

I 脳と腸の機能発生の、ゼブラフィッシュをモデルとした、光遺伝学およびイメージング解析

Optogenetic and imaging analyses of development and function of the brain and gut in the zebrafish

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。現在は、主として Cre 組み替え技術や光転換蛍光蛋白質 Kaede や KikGR 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より解析を進めている。

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思われる。私達は、腸の蠕動運動に伴う平滑筋、神経細胞、ペースメーカー細胞での GCaMP3 を用いたカルシウム動態の可視化に成功し、蠕動反射と徐波に由来するの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、ChR2 を用いた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。

II ゼブラフィッシュ腸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 enteric 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 SPring-8 におけるマイクロ CT と X 線ライブイメージング : A. 古代魚における第 2、第 3 の顎の形態と進化の解析, B. 乾燥耐性生物の細胞小器官の相関顕微鏡解析

A. Synchrotron microCT and live imaging analysis of the second and third jaws in ancient fish by using SPring-8; B. High resolution phase-contrast mCT and correlative microscopic analysis of organelle in Tardigrada under anhydrobiosis

八田公平・二階堂昌孝
Hatta K, Nikaido M

多くの魚は口にある顎 (口腔顎: 第 1 の顎) のほかに、のどに咽頭顎 (第 2 の顎) をもっている。今年度は、スポットドガー、ポリプテルス、ハイギョなどの古代魚、シルバーアロワナやバタフライフィッシュなど舌に歯 (第 3 の顎) をもつもの、また、ベニイロカエルアンコウなど特徴的な形態を持つものについて、それぞれのもつ複数の顎の形態と摂食時における特徴的な運動様式を、SPring-8 におけるマイクロ CT や高速 X 線ライブイメージングによって捉えることに成功した。

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成功している。

V SERS ナノビーコンを用いた ゼブラフィッシュの *in vivo* イメージング

In vivo live-imaging of zebrafish with SERS nano-beacon

八田公平・二階堂昌孝
Hatta K, Nikaido M

粒子径約 50nm の金ナノ粒子コロイドにレポータ分子 4,4'-bipyridine を加えて金ナノ粒子自己集合体をつくり、これをゼブラフィッシュ幼生の脳室に注入し、Thermo Scientific DXR2xi イメージング顕微ラマン（785nm, 35mW）を用いて、10 μ m ピクセルごとに露光時間 300Hz でラマンスペクトルを取得した。その結果、約 4 分間で金ナノ粒子自己集合体が脳室の中に局在していることが、1610 cm^{-1} (897nm)のイメージング像によって示された。将来的に、生体内の腸において抑制的な神経伝達物質としての役割を担う一酸化窒素 (NO) の動態を高感度の表面増強ラマン散乱 (SERS) をナノビーコンとして検出することを目指している。(高度研 福岡隆夫氏、山口明啓氏らとの共同研究)

発表論文 List of Publications

- I-1 Shin-ichi Okamoto & Kohei Hatta : Ca^{2+} -imaging and photo-manipulation of the simple gut of zebrafish larvae *in vivo*. 10th European Zebrafish Meeting, 2017 年 7 月 3-7 日 Budapest, Hungary (ポスター)
- I-2 岡本 晋一、 〇八田公平 ゼブラフィッシュ幼生の単純な腸の生体内カルシウムイメージングと光操作 第 50 回 日本発生生物学学会 2017 年 5 月 10-13 日 船堀、東京 (口頭発表)
- I-3 〇八田公平、岡本 晋一 ゼブラフィッシュ幼生の単純な腸における蠕動運動の Ca^{2+} イメージングおよび光遺伝学解析 第 40 回 日本神経科学大会 (Neuroscience 2017) 2017 年 7 月 20-23 日 幕張、東京 (口頭発表)
- I-4 岡本 晋一、高御堂 大慈、西田 さやか、兒島 卓也、二階堂 昌孝、〇八田 公平 ゼブラフィッシュ幼生の単純な腸のカルシウムイメージングと光遺伝学解析 生命科学系学会合同年次大会 (ConBio2017 第 40 回日本分子生物学学会年会) 2017 年 12 月 3-6 日 神戸 (ポスター)
- I-5 〇高御堂 大慈、西田 さやか、兒島 卓也、二階堂 昌孝、岡本 晋一、八田 公平 ゼブラフィッシュ幼生の腸の運動と関連して活動する細胞の同定 生命科学系学会合同年次大会 (ConBio2017 第 40 回日本分子生物学学会年会) 2017 年 12 月 3-6 日 神戸 (ポスター)
- I-6 馬場 俊平、〇青木 滯、井上 智裕、東 毅、角本 貴進、池永 隆徳、二階堂 昌孝、八田 公平 ゼブラフィッシュのマウスナー細胞を抑制する GABA 作動性ニューロンのシナプスの解析 生

