

I ゼブラフィッシュを主なモデルとした 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 and other model animals

八田公平・日下部岳広・中川将司
Hatta, K., Kusakabe, T., Nakagawa, M.

ゼブラフィッシュは胚が透明で発生がはやく遺伝学的手法に優れた、ヒトをふくむ脊椎動物のモデルである。特定波長の光によって蛍光色に変化する蛍光蛋白質を発現させ、脳や神経回路が、生きた個体の中で、どのように発生するかを共焦点4次元イメージングによって調べた。特に私たちによっ
てはじめて発見された右と左の脳を行き来する特殊な神経細胞群について詳しい解析をおこなった。
また、特定波長の光によって神経細胞の興奮性を制御できるトランスジェニックゼブラフィッシュの
作成に成功した。光遺伝学的解析によって、コリンと GABA/グリシン作動性神経細胞のホヤ幼生の
遊泳運動における役割を調べた。一方、組織間相互作用によって複雑な器官形成を行う神経堤細胞に
ついて、ゼブラフィッシュとメダカの咽頭歯の構造と運動を SPring-8 における高解像度マイクロ CT
によって解析し、両者が全く異なる立体構造を持つ事を明らかにした。今後、細胞と分子レベルにおい
て器官の多様性を生み出す謎を明らかにしたい。

II ホヤをモデルとした神経系の発生と機能の研究

Nervous system development and function in the ascidian larva

日下部岳広・中川将司・八田公平
Kusakabe, T., Nakagawa, M., Hatta, K.

ホヤは脊椎動物と同じ脊索動物門に属し、脊椎動物と近縁な動物である。ホヤ幼生の神経系は細胞
の数が少なく単純な構造にもかかわらず、脊椎動物の神経系と基本的な構造が共通であり、脊椎動物
の複雑な神経系の発生機構および生理機構を理解するうえで優れたモデルとなる。ホヤ幼生の運動制
御に関わる神経回路およびそこで使われる神経伝達物質を明らかにすることを目的として、神経回路
網の解明と、人工的に神経細胞の活動を制御する新しい手法を用いた神経細胞の機能解析を行って
いる。グルタミン酸作動性細胞、GABA 作動性細胞、コリン作動性細胞などに特異的なプロモーター
を利用して、個々の細胞が用いる神経伝達物質同定し、神経接続パターンを可視化した。

神経系の機能を明らかにするには、生理学的研究が必要である。しかし、ホヤ幼生の細胞は小さく、体全体が被囊で覆われているため、電気生理学的手法が極めて困難である。そこで、光学的手法の適用を試みた。光照射により開閉を制御することが可能な陽イオンチャンネルおよびクロライドポンプをこれらのプロモーターの制御下でホヤ幼生の神経細胞に発現させ、個体そのままの状態での神経細胞の活性を人工的に制御することに成功した。一方、Ca²⁺指示タンパク質カメレオンをホヤ幼生の筋肉や神経細胞に発現させ、筋肉や神経の活動を計測することも可能になった。

また、神経系の形成機構を明らかにする目的で、ホヤ幼生の神経細胞サブタイプで特異的に発現する遺伝子の発現制御機構を解析している。コンパクトなホヤゲノムの特徴を活かして比較ゲノム解析を行うことにより、シス調節配列を効率よく推定し、神経細胞サブタイプ特異的な遺伝子発現に関わる転写因子を特定することに成功した。

発表論文 List of Publications

- I-1 Mariko Itoh, Kyohei Fujita & Kohei Hatta: A sleep disorder in zebrafish: analysis of a population that spawn before dawn. Reports of graduate school of material science and graduate school of life science, University of Hyogo 19 [2008]:19-28 (2009)
- I-2 Tamami Yamamoto, Keisuke Yoshida, Takuto Hashimoto, Hidetoshi Takano, Yasushi Kagoshima, Kentaro Uesugi (JASRI), Akihisa Takeuchi (JASRI), Yoshio Suzuki (JASRI), Mariko Itoh, Erika Isoda, Sohei Nakayama, Moly Pricila Khan & Kohei Hatta: X-ray imaging by refraction-enhanced micro-tomography reveals developing teeth and brain of zebrafish and medaka in three dimension. 8th International Meeting on Zebrafish Development and Genetics, Wisconsin U.S.A. (2008)
- I-3 Kohei Hatta: Four-dimensional imaging analyses of brain morphogenesis and neural network formation in vertebrates. GCOE 国際シンポジウム “Structure Biology from Atoms to Tissues” 2009年3月25日、先端科学技術支援センター、赤穂
- I-4 八田公平・磯田恵里佳・山本珠実・伊藤真理子・中山創平・Pricila Khan Moly: 脊椎動物における形態形成の生体イメージング解析：左右の脳の境界を越えて移動する神経、神経上皮と神経堤細胞。2008年5月27日、第41回日本発生生物学会、徳島
- I-5 山本珠実・吉田圭佑・橋本琢人・竈島靖・上杉健太郎 (JASRI) ・竹内晃久 (JASRI) ・鈴木芳生 (JASRI) ・伊藤真理子・磯田恵里佳・八田公平: Imaging by high resolution phase contrast X-ray computed micro-tomography reveals 3D structures of developing teeth and brain in zebrafish. and medaka. 2008年5月28日 第41回日本発生生物学会 徳島
- I-6 八田公平: 脳や神経はどのようにしてつくられるか? 高校生のためのサマーサイエンスセミナー 2008年8月11日 財団法人高輝度光科学研究センター、兵庫県立大学、財団法人ひょうご科学技術協会主催 播磨科学公園都市
- I-7 山本珠美・八田公平 「チャンネルロドプシン2を用いた、脊椎動物における、行動を制御する神経回路と筋肉機能の研究」第14回小型魚類研究会、2008年9月21日、岡崎
- I-8 伊藤真理子・磯田恵里佳・山本珠実・Moly Pricila Khan・中山創平・藤田恭平・松下淑恵・

