

平成 27 年度

博士論文

ゼブラフィッシュ幼生の腸運動に
関わる平滑筋と腸神経系の Ca^{2+} イメ
ージングと光遺伝学による機能解析

兵庫県立大学

生命理学研究科 生命科学専攻 細胞機能解析部門

生体情報学 1 講座

SD13L002 岡本 晋一

目次

I 要旨	2
II 序論	3
III 材料・方法	7
IV 結果	10
V 考察	13
VI 図・動画	17
VII 謝辞	35
VIII 参考文献	36

I 要旨

腸に取り込まれた食物は蠕動運動により体外に排出される。この運動は、輪走筋と縦走筋からなる 2 層の平滑筋層を収縮・弛緩させることで起こり、腸神経系が制御している。これまで、この腸の運動については哺乳類において主に電気生理学を用いて調べられてきたが、腸全体での筋肉や神経の活動を生体内で調べることは難しかった。一方、ゼブラフィッシュ幼生の体は透明であり、腸の構造は哺乳類の腸と比較して単純であるため、脊椎動物の消化器官の機能の研究をするためのモデルとして非常に優れている。しかしながら、食塊を排泄する筋肉の振る舞いや神経ネットワークについては、ほとんど調べられていなかった。そこで、本研究では Ca^{2+} インジケータである GCaMP3 を発現するトランスジェニックゼブラフィッシュを用いて、蠕動運動時の筋肉や神経の Ca^{2+} イメージングをおこなった。その結果、腸が収縮すると、輪走筋の Ca^{2+} 濃度は上昇することが示された。また、蠕動運動時に Ca^{2+} シグナルは食塊の口側で強くなり、排泄腔側で弱くなることが示された。これによって、ゼブラフィッシュ幼生における蠕動反射をはじめて可視化し、その存在を明らかにした。さらに、この食塊の口側で起こる Ca^{2+} シグナルは間欠性であり、排泄腔側と同時に口側へも Ca^{2+} シグナルが伝搬することもわかった。

次に、青色光を照射したときのみ開く陽イオンチャネルであるチャンネルロドプシン 2 (ChR2) を用いて特定の筋肉細胞や神経細胞を人為的に活動させ、光遺伝学の技術を用いて、腸の運動を制御する神経系ネットワークの解明を目指した。その結果、ChR2 を発現する輪走筋を直接光刺激すると、腸が局所的に収縮した。また、単一または、少数の神経細胞、粘膜の細胞でも同様に光刺激を与えることにより、腸の運動の停止や蠕動反射のような動きを引き起こすことに成功した。この結果は、光遺伝学の技術を用いて腸の振る舞いの人為的な制御に成功した最初の例である。

これらの研究は、脊椎動物における腸の運動を制御する筋肉、腸神経系、その他の細胞種の機能を *in vivo* で調べる研究の基礎となることが期待される。また、この研究が進むことで、神経回路／器官レベルでの効果が確立していない IBS (過敏性腸症候群) などの薬剤の作用機構を腸全体で可視化、解明できるようになることが期待される。

II 序論

腸は食物が胃で溶かされた後、その中の栄養や水分を吸収する重要な器官である。腸に取り込まれた食物は、消化され便となり排出される。この時、蠕動運動と呼ばれる運動によって食物は肛門へと運ばれる (Fig. 1)。この運動は 2 種類の平滑筋と腸神経系 (Enteric Nervous System : ENS) によって制御されている。

腸の構造は層構造を形成しており、哺乳類では同軸状の層に分けることが出来る。食物と接する内腔から粘膜 (mucosa)、粘膜下層 (submucosa)、筋層 (muscularis)、しょう膜 (serosa) の順に構成されている (Fig. 2)。

粘膜は内腔もしくは管内の空間を囲っている消化管の最内層を形成しており、この層で吸収と分泌がおこなわれている。内腔から上皮 (epithelium)、粘膜固有層 (lamina propria)、粘膜筋板 (muscularis mucosa) に分けることが出来る。粘膜下層は、腸の骨格的役割を果たす構造で、内側の粘膜を支持し、外側の筋層の運動を管壁全体の形の変化として伝える。筋層は平滑筋による層であり、内側に管を周回し輪状の輪走筋 (circular smooth muscle)、外側に管長方向に縦に走る縦走筋 (longitudinal smooth muscle) の 2 層からなる。

ENS は腸の全長にわたり壁内に存在する。自律神経系に属し、神経細胞とグリア細胞から成る。神経堤細胞から発生し、腸全体に相互接続した神経節のネットワークを形成する 2 つの神経叢 (筋層間神経叢、粘膜下神経叢) からなる (Sasselli et al. 2012)。筋層間神経叢 (アウエルバッハ神経叢) は輪走筋と縦走筋の間に位置し、輪走筋や縦走筋の運動を支配する。粘膜下神経叢 (マイスナー神経叢) は粘膜下層の中にあり、内在性知覚ニューロン (IPAN) が存在し、消化管壁などに加わる刺激を感知している (Fig. 3a : Brookes 2001 ; 福土 2007)。数個～数十個の神経細胞から構成される無数の神経節が神経線維でつながれた網目状構造をとる。ヒトの腸では、1～10 億個の神経細胞があり、マウスの小腸では約 40 万個の筋層間神経が、モルモットの小腸では約 30 万個の筋層間神経と約 95 万個の粘膜下神経が含まれていることがこれまでに示されている (Gabella 1987)。脳からの入力とは関係なく自律的に腸の運動、分泌、血流を制御している (Furness 2000)。中枢神経から独立しても働くことのできる神経系であることから、腸は『第 2 の脳』とも呼ばれている。

神経伝達物質には、セロトニン (5-hydroxytryptamine : 5-HT)、アセチルコリン、VIP (vasoactive intestinal polypeptide)、PACAP (pituitary adenylate

cyclase-activating polypeptide)、一酸化窒素などが知られている (Fig. 4 : Li & Furness 1993 ; Brookes 2000 ; Costa et al. 2000 ; Matsuda et al. 2000 ; Olsson & Holmgren 2001)。

さらに腸の動きに関わる細胞にカハールの介在細胞 (ICCs : interstitial cells of Cajal) と呼ばれるペースメーカー細胞がある。*c-kit* が ICCs の細胞分化、機能発現に関与し、KIT 受容体タンパクの免疫染色が ICCs の特異的染色法として知られている (Ward et al. 1994)。ICCs は筋層間神経叢や粘膜下神経叢などに分布しており (Fig. 5 : Camborova et al. 2003)、ICCs で発生した活動電位は隣接する平滑筋へと伝えられ、腸の自発運動 (slow wave) が引き起こされると考えられている (Yamazawa & Iino 2002)。また、コリン作動性神経あるいは一酸化窒素作動性神経を介する平滑筋脳収縮や弛緩反応は、神経から一度 ICC にシグナルが伝わり、その後 ICC からギャップ結合を介して平滑筋へとシグナル伝達が起こると考えられている (Fig. 5 : Ward et al. 2004 ; Blair et al. 2014)。

腸は 3 種類の運動によって、食物の消化と肛門への運搬をおこなっている。分節運動、振子運動、蠕動運動である (Fig. 6)。分節運動は、輪走筋がある間隔を置いて収縮して、いくつかのくびれたところと膨らんだところとを交互につくる。そして、膨らんでいたところがかびれて、くびれていたところが膨らむ、といった形で交互にくり返される運動である。これにより食物と消化液が混和される。振子運動は、縦走筋の収縮と弛緩を繰り返す運動である。分節運動と同様に食物を粉碎し、混和する運動である。蠕動運動は食物の口側で主に輪走筋が収縮することでくびれが起こり、それが口側から肛門側へ向かって移動する運動であり、消化された食物・食塊を肛門側へ移動させる (Cannon 1898)。

腸の運動については、これまで電気生理学を用いて調べられている。哺乳類では、腸を取り出し運動時の筋肉や神経細胞の活動が観察されている (Jule 1980 ; Kunze et al. 1988 ; Brookes et al. 2001 ; Bian et al. 2003 ; Spencer et al. 2012)。また、取り出した腸をビデオ撮影すること (Spencer et al. 2011 ; Barnes et al. 2014 ; Dinning et al. 2014) や Fluo-4 を用いた Ca^{2+} イメージング (Tack & Smith 2004) によって、腸の運動について調べられている。これらの研究から腸の運動は、筋肉とそれを制御する ENS によって起こっていることは示されているが腸全体の運動と筋肉と神経活動の関係を示すことは難しく詳しいことはまだわかっていない。また、これらの方法では生体内で腸の運動についても解明できていない。

ゼブラフィッシュは腸の機能を研究するためのモデルとして優れている。ゼブラフィッシュの発生は早く、受精後 21 時間目胚で前腸、受精後 26 時間目で

後方の腸が形成され、受精後 34 時間目には腸は頭側から排泄腔へと伸びる (Wallace & Pack 2003)。受精後 74 時間目に輪走筋の層がみられ受精後 89 時間目までに縦走筋の層が腸全体で形成される (Kelsh & Eisen 2000; Olden et al. 2008)。受精後 96 時間目までに、腸神経は腸壁周辺で形成され、受精後 93~98 時間目の間に腸神経の前半 40%が作られる (Olden et al. 2008)。受精後 3 日目から伝播しない散発性の腸の収縮が見られ始め、受精後 4 日目になると規則的な運動パターンが現れる。受精後 5 日目にはゼブラフィッシュは餌を食べ始める (Ng et al. 2005)。

また、ゼブラフィッシュの腸は哺乳類の腸と基本的な機能は同じであるが、構造は哺乳類よりも単純になっている (Wallace et al. 2005)。構造は内腔から粘膜、筋層、しょう膜の順に構成され、粘膜筋板、粘膜下神経叢が欠損している。腸神経の細胞体は筋層間神経叢の一層で構成されている (Fig. 7; Wallace et al. 2005)。ゼブラフィッシュの腸神経細胞の数は哺乳類よりも少なく、受精後 5 日目の幼生では約 400 個 (Wallace et al. 2005) 受精後 8 日目の幼生では約 700 個 (Horiuchi & Nikaido 未発表データ) である。ゼブラフィッシュには胃が無く、腸は近位腸 (proximal intestine : PI)、中間部腸 (middle intestine : MI)、腸の末端部 (distal part of intestine : DI) の 3 つの部位に分けることが出来る。PI は胃の代替りの役割を持ち、MI は栄養分を吸収し、免疫の役割を持つ。DI は大腸と類似している (Fig. 8 ; Ng et al. 2005)。

一方で、哺乳類と共通な特徴も報告されている。ゼブラフィッシュの腸神経における神経伝達物質は 5-HT、アセチルコリン、VIP、PACAP、一酸化窒素、カルレチニンなどであり、これらは哺乳類の腸神経と共通している (Holmqvist et al. 2004 ; Holmberg et al. 2004, 2006 ; Levanti et al. 2008 ; Olsson et al. 2008 ; Uyttebroek et al. 2010)。ICCs についてもマーカー遺伝子の発現が確認されている (Rich et al. 2007, 2013)。さらに、エサを与えていないゼブラフィッシュ幼生の腸をビデオで撮影することで、自然発生的な腸の収縮の波が示されている (Fig. 9 ; Holmberg et al. 2007)。