- 命科学系学会合同年次大会 (ConBio2017 第40回日本分子生物学会年会) 2017年12月3-6日 神戸 (ポスター)
- II-1 Nikaido, M., Izumi, S., Ohnuki, H. (埼玉大), Takigawa, Y., Yamasu, K. (埼玉大) and Hatta, K. Early development of the enteric nervous system visualized by using a new transgenic zebrafish line harboring a regulatory region for choline acetyltransferase a (chata) gene. *Gene Expression Patterns*. vol. 28 p12-21. (2018). 査読あり
- II-2 Nikaido, M., Acedo, JN. (Stowers Institute), Hatta, K. and Piotrowski T. (Stowers Institute) Retinoic acid is required and Fgf, Wnt, and Bmp signalling inhibit posterior lateral line placode induction in zebrafish. *Developmental Biology*. vol.431(2) p215-225. (2017). 査読あり
- II-3 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). 査読あり
- II-4 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). 査読あり
- II-5 ○二階堂 昌孝、泉 早紀、大貫 穂乃佳、瀧川 雄基、弥益 恭、八田 公平 コリンアセチルトランスフェラーゼ調節領域を使用した遺伝子導入魚による腸神経系の初期発生過程の可視化 第40回 日本神経科学大会 (Neuroscience 2017) 2017年7月20-23日 幕張、東京 (口頭発表)
- II-6 ○桑田 舞、八田 公平、二階堂 昌孝 迷走神経堤の可視化による腸神経分化過程の細胞動態の解明 第40回 日本神経科学大会 (Neuroscience 2017) 2017年7月20-23日 幕張、東京 (ポスター)
- II-7 ○大野 真理愛、堀内 奈津美、二階堂 昌孝、八田 公平 ゼブラフィッシュを用いた腸神経系傷害後の機能回復機構の解明 生命科学系学会合同年次大会 (ConBio2017 第40回日本分子生物学会年会) 2017年12月3-6日 神戸 (ポスター)
- II-8 ○桑田舞、大野 真理愛、青木滯、兒島卓也、古森大樹、高御堂大慈、西田さやか、本多美瑛、二階堂昌孝、中川将司、八田公平 2つの脳の作り方：～いろいろな色の光と遺伝子による挑戦～ 知の交流シンポジウム 2017年9月19日 神戸 (ポスター)
- III-1 桑原 健太、杉本 健太郎、○中川 将司 ホヤ幼生視細胞の光信号伝達系 第88回 日本動物学会 2017年9月21日 富山 (口頭発表)
- IV-1 ○八田公平、○古森大樹 身近にいるエイリアン？ 魚がかくし持つ第2のあごのなぞを SPring-8 でときあかす やさしいサイエンスセミナー 播磨科学公園都市まちびらき 20周年記念事業 2017年10月29日 光都オプトピアシアター 赤穂 (口頭発表)
- IV-2 Taiki Komori, Saki Shiimoto, Shota Nomura, Kenta Kuwabara, Tomohiro Inoue, Takanori Ikenaga (鹿児島大), Kentaro Uesugi (JASRI), Masato Hoshino (JASRI), Masataka Nikaido, Mai Kuwata, Maria Ohno, Mio Aoki, Takuya Kojima, Daiji Takamido, Sayaka Nishida, Mie Honda, & ○Kohei Hatta. Synchrotron mCT and live-imaging analysis of pharyngeal jaws of ancient fish, arowana, gar, polypterus and lungfish, in feeding. The Joint Symposium between The 2nd Brain Research Institute Monash University of Toyama International Symposium 'Recent Updates on Neurobehavioral

Studies and The 12th Domestic Symposium on Behavior and Nervous System in Aquatic Animals' 富山 2017年12月16-17日 (口頭発表)

- IV-3 清家 奈央, 桑原 健太, 福田 恭子, 仲宗根 爽乃, 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, 米村 重信, 西野 有理, 野間 有加里, 宮沢 淳夫, 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組織・細胞・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 3D 解析 第2回クマムシ学研究会 2017年8月5日 東京大学本郷キャンパス (口頭発表)
- V-1 ○福岡 隆夫 (高度研、アーカイラス)、二階堂 昌孝、山口 明啓 (高度研)、春井 里香 (サーモフィッシャーサイエティフィック (株))、奈良 明司 (サーモフィッシャーサイエティフィック (株))、内海 裕一 (高度研)、八田 公平 SERS ナノビーコンを用いたゼブラフィッシュの *in vivo* イメージング。日本分析化学会 第66年会 2017年9月10日 東京 (口頭発表)

大学院生命理学研究科

博士前期課程

- 桑田 舞：腸神経細胞の多様性獲得機構の解明
大野 真理愛：腸神経系の再生機構の研究

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