の中で区別して可視化することに初めて成功した。また、カルシウム指示タンパク質 GCaMP3 を用いて、脳の神経細胞の活動と尾、胸びれの動きを同時観察することにより、両者の関係について詳細な解析を行った。

ゼブラフィッシュは第2の脳とも呼ばれる腸神経系の機能や発生の解析にも優れたモデルとなりうると考えられる。私達は、腸の蠕動運動に伴う平滑筋でのカルシウム動態を解析し、蠕動反射と徐波の2つの収縮波をカルシウム動態によって区別できることを発見した。また、腸神経細胞その他のカルシウム動態の一部も明らかとなった。一方、光遺伝学的手法によって、腸神経細胞や平滑筋を局所的に刺激することにより、光で生きた個体内の腸の動きをコントロールすることに成功している。

脊椎動物の祖先であるホヤの腸のはたらきについては、未だよくわかっていない。私達は、変態後のホヤの腸の動きとセロトニン作動性細胞の分布について解析した。

一方、SPRING-8 におけるマイクロ CT や高速 X 線撮影によって、様々な硬骨魚類の咽頭歯の形態と摂食時における運動の解析を行なっている。本年度は、昨年得られた、ウナギ、スポッテドガーの摂食行動の動画の解析をすすめた。

II ゼブラフィッシュ神経堤およびプラコードの発生・分化の分子遺伝学解析

Molecular genetic analyses of development of the neural crest and placode in the zebrafish

二階堂昌孝・八田公平
Nikaido M, Hatta K

多種、多数（ヒトでは 20 種以上で 1 億個）の神経細胞から成り、中枢から半ば独立して活動する事から第 2 の脳とも呼ばれる腸神経の神経サブタイプの分化機構の解明を行っている。まずその前駆細胞である神経堤細胞一つが何種類の神経細胞を生じるのか解明するため、細胞ごとにユニークな蛍光色でマークする Brainbow のシステムを導入した。また腸神経の重要な神経伝達物質であるアセチルコリンの合成酵素の転写制御領域を利用して作成した遺伝子導入魚を利用して、腸神経細胞の発生過程の観察を行なった結果、腸神経細胞の分化は、単純に口側から肛門側へと進むのではなく、パイオニア的に分化した一部の神経細胞の間を埋めるように分化し、腸全体を覆うことが明らかとなった。加えて各種神経細胞の発生期の特異化に関わる転写制御因子等を単離する目的で開始したトランスクリプトーム解析では、いくつか興味深い遺伝子が得られてきた。一方、成体の腸神経細胞の発生・再生研究のための幹細胞の探索については、腸神経系の再生を解析する実験系を用い、神経幹細胞のマーカー（Sox2, Sox10）陽性の細胞からの神経新生を確認する実験を進めている。

III ホヤ幼生視細胞の光信号伝達系

Photo-signal transduction in ascidian larval photoreceptors

中川将司・八田公平
Nakagawa M, Hatta K

動物の眼は多種多様である。しかし、脊椎動物内ではその器官の構造、視細胞の形態、そして視細胞内信号伝達系等の性質は、最も下等な円口類からヒトまで殆ど同じである。脊椎動物型眼が進化の過程でどのように確立されてきたのか、まだ殆ど分かっていない。ホヤは脊椎動物に最も近縁な無脊椎動物であり、そのオタマジャクシ幼生は脊椎動物の基本体制を備えている。従って、ホヤの視細胞の機構を明らかにすることによって、脊椎動物型眼が確立される進化の過程に関する知見が得られると期待される。本研究では、ホヤ幼生視細胞の光信号伝達系に着目し研究を進めている。また、光遺伝学的手法を用いて、ホヤ幼生の単純な脊椎動物様中枢神経系の機能解析を行っている。

IV 乾燥耐性生物（クマムシ、ネムリユスリカ）および 動植物の高解像度位相マイクロ CT 解析

High resolution phase-contrast synchrotron microCT analysis of Tardigrada and sleeping chironomid under cryptobiosis, and Kinorhyncha

八田公平・二階堂昌孝・中川将司
Hatta K, Nikaido M, Nakagawa M

緩歩動物クマムシの一部や、節足動物であるネムリユスリカは、体や細胞から水がほとんど失われた乾燥状態でも生き続けることができる。しかし、乾燥状態における組織や細胞の形態についてはほとんどわかっていない。私たちは、SPring-8 における高解像度マイクロ CT と共焦点顕微鏡や電子顕微鏡観察を組み合わせた相関顕微鏡の技法を用いて、乾燥状態にある体腔細胞（クマムシ）

や脂肪細胞（ネムリユスリカ）の中の細胞小器官、脂肪滴の 3D 形態を生きたまま定量的に観察することに成功した。さらに Zernike 法を用いて、乾眠状態にある個体内部の折れたたまった表皮、筋肉、神経節などの可視化にも初めて成功した。また、染色技術を組み合わせて、ゼブラフィッシュの脳、腸やホヤの幼生の神経組織、あるいは微小な海産ベントス（砂隙生物）動物動物（コマツトゲカワ）の立体内部構造をマイクロ CT によって可視化した。

