

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 GCaMP を用いたカルシウム動態の可視化して、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示し、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。本年度は、これらに関わる細胞・分子の同定や、脳腸関連の発生について進展が見られた。

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いるため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転写因子群のリストを得ることができた。これらから特に発現量の多い遺伝子をクローニングしたので、今後はそれらの発現部位や機能を解析する。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、こちらは発現領域についてまとめた論文を投稿中である。一方、昨年度我々は、*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、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活性化することを示した。今年度は、実際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解明するため、候補となる分泌タンパク質遺伝子 (*Fgf3,8* など) を単離した。また、*Fgf* シグナルを操作できる遺伝子導入魚を用いて、再生への影響を解析中である。

Ⅲ 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補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、ハエトリソウがヨーロッパイエコオロギを捕まえる様子を撮影することに成功している。本年度は、ウナギ目、タウナギ目、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、解剖、透明標本などの結果を解析し、比較することで、咽頭顎とその周辺の形態・機能・進化について仮説を立てることができた。

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、成魚の脳のグリア細胞のマイクロ CT による可視化に進展が見られた。

発表論文

- I-1 Shota Iwatani, Mio Aoki, Masataka Nikaido, ○Kohei Hatta Developmental origin of the Axon Cap Glia which surround the initial segment of the Mauthner axon in zebrafish (口頭発表 ; Web 参加) The 17th International Zebrafish Conference (2022年6月22-26日 Montreal, Canada)
- I-2 ○Shota Iwatani, Mio Aoki, Masataka Nikaido, Kohei Hatta Development of the axon cap glia, specialized structure surrounding the initial segment of the Mauthner cell, from larval to adult in zebrafish. (口頭発表) 第45回日本神経科学大会 (2022年7月3日 沖縄)
- I-3 Daiji Takamido, Hikaru Minamide, Shin-ichi Okamoto, Koudai Shimomura, Shiori Satoh, Ayumu Jimpo, Risa Wada, Yumiko Mizumaki, Koichi Kawakami (遺伝研) , ○Kohei Hatta Functional imaging and photo-manipulation of cells derived from three germ layers in the larval zebrafish gut (ポスター発表 + ショートトーク ; Web 参加) The 17th International Zebrafish Conference (2022年6月22-26日 Montreal, Canada)
- II-1 ○山本果歩、二階堂 昌孝、八田 公平 Involvement of ERK signaling in the regeneration processes of the enteric nervous system in zebrafish (口頭・ポスター発表) 第55回日本発生生物学会 (2022年6月2日 金沢)
- II-2 ○山本果歩、二階堂 昌孝、八田 公平 Involvement of ERK signaling in the regeneration processes of the enteric nervous system in zebrafish (口頭発表) 第28回小型魚類研究会 (2022年9月2日 大阪)
- III-1 仲野 友太、吉尾 悠暉、○長塚 美月、塩本 咲希、上杉 健太郎 (高輝度光科学研究センター)、星野 真人 (高輝度光科学研究センター)、高田 将真、岡田 央人、八田 公平 ウナギ目とタウナギ目の咽頭顎の相違 (口頭発表) 第93回日本動物学会 (2022年9月10日 東京)
- III-2 ○谷口 夏輝、岩谷 将太、上杉 健太郎 (高輝度光科学研究センター)、安武 正展 (高輝度光科学研究センター)、八田 公平 マウスナー細胞の軸索起始部を取り囲む特殊なグリア構造の μ CT による可視化 Visualization of a specialized glial structure surrounding the initial segment of the Mauthner cell with the synchrotron radiation X-ray micro computed tomography (SR- μ CT) (ポスター発表) 第45回日本神経科学大会 (2022年6月30日 沖縄)

生命科学専攻

博士前期課程

山本果歩：ゼブラフィッシュ腸神経細胞の再生機構の解析

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起源

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