

## I 脳と腸の機能発生の、ゼブラフィッシュをモデルとした 光遺伝学およびイメージング解析

Optogenetic and imaging analyses of development and function of the brain and gut 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 作動性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ってきた。Cre 組み替え技術を用いて、マウスナー細胞に投射する複数の GABA 作動性のシナプス末端を、生きた個体の中で区別して可視化することにより解析を進めている。

ゼブラフィッシュは第2の脳とも呼ばれる腸神経系の機能や発生の解析にも優れたモデルとなりうると考えられる。私達は、腸の蠕動運動に伴う平滑筋、神経細胞、ペースメーカー細胞での GCaMP3 を用いたカルシウム動態の可視化に成功し、蠕動反射と徐波の2つの収縮波をカルシウム動態によって区別できることを発見した。また、腸神経細胞その他のカルシウム動態の一部も明らかとなった。一方、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成功している。

## II ゼブラフィッシュ腸神経堤およびプラコードの 発生・分化の分子遺伝学解析

Molecular genetic analyses of development of the enteric neural crest and placode in the zebrafish

二階堂昌孝・八田公平  
Nikaido M, Hatta K

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細胞前駆体である神経堤細胞の個々の移動や、分裂後の運命を可視化・解析するため、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。これによって、(1) 腸原基に入った後の神経堤細胞は様々な方向に移動していること、(2) 分裂後、両娘細胞ともに神経分化するものや、一方だけが神経分化し他方はさらに分裂するものがあるように、細胞ごとにパターンが異なることがわかった。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開始したトランスクリプトーム解析では、いくつか興味深い遺伝子が得られてきた。特に、自発的に採餌を開始する受精後5日ごろの興奮性神経伝達物質として、今回初めて *tachykinin3a* の発現が確認できた。一方、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は、腸神経系の再生を解析する実験系を用い、(1) 神経細胞除去部に未分化神経堤由来細胞が進入し神経分化することや、(2) 神経細胞除去に応じて、神経幹細胞のマーカー (Sox10) 陽性の細胞が増殖することが示唆される結果を得た。

### III ホヤ幼生神経系の機能解析

#### Functional analysis of ascidian larval nervous system

中川将司・八田公平  
Nakagawa M, Hatta K

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。幼生の神経系における神経細胞数は、僅か 177 個であることが明らかにされた。しかし、その神経系の機能解析は、殆どなされていない。我々は、単一細胞光刺激装置を作製し、光遺伝学的手法を用いてホヤ幼生の神経機能解析を行っている。

### IV SPring-8 におけるマイクロ CT と X 線ライブイメージング： A. 古代魚における第 2、第 3 の顎の形態と進化の解析、 B. 乾燥耐性生物の細胞小器官の相関顕微鏡解析

Synchrotron microCT and live imaging analysis of the second and third jaws in ancient fish by using SPring-8; High resolution phase-contrast mCT and correlative microscopic analysis of organelle in the dried-state Tardigrada

八田公平・二階堂昌孝  
Hatta K, Nikaido M

A: 多くの魚は口にある顎（口顎：第 1 の顎）のほかに、咽頭顎（第 2 の顎）をもっている。私達は、その機能進化過程を調べるため、スポットドガー、ポリプテルス、ハイギョなどの「古代魚」、シルバーアロワナやバタフライフィッシュなど、舌にも歯をもっている（3つの顎をもつ）もの、また、ベニイロカエルアンコウなど特徴的な形態を持つものについて、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の解析を行なってきた。今年度はそれに加えて、脊椎動物の祖先である棘皮動物（ウニ）や、咽頭歯なしでも獲物を丸呑みできる陸上爬虫類（コーンスネーク）の摂食時におけるアリストテレスのランタンや、左右が分離した特殊な口顎の動きの立体ライブイメージングに成功した。B: 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形態を生きたまま定量的に観察することに成功した。さらにZernike法を用いて、乾眠状態にある個体内部の折れたたまった表皮、筋肉、神経節などの可視化を行なっている。

