

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。また、マウスナー細胞の軸索起始部を覆う特殊なグリア細胞 (axon cap glia) で蛍光を発するトランスジェニックゼブラフィッシュを発見し、これによって、特殊なグリア細胞の発生起源を追跡することが初めて可能になった。

一方、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の発生・分化の分子遺伝学解析

Molecular genetic analyses of development of the enteric neural crest 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得られた興奮性神経伝達物質遺伝子 *tachykinin3a* は、腸神経細胞に発現することが確認できた。現在 Tachykinin3a 作動性神経細胞の分布や形態、機能を知る目的で遺伝子導入魚や遺伝子ノックアウトを作成中である。また、ペースメーカー細胞の1種に発現する *pdgrfa* 遺伝子も単離し、腸に発現することを確認した。こちらも、腸の運動時の働き方を解析する目的でカルシウム インジケータの GCaMPなどを導入した遺伝子導入魚の作成を行っている。一方、腸神経細胞の再生を解析する実験系を確立し、神経細胞除去部に未分化神経堤由来細胞が出現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、受理された。

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.硬骨魚類における第2、第3の顎の形態・機能と進化の解析、
B.マルチスケール CT による個体内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 teleost by using SPring-8; Micro-nano multi-scale CT 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

イッシュなど、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。また、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ている。本年度は、さらにカラシン目2種、シマドジョウが砂と餌を吸い込み、砂を鰓蓋から排出する様子のほか、クランウェルツノガエルが眼と舌を使って餌を飲み込む様子、ハエトリソウがヨロピアンイエコオロギを捕まえる様子を撮影することに成功した。

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、マイクロ・ナノ・マルチスケール位相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ている。本年度はさらに、幼生時に片方のCEMAPOCを赤外レーザーで破壊したのち育てた成魚の脳のマイクロCT解析を行った。

発表論文 List of Publications

- I-1 Daiji Takamido, Shin-ichi Okamoto, Shiori Satoh, Yumiko Mizumaki, Risa Wada, Ayumi Jimpo, Koichi Kawakami (遺伝研), Masataka Nikaido, Kohei Hatta. Functional Imaging and Optogenetic Analysis of Cells Derived from Three Germ Layers in the Larval Zebrafish Gut (口頭発表; Web開催) 11th European Zebrafish Meeting (2020年10月26-27日, Prague, Czech)
- II-1 Maria Ohno, Masataka Nikaido, Natsumi Horiuchi, Koichi Kawakami (遺伝研) & Kohei Hatta: The enteric nervous system in zebrafish larvae can regenerate via migration into the ablated area and proliferation of neural crest-derived cells. *Development*. vol. 148. dev195339. 2021.
- II-2 〇二階堂昌孝、白井彩香、水巻裕美子、川上浩一(遺伝研)、上野直人(基生研)、重信秀治(基生研)、八田公平 ゼブラフィッシュ消化管の初期発生過程において、腸神経細胞の分化や多様性の創出に関わる新規遺伝子の探索 (abstract WEB公開のみ) 第53回日本発生生物学会 (2020年5月19-22日, 熊本)
- IV-1 〇八田公平 放射光イメージングの動物学への応用: 魚類が持つ第2・第3の顎の機能の多様性と進化 (口頭発表; Web開催) The 14th NIBB Bioimaging Forum (2020年11月6日, 岡崎)
- IV-2 〇Kohei Hatta, Tomoya Shimamura, Hiroto Okada, Kentaro Uesugi (JASRI), Akihisa Takeuchi (JASRI), Masataka Nikaido, Daiji Takamido, Mio Aoki Zooming in from a whole animal to identified neurons or cells by micro-nano multi-scale synchrotron X-ray computer tomography. *Technologies for brain structure/function analysis* (口頭発表; Web開催) 第43回神経科学大会 (2020年7月29日-8月1日, 神戸)

大学院生命理学研究科

博士前期課程

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