しかし、これまで食塊を排泄する時の筋肉の振る舞いや神経ネットワークの活動について詳細には調べられていなかった。

Ca^{2+} は様々な組織や器官で、重要な細胞シグナルを調節する二次メッセンジャーである (Berridge 1998)。筋肉の収縮は、細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇に依存している。 Ca^{2+} の濃度が上昇することで、アクチンとミオシンが互いに滑りあい筋収縮が起こる。神経では、興奮が神経線維を伝導してきて終末部に達すると前シナプスへの Ca^{2+} 流入が生じる。それに応じて小胞膜とシナプス前膜が融合して、神経伝達物質が放出される。 Ca^{2+} 濃度変化を調べる方法の一つに遺伝学

的にコード化されたカルシウム指標 (GECIs : Genetically encoded calcium indicators) 用いるものがある (Palmer & Tsien 2006)。GECIs の一つに GCaMP (Fig. 10) がある。GCaMP はカルシウム結合ドメイン M13、GFP、カルモジュリンにより構成されている (Nakai et al. 2001)。GFP の N 末端側にカルモジュリンを C 末端側には M13 を結合した形をしている。Ca²⁺濃度が上昇し、Ca²⁺ がカルモジュリンに結合すると、M13 と相互作用して GFP の立体構造を変化させ、緑色蛍光の強度が増加する。また、アミノ酸の置換により GCaMP よりも明るく、感受性がより良い改良版がつけられている。その一つに GCaMP3 がある (Tian et al. 2009)。この GCaMP3 を用いて、私達は、ゼブラフィッシュの骨格筋の活動や神経細胞発生以前の脳原基の活動 (Okamoto et al. 2013) や、発生が進んだ胚の脳の神経やグリア細胞の Ca²⁺イメージングに成功している。

神経回路の機能解析は、神経細胞を発火、または欠損により他の神経細胞の応答や行動を調べることでおこなわれている。神経細胞を発火させる方法に光遺伝学 (optogenetics) がある。これは、光活性化イオンチャネルを神経細胞に発現させ、特定の波長の光を照射し、標的とする神経細胞を発火または抑制させるものである。光活性化イオンチャネルの一種に ChR2 (channelrhodopsin-2) がある (Fig. 11)。この ChR2 はクラミドモナス由来の膜タンパク質であり、青色光 ($\lambda = 460 \text{ nm}$) で活性化する陽イオンチャネルである (Nagel et al. 2003)。これまで、ChR2 を神経細胞で発現させ、ミリ秒単位で青色光照射により活動電位を発生させることが出来ることが示されている (Deisseroth et al. 2006)。しかし、腸の筋肉や神経細胞においてはおこなわれていない。

そこで本研究では Ca²⁺インジケータである GCaMP3 を発現する遺伝子組み換えゼブラフィッシュを用いて、蠕動運動時の筋肉や神経の Ca²⁺イメージングと ChR2 を用いた光遺伝学の技術を用いることで特定の筋肉細胞や神経細胞を人為的に活動させることで腸の運動を制御する平滑筋と神経系ネットワークの解明を目指した。

III 材料・方法

i. ゼブラフィッシュ

ゼブラフィッシュは研究室のインキュベータ内または兵庫県立大学光都キャンパス生体材料センターで飼育した。受精後1週間までのゼブラフィッシュは、飼育水を入れたシャーレで研究室の28.5°Cのインキュベータ内で飼育した。その後は生体材料センターへ移し、稚魚の頃はゾウリムシやひかりラボ(粉エサ)を与えた。成魚にはブラインシュリンプやオトヒメを与えた。生体材料センターでは、水温28.5°C、午前9時から午後11時までの14時間を明条件、残りの10時間を暗条件とした。ゼブラフィッシュの発生段階の記載は Kimmel et al. (1995) に従った。本研究で用いたトランスジェニックゼブラフィッシュは以下のものである。SAGFF(LF)134A (Nakayama et al. 2012)、Tg(hsp70 : Gal4) (Scheer et al. 2001)、Tg(UAS : GFP)、Tg(UAS : kaede) (Hatta et al. 2006)、Tg(UAS : GCaMP3)、Tg(UAS : ChR2-eYFP) (Boyden et al. 2005) である。

ii. 試薬

飼育水：人工海水塩 (600 mg)、0.0001%メチレンブルー in 純水 (10 L)

MESAB : $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ (1.0 g) と 3-Aminobenzoil acid ethyl (0.2 g) を dH_2O (50 ml) に溶かした溶液を 25×MESAB とし、希釈して用いた。

4% PFA (paraformaldehyde) : paraformaldehyde (1.74 g) を dH_2O (20 ml) に溶かし、pH を 7~8 に調節した溶液を 8% PFA とし、希釈して用いた。

PBS (phosphate-buffered saline) : NaCl (80 g)、 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ (29 g)、KCl (2 g)、 KH_2PO_4 (2 g) を dH_2O (1 L) に溶かし、pH を 7.4 に調節した溶液を 10×PBS とし、希釈して用いた。

iii. Kaede の光転換

光転換は Hatta et al. (2006) に従っておこなった。ゼブラフィッシュ幼生を MESAB に浸し麻酔をかけ、1% LMP アガロースゲル (A9045; Sigma-Aldrich) でボトムチャンバーに固定した。ゲルの乾燥を防ぐために、ゲルが固まってか

ら MESAB を入れた。共焦点顕微鏡 (TCS SP8 ; Leica) を用いて、標的の細胞に波長 405 nm のレーザー光を照射した。部分的に照射するために、ROI (region of interest) を使っておこなった。対物レンズは 63×/1.30 (Leica) を用いた。

iv. 熱ショック

28.5°C のインキュベータ内で育てていた幼生を、飼育水を入れたチューブに移した。これを、あらかじめ 37°C に温めておいたウォーターバスに 30 分間浸した。そして、再び 28.5°C のインキュベータ内で育てた。

v. Ca²⁺イメージング

ゼブラフィッシュ幼生を MESAB に浸し麻酔をかけ、1%LMP アガロースゲルに埋めてボトムチャンバーに固定した。観察時はゲルの乾燥を防ぐために、ゲルが固まってから MESAB を入れた。そして、共焦点顕微鏡 (FLUOVIEW FV300 ; OLYMPUS)、対物レンズ (20×/0.75, 40×/0.80 ; OLYMPUS) を用いて Ca²⁺イメージングをおこなった。撮影は 13 から 20 分の間でおこなった。画像の解析は Image J を用いた。

vi. 光遺伝学的手法

ゼブラフィッシュ幼生を MESAB に浸し麻酔をかけ、1%LMP アガロースゲルに埋めてボトムチャンバーに固定した。観察時はゲルの乾燥を防ぐために、ゲルが固まってから MESAB を入れた。そして、蛍光顕微鏡 (AxioPlan2 ; Zeiss)、DP72 カメラ (OLYMPUS)、対物レンズ (40×/0.80 ; OLYMPUS) を用いて青色光の照射をおこなった。画像獲得ソフトとして DP2-BSW (OLYMPUS) を用いて 1 秒間隔で撮影をおこない、Image J を用いて解析をおこなった。

vii. 抗体染色

抗体染色の方法は Ungos et al. (2003) に従っておこなった。ゼブラフィッシュ幼生を MESAB に浸し麻酔をかけた後、4% PFA で室温 2 時間浸して固定し、dH₂O で室温 30 分間 3 回洗った後、Blocking Solution で室温 1 時間反応させた。Blocking Solution で希釈した一次抗体と室温一晩反応させた。PBST でよく洗った後、Blocking Solution で希釈した二次抗体と室温一晩反応させた。

PBST でよく洗った後、50%グリセロール/PBS で封入し共焦点顕微鏡 (Leica) を用いて観察した。

Blocking Solution : 2% NGS, 1% Bovine Serum Albumin, 0.1% Triton X-100, 1% DMSO in PBS

一次抗体

Antigen	Host	Dilution	Company
GFP	Mouse	1/5000	Invitrogen
5-HT; serotonin	Rabbit	1/4000	Sigma-Aldrich

二次抗体

Antigen	Host	Dilution	Company
Mouse IgG (Alexa Fluor 488)	Goat	1/500	Life technologies
Rabbit IgG (Alexa Fluor 594)	Goat	1/500	Invitrogen

IV 結果

i ゼブラフィッシュの腸の構造

ダブルトランスジェニックゼブラフィッシュ SAGFF(LF)134A ; Tg(UAS : GFP)において、受精後 2 日目幼生から腸で GFP が発現することが報告されている (Fig. 12 ; Nakayama et al. 2012)。私は SAGFF(LF)134A 系統の腸における Gal4FF の発現箇所について調べるために、SAGFF(LF)134A ; Tg(UAS : Kaede)を作製し、光転換技術を用いて細胞を単一で識別した。受精後 5 日目幼生の腸に波長 405nm のレーザー光を照射し光転換をおこなった。このとき、ROI を用いて局所的 (直径約 3 μm) に照射した。その結果、局所的に赤色蛍光を標識することができた (Fig. 13)。標識された細胞はリボン状で、細長く、平らであり、端は細くなっていた。さらに、腸の周囲を半分以上周回していた (Fig. 13)。これらの特徴から輪走筋で Gal4FF が発現していることがわかった。

次に、Tg(hsp70:Gal4)の腸における Gal4 の発現箇所について調べるために、Tg(hsp70 : Gal4) ; Tg(UAS : GFP)の受精後 3 日目の幼生に熱ショックを与え、5 日目の幼生で 5-HT 抗体を用い抗体染色をおこなった。そして、共焦点顕微鏡で観察をおこなった。その結果、GFP は腸の粘膜、輪走筋、神経細胞でモザイクに発現していた (Fig. 14)。また、5-HT 抗体は神経細胞や粘膜の細胞の一部で標識していた (Fig. 14)。

ii 蠕動運動時の輪走筋における Ca^{2+} イメージング

筋肉の収縮は筋肉細胞に存在する Ca^{2+} 濃度の変化によって制御されている。そこで、蠕動運動時の輪走筋の活動を調べるために、 Ca^{2+} インジケーターの一種である GCaMP3 (Tian et al. 2009) をレポートする系統 Tg(UAS : GCaMP3) と、SAGFF(LF)134A を掛け合わせ、得られた幼生で Ca^{2+} イメージングをおこなった。受精後 5 日目幼生からエサとしてゾウリムシを与え、腸内に食塊を持つ受精後 8 日目幼生を側方から Ca^{2+} イメージングをおこなった。

その結果、蠕動運動時の輪走筋における Ca^{2+} イベントを観察することができた (Fig. 15 ; movie 1)。このとき蛍光強度は食塊の口側で強く、排泄腔側では弱くなっており、その境界は明確に見られた (Fig. 15c ; 矢印)。さらにこの Ca^{2+} イベントは口側と排泄腔側へと伝わっていく (Fig. 16, 17)。ここでは、口側への wave を AW : ascending wave、排泄腔側への wave を DW : descending wave

と呼ぶ。食塊は DW によって排泄腔側へと押し進められた。AW (n=14/22, 7 匹) と DW (n=14/22, 7 匹) は多くのサンプルで見られた。AW と DW は共に食塊の口側の同じ箇所から生じていた。