また、ナノマイクロ位相CT法を用いて、ゼブラフィッシュの脳や腸の細胞ひとつひとつの高解像度観察に成功した。

## 発表論文 List of Publications

- I-1 Daiji Takamido, Sayaka Nishida, Takuya Kojima, Masataka Nikaido, ○ Kohei Hatta  
Identification of neuronal and non-neuronal cells associated with either peristalsis or slow waves in the zebrafish intestine（国際学会，口頭発表）13th International Zebrafish Conference (2018年6月20-24日, Madison, USA)
- I-2 Daiji Takamido, Sayaka Nishida, Takuya Kojima, Masataka Nikaido, Shin-ichi Okamoto, ○ Kohei Hatta  
Imaging and optogenetic analysis of the second brain to control gut motility in zebrafish larvae（国際学会，ポスター発表）CSH Asia meeting on Latest Advances in Development & Function of Neuronal Circuits (2018年9月6-7日, Awaji Japan)
- I-3 ○高御堂 大慈、西田 さやか、兒島 卓也、二階堂 昌孝、川上 浩一、岡本 晋一、八田 公平  
Ca<sup>2+</sup> imaging and optogenetic analysis of cells derived from ectodermal, mesodermal and endodermal germ layers in the zebrafish gut.（ポスター発表）第41回日本分子生物学会（2018年11月28-30日, 横浜, 神奈川県）
- I-4 ○青木 滯、馬場 俊平、井上 智裕、東 毅、角本 貴進、池永 隆徳、二階堂 昌孝、八田 公平  
ゼブラフィッシュ幼生のマウスナー細胞を抑制するGABA作動性ニューロンのシナプスの解析（口頭発表）第41回日本神経科学大会（2018年7月26-29日, 神戸）
- I-5 ○八田 公平、兒島 卓也、高御堂 大慈、西田 さやか、二階堂 昌孝、岡本 晋一  
ゼブラフィッシュ幼生の単純な腸における徐波と蠕動運動に関連して活動する細胞群の光遺伝学による機能解析（口頭発表）第41回日本神経科学大会（2018年7月26-29日, 神戸）
- I-6 ○高御堂 大慈、西田 さやか、兒島 卓也、二階堂 昌孝、岡本 晋一、八田 公平  
ゼブラフィッシュ幼生の腸における蠕動運動と徐波に関連して活動する神経および非神経細胞群の同定（口頭発表）第41回日本神経科学大会（2018年7月26-29日, 神戸）
- I-7 ○青木 滯、○高御堂 大慈  
2つの脳の作り方：～いろいろな色の光と遺伝子による挑戦～（ポスター発表）第一回 技術・人材マッチング交流会（2019年2月12日, 光都, 兵庫県）
- II-1 Mai Kuwata, ○Masataka Nikaido, Koichi Kawakami (NIG) & Kohei Hatta : A heat-shock mediated multi-color labeling of the enteric neural crest cells for analyzing the patterns of their migration, division and differentiation in zebrafish gut.（口頭・ポスター発表）第51回 日本発生生物学会（2018年6月6-8日, 船堀, 東京都）

- II-2 ○大野 真理愛、堀内 奈津美、川上 浩一（遺伝研）、二階堂 昌孝、八田 公平 ゼブラフィッシュを用いた腸神経系傷害後の再生機構の解明（ポスター発表）第41回 日本神経科学大会（2018年7月26-29日、神戸、兵庫県）
- II-3 ○大野 真理愛、堀内 奈津美、川上 浩一（遺伝研）、二階堂 昌孝、八田 公平 ゼブラフィッシュを用いた腸神経系傷害後の神経再生機構の解明（ポスター発表）第41回日本分子生物学会（2018年11月28-30日、横浜、神奈川県）
- IV-1 ○八田 公平、○岡田 央人 ウツボ・ヘビは、どうやってエサを丸のみするの？ 魚のもつ2つの「あご」の秘密を SPring-8 でときあかす！（招待講演）西栗栖ふれあいフェスティバル（2018年11月18日、西栗栖コミュニティセンター、たつの、兵庫県）

## 大学院生命理学研究科

### 博士前期課程

大野 真理愛：腸神経系の再生機構の研究

青木 滯：マウスナー神経細胞を制御する GABA 作動性回路の探索

高御堂大慈：腸の運動を制御する神経・非神経細胞の  $Ca^{2+}$  イメージングと光遺伝学解析

## 科学研究費補助金等

- 1 日本学術振興会科学研究費補助金（平成 28～30 年度）基盤研究（C）課題番号 16K06998  
研究課題 単純な脊椎動物の腸神経系機能の可視化と光遺伝学による腸運動の制御  
研究代表者 八田公平  
共同研究者 二階堂昌孝  
共同研究者 中川将司
- 2 住友財団 基礎科学研究助成（平成 30 年 11 月～令和元年 10 月）  
研究課題 多様な腸神経細胞の形成・特異化に関わる転写因子コードの解明  
研究代表者 二階堂昌孝