- 山崎権彦・田島一剛・八田公平：脳や神経回路はどのようにしてつくられるか？ ヒトのモデルとしてのゼブラフィッシュを用いた研究の現在と未来。兵庫県立大学シンポジウム一産学共生への挑戦—はりま産学交流会産学パートナーシップ 2008年9月22日 姫路商工会議所
- I-9 八田公平・磯田恵里佳：脊椎動物の左右脳形成における神経細胞群の新規移動メカニズムとその機能。2008年11月26日 兵庫県立大学研究発表会 神戸学園都市キャンパス 三木記念講堂
- I-10 磯田恵里佳・八田公平：右脳と左脳の境界を通り移動する神経細胞の同定。2008年12月9日、BMB2008（第31回に本分子生物学会年会、第81回日本生化学会大会合同大会）神戸ポートアイランド
- I-11 中山創平・山本珠実・藤田恭平・Moly Pricila Khan・八田公平：歯を形成する組織間相互作用の解析 - 硬骨魚類をモデルとして形態、数、配置の違いの謎に迫る。 - 生命科学系 GCOE ネットワーク・フォーラム2009 2009年2月14日東京大学
- II-1 Horie, T., Kusakabe, T., and Tsuda, M.: Glutamatergic networks in the *Ciona intestinalis* larva. *J. Comp. Neurol.* 508 (2), 249-263 (2008)
- II-2 Horie, T., Sakurai, D., Ohtsuki, H., Terakita, A., Shichida, Y., Usukura, J., Kusakabe, T., and Tsuda, M.: Pigmented and nonpigmented ocelli in the brain vesicle of the ascidian larva. *J. Comp. Neurol.* 509 (1), 88-102 (2008)
- II-3 Sakai, T., Aoyama, M., Kusakabe, T., Tsuda, M., and Satake, H.: Functions of a GnRH receptor heterodimer of the ascidian *Ciona intestinalis*. *Acta Biol. Hung.* 59 (Suppl.), 241-243 (2008)
- II-4 Dong, B., Horie, T., Denker, E., Kusakabe, T., Tsuda, M., Smith, W. C., and Jiang, D.: Tube formation by complex cellular processes in *Ciona intestinalis* notochord. *Dev. Biol.* 330 (2), 237-249 (2009)
- II-5 Horie, T., Nakagawa, M., Sasakura, Y., and Kusakabe, T. G.: Cell type and function of neurons in the ascidian nervous system. *Dev. Growth Differ.* 51 (3), 207-220 (2009)
- II-6 Vandebon, A., Miyamoto, Y., Takimoto, N., Kusakabe, T. and Nakai, K.: Markov chain-based promoter structure modeling for tissue-specific expression pattern prediction. *DNA Res.* 15 (1), 3-11 (2008)
- II-7 Koki Nishitsuji, Takeo Horie, Yuki Morimoto, Yuki Miyamoto, Yasunori Sasakura, and Takehiro G. Kusakabe: Identification and characterization of a *cis*-regulatory module required for specific gene expression in a subset of GABA/glycinergic neurons of the *Ciona intestinalis* larva、日本発生生物学会第41回大会、2008年5月28-29日 徳島県郷土文化会館
- II-8 Yuki Morimoto, Takeo Horie, Yasunori Sasakura, and Takehiro G. Kusakabe: Ontogeny of glutamatergic, GABA/glycinergic, and cholinergic neurons in the *Ciona intestinalis* larva、日本発生生物学会第41回大会、2008年5月28-29日 徳島県郷土文化会館
- II-9 Takako Suzuki, Takeo Horie, Koki Nishitsuji, Yasunori Sasakura, and Takehiro G. Kusakabe: Ci-POU-IV, a POU domain transcription factor, is required for

