

## 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  
Hatta, K., Ikenaga, T

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。さらに、カルシウム指示タンパク質 GCamp3 をゼブラフィッシュの胚に発現させ、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。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ことによる、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おり、後交連を通して脳の反対側へと移動する神経細胞の移動中のパターンや移動後の分布などについて詳細な解析を行った。

## 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

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にもかかわらず、その基本構造は脊椎動物のものと共通している。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。また Ca<sup>2+</sup>指示タンパク質カメレオン及び GCAMP3 発現させ、神経細胞の興奮応答を計測すると共に、光によって神経活動を制御できるチャンネルロドプシンやハロドプシンを用いて、特定の神経の活動と行動との関係を調べている。周期的に発火する神経細胞を見

つけた。

ホヤ幼生は右側にのみ視細胞が存在する。左右非対称が生じる機構について研究を行い、発生過程で胚が回転することが、左右非対称性形成に重要であることを見出した。

## 発表論文 List of Publications

- I-1 Moly PK, Hatta K : Early glycinergic axon contact with the Mauthner neuron during zebrafish development. *Neuroscience Research*. 70: 251-259. (2011)
- I-2 Ikenaga T, Urban JM (NIH), Gebhart N (University of Florida), Hatta K, Kawakami K (国立遺伝学研究所), Ono F (NIH) : Formation of spinal network in zebrafish determined by domain-specific *Pax* genes. *Journal of Comparative Neurology*. 519: 1562-1579. (2011)
- I-3 Nakayama S, Ikenaga T, Kawakami K (国立遺伝学研究所), Ono F (NIH), Hatta K. 2012. 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.
- I-4 Ikenaga T, Murakami Y, Nagata A, Takeuchi A (JASRI), Uesugi K (JASRI), Suzuki Y (JASRI), Hatta K : X-ray micro-tomography for observation of three-dimensional structure of the zebrafish brain with single cell resolution, 8<sup>th</sup> International Comparative Physiology and Biochemistry. (Nagoya, 2011年5月)
- I-5 Hatta K, Yamasaki N, Someya Y, Okada M, Matsui S, Matsushita Y, Itoh M, Yamamoto T : Altering neural network by blocking axonal navigation with nano-microstructure during zebrafish development. 7<sup>th</sup> European Zebrafish Meeting. (Edinburgh, Scotland, 2011年6月)
- I-6 Park JY (NIH), Ikenaga T, Ono F (NIH): Time-lapse observation of synapse formation in vivo revealed that rapsyn transport and clustering requires acetylcholine receptors, 7<sup>th</sup> European Zebrafish Meeting. (Edinburgh, 2011年6月)
- I-7 Nakajima Y, Hatta K : Axonal navigation of neurons whose somas are located in the 4<sup>th</sup> segment of hindbrain in a zebrafish embryo. Images and Movies Session, CDB-QBiC ジョイントシンポジウム (2011年6月)
- I-8 Nakayama S, Kamihagi C, Ikenaga T, Kawakami K (国立遺伝学研究所), Hatta K : The observation of craniofacial cartilages and a single floor plate cell using a Gal4-enhancer trap line, 小型魚類研究会 (三島、2011年9月)
- I-9 Hatta K, Okamoto S, Nakagawa M, Ikenaga T, Yamamoto T, Nakajima Y, Itoh M : Imaging of structure, development and function of nervous system in a simple vertebrate, 第49回日本生物物理学会 (姫路、2011年9月)
- I-10 牛村英里 : 現世のサメ類における鋸歯縁の構造と形成、第4回顎顔面の器官発生・形態形成研究会 (長野県北佐久郡、2011年10月)
- I-11 Nakayama S, Ikenaga T, Kawakami K (国立遺伝学研究所), Hatta K : A Gal4 enhancer trap line useful to study morphogenesis of craniofacial perichondrial cells, floor plate and dorsal midline radial gila in the zebrafish larva, 2011 American Society of Cell Biology Meeting. (Denver, USA, 2011年12月)
- I-12 牛村英里・後藤仁敏 (鶴見大短大) ・下田信治 (鶴見大歯) ・八田公平 : サメ類における鋸歯縁の構造と形成、第161回日本古生物学会例会 (群馬県、2012年1月)

