

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系の発生・再生の分子遺伝学解析

Molecular genetic analyses of development and regeneration of the enteric nervous system 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 種以上で約 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有して中枢から半ば独立して活動できる腸神経系は第2の脳とも呼ばれる。我々はこの腸神経系を構成する各種神経細胞や、それらが存在する腸の各領域を規定する遺伝子を単離す

る目的でトランスクリプトーム解析を行っている。この解析の結果、分化した腸神経細胞に強い発現が見られる転写因子群、腸神経細胞の前駆細胞に強い発現を示す遺伝子群のリストを得ることができた。今後これらから転写因子を単離し発現部位を解析する。また、腸の前後軸に応じて異なる発現パターンを示す転写因子も 13 種特定することができた。一方、昨年度我々はゼブラフィッシュの腸神経細胞が再生することを示した。今年度は、Fgf をはじめとする各種分泌タンパク質の下流因子である ERK が再生過程で活性化しているかを調べることで、再生の分子機構を解明しようとしている。その結果、神経細胞除去後の神経細胞前駆体や分化した神経細胞で ERK の活性化が見られた。このことを手がかりに、どのような分泌タンパク質が、再生のどの過程に必要なのか、さらに詳細に解析する計画である。

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。本年度は、魚類におけるマウスナー細胞と類似した形態を持つホヤ幼生の ddNs が、機能的にも類似していることを、新たに大学院生（村田）が開発したプログラムを用いて明らかにした。

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。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捕食する様子の立体ライブイメージング、カラシン目、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も成功している。本年度は、砂を口から出すボラや、ウナギ目の近縁のカライワシ目に属するターポン（イセゴイ）の mCT を解析し、互いに比較することで、咽頭顎とその周辺の形態・機能・進化を明らかにすることを目指している。

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、成魚の脳のグリア細胞のマイクロ CT による可視化に大きな進展が見られた。

発表論文 List of Publications

- I-1 Shin-ichi Okamoto, Kohei Hatta : Ca²⁺-imaging and photo-manipulation of the simple gut of zebrafish larvae in vivo. Scientific Report (2022年2月7日) doi: 10.1038/s41598-022-05895-4
- I-2 ○岩谷 将太、八田 公平、二階堂 昌孝、青木 滯：ゼブラフィッシュ幼生におけるマウスナー細胞の軸索起始部を取り囲む Axon Cap Glia の起源と発生（口頭発表）第44回日本神経科学大会（2021年7月28日 神戸）
- I-3 ○下村 晃大、二階堂 昌孝、八田 公平：フォトコンバージョン可能な蛍光タンパク質によるゼブラフィッシュ幼生の単一腸神経細胞の形態と支配領域の解析（ポスター発表；Web 参加）第44回日本神経科学大会（2021年7月31日 神戸）
- I-4 Daiji Takamido, Shin-ichi Okamoto, Koudai Shimomura, Koichi Kawakami（遺伝研），Masataka Nikaido, ○Kohei Hatta : Activities and morphology of individual cells derived from three germ layers associated with the region-specific movements of the larval zebrafish gut（口頭発表；Web 開催）第54回日本発生生物学会年会（2021年6月18日 神戸）
- I-5 Daiji Takamido, Shin-ichi Okamoto, Koudai Shimomura, Koichi Kawakami（遺伝研），Masataka Nikaido, ○Kohei Hatta : Activities and morphology of individual cells derived

from three germ layers associated with the region-specific movements of the larval zebrafish gut (ポスター発表 ; Web 開催) The 16th International Zebrafish Conference (2021年6月16-22日、Montreal、Canada)

III-1 村田大夢、中川将司、○八田公平、堀江健生(筑波大) : 光遺伝学的手法によるホヤ幼生のマウスナー細胞様神経の機能解析 (ポスター発表 ; Web 開催) 第92回日本動物学会 (2021年8月25日、米子)

IV-1 ○高田将真、八田公平、岡田央人、上杉健太郎、星野真人 : SPring-8 を用いた骨鰓上目の咽頭顎の機能の解析 (ポスター発表 ; Web 開催) 第92回日本動物学会 (2021年8月25日、米子)

生命科学専攻

博士後期課程

村田大夢 : 光遺伝学を用いたホヤ幼生神経系の解析

博士前期課程

岩谷将太 : 逃避行動の指令ニューロンの軸索起始部を囲む特殊なグリアの発生期限

下村晃大 : ゼブラフィッシュ腸神経細胞の単細胞レベルでの形態解析

高田将真 : SPring-8 を用いた骨鰓上目の咽頭顎の機能の解析