次にこの Ca^{2+} イベントの特徴をより詳しく調べるために、各現象の継続時間と間隔を求めた。継続時間は 50 % の明るさから再び 50 % の明るさまで下がる時間とした。継続時間は、9.6~106.2 秒で平均±標準偏差は 40 ± 22 秒 (n=87, 7 匹) であった。食塊の口側で起こる Ca^{2+} イベントの間隔は 175 ± 105 秒 (n=15, 4 匹) であった。

Fig. 15 の Ca^{2+} イメージングの結果を詳しく解析したところ、透過光イメージにおいて、口側から排泄腔へ伝わる規則的で頻度の多い腸の収縮が見られた

(Fig. 18)。この収縮の波は 1.14 (cycles/min) の頻度で起こり、速度の平均が 3.20 ± 1.22 ($\mu\text{m}/\text{sec}$) であった。また、エサを与えていない受精後 4 日目と 7 日目の SAGFF(LF)134A ; Tg(UAS : GCaMP3) 幼生でも Ca^{2+} イメージングをおこなった。すると、透過光イメージにおいて、口側から排泄腔へ伝わる腸の収縮が見られた (Fig. 19 ; movie 2 ; movie 3)。頻度は受精後 4 日目で 1.44 ± 0.12 (cycles/min)、受精後 7 日目で 1.74 ± 0.54 (cycles/min) であった。しかし、これらの収縮の波において GCaMP3 の蛍光強度の変化は見られなかった。

iii 蠕動運動時の輪走筋と神経細胞における Ca^{2+} イメージング

蠕動運動時の輪走筋以外の細胞の活動を調べるために、Tg(hsp70 : Gal4) ; Tg(UAS : GCaMP3) で Ca^{2+} イメージングをおこなった。排泄腔はアガロースで塞がれた状態でおこなった。受精後 6 日目幼生に熱ショックを与え、受精後 8 日目幼生を側方から Ca^{2+} イメージングをおこなった。その結果、輪走筋と神経細胞でモザイクに GCaMP3 が発現した。そして、蠕動運動時の輪走筋と神経細胞における Ca^{2+} イベントを同時に観察することができた (Fig. 20 ; movie 4)。Fig. 20 で示す結果では、輪走筋や神経細胞で起こる Ca^{2+} イベントの集団が 2 つのタイミングに分かれていた。一つは、食塊の口側の輪走筋が収縮する時に見られるもの (Fig. 20 ; 黄色三角)。もう一方は、排泄腔付近の輪走筋が収縮するときに見られるもの (Fig. 20 ; 白色三角) であった。また、口側から伸びている遠心性の軸索においても Ca^{2+} イベントが見られた (Fig. 20 ; 赤色三角)。排泄腔がアガロースで塞がれ食塊を排泄出来なくても、 Ca^{2+} イベントは繰り返し見られた (Fig. 20)。

iv 光遺伝学を用いた輪走筋の機能解析

腸を動かす時の輪走筋の機能を調べるために、私は SAGFF(LF)134A ; Tg(UAS:ChR2-eYFP) を作製した。受精後 8 日目の幼生をアガロースで固定し、直径 50 μm の狭い範囲で ChR2-eYFP を発現する輪走筋に青色光を照射した。すると青色光を照射した輪走筋で収縮が生じ、内腔が閉じた (n=11/13 ; Fig. 21a-c)。一方、収縮を起こした箇所 の口側、排泄腔側では収縮が見られなかった。

コントロールとして SAGFF(LF)134A ; Tg(UAS : GFP) を用いて GFP を発現する輪走筋に青色光を照射した場合は、輪走筋の収縮は見られなかった (n=11/11 ; Fig. 21d-f)。

v 光遺伝学を用いた神経細胞の機能解析

腸の運動に関わる輪走筋以外の細胞の機能を調べるために、私は Tg(hsp70 : Gal4) ; Tg(UAS : ChR2-eYFP) を作製した。まず、受精後 6 日目のゼブラフィッシュ幼生に熱ショックを与え、受精後 8 日目の幼生をアガロースで固定し、直径 50 μm の範囲で ChR2-eYFP を発現する部位に青色光を照射した。その結果、神経細胞でモザイクに ChR2-eYFP を発現させることができた。

(ChR2-eYFP の発現を確認したサンプルは 12 匹、その中で反応が見られたものは 2 匹)

Fig. 22 は、軸索を口側へ伸ばす神経細胞であった。この神経細胞に青色光を照射すると、照射箇所 の口側で腸の収縮が見られた。

また、排泄腔付近に 2 つの神経細胞で ChR2 が発現するものもあった (Fig. 23)。この神経細胞は軸索が腸の背側を通り反対側にまで伸ばしていた。この神経細胞に青色光を照射すると、排泄腔部分の速い腸の動き (頻度は $7.7 \pm 1.5/\text{min}$) が青色光照射時に停止した。また、5-HT 抗体で抗体染色をおこなったところ、標識されなかった。

次に、受精後 3 日目のゼブラフィッシュ幼生に熱ショックを与え、受精後 5 日目の幼生でも同様の実験をおこなった。すると受精後 6 日目の幼生に熱ショックを与えたときとは異なり、上皮、内分泌細胞 (EC 細胞)、粘膜層でモザイクに ChR2-eYFP が発現していた (Fig. 24)。直径 50 μm の範囲で青色光を照射したところ、照射箇所 の口側で収縮が起こり、排泄腔側では動きが見られなかった (Fig. 24)。この動きは蠕動運動に似たものであった。(ChR2-eYFP の発現を確認したサンプルは 22 匹、その中で蠕動運動に似た反応が見られたものは 5 匹)

V 考察

i SAGFF(LF)134A 系統の腸での Gal4FF 発現箇所

SAGFF(LF)134A ; Tg(UAS : Kaede)を用いて光転換を利用した実験の結果、標識された細胞はリボン状で、細長く、平らであり、端は細くなっていた。さらに、腸の周囲を半分以上周回していた (Fig. 13)。これらの特徴から、SAGFF(LF)134A 系統は腸の輪走筋で強く Gal4FF を発現していると考えられる。さらに、SAGFF(LF)134A 系統はゼブラフィッシュ幼生の輪走筋の機能解析に適した系統であると考えられる。また、今回観察した箇所において輪走筋の層は1層であった。これまでに成魚のゼブラフィッシュの輪走筋の層は2、3層で形成されていることが示されている (Fig. 25 ; Ball et al. 2012)。

ii Tg(hsp70 : Gal4)の腸での Gal4 発現箇所

哺乳類のENSにおいて下降性の介在ニューロンの一部はセロトニン作動性神経であることが知られている。また、ゼブラフィッシュのENSにおいてもセロトニン作動性神経が存在する事が報告されている (Fig. 26 ; Njagi et al. 2010)。本研究では、Tg(hsp70 : Gal4) ; Tg(UAS : GFP)の受精後3日目の幼生に熱ショックを与えると、輪走筋、神経細胞、粘膜の細胞でGFPがモザイクに発現した。5-HT抗体で抗体染色をしたとき、GFPを発現する神経細胞の一部で標識された。しかし、5-HT抗体で標識された細胞の全てでGFPは発現していなかった。従って、セロトニン作動性神経の一部と、それ以外の神経細胞の一部で、GFPが発現していたと考えられる。

一方、哺乳類の粘膜層にあるEC細胞はセロトニンの生産源の一つであり、生体内の総生産量の約95%を占めることが報告されている。また5-HT抗体による抗体染色によって腸クロム親和性細胞がゼブラフィッシュの腸でも確認されている (Fig. 26 ; Njagi et al. 2010)。本研究において、粘膜層でGFPを発現し、かつ5-HT抗体で標識された細胞は内腔側が細い涙型をしていた。これらのことより、Tg(hsp70 : Gal4)を用いることで、EC細胞にGal4を発現させることが出来ることが示された。

これらのことより、Tg(hsp70 : Gal4)は腸の様々な細胞の機能解析に有用であると考えられる。

iii 蠕動運動時の Ca^{2+} イメージング

GCaMP3 を用いて、蠕動運動時の輪走筋の Ca^{2+} イメージングをおこなった。その結果、蛍光強度は食塊の口側で強く、排泄腔側では弱くなっており、その境界は明確に見られた。また収縮が口側や排泄腔側へ伝わる AW と DW が見られた。SAGFF(LF)134A ; Tg(UAS : GCaMP3)を用いることで蠕動運動時の輪走筋の働きを可視化することに成功した。

DW は食塊の口側から起こることから、食塊は DW によって排泄腔方向へ運ばれ排泄されていると考えられる。一方 AW は口側の収縮領域を広げることで、食塊の推進力を強めていると考えられる。

食塊の口側で起こる Ca^{2+} イベントの間隔は 175 ± 105 秒 ($n=15$, 4 匹) であった。一度に排泄腔に食塊を運ぶのではなく数回に分けて運び、食塊があっても反応していない時間がある。運動神経のシナプス前に存在する自己受容体によるフィードバック制御が報告されており (Furness 2005)、そのために一度、筋肉の収縮が起きた後すぐに、収縮が起こらなかった可能性がある。また、未だ知られていない、CPG 様の回路が ENS に存在する可能性や、平滑筋の収縮持続時間に限界がある可能性が考えられる。

次に、Tg(hsp70 : Gal4) ; Tg(UAS : GCaMP3)で Ca^{2+} イメージングをおこなった。その結果、蠕動運動時の輪走筋と神経細胞における Ca^{2+} イベントを同時に観察することができた (Fig. 20 ; movie 4)。つまり、Tg(hsp70 : Gal4) ; Tg(UAS : GCaMP3)神経細胞の活動を単一細胞レベルで調べることが出来ると考えられる。

また、活動のタイミングが異なる集団が観察された (Fig. 20)。このことより、排泄腔付近の輪走筋 (Fig. 20b, b')、食塊の口側の輪走筋 (Fig. 20c, c') は、交互に (排他的に) 収縮する。食塊の口側の輪走筋は食塊が排泄腔方向に進む運動と一致しているが排泄腔付近の輪走筋は一致していない。従って、後者が蠕動反射に関連した運動であると結論される。画面上 (Fig. 20c, c') に神経細胞は 9 個広い範囲に分布しており、そのうちの 2 個は、排泄腔付近の筋肉に近いところに存在したが、これらは全て食塊の口側の輪走筋 (Fig. 20 c, c') が興奮している時に興奮し、排泄腔付近の輪走筋が興奮する時は興奮していなかった。これらのことから、この 9 個の神経細胞は、興奮性シナプスシナプスによるネットワークに含まれる蠕動反射回路の一員である可能性がある。

今後、神経タイプごとに分けてイメージング、ICCs や EC 細胞などでのイメージングが必要になると考えられる。

iv slow wave

哺乳類の腸には、slow wave という腸の収縮の波があることが報告されている (Furness 2005)。これは、頻度が約 1 (cycles/min) で ICCs によって生み出されている (Yamazawa & Iino 2002)。ゼブラフィッシュにも ICCs が存在することは c-Kit 抗体による標識によって示されている (Rich et al. 2007)。本研究では、受精後 4 日目、7 日目、8 日目幼生で、口側から排泄腔へ伝わる規則的で頻度の多い腸の収縮が見られた。各時期での頻度は受精後 4 日目幼生で 1.44 ± 0.12 (cycles/min)、7 日目で 1.74 ± 0.54 (cycles/min)、8 日目で 1.14

