

I ゼブラフィッシュをモデルとした脳と 神経堤由来器官（咽頭歯、腸神経系）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。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 など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い、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。また、幼生の胸びれの動きを高速カメラを用いて詳細に解析し、両方とも前方にあげて耳を塞ぐような体制をとる「スクリーム」と名付けた行動が、特徴的な体軸の屈曲行動（ストラグリング）と関連しておこることがわかっている。今年度は、胸びれの行動が GABA とグリシンの両方によって、異なる制御をうけていることを、薬理的に明らかにした。

カルシウム指示タンパク質 GCaMP3 を用いて、腸の蠕動運動に伴う腸神経系や筋肉でのカルシウム動態について詳細な解析を行い、次に、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初めて成功した。私たちは、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、局所的に赤外レーザーを照射して、チャンネルロドプシンを少数の脳細胞に局所的に発現させることによって、神経細胞の形態と機能を同時にしらべる「多段階光遺伝学」を確立している。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させている。本年度は、さらにこれらの方法を組み合わせ、ひとつひとつの脳細胞の活動と、行動を同時に撮影して、総合的に解析することに成功した。

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摂食時における運動を解析を続けており、ウナギ、シクリッド、タイ、イロブダイなどの咽頭歯の動きの撮影を新たにおこなった。

平成 25 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、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。これを使った系譜解析を今後進めていく。また腸神経の重要な神経細胞種であるコリン作動性の神経細胞を標識する遺伝子導入魚を利用して、その発生過程の記載を行っている。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、

新たにトランスクリプトーム解析も開始した。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、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。いくつかの神経幹細胞のマーカー (Sox2, Sox10) の発現も腸で確認でき、これらのマーカー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。

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。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うために、光遺伝学手法を用いた単一細胞光刺激装置を開発した。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。

III 乾燥耐性生物クマムシおよびネムリユスリカのマイクロCT解析

Synchrotron microCT analysis of Tardigrada and sleeping chironomid under cryptobiosis

八田公平・二階堂昌孝・中川将司
Hatta K, Nikaido M, Nakagawa M

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形態を生きたまま観察することに成功した。また、染色技術を組み合わせ、ゼブラフィッシュの脳、腸やホヤの幼生の神経組織、あるいは微小な海産ベントス(砂隙生物)動物動物のマイクロCTによって可視化した。

発表論文 List of Publications

I-1 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-2 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. 9th European Zebrafish Meeting 9-13 July, 2015 オスロ, ノルウェー (口頭発表)
- I-3 Hatta K. Visualizing development and function of the zebrafish CNS. The Kimmel Symposium 2015.6.19 アメリカ合衆国 オレゴン州 ユージーン (招待講演)
- I-4 八田公平 体にひそむ「第2の脳」と「第2の顎(あご)」のなぞを解く 第3回 県立健康生活科学研究所・理学部 合同研究発表会 2015.12.8, 赤穂 (口頭発表)
- I-5 Saki Shiomoto, Shota Nomura, Kenta Kuwabara, Kentaro Uesugi (JASRI), Akihisa Takeuchi (JASRI), Yoshio Suzuki (JASRI), Takanori Ikenaga, Masataka Nikaido, Kohei Hatta Analysis of fine three-dimensional structure of pharyngeal teeth of saury (*Cololabis saira*: 'SAMMA'), flying fish (*Cypselurus pinnatibarbatus japonicus*: 'TOBIUO'), medaka (*Oryzias latipes*), zebrafish (*Danio rerio*), and other teleost species by X-ray micro-computed tomography *Microscopy (Tokyo) (2015) 64 (suppl 1): i137*
- I-6 池永隆徳 (鹿児島大)、鈴木あゆみ (鹿児島大)、前田雄大 (鹿児島大)、原田達典、八田公平 小型魚類の咽頭歯形態と運動パターン解析 第11回水生動物の行動と神経系シンポジウム 2015.12.5 横浜 (口頭発表)
- I-7 塩本咲希、野村翔太、井上智裕、桑原健太、池永隆徳 (鹿児島大)、八田公平 コイ、マダクモウツボにおける咽頭歯の機能違い 第11回水生動物の行動と神経系シンポジウム 2015.12.5 横浜 (口頭発表)
- I-8 瀧川雄基、桑田舞、八田公平、二階堂昌孝 ゼブラフィッシュ腸神経系発生過程の可視化のためのトランスジェニック魚作成の試み 第38回日本分子生物学会年会 2015.12.2 神戸 (ポスター発表)
- II-1 Kenta Kuwabara, Masashi Nakagawa. Identification of effector protein of photo-signal-trans-duction in ascidian larval photoreceptor. 第3回ピコバイオロジー研究所国際シンポジウム. 兵庫県立大学.2015年10月. ポスター発表
- II-2 Abitua P.B., Gainous, T. B., Kaczmarczyk A. N., Winchell C. J. (University of California, Berkeley), Hudson C. Sorbonne Universite ´ s, Universite ´ Pierre et Marie Curie, Kamata, K., Nakagawa M. Tsuda M., Kusakabe T. G. (甲南大学) and Levine M. (University of California, Berkeley) The pre-vertebrate origins of neurogenic placodes. *Nature* 524, 462-465 (2015)
- III-1 Kohei Hatta, Kyoko Fukuda, Ayano Nakasone, Kisa Kakiguchi (CDB), Shigenobu Yonemura (CDB), Kenta Kuwabara, Kentaro Uesugi (JASRI), Akihisa Takeuchi (JASRI), Yoshio Suzuki (JASRI), Kaoru Nozue, Kyoko Shibata, Sakushi Morikawa, Shin-ichi Okamoto and Mari Okubo. Correlative imaging analysis of Tardigrada (water bears) under the active and dehydrated states by X-ray micro-computed tomography, electron microscopy and confocal microscopy. *Microscopy*, Vol. 64, No. S1, pp.139, 2015.
(The 2nd East-Asia Microscopy Conference, 24-27 November 2015, Himeji, Japan 口頭発表)
- III-2 福田恭子、仲宗根爽乃、桑原健太、野末馨、柴田今日子、大久保真理、森川作志、岡本晋一、垣口貴沙 (CDB)、米村重信 (CDB)、上杉健太郎 (JASRI)、竹内晃久 (JASRI)、鈴木芳生

(JASRI)、八田公平 乾眠および活動状態にある極限環境耐性生物クマムシの細胞小器官レベルでの放射光 mCT・光顕・電顕による統合（相関顕微鏡）3D解析. 分子生物学会, 神戸国際会議場, 2015年12月. (口頭発表)

III-3 桑原健太、福田恭子、野末馨、山崎博史（ベルリン自然史博物館）、広瀬裕一（琉球大）、中川将司、二階堂昌孝、池永隆徳（鹿児島大）、八田公平 X線イメージング技術の脊椎動物・原索動物の幼生、および、動物動物個体への応用. 分子生物学会 神戸国際会議場, 2015年12月. ポスター発表

III-4 仲宗根爽乃、桑原健太、福田恭子、黄川田隆洋（産総研）、八田公平 ネムリユスリカにおける乾燥状態と活動状態の内部器官構造の比較. 分子生物学会, 神戸国際会議場, 2015年12月. ポスター発表

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

桑原 健太：原始的脊索動物ホヤ幼生視細胞の光信号伝達系

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（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

3 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 単一細胞光刺激装置を用いて、ホヤ幼生中枢神経系の機能解析（平成27年度）

研究代表者 中川将司

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