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
Hatta K, Nikaido 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 作動性のシナプス端末を、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、腸神経細胞、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、蠕動反射と徐波関連運動の２種類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。一方、光遺伝学的な手法によって、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、感覚神経系から運動神経系までの神経回路を持って中枢から半ば独立して活動できることから、腸神経系は第２の脳とも呼ばれる。この腸神経系を構成する各種神経細胞や、腸神経系の運動機能に重要なペースメーカー細胞の分化や機能に関わる遺伝子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、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単離した *tachykinin3a* は、腸神経細胞に発現することが確認できた。また、ペースメーカー細胞の分類に

重要なマーカーとして *pdgrfa* 遺伝子を単離し、腸に発現することを確認した。一方、腸神経細胞の再生を解析する実験系を用い、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、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ため、学術雑誌に投稿した。

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における放射光イメージングの動物学・神経生物学への応用：A.古代魚等における第２、第３の顎の形態・機能と進化の解析，B.マイクロナノ CTによる個体内の神経細胞の相関顕微鏡観察

Synchrotron microCT and live imaging analysis of the second and third jaws in ancient fish by using SPring-8; micoro-nanoCT and correlative microscopic analysis of identified neurons or cells in an intact animal

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、その形態・機能の進化過程を調べるため、SPring-8 におけるマイクロ CT と高速 X 線動画撮影によって、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いる。これまでに、スポッテドガー、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、ベニイロカエルアンコウなど特徴的な形態を持つもの、また、その比較対照となる陸上脊椎動物（コーンスネイク）、脊椎動物の祖先である棘皮動物（ウニ、ニセクロナマコ）などについて、解析を行った。今年度はそれに加えて、咽頭顎進化の鍵と考えられるアミアカルヴァ／アミメウナギをはじめとする計４種のポリプテルス、

陸上爬虫類（ヒョウモントカゲモドキ）の口顎の動き、鳥類（ニワトリの雛）の摂食時における特徴的な舌の動き、また、ミナミトビハゼが水から上がった状態で魚を補食する様子の立体ライブイメージングに成功した。

B: SPring-8 における高解像度マイクロ CT と共焦点顕微鏡を組み合わせた相関顕微鏡の技法を用いて、ナノーマイクロ位相 CT 法を用いて、個体内にあるゼブラフィッシュの脳や腸の細胞ひとつひとつ（CEMAPOC、マウスナー細胞、中腸と後腸の粘膜にある内外分泌細胞）を同定し高解像度観察することに成功した。

発表論文　List of Publications

Ⅰ-1　○青木 澪、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（ポスター発表）第 4 2 回日本神経科学大会（2019 年 7 月 27 日, 新潟）

Ⅰ-2　Daiji Takamido, Sayaka Nishida, Takuya Kojima, Masataka Nikaido, Koichi Kawakami（遺伝研）, Shin-ichi Okamoto, ○Kohei Hatta：Ca^{2+} imaging and optogenetic analysis of tissues in the zebrafish gut（国際学会, 口頭発表）International Zebrafish Conference （2019 年 6 月 15 日 Suzhou, China）

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　ゼブラフィッシュ幼生の腸組織のカルシウムイメージングと光遺伝学的解析（ポスター発表） 第 4 2 回日本神経科学大会（2019 年 7 月 27 日, 新潟）

Ⅰ-4　○高御堂大慈、西田さやか、兒島卓也、佐藤史織、神保歩、和田里紗、岡本晋一、川上浩一、二階堂昌孝、八田公平　ゼブラフィッシュ幼生の腸運動のカルシウムイメージングと光遺伝学的手法による機能解析（ポスター発表）第 42 回日本分子生物学会（2019 年 12 月 5 日, 福岡）

Ⅱ-1　Mai Kuwata, Masataka Nikaido, & 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. Dev. Dyn. vol. 248(6). p437-448. 2019.

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細胞除去後の再生機構の解明（口頭発表）第 52 回日本発生生物学会大会（2019 年 5 月 14-17 日, 大阪）

Ⅱ-3　○二階堂 昌孝、白井 彩香、水巻 裕美子、上野 直人（基生研）、重信 秀治（基生研）、八田 公平　ゼブラフィッシュ腸神経系を構成する外・中胚葉組織の分化マーカーの単離 （ポスター発表）第 42 回日本分子生物学会（2019 年 12 月 3-6 日, 福岡）

Ⅲ-1　○村田 大夢、堀江 健生（筑波大）、中川 将司　ホヤ幼生のマウスナー様神経は、逃避行動を引き起こさない（口頭発表）第 90 回日本動物学会（2019 年 9 月 14 日, 大阪）

Ⅳ-1　○岡田 央人、古森 大樹、塩本 咲希、桑原 健太、上杉 健太朗（JASRI）、星野 真人（JASRI）、八田 公平　水棲および陸上脊椎動物が獲物を丸呑みにする仕組みの多様性と共通性：放射光 X 線イメージングを用いた解析 （口頭発表）第 90 回日本動物学会（2019 年 9 月 14 日, 大阪）

Ⅳ-2　○八田公平　放射光イメージングの動物学への応用：魚が隠し持つ第 2・第 3 の顎の謎を SPring-8 で解き明かす（口頭発表）第 90 回日本動物学会　SPring-8 先端利用技術ワークショップ　シンクロトロン放射光 X 線は動物学にどう役立つか？（2019 年 9 月 12 日, 大阪）

Ⅳ-3　○青木 澪、馬場 俊平、井上 智裕、東 毅、角本 貴進、岡田　岸他華　上杉 健太朗（JASRI）、竹内晃久（JASRI）、池永 隆徳、二階堂 昌孝、八田 公平　ゼブラフィッシュ幼魚におけるマウスナー細胞上の GABA 作動性ニューロンのシナプス終末解析（ポスター発表）第 42 回日本分子生物学会（2019 年 12 月 5 日, 福岡）

大学院生命理学研究科

博士前期課程

青木　澪：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

岡田　央人：水棲および陸上脊椎動物が獲物を丸呑みにする顎・舌・咽頭の仕組みの進化

村田　大夢：ホヤ幼生の行動を制御する神経回路の光遺伝学的解析

科学研究費補助金等

住友財団　基礎科学研究助成（平成 30 年 11 月～令和 2 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