(cycles/min) であった。これまでに、受精後 4 日目と 7 日目のゼブラフィッシュ幼生で自然発生的な腸の収縮の波が報告されている。今回見られたこのイベントは Holmberg によって示されている、自然発生的な anterograde contractions (受精後 4 日目の幼生で 1.16 ± 0.15 (cycles/min)、7 日目で 1.05 ± 0.09 (cycles/min) ; Holmberg et al. 2007) や slow wave と同じものであると考えられる。

また、GCaMP3 の蛍光強度変化が見られなかったのは、slow wave に関わる細胞で GCaMP3 が発現していなかった可能性や、Ca²⁺濃度変化が GCaMP3 では検出できないぐらい少ないことが原因である可能性が考えられる。

v 光遺伝学による輪走筋の機能解析

SAGFF(LF)134A ; Tg(UAS : ChR2-eYFP)を用いて、光遺伝学による輪走筋の機能解析をおこなった。その結果、青色光を照射した箇所では収縮が見られたが、収縮を起こした箇所の口側、排泄腔側では収縮が見られなかった (Fig. 21)。このことより、筋肉の収縮だけでは口側や排泄腔側への腸の収縮、蠕動運動、あるいは、本研究で記載した AW や DW が起こらないと考えられる。

vi 光遺伝学による神経細胞や粘膜にある細胞の機能解析

本研究では、Tg(hsp70 : Gal4) ; Tg(UAS : ChR2-eYFP)を用いて、光遺伝学による腸神経細胞や粘膜にある細胞の機能解析をおこなった。

最初に、ChR2-eYFP が発現する口側へ軸索を伸ばす神経細胞でおこなった。この神経細胞に青色光を照射すると、その神経細胞よりも口側で腸の収縮が起こった (Fig. 22)。軸索を伸ばす方向や収縮を起こす箇所から Fig. 23 の神経細胞は Fig. 3b 内の 3 の介在神経であると考えられる。

次に、排泄腔付近で ChR2-eYFP を発現する 2 つの神経細胞でおこなった。この神経細胞に青色光を照射すると、排泄腔部分の速い腸の動きが停止した (Fig. 23)。したがって、これらの細胞は抑制性運動神経細胞か、それを制御する介在神経細胞である可能性がある。2 つの神経細胞の形態を区別することはできなかったが、2 本の軸索と考えられる神経線維が、背側正中線を越えて、両側にまたがって投射する興味深い特徴を持つ。また、排泄口の規則正しい収縮の頻度が $7.7 \pm 1.5/\text{min}$ であり、食塊の通過とは無関係に他の腸の動きに比べ動きが頻繁に起こっていた。このことから、蠕動反射とは別に、排泄腔付近における運動を制御する特殊な神経回路が存在すると考えられる。ちなみに、この動きと関連する筋肉や神経細胞における Ca^{2+} イベントは、観察できていない。

次に、ChR2-eYFP を発現する粘膜細胞や EC 細胞 (Fig. 3b-1) でおこなった (Fig. 24)。すると青色光の照射箇所は口側で収縮が起こり、排泄腔側では動きが見られない結果になった (Fig. 24)。EC 細胞は、内分泌細胞であり、内腔の食物から刺激を得ると粘膜内にセロトニンを放出する。そして内在性知覚ニューロン (IPAN ; Fig. 3b-2) が興奮し、介在性ニューロン (Fig. 3b-3, 7)、運動神経 (Fig. 3b-4, 8) へとシグナルが伝わり、口側の平滑筋が収縮し排泄腔側の平滑筋は弛緩する。これにより、蠕動運動が起こっていると考えられている。このことより、ChR2-eYFP を発現する EC 細胞に青色光を照射することで蠕動反射を人為的に引き起こすことに成功したと考えられる。

本研究では、 Ca^{2+} イメージングを用いて、腸の平滑筋と神経細胞の振る舞いを生きた脊椎動物の体内で観察する事に世界で初めて成功した。また、光遺伝学を初めて腸に応用し、1~数個の細胞を興奮させるだけで、ゼブラフィッシュ幼生の腸の局所的な運動を引き起こせる事を証明した。今後これらの研究が、脊椎動物における腸の振る舞いを制御する筋肉、ENS、他の細胞の機能を生体内において、単一細胞レベルで調べるための基礎になると期待される。

