

I ゼブラフィッシュの脳における 神経細胞と特殊なグリアの発生・機能に関する イメージング解析

Imaging analysis of development and function of specialized neurons and glia in
the zebrafish brain

八田公平
Hatta K

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、脳の左右で交換する特殊な神経細胞の発生と機能について解析を進めている。また、魚類の後脳に存在し、逃避行動の制御に関わる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) において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、これを用いて、このグリア細胞の発生起源やマウスナー細胞との関係について調べている。また、終脳にある放射状グリアと GABA 作動性ニューロンとの関連についても解析を行なっている (松永)。

II 腸・心臓・浮袋、 及びそれらの自律神経系支配の発生・機能に関する ゼブラフィッシュをモデルとした 光遺伝学・イメージング解析

Optogenetic and imaging analysis of development and function of the gut, heart,
swim bladder, and their autonomic innervations in the zebrafish

八田公平
Hatta K

ゼブラフィッシュは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、ペースメーカー様細胞のカルシウム動態を GCaMP を用いて可視化して、蠕動反射と徐波関連運動の2種類の収縮波の解析を行なっている。また、光遺伝学的手法によって、腸の周りに存在する腸神経細胞や平滑筋、ペースメーカー様細胞、内胚葉細胞など1~数個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、さらに、脳腸相関 (川原)、心臓や肺の相同器官である浮袋 (山内) における副交感・交感神経系の発生について新しい知見が得られた。

Ⅲ 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

八田公平
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て、それらの発現部位や機能を解析している。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 (Nikaido et al. 2023)。また、平滑筋細胞とギャップ結合によって繋がっていると考えられている介在細胞の一種のマーカー *pdgfra* のゼブラフィッシュの腸における発現パターンを初めて報告した。一方、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ている (山本)。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) を単離して、その発現パターンを調べた。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。

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. 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
Hatta K

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、ウナギ目であるマウナギやアナゴ、タウナギ目、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、また、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、考察を進めている（長塚）。一方、砂を口から出すボラの特徴的な咽頭嚢とそれに付随する咽頭歯や、下顎咽頭骨に付随する鰓歯の詳しい構造について mCT と透明標本から明らかにした。また、スズキ目であるマナガツオの食道嚢にある食道歯の構造について、透明標本から、その詳しい構造を明らかにした（腰山）。

B: SPring-8における高解像度 nCT と共焦点顕微鏡を組み合わせた相関顕微鏡の技法や、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を行なっている。また、成魚の脳のグリア細胞（axon cap glia）の nCT による可視化にも成功している。

発表論文

- I-1 ○Maho Matsunaga, Shota Iwatani, Mio Aoki, Kohei Hatta Visualization of specialized glial cells in zebrafish larvae and their association with neurons (ポスター発表) 第46回日本分子生物学会 (2023年12月6-8日 神戸)
- II-1 ○Nozomi Yamauchi, Mari Oshima, Kohei Hatta Revealing the growth and function of neurons around heart and swim bladder in larval zebrafish (ポスター発表) 第46回日本分子生物学会 (2023年12月6-8日 神戸)
- III-1 ○Masataka Nikaido, Ayaka Shirai, Yumiko Mizumaki, Shuji Shigenobu (基礎生物学研究所), Naoto Ueno (基生研), ○Kohei Hatta Intestinal expression patterns of transcriptional factors and markers for interstitial cells in the larval zebrafish. *Dev Growth Differ* 65(7):418-428 (2023) (査読あり)
- IV-1 ○河野なつみ 脳から腸、そして顎へ ～ヒトに近いモデル生物「ゼブラフィッシュ」を用いた研究～ (ポスター発表) 令和5年度兵庫県立大学理学部・大学院理学研究科技術・人材マッチング交流会 (2023年12月1日 兵庫県立先端科学技術支援センター 赤穂)

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

長塚美月：SPring-8を用いた骨鰾上目の咽頭顎の機能の解析

松永麻穂：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