発表論文 List of Publications

- I-1 Kohei Hatta, Saki Shiomoto, Shota Nomura, T Inoue, Kenta Kuwabara, Kentaro Uesugi (JASRI), A. Suzu, K. Fujita, T. Harada, Takanori Ikenaga (兵庫県立大／鹿児島大). Diverse structure of pharyngeal teeth in teleost (zebrafish, medaka, carp, snowflake moray) live-imaged by synchrotron X-ray cinematography. 2016.7.15 アメリカ合衆国 フロリダ州 オーランド (口頭発表)
- I-2 Saki Shiomoto, Shota Nomura, Kenta Kuwabara, Tomohiro Inoue, Yuka Takamiya, Tatsunori Harada, Kazutake Tashima, Kyohei Fujita, Tamami Yamamoto, Ayumi Suzu (鹿児島大), Kentaro Uesugi (JASRI), Takanori Ikenaga (兵庫県立大／鹿児島大), Kohei Hatta. Application of synchrotron microCT and X-ray cinematography to zoology. 動物学への放射光 X 線 CT と X 線映画撮影の適用。Joint events of the 22nd International Congress of Zoology and the 87th meeting of Zoological Society of Japan. 2016.11.18 沖縄 (口頭発表)
- II-1 Masataka Nikaido, Saki Izumi, Honoka Ohnuki, Yuki Takigawa, Kyo Yamasu and Kohei Hatta. Early development of the enteric nervous system visualized by a transgenic zebrafish line harboring regulatory region for choline acetyltransferase. The annual evaluation conference of the leading program. 2017 年 3 月 13-14 日 光都 CAST (ポスター発表)
- II-2 Mai Kuwata, Kohei Hatta and Masataka Nikaido. Lineage analysis of the vagal crest cells to reveal the cellular basis of the formation of multiple cell types in the enteric nervous system. The annual evaluation conference of the leading program. 2017 年 3 月 13-14 日光都 CAST (ポスター発表)
- II-3 M. Venero Galanternik (Stowers Institute), M. Nikaido, Z. Yu (Stowers Institute), S. A. McKinney (Stowers Institute), T. Piotrowski (Stowers Institute): Localized Gene Induction by Infrared-Mediated Heat Shock. *Zebrafish*. vol.13(6) p537-540 (2016).
- II-4 D. D. Nogare (NIH), M. Nikaido, K. Somers (NIH), J. Head (NIH), T. Piotrowski (Stowers Institute), A. B. Chitnis (NIH): In toto imaging of the migrating Zebrafish lateral line primordium at single cell resolution. *Dev Biol*. vol.422(1) p14-23 (2017).
- II-5 M. Delfino-Machín (U. of Bath), R. Madelaine (U. de Toulouse), G. Busolin (U. of Padova), M. Nikaido, S. Colanesi (U. of Bath), K. Camargo-Sosa (U. of Bath), E. W. Law (U. of Bath), S. Toppo (U. of Padova), P. Blader (U. de Toulouse), N. Tiso (U. of Padova), R. N. Kelsh (U. of Bath): Sox10 contributes to the balance of fate choice in dorsal root ganglion progenitors. *PLoS One*. vol.12(3) e0172947 (2017).
- III-1 Kenta Kuwabara, Kohei Hatta and Masashi Nakagawa. Identification of effector protein of photo-signal-transduction in ascidian larval photoreceptor. The annual evaluation

conference of the leading program. 2017年3月13-14日光都 CAST (ポスター発表)

- IV-1 福田恭子、仲宗根爽乃、桑原健太、野末馨、柴田今日子、大久保真理、森川作志、岡本晋一、柿口貴沙 (理研 CLST), 米村重信 (理研 CLST)、上杉健太郎 (JASRI)、竹内晃久 (JASRI)、鈴木芳生 (JASRI)、八田公平. 極限環境耐性生物クマムシの細胞小器官レベルでの放射光 mCT・光顕・電顕による統合 (相関顕微鏡) 解析。第一回クマムシ学研究会 2016.4.10 日吉 慶応義塾大学 (口頭発表)
- IV-2 仲宗根爽乃、福田恭子、桑原健太、野末馨、柴田今日子、大久保真理、森川作志、岡本晋一、柿口貴沙 (理研 CLST), 米村重信 (理研 CLST)、黄川田隆洋 (農研機構)、上杉健太郎 (JASRI)、竹内晃久 (JASRI)、鈴木芳生 (JASRI)、八田公平. 極限環境耐性生物クマムシとネムリユスリカの放射光 mCT・共焦点・電顕による相関顕微鏡解析。Cryopreservation Conference 2016. 2016年11月10日。岡崎 基礎生物学研究所 (口頭発表)
- IV-3 Knetz Kuwabara, Hiroshi Yamasaki (ベルリン自然史博物館), Euichi Hirose (琉球大), Akihisa Takeuchi (JASRI), Kenntaro Uesugi (JASRI), Kohei Hatta. MicroCT analysis of a kinorhyncha (mud dragon), Echinoderes Komatsui, a small marine benthic invertebrate. 小型海洋性底生無脊椎動物、動吻動物の一種、コマツトゲカワのマイクロ CT 解析 Joint events of the 22nd International Congress of Zoology and the 87th meeting of Zoological Society of Japan. 国際動物学会 2016.11.17 沖縄 (ポスター発表)

大学院生命理学研究科

博士前期課程

桑原健太：原始的脊索動物ホヤ幼生視細胞の光信号伝達系

桑田 舞：腸神経細胞の多様性獲得機構の解明

科学研究費補助金等

- 1 日本学術振興会科学研究費補助金 (平成 28~30 年度) 基盤研究 (C) 課題番号 16K06998
研究課題 単純な脊椎動物の腸神経系機能の可視化と光遺伝学による腸運動の制御
研究代表者 八田公平
共同研究者 二階堂昌孝
共同研究者 中川将司
- 2 日本学術振興会科学研究費補助金 (平成 26~29 年度) 挑戦的萌芽研究 課題番号 26650122
研究課題 光遺伝学と単一細胞光刺激装置を用いて、ホヤ幼生中枢神経回路の機能解析
研究代表者 中川将司