VI 図・動画

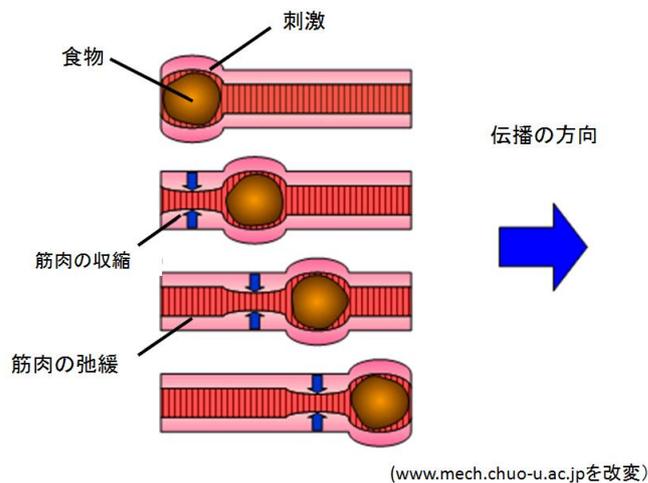


Fig. 1 : 蠕動運動

蠕動運動の模式図。腸が食物の刺激を受け、筋肉を収縮させ食物を一定方向に運ぶ。

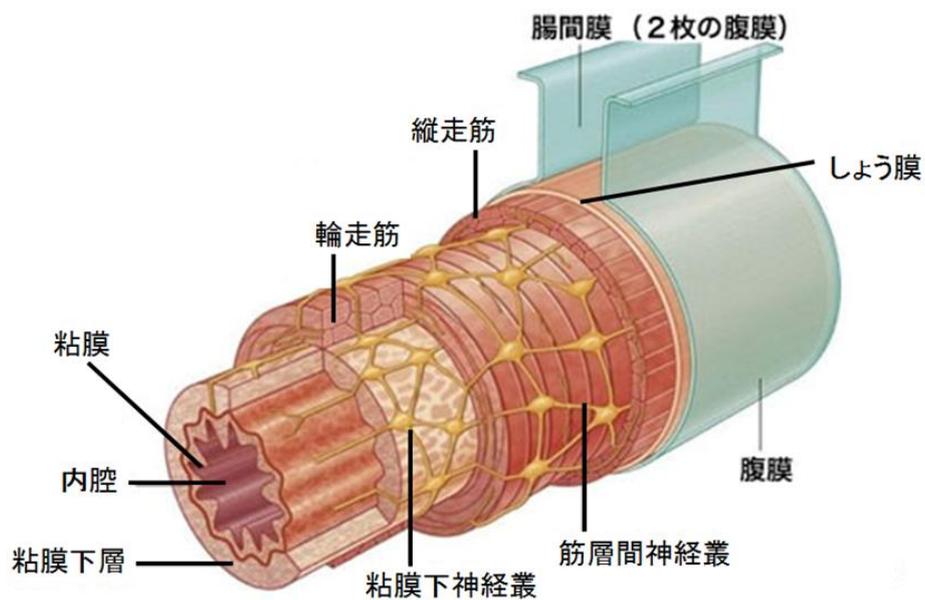


Fig. 2 : 哺乳類の腸の構造

腸は層構造であり、内腔から、粘膜、粘膜下層、粘膜下神経叢、輪走筋、筋層間神経叢、縦走筋、しょう膜の順に構成される。

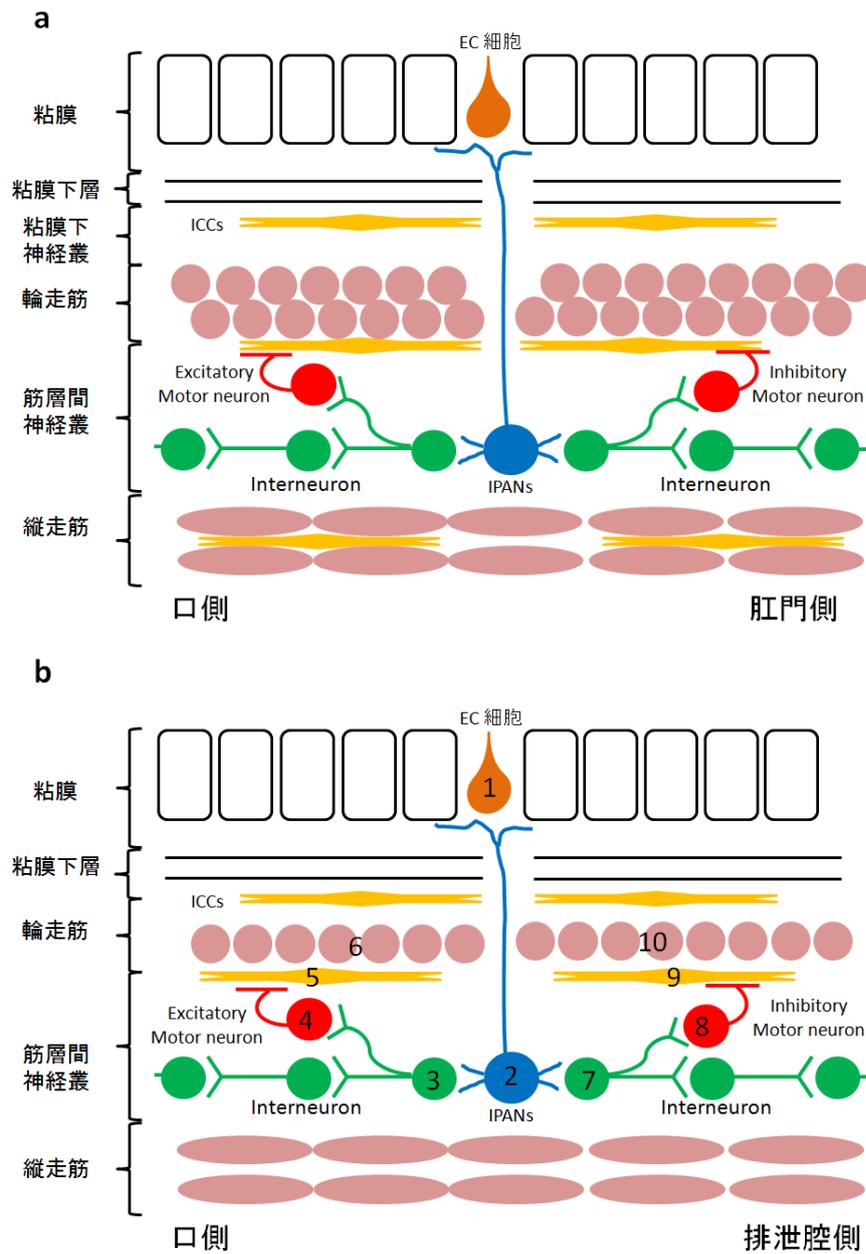


Fig. 3 : 哺乳類とゼブラフィッシュの蠕動反射に関わる神経回路の模式図

a : 哺乳類における蠕動反射に関わる神経回路の模式図。

b : ゼブラフィッシュにおける蠕動反射に関わる神経回路の仮想の模式図。

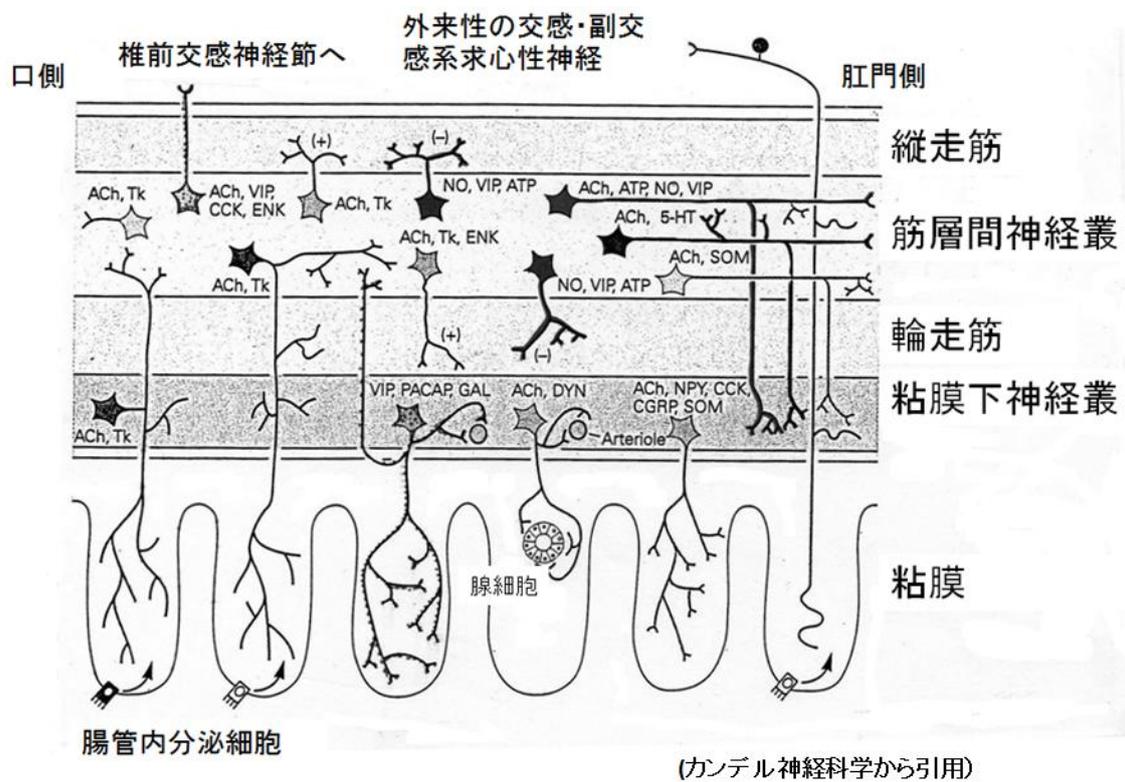
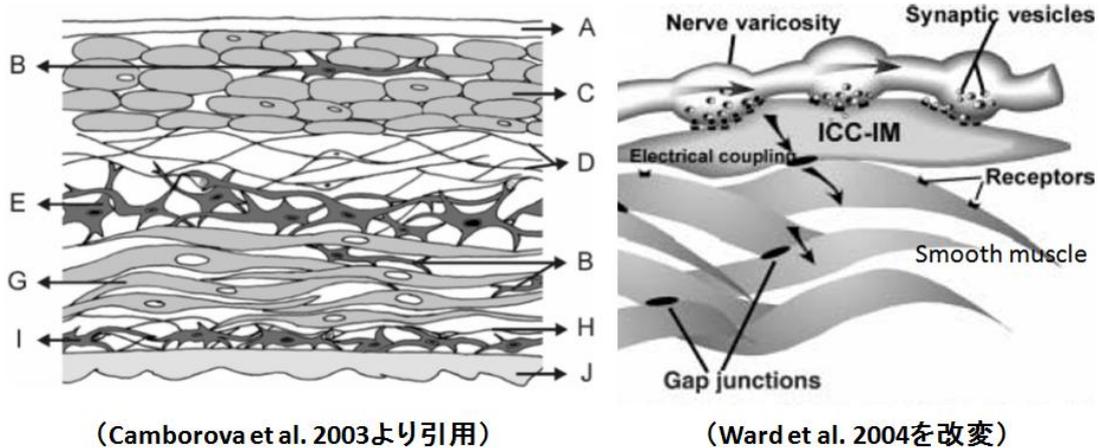


Fig. 4 : モルモットの小腸の筋肉と神経叢の構成

腸神経系では形態、化学的性質、機能的性質から少なくとも14種類のニューロンが同定されている。

ACh : アセチルコリン、ATP : アデノシン三リン酸、CCK : コレシストキニン、CGRP : カルシトニン遺伝子関連ペプチド、DYN : ダイノルフィン、ENK : エンケファリン、GAL : ガラニン、NPY : ニューロペプチドY、NO : 一酸化窒素、PACAP : 下垂体アデニル酸シクラーゼ活性化ペプチド、SOM : ソマトスタチン、Tk : タキキニン、VIP : 血管作動性腸管ペプチド、5-HT : セロトニン

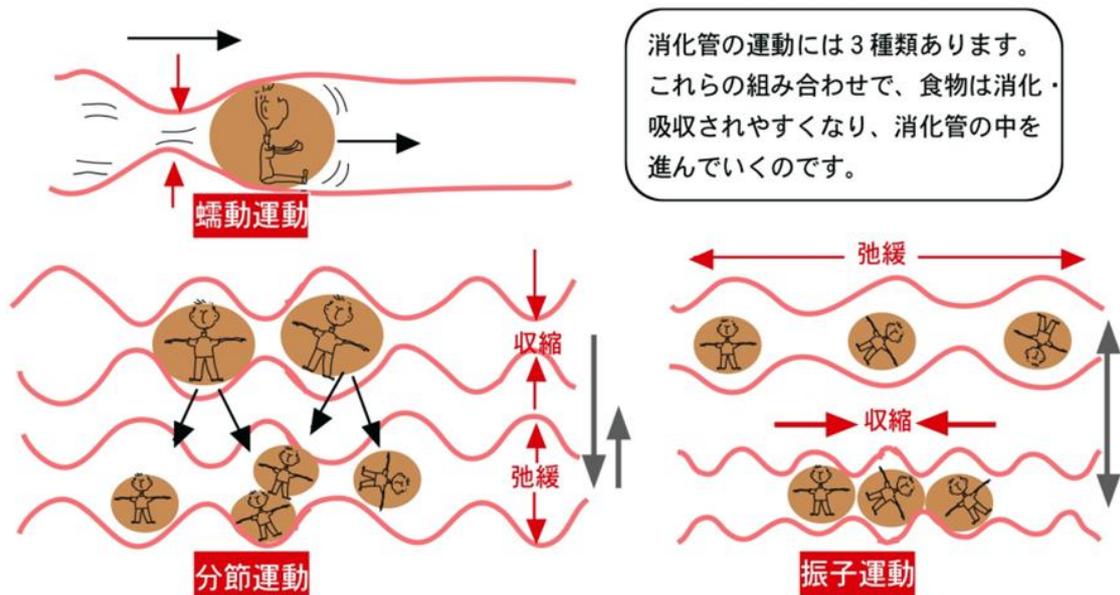


(Camborova et al. 2003より引用)

(Ward et al. 2004を改変)

Fig. 5 : 腸の運動に関わるカハールの介在細胞 (ICC)

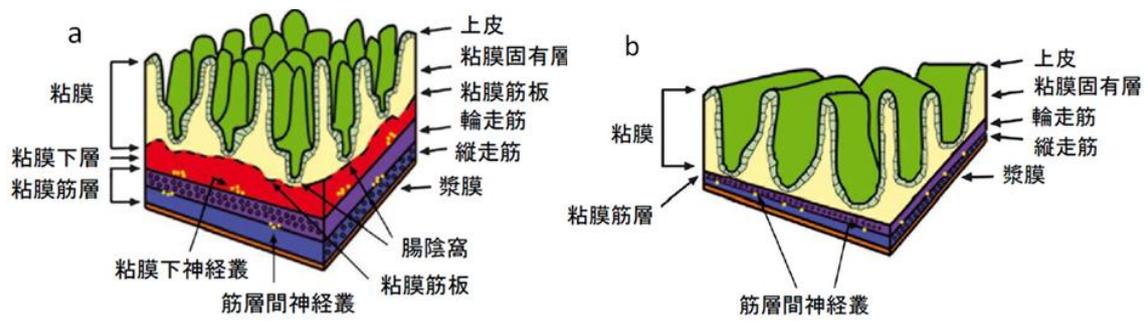
A : しょう膜 B : 筋層内に分布する ICC (ICC-IM : intramuscular-ICC) C : 縦走筋 D : 筋層間神経叢 E : 筋層間神経叢に分布する ICC (ICC-MY : myenteric-ICC) G : 輪走筋 H : 粘膜下神経叢 I : 粘膜下神経叢に分布する ICC (ICC-SM : submucosal-ICC) J : 粘膜下層 神経から一度 ICC にシグナルが伝わり、その後 ICC からギャップ結合を介して平滑筋へとシグナル伝達が起こると考えられている。



(<http://shiratorik-kango.blog.so-net.ne.jp/2013-03-07-2>より引用)

Fig. 6 : 腸で見られる3種類の運動

食塊を肛門側へ運ぶ蠕動運動。食物を粉碎し、食物と消化液を混和させる分節運動、振子運動がある。これらの運動により食物は消化吸収されやすくなり、肛門側へと進んでいく。



(Wallace et al. 2005を改変)

