

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、腸の蠕動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、胸びれと体軸の動きを制御する神経回路に関する研究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。

昨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（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である。この目的のため、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蛍光タンパク質で標識するための遺伝子導入魚の作成を試みており、現在、中枢神経系では蛍光の発現が認められている。またこの過程で、コリン作動性のマーカーの発現が、蠕動運動を起こしている時期にも関わらず、発現しないという結果が得られた。新しい発見につながる可能性もあり、詳細に解析する予定である。腸神経細胞の幹細胞の探索については、魚では初期発生終了後も腸神経の新生が起こっている事が確認できた。加えていくつかの神経幹細胞のマーカー (Sox2, Sox10, GFAP, Nestin 等) の発現を解析している最中である。

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
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、筑波大学との共同研究で、高速共焦点レーザー顕微鏡を用いて、Ca²⁺ imaging よるホヤ幼生神経の機能解析を行っている。

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 Aigler SR (コロラド大), Jandzik D (コロラド大), Hatta K, Uesugi K (JASRI), Stock DW (コロラド大). Selection and constraint undelie irreversibility of tooth loss in cypriniform fishes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 111:7707-7712 (2014)
- I-3 Itoh M, Yamamoto T, Nakajima Y, Hatta K. Multisteped optogenetics connects neurons and behavior. *Curr Biol.* 15:24(24):R1155-6. (2014)
- I-4 Itoh M, Hatta K. Munch's SCREAM: A spontaneous movement by zebrafish larvae featuring strong abduction of both pectoral fins often associated with a sudden bend. *Neurosci Res.*94:17-27. (2015)
- I-5 Moly PK, Ikenaga T, Islam AF, Kamihagi C, Hatta K. Mauthner-homologous reticulospinal neurons are initially appearing glycine-immunoreactive neurons in the embryonis zebrafish brain. 11th International Conference on Zebrafish Development and Genetics H26. H26.6.24-28 アメリカ合衆国 ウィスコンシン州 マジソン ポスター発表
- I-6 Jandzik, D (コロラド大), Aigler SR (コロラド大), Hatta K, Uesugi K (JASRI), Stock WS (コロラド大学). Retention of ancestral developmental potential for dentition varies between fish lineages. 11th International Conference on Zebrafish Development and Genetics H26. H26.6.24-28 アメリカ合衆国 ウィスコンシン州 マジソン ポスター発表
- I-7 Uyeno D (フロリダ大フロリダ自然史博物館), Nozue K, Hatta K, Hirose E (琉球大), Nagasawa, K (広島大). A species of bizzare copepod parasitic in the solitary ascidian, *Styela plicata* (Lesueur), from the Seto Inland Sea, western Japan. 12th International Conference on Copepoda H26.7.13-18 韓国 ソウル 漢陽大学 口頭発表

- I-8 Itoh M and Hatta K. pERK induction in the Mauthner neuron after stimulating the presynaptic trigeminal ganglion with Multi-Stepped Optogenetics. The 20th Japanese Medaka and Zebrafish Meeting. H26.9.20-21 東京 口頭発表
- I-9 Ikenaga T, Kamihagi C, Moly PK, Hatta K. Identifiable glycine-immunoreactive neurons in embryonic zebrafish hindbrain are Mauthner cell's homologous reticulospinal neurons. The 20th Japanese Medaka and Zebrafish Meeting. H26.9.20-21 東京 ポスター発表
- I-10 Okamoto S, Hatta K. Ca²⁺ imaging of smooth muscles in a simple gut of zebrafish larvae. The 20th Japanese Medaka and Zebrafish Meeting. H26.9.20-21 東京 ポスター発表
- I-11 Okamoto S, Hatta K. Ca²⁺ imaging of smooth muscles in a simple gut of zebrafish larvae. The 20th Japanese Medaka and Zebrafish Meeting. 第2回ピコバイオロジー研究所国際シンポジウム H26.10.9-10 赤穂 ポスター発表
- I-12 Nikaido, M., Alexander, R. L.(Stowers Institute) and Piotrowski, T.(Stowers Institute) Removal of Fgf/Wnt signalling is crucial for posterior lateral line placode induction. 第2回ピコバイオロジー研究所国際シンポジウム H26.10.9-10 赤穂 ポスター発表
- I-13 Nikaido, M., Alexander, R. L. (Stowers Institute) and Piotrowski, T. (Stowers Institute) Removal of Fgf/Wnt signalling is crucial for posterior lateral line placode induction. H26 11.25-27 第37回日本分子生物学会年会 横浜 ポスター発表
- I-14 高橋一樹 (埼玉大学)・伊藤佑貴 (埼玉大学)・吉村麻美 (埼玉大学)・津田佐知子 (埼玉大学)・二階堂昌孝・川村哲規 (埼玉大学)・弥益恭 (埼玉大学) 酸素代謝関連遺伝子による神経堤細胞の発生制御 H26 11.25-27 第37回日本分子生物学会年会 横浜 ポスター発表
- I-15 桑原健太「動物組織のマイクロ CT」ワークショップ「SPring-8 マイクロ CT の発生生物学への応用と問題点」H26.12.26 姫路 口頭発表
- I-16 塩本咲希「咽頭歯の形態の多様性と機能」ワークショップ「SPring-8 マイクロ CT の発生生物学への応用と問題点」H26.12.26 姫路 口頭発表
- I-17 福田恭子「極限環境耐性生物クマムシのマイクロ CT 解析」ワークショップ「SPring-8 マイクロ CT の発生生物学への応用と問題点」H26.12.26 姫路 口頭発表
- II-1 Horie T.(筑波大), Ohkura M.(埼玉大), Sasakura Y.(筑波大), Kusakabe T. G. (甲南大), Nakai J.(埼玉大), Nakagawa M. “Structural and physiological analysis of neural circuit for swimming locomotion of the ascidian larva” 第2回 名古屋大学神経回路国際シンポジウム (名古屋 2014年9月)
- II-2 堀江 健生 (筑波大)・大倉 正道(埼玉大)・日下部岳広 (甲南大)・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構造と生理機能の解析 日本動物学会第85回大会 (仙台 2014年9月)
- II-3 中川将司、桑原健太、杉本健太郎 “ホヤ幼生視細胞の光伝達系の解析” ホヤ研究集会 (東京 2014年10月)

大学院生命科学研究科

博士後期課程

岡本晋一：ゼブラフィッシュ幼生の腸の機能の Ca²⁺ イメージングと光遺伝学的解析

博士前期課程

井上智裕：ゼブラフィッシュ幼生のマウスナー細胞における GABA 入力の探索

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・光顕・電顕による統合 3D 解析 (平成 25~27 年度)
研究代表者 八田公平
- 2 公立大学法人兵庫県立大学特別研究助成金 (先導的プロジェクト研究)
研究課題 SPring-8 マイクロ CT を使った細胞をベースにした動植物の発生機構解析法の開発 (平成 26 年度)
研究分担者 八田公平・二階堂昌孝
- 3 公立大学法人兵庫県立大学特別研究助成金 (若手研究者の研究支援)
研究課題 腸神経細胞再生を目指した幹細胞の同定と腸神経の分化・再生機構解明の研究 (平成 26 年度)
研究代表者 二階堂昌孝
- 4 日本学術振興会科学研究費補助金 (平成 26~28 年度) 挑戦的萌芽研究 課題番号 26650122
研究課題 光遺伝学法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
- 5 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