- I-13 Ikenaga T, Nagata A, Murakami Y, Hatta K: X-ray micro-tomography for observation of three-dimensional structure of the zebrafish brain with single cell resolution. Formation and function of brain networks : From genes to behaviour. (Nagoya, 2012 年 1 月)
- II-1 Nishitsuji, K., Horie, T. (筑波大学), Ichinose, A. (甲南大学), Sasakura, Y. (筑波大学), Yasuo, H. (UPMC University of Paris 06), and Kusakabe, T.G. (甲南大学) : Cell lineage and cis-regulation for a unique GABAergic/glycinergic neuron type in the larval nerve cord of the ascidian *Ciona intestinalis*. *Dev. Growth Differ.* 54, 177-186. (2012)
- II-2 Ogura Y. (筑波大学), Sakaue-Sawano A. (理研 BSI), Nakagawa M., Satoh N.(OIST), Miyawaki A. (理研 BSI), and Sasakura Y. (筑波大学) : Coordination of mitosis and morphogenesis: Role of a prolonged G2 phase during chordate neural tube closure. 発生物学学会 (宜野湾、2011 年 5 月)
- II-3 Nakagawa M., Fukano T. (理研 BSI), Horie T. (筑波大学), Sasakura, Y. (筑波大学) and Miyawaki, A. (理研 BSI) : Physiological study of ascidian tail muscle. 8th International Congress of Comparative Physiology and Biochemistry. (名古屋、2011 年 7 月)
- II-4 Nakagawa M., Fukano T. (理研 BSI), Horie T. (筑波大学), Sasakura, Y. (筑波大学) and Miyawaki, A. (理研 BSI) : Ca<sup>2+</sup> imaging of *Ciona* larval muscles, photoreceptors and neurons. 6th International Tunicate Meeting. (Montreal Canada, 2011 July)
- II-5 Nishitsuji, K., Ichinose, A., Horie, T., Sasakura, Y., Yasuo, H. (UPMC University of Paris 06), Kusakabe, T.G. : Specification and differentiation of a GABAergic/glycinergic neuron subtype in the *Ciona intestinalis* larva. 6th International Tunicate Meeting. (Montreal Canada, 2011 July)
- II-6 中川将司・深野 天 (理研 BSI) ・堀江健生 (筑波大学) ・笹倉靖徳 (筑波大学) ・宮脇敦史 (理研 BSI) : ホヤ胚での神経活動、日本動物学会第 82 回大会 (旭川 2011 年 9 月)
- II-7 西辻光希・一瀬 葵 (甲南大学) ・堀江健生 (筑波大) ・笹倉靖徳 (筑波大) ・安尾仁良 (UPMC University of Paris 06) ・日下部岳広 (甲南大学) : ホヤ幼生の GABA / グリシン作動性神経細胞の細胞系譜と細胞特異的転写制御機構の解析、日本動物学会第 82 回大会 (旭川、2011 年 9 月)
- II-8 一瀬 葵 (甲南大学) ・西辻光希・堀江健生・宮本由紀 (甲南大学) ・日下部岳広 (甲南大学) : ホヤ幼生の GABA/グリシン作動性神経細胞形成における転写因子 SoxB1 の役割、日本動物学会第 82 回大会 (旭川、2011 年 9 月)
- II-9 Nishitsuji, K., Horie, T. (筑波大), Hayashibara, K. (甲南大学), Suzuki, T. (名古屋大), Sasakura, Y. (筑波大), and Kusakabe, T.G. (甲南大学) : Transcriptional regulation underlying the differentiation of glutamatergic neurons in the *Ciona intestinalis* larva. International Symposium Genetic Regulation of Development Commemorative of 27th International Prize for Biology. (京都、2011 年 11 月)
- II-10 Ichinose, A. (甲南大学), Nishitsuji, K., Horie, T. (筑波大), Sasakura, Y. (筑波大), Yasuo, H. (UPMC University of Paris 06), and Kusakabe, T.G. (甲南大学) : Cell lineage and transcriptional regulation for a GABAergic/glycinergic neuron subtype in the ascidian larva. International Symposium Genetic Regulation of Development Commemorative of 27th International Prize for Biology. (京都、2011 年 11 月)
- II-11 Nishitsuji K., Horie, T. (筑波大), Hayashibara K. (甲南大学), Suzuki, T. (名古屋大), Sasakura, Y. (筑波大), and Kusakabe, T.G. (甲南大学) : Regulation and specification mechanisms of glutamatergic neurons during development of the larval nervous system of the ascidian *Ciona intestinalis*. 第 34 回日本分子生物学会年会 (横浜、2011 年 12 月)

- II-12 一瀬 葵 (甲南大学)・西辻光希・堀江健生 (筑波大)・安尾仁良 (UPMC University of Paris 06)・日下部岳広 (甲南大学) : カタユウレイボヤ幼生の GABA / グリシン作動性神経細胞の細胞系譜と特異的転写調節機構の解析、第 34 回日本分子生物学会年会 (横浜、2011 年 12 月)
- II-13 中川将司 : 脊椎動物のミニチュア版神経系をもつホヤ幼生の生理学、第 4 回甲南大学シンポジウム「最新の分子生理学がひもとく生命の原理」 (神戸、2012 年 1 月)

## 大学院生命理学研究科

### 博士後期課程

- 中山創平 : フローアプレートや頭部骨格の研究に役立つ Gal4 トランスジェニックゼブラフィッシュの解析
- 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
- 西辻光希 : ニューロン型特異的転写制御機構の解析
- 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

- 中島洋平 : IR-LEGO 顕微鏡を用いた局所的な遺伝子発現誘導
- 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<sup>2+</sup>上昇波の研究
- 牛村英里 : サメの鋸歯の形成機構

## 科学研究費補助金等

### 1 兵庫県立大教育助成

研究課題 化石および現世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と摂食行動の X 線解析

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 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