

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・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。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、様々な硬骨魚類の咽頭歯の形態と機能を解析した。またこの際に発展させた技術を用いて、乾燥状態の緩歩動物の内部構造の観察などへの応用も試みている。当該年度より新たに二階堂昌孝助教が加わった。当研究室では、神経堤由来の細胞・組織の形成を司る分子機構の解明をテーマとして研究を進める予定である。具体的には、多種、多数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である。この目的のため、現在は、腸神経の重要な神経細胞種であるコリン作動性、一酸化窒素作動性の神経細胞を発生期に見分けるためのマーカーとなる遺伝子や、これらを蛍光タンパク質で標識するための遺伝子導入魚を作成中である。また、腸神経細胞の幹細胞の探索や、そこから神経細胞を生じるメカニズムについても解析する計画である。

II 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

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。

発表論文 List of Publications

- I-1 Moly PK, Ikenaga T, Kamihagi C, Islam AF, Hatta K. Identification of initially appearing glycine-immunoreactive neurons in the embryonic zebrafish brain. *Dev Neurobiol.* 74:616-632 (2014)
- I-2 Okamoto S, Nakagawa M, Hatta K. Stochastic Ca²⁺ waves that propagate through the neuroepithelium in limited distances of the brain and retina imaged with GCaMP3 in zebrafish embryos. *Zoolog Sci.* 30:716-723 (2013)
- I-3 Aigler SR (コロラド大学), Jandzik D (コロラド大学), Hatta K, Uesugi K (JASRI), Stock DW (コロラド大学). Selection and constraint undelie irreversibility of tooth loss in cypriniform fishes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 111:7707-7712 (2014)
- I-4 八田公平・伊藤真理子・上萩ちひろ「ゼブラフィッシュを用いたオプトジェネティクス研究：多段階光遺伝学と単一細胞光遺伝学へ」p. 514-159 「オプトジェネティクスー光工学と遺伝学による行動制御技術の最前線」エヌティーエス出版 (2013)
- I-5 上萩ちひろ・八田公平 単細胞での光遺伝学：ゼブラフィッシュにおいてマウスナー細胞のみを興奮させたときに誘導される C 型逃避行動の解析 日本神経生物学会 (Neuro2013) 京都 2013 年 6 月 20 日～23 日 (ポスター)
- I-6 Itoh M & Hatta K. Multi-stepped optogenetics: Infrared laser mediated local expression of ChR2 to visualize neural circuits involved in animal behaviors in zebrafish larvae. 8th European Zebrafish Meeting 9-13 July, 2013 Barcelona, Spain (口頭発表)
- I-7 八田公平 「SPRING-8 における X 線顕微鏡：動物組織器官と行動の高解像度 CT および高速ライブ動画解析」日本顕微鏡学会関西支部会議ならびに支部特別講演会 2013 年 9 月 7 日 姫路 (招待講演)
- I-8 八田公平 「ゼブラフィッシュにおける囊胚形成」JT 生命誌研究館 20 周年記念 BRH シンポジウムシリーズ、かたちまつり 3 ～脊椎動物の原腸形成運動は似ているのか？高槻 2013 年 10 月 12 日 (招待講演)
- I-9 垣口 貴沙・大久保 真里・森川 作志・杉山 央未・岡本 晋一・伊藤 真理子・八田 公平・米村 重信 「乾眠状態のヨコヅナクマムシの電子顕微鏡解析：固定、包埋の条件検討」日本細胞生物学会 2013 年 6 月 19～21 日 (ポスター／口頭発表) 岡本 発生生物学会
- I-10 Nikaido M, Law EW (英国バース大学) and Kelsh RN (英国バース大学). A systematic survey of expression and function of zebrafish frizzled genes. *PLoS One.* 8(1) e54833. (2013).
- I-11 Nikaido M, Alexander R (米国ストワーズ医学研究所) and Piotrowski T (米国ストワーズ医学研究所). The origin of stem and progenitor cells in the zebrafish lateral line primordium. (第 46 回日本発生生物学会 松江 2013 年 5 月 28～31 日)
- I-12 八田公平・岡本晋一 「NHK 総合 ためしてガッテン」 生体内での腸のカルシウムイメージングの紹介 2014 年 3 月 12 日 (出演)

- II-1 Katsumoto, S. Hatta K. and Nakagawa, M. Brief hypo-osmotic shock causes test cell death, prevents neurula rotation, and disrupts left-right asymmetry in *Ciona intestinalis*. *Zool Sci.* 30: 352-359 (2013)
- II-2 Horie, T. (筑波大), Ohkura, M. (埼玉大), Nakai, J. (埼玉大), Nakagawa, M.: “In vivo calcium imaging of neural circuit for swimming locomotion of the ascidian larva” 日本比較生理生化学会第 35 回大会 (姫路 2013 年 7 月)
- II-3 中川将司: カタユウレイボヤ幼生の Ca^{2+} イメージング 第 33 回ホヤの生物学談話会 (岡山 2013 年 9 月)
- II-4 Katsumoto S., Hatta, K., Nakagawa, M.: “Brief hypo-osmotic treatment on eggs disrupts the left-right asymmetry of the larvae in *Ciona intestinalis*.” 第 51 回日本生物物理学会年会 (京都 2013 年 10 月)
- II-5 堀江 健生 (筑波大) ・大倉 正道 (埼玉大) ・中井 淳一 (埼玉大) ・中川 将司: ホヤ幼生の遊泳運動神経回路の in vivo Ca^{2+} イメージング 第 36 回分子生物学会 (神戸 2013 年 12 月)
- II-6 Takeo Horie (筑波大), Masamichi Ohkura (埼玉大), Takehiro G Kusakabe (甲南大), Junichi Nakai (埼玉大), Masashi Nakagawa: “Structural and physiological analysis for a central pattern generator controlling swimming locomotion of the ascidian larva.” 第 91 回日本生理学会大会シンポジウム「無脊椎動物から哺乳類へとつながる運動制御の神経回路-Central Pattern Generator 研究の最前線」 (鹿児島 2014 年 3 月)

大学院生命理学研究科

博士後期課程

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

博士前期課程

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. 住友財団

研究課題 緩歩動物クマムシの神経系がもつ乾燥耐性機構の mCT・光頭・電頭による統合 3D 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