Fig. 7 : 哺乳類と硬骨魚類の腸の構造

a : 哺乳類の腸の構造の模式図 b : ゼブラフィッシュの腸の構造の模式図

ゼブラフィッシュの腸の構造は哺乳類と比べ単純な構造になっている。

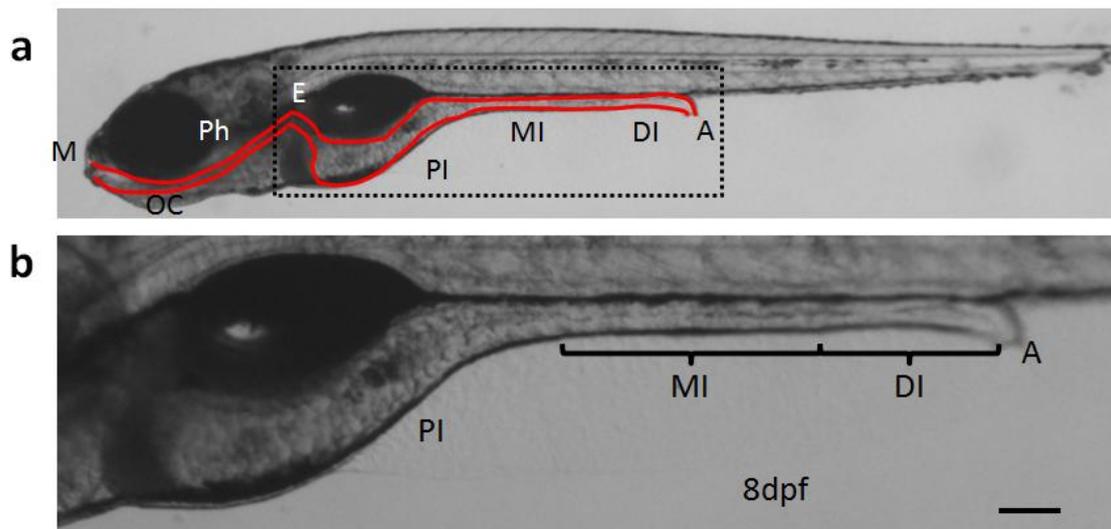


Fig. 8 : ゼブラフィッシュの消化管

a : 生後 8 日目のゼブラフィッシュ幼生を側方から観察したもの。

赤色の線は消化管の輪郭を示している。M: 口 (mouth)、OC: 口腔 (oral cavity)、Ph : 咽頭 (pharynx)、E : 食道 (esophagus)、PI : proximal intestine、MI : mid intestine、DI : distal intestine、A : 排泄腔 (anal) b : a の四角部の拡大図。スケールバーは 50 μ m

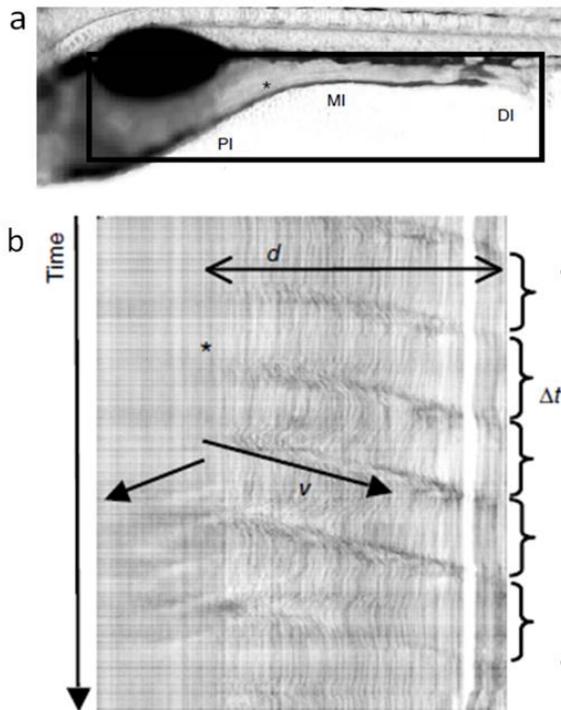
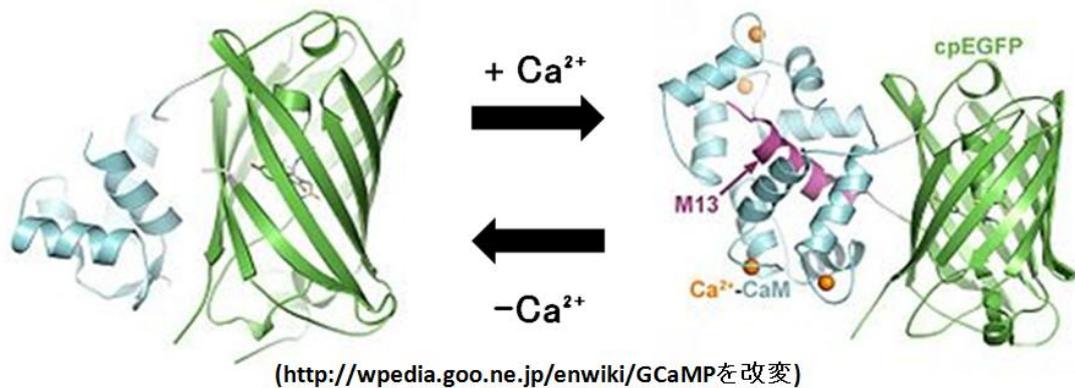


Fig. 9: ビデオ撮影によるゼブラフィッシュの腸の観察

a: 時空間図の作製部位 (四角の領域)

b: 時空間図。d は収縮の波が伝わった距離 Δt は収縮の波の間隔

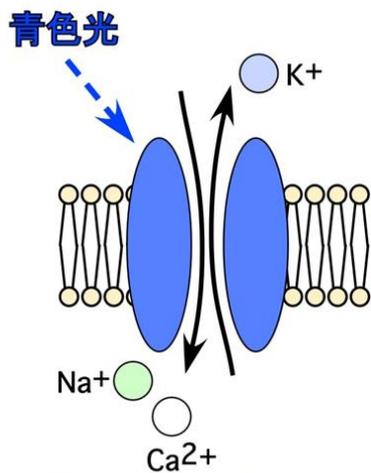
(Holmberg et al. 2007から引用)



(<http://wpedia.goo.ne.jp/enwiki/GCaMP>を改変)

Fig. 10 : GCaMP

Ca^{2+} (オレンジ色) が結合した状態 (左図) と結合していない状態 (右図) を示している。GCaMP は GFP (緑色)、カルモジュリン (青色)、M13 (紫色) から構成される。 Ca^{2+} が結合していないと GFP の構造がゆがみ蛍光強度が弱い、 Ca^{2+} 濃度が上昇し Ca^{2+} がカルモジュリンに結合すると構造が変化し、GFP の構造が正常に戻り蛍光強度が上昇する。



(<https://bsd.neuroinf.jp/wiki/光遺伝学から引用>)

Fig. 11 : チャンネルロドプシン 2 (ChR2)
 クラミドモナス由来の膜タンパク質であり、青色光 ($\lambda = 460 \text{ nm}$) を受容すると活性化する陽イオンチャネルである。

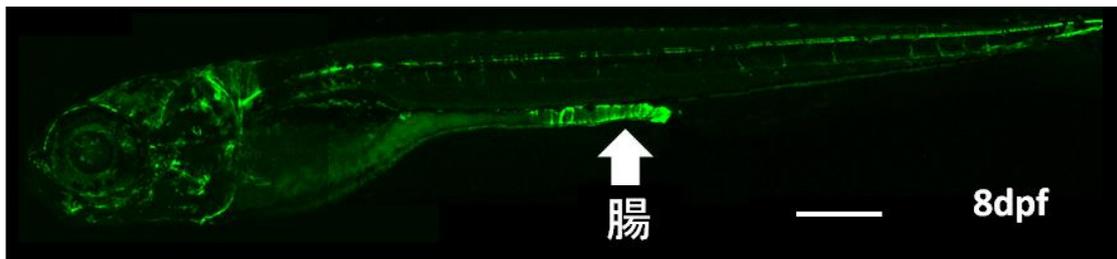


Fig. 12 : SAGFF(LF)134A; Tg(UAS:GFP)

受精後 8 日目の幼生。腸において発現が見られる。スケールバーは $200 \mu\text{m}$

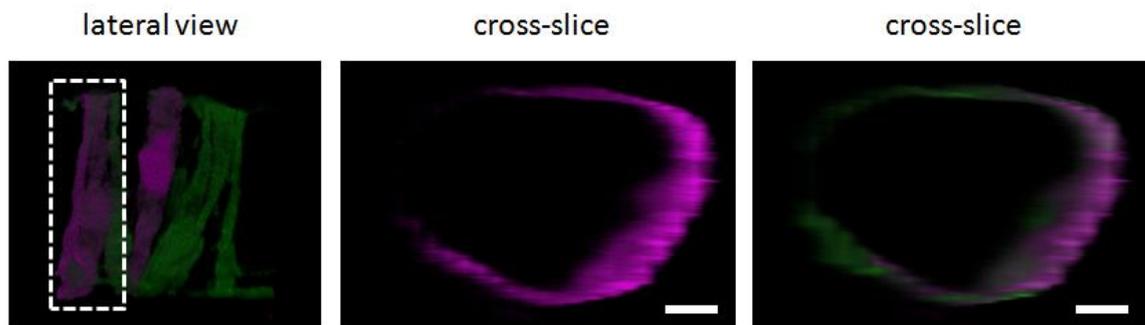


Fig. 13 : 輪走筋の形態

受精後 5 日目の SAGFF(LF)134A ; Tg(UAS : Kaede)幼生の輪走筋に 405 nm のレーザー光を照射したところ、局所的に輪走筋を赤色蛍光で標識することに成功した。側方から見た図 (lateral view) と腸の横断面の図。横断面の図は側方から見た図の左側の輪走筋の図である。スケールバーは $10 \mu\text{m}$

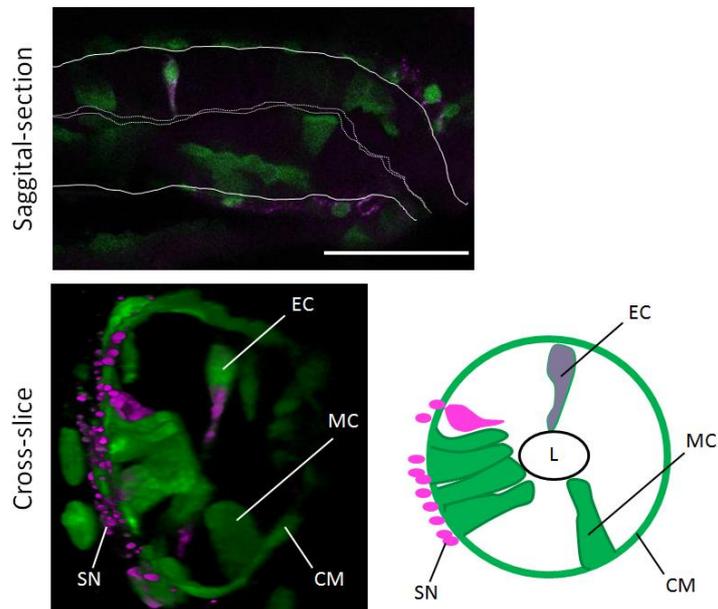


Fig. 14 : ゼブラフィッシュの腸の構造

受精後 3 日目の $Tg(hsp70 : Gal4) ; Tg(UAS : GFP)$ 幼生に熱ショックを与え、5 日目幼生で GFP 抗体 (緑) と 5-HT 抗体 (マゼンタ) を用いて抗体染色をおこなった。CM : 輪走筋、MC : 粘膜、EC : 内分泌細胞、SN : 神経細胞、で GFP の発現が見られた。L : 内腔

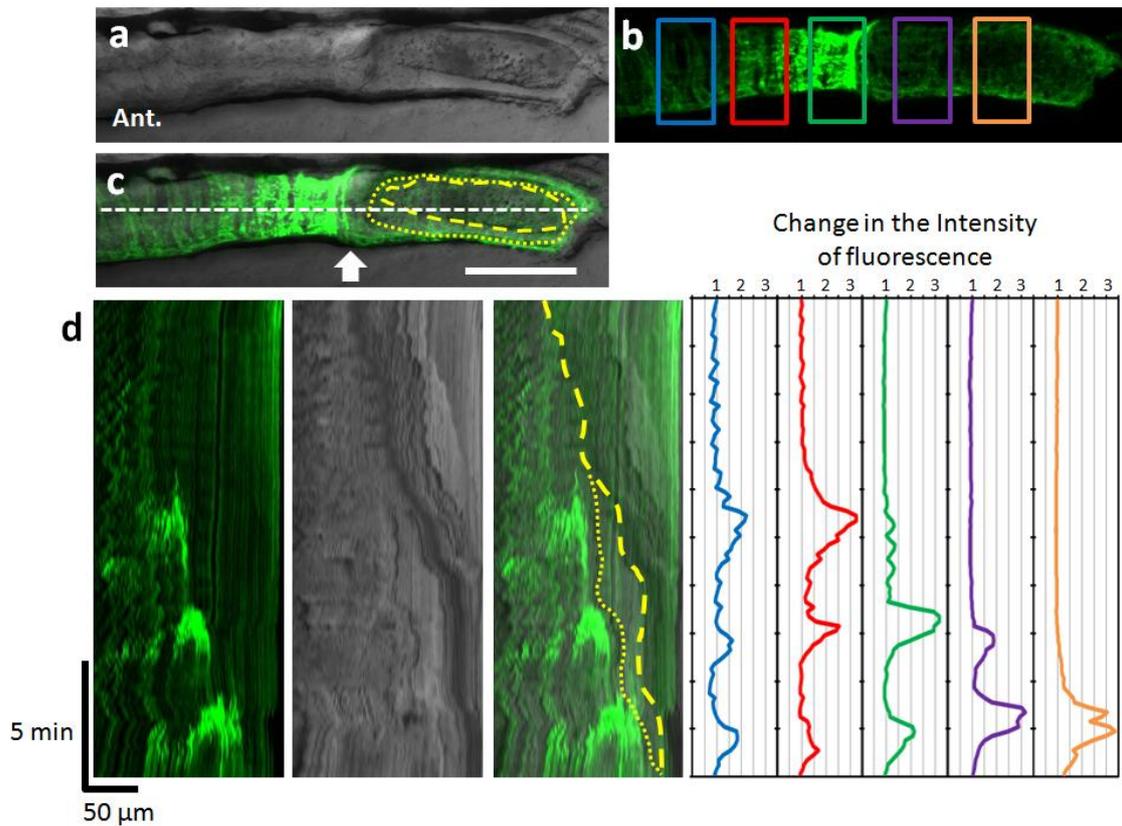


Fig. 15 : 蠕動運動時の輪走筋における Ca^{2+} イメージング

a-c : 受精後 8 日目の SAGFF(LF)134A ; Tg(UAS : GCaMP3) 幼生の側方から見た図。**a :** 明視野の図。Ant. は頭側 (anterior)。**b :** GCaMP3 の蛍光の図。図内の四角は蛍光強度の測定部位を示す。**c :** 明視野の図と GCaMP3 の蛍光を重ね合わせた図。黄色の破線は食塊の外枠、黄色の点線は食塊の周りにある粘性物の外枠を示している。スケールバーは $50 \mu\text{m}$ **d :** 時空間図と蛍光強度の時間変化。**c** 内の白色点線箇所で作製。

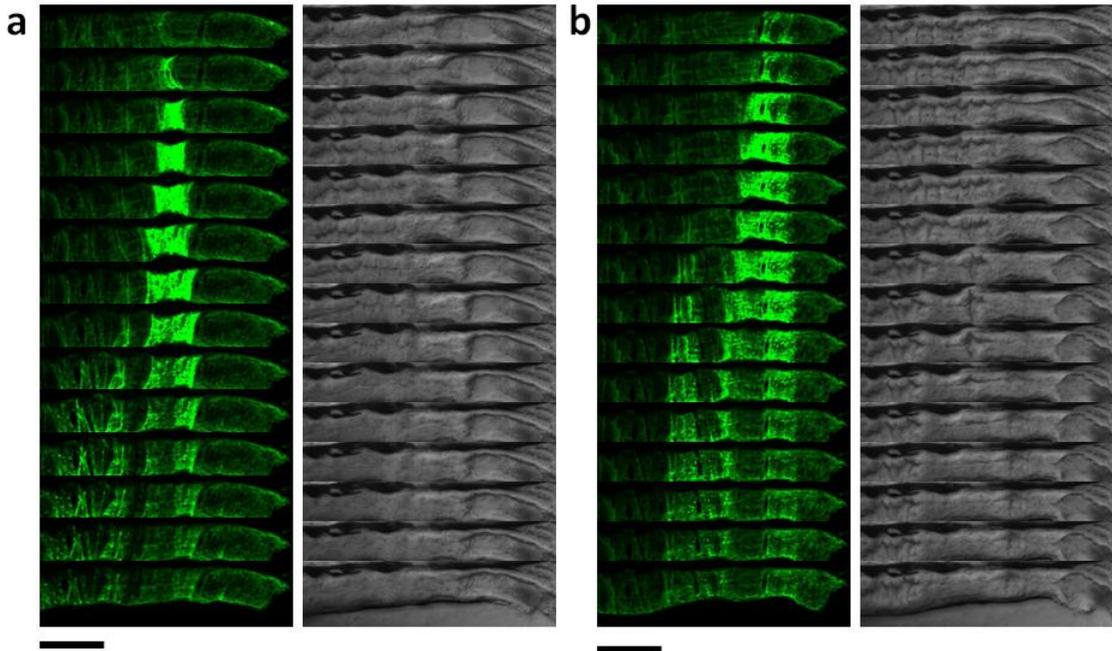


Fig. 16 : 時空間図

Fig. 15 の 2 つ目 (a) と 3 つ目 (b) の Ca^{2+} イベントの時空間図。間隔は 11 秒である。スケールバーは $50 \mu\text{m}$

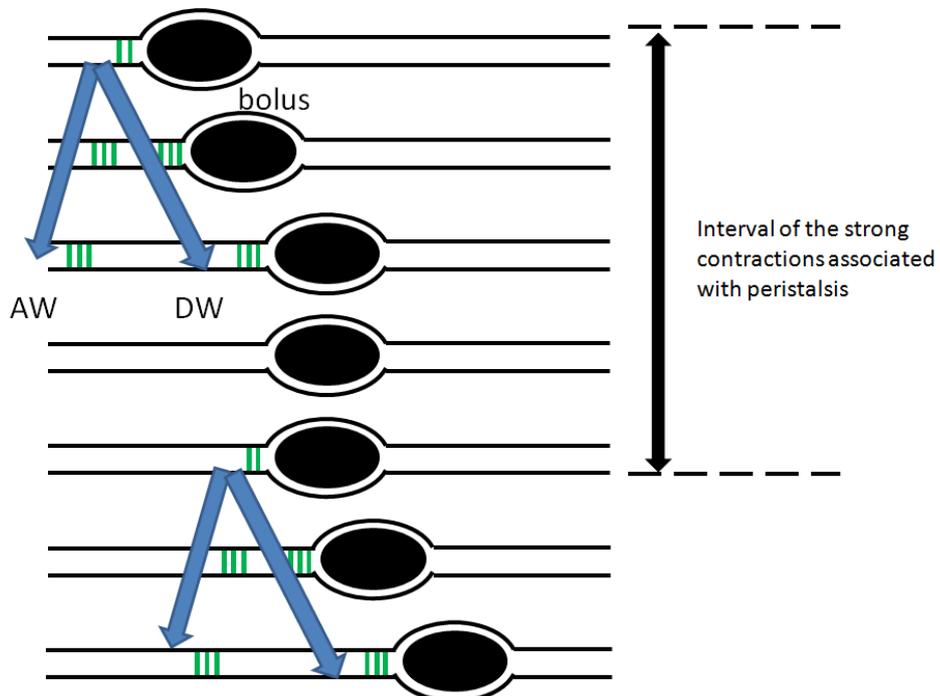


Fig. 17 : 蠕動運動時の Ca^{2+} wave の模式図

GCaMP3 の蛍光強度が上昇した箇所を緑色の線で示している。黒丸は食塊 (bolus) を表している。AW : ascending wave、DW : decending wave

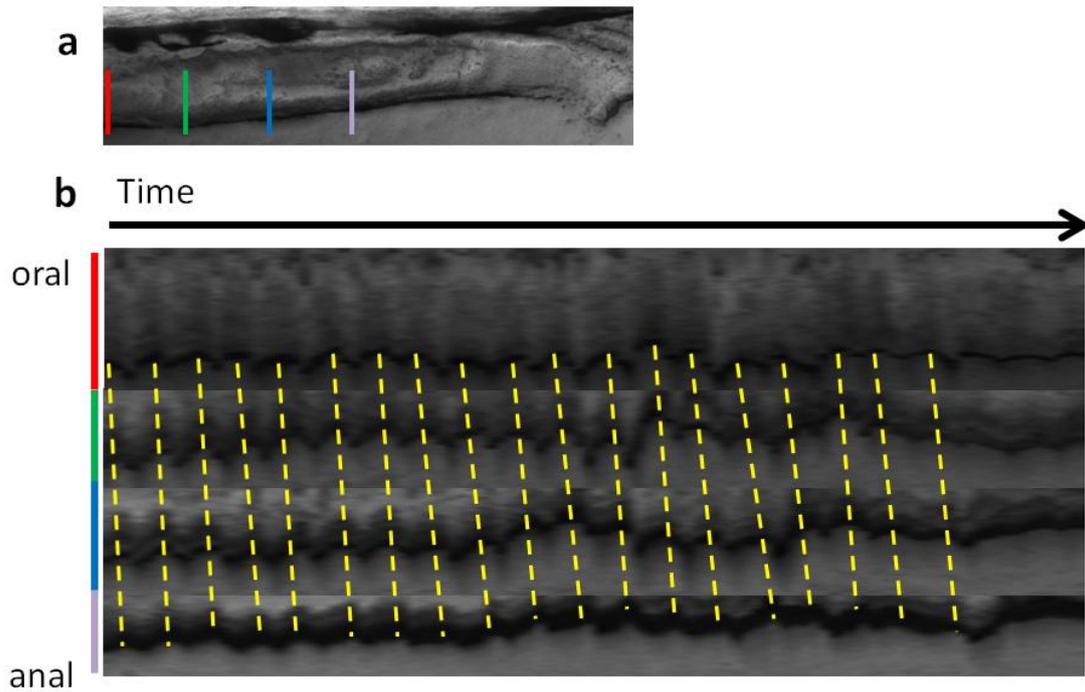


Fig. 18 : slow wave に似た動き

a : Fig. 15 のサンプル。赤色、緑色、青色、紫色の線は解析箇所を示している。

b : 左の色の線は **a** 内の線の色と対応している。腸が収縮している所を黄色の破線で示している。

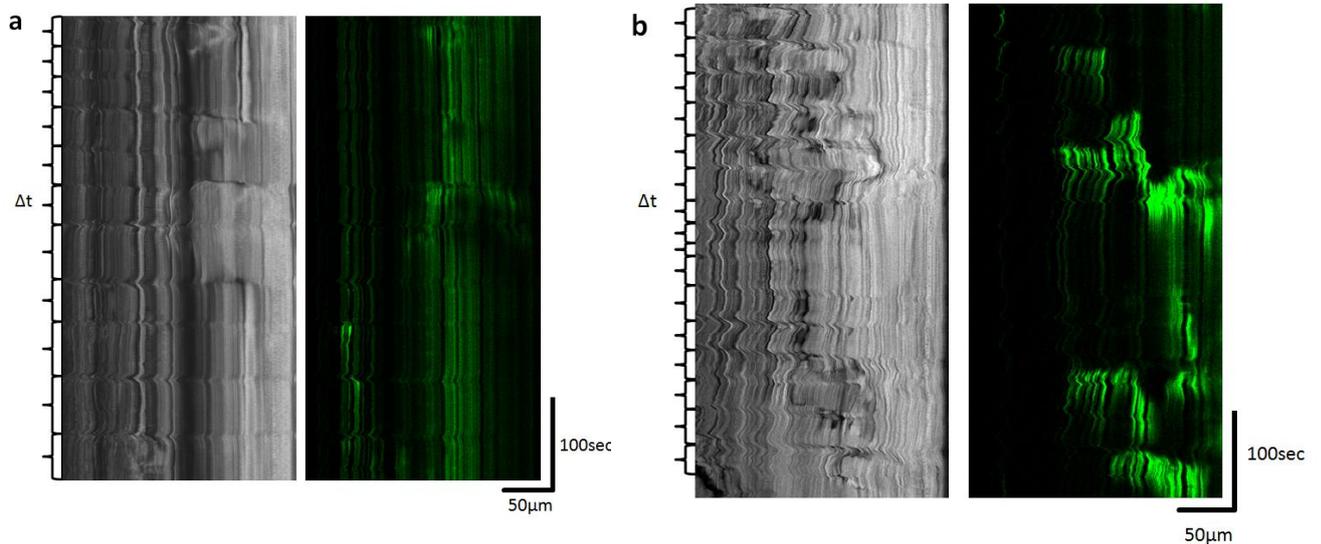


Fig. 19 : 受精後 4 日目と 7 日目の腸の Ca^{2+} イメージング

a, b : SAGFF(LF)134A ; Tg(UAS : GCaMP3) の受精後 4 日目 (**a**) と 7 日目 (**b**) の幼生の腸の Ca^{2+} イメージングの結果を時空間図で示したもの。

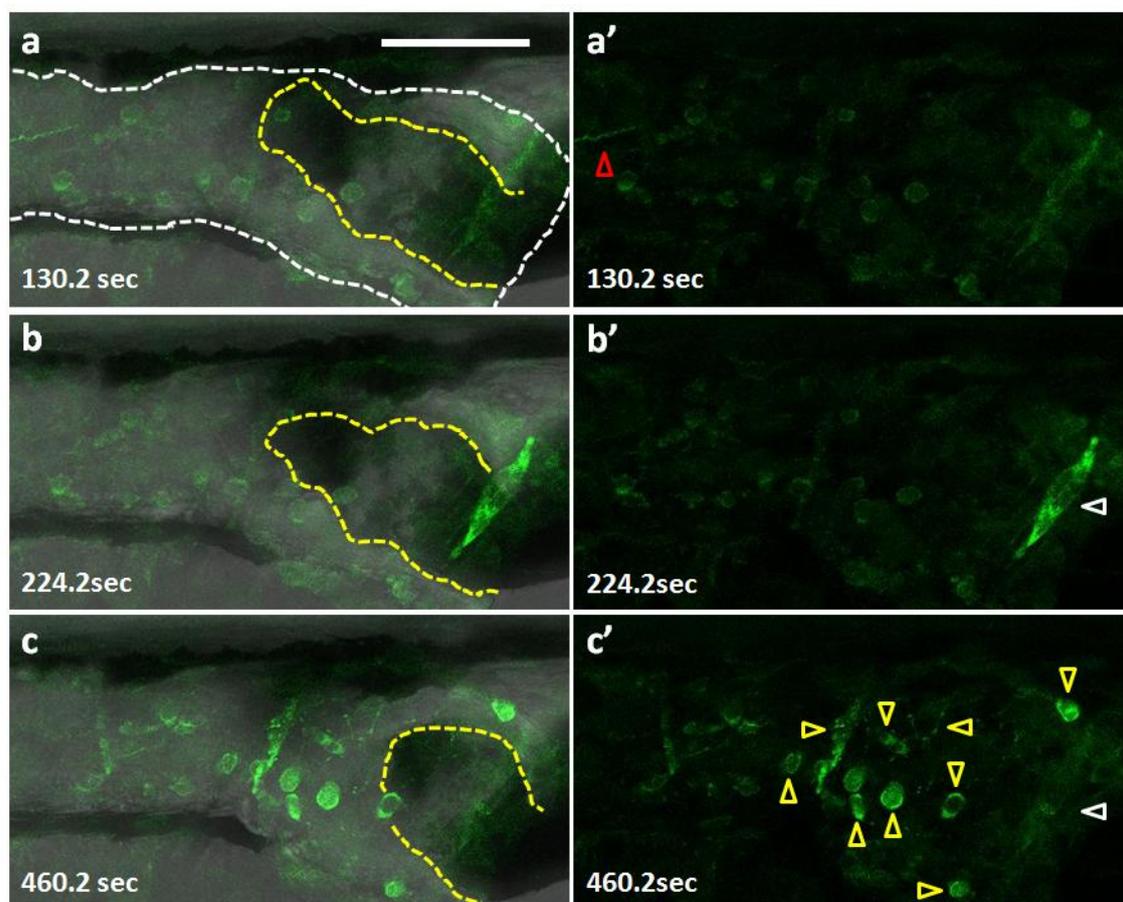


Fig. 20 : 蠕動運動時の輪走筋と神経細胞における Ca^{2+} イメージング

Tg(hsp70 : Gal4) ; Tg(UAS : GCaMP3)の受精後 6 日目の幼生に熱ショックを与え、受精後 8 日目で Ca^{2+} イメージングをおこなった。**a-c** : GCaMP3 の蛍光と明視野を重ね合わせた図。黄色の破線は食塊の外枠を示している。**a'-c'** : GCaMP3 の蛍光の図。**a, a'** : 口側から伸びている遠心性の軸索 (赤色三角) **b, b'** : 排泄腔付近の収縮が起きたときの GCaMP3 の蛍光強度の上昇 (白色三角) **c, c'** : 蠕動運動時の筋肉と神経細胞の GCaMP3 の蛍光強度の上昇 (黄色三角) スケールバーは 50 μm

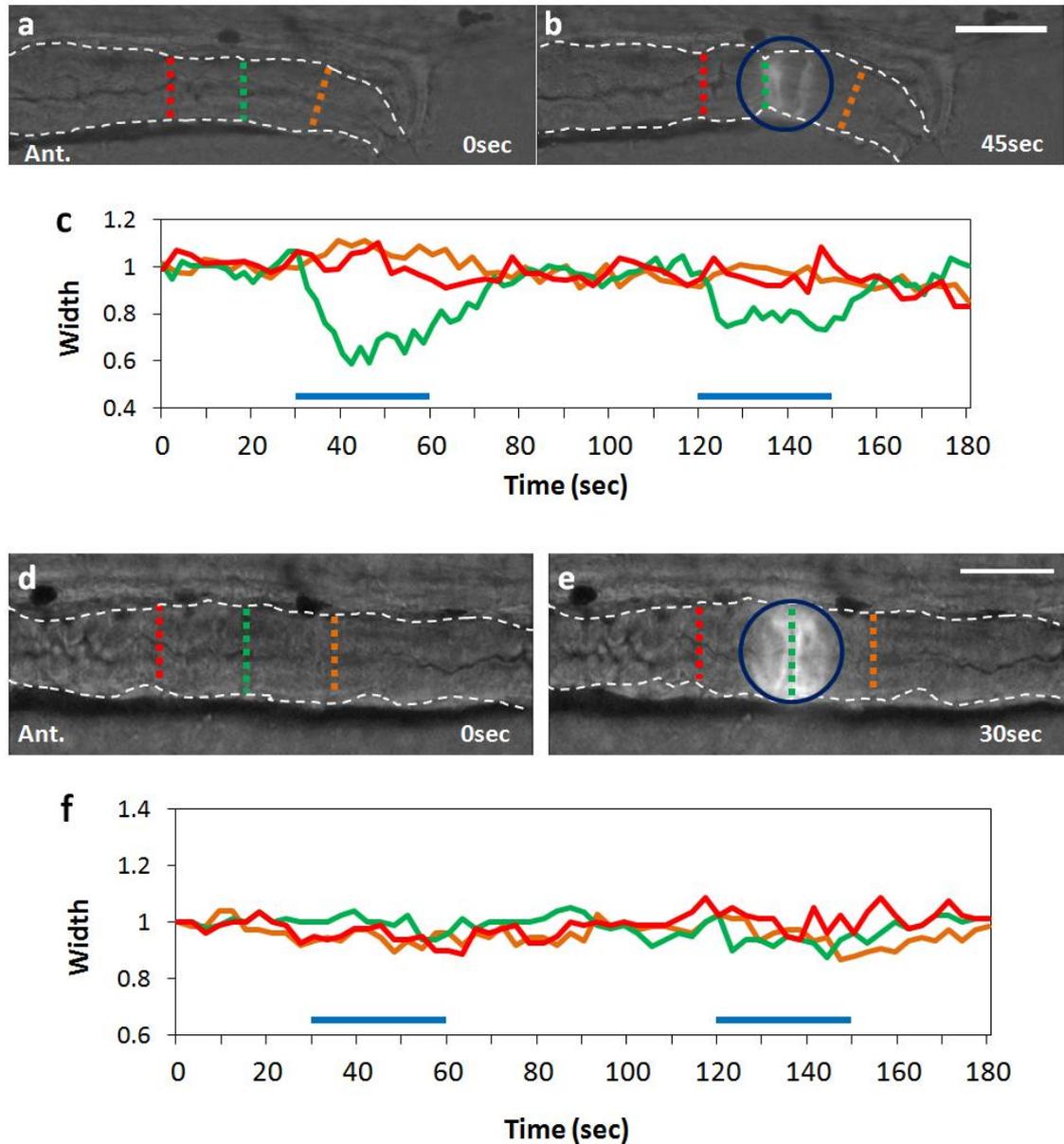


Fig. 21 : 輪走筋における ChR2 を用いた光遺伝学

SAGFF(LF)134A ; Tg(UAS : ChR2-eYFP) (a-c)、SAGFF(LF)134A ; Tg(UAS : GFP) (d-f) の受精後 8 日目の ChR2 を発現する輪走筋に青色光を照射して腸の動きを調べた。a, d : 0 秒時の側面から見た腸の図。b, e : 青色光 (488 nm) を照射したときの側面から見た腸の図。c : a, b の 3 つの線で示す箇所の腸の幅の長さを測定したもの。f : d, e の 3 つの線で示す箇所の腸の幅の長さを測定したもの。緑色線は青色光を照射した所、赤色線は青色光を照射した所よりも頭側、オレンジ色線は排泄腔側である。青色線は青色光を照射した時間を示している。スケールバーは 50 μm