- development of epidermal glutamatergic neurons in the *Ciona intestinalis* larva、日本発生生物学会第41回大会、2008年5月28-29日 徳島県郷土文化会館
- II-10 A. F. M. Tariqul Islam, Pricila Khan Moly, Yuki Miyamoto, and Takehiro G. Kusakabe: Roles of hedgehog signaling in *Ciona intestinalis* development: insights from *hedgehog* and *Gli* expression and cyclopamine treatment、日本発生生物学会第41回大会、2008年5月29-30日 徳島県郷土文化会館
- II-11 Koki Nishitsukji, Takeo Horie, Yuki Morimoto, Yuki Miyamoto, Yasunori Sasakura, and Takehiro G. Kusakabe: Identification and characterization of a *cis*-regulatory module required for specific gene expression in a subset of GABA/glycinergic neurons of the *Ciona intestinalis* larva. Joint meeting of the Société Française de Biologie du Développement / Japanese Society of Developmental Biologists、2008年9月13-17日 GIENS (FRANCE)
- II-12 Takehiro Kusakabe: Gene Regulatory Mechanisms underlying the Determination of Neuronal Identity in the Ascidian Larva、The 16th CDB Meeting: Cis-sequence Regulation and its Evolution、2008年9月29-10月1日 理研CDB (神戸)
- II-13 A. F. M. Tariqul Islam・加藤裕美子・日下部岳広: DiI標識とレーザー細胞破壊によるカタユウレイボヤ幼生の光受容細胞の細胞系譜解析、日本動物学会第79回大会、2008年9月7日 福岡大学七隈キャンパス
- II-14 西辻光希・寺嶋泰子・堀江健生・吉田麗子・池田洋子・Nicolas Sierro・中井謙太・日下部岳広: カタユウレイボヤ神経系特異的遺伝子の転写調節領域の大規模解析、日本動物学会第79回大会、2008年9月7日 福岡大学七隈キャンパス
- II-15 瀧本紀子・Minghao Jin・日下部岳広・津田基之: ホヤにおける視覚サイクル機構、日本動物学会第79回大会、2008年9月7日 福岡大学七隈キャンパス
- II-16 中川将司・深野天・堀江健生・笹倉靖徳・宮脇敦史: 明暗刺激によるホヤ幼生筋肉のCa²⁺変化、日本動物学会第79回大会、2008年9月5日 福岡大学七隈キャンパス
- II-17 日下部岳広・笹倉美幸・西辻光希・寺嶋泰子・九鬼裕子・宮本由紀・堀江健生・津田 基之: ホヤ幼生の神経発生におけるOtxとPax2/5/8の役割、第31回日本神経科学大会、2008年9月7日 東京国際フォーラム
- II-18 酒井翼・青山雅人・日下部岳広・津田基之・佐竹炎: ホヤGnRH受容体ヘテロダイマーのリガンド特異的なERKリン酸化シグナル伝達経路、日本動物学会第79回大会、2008年9月5日 福岡大学七隈キャンパス
- II-19 酒井翼・青山雅人・日下部岳広・津田基之・佐竹炎: ホヤGnRH受容体とオーファン受容体のヘテロダイマー形成によるリガンド特異的なシグナル伝達調節. 第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会合同大会、2008年12月12日 神戸ポートアイランド

大学院生命理学研究科

博士後期課程

A. F. M. Tariqul Islam : 神経系におけるパターン形成機構の解析

Moly Pricila Khan : ゼブラフィッシュの運動を制御する神経回路の形成機構の解析

博士前期課程

西辻光希 : ニューロン型特異的転写制御機構の解析

森元熊紀 : ホヤ幼生のニューロンネットワークの解明

伊藤真理子 : トランスジェニックゼブラフィッシュを用いた睡眠とストレスの研究

山本珠美 : 脳の機能と構造を解析するための新しい技術の開発

磯田恵里佳 : 左右の脳を移動する特殊な神経細胞群の研究

勝本真平 : ホヤ幼生の左右非対称性

松永 誠 : ホヤ幼生神経における小胞型トランスポータのシナプス小胞移行

科学研究費補助金等

1 ひょうご科学技術協会研究助成 (平成 20 年度)

研究課題 特定波長の光によって蛍光色や機能が変化する蛋白を用いた神経回路網形成過程の解析

研究代表者 八田公平

2 日本学術振興会科学研究費補助金 (平成 18-20 年度) 基盤研究(B) 課題番号 18370089

研究課題 ホヤ神経系の細胞型を規定する転写制御ネットワークの解明

研究代表者 日下部岳広

3 日本学術振興会科学研究費補助金 (平成 20-21 年度) 萌芽研究 課題番号 20657018

研究課題 中枢神経系と筋細胞における **GnRH** の新奇な生理機能

研究代表者 日下部岳広

4 日本学術振興会科学研究費補助金 (平成 20-22 年度) 基盤研究(B) 課題番号 20310115

研究課題 ホヤゲノムにコードされる小分子 **RNA** の包括的探索

研究分担者 日下部岳広

5 文部科学省科学研究費補助金 (平成 17-21 年度) 特定領域研究 課題番号 17018018

研究課題 脊椎動物起源の研究

研究分担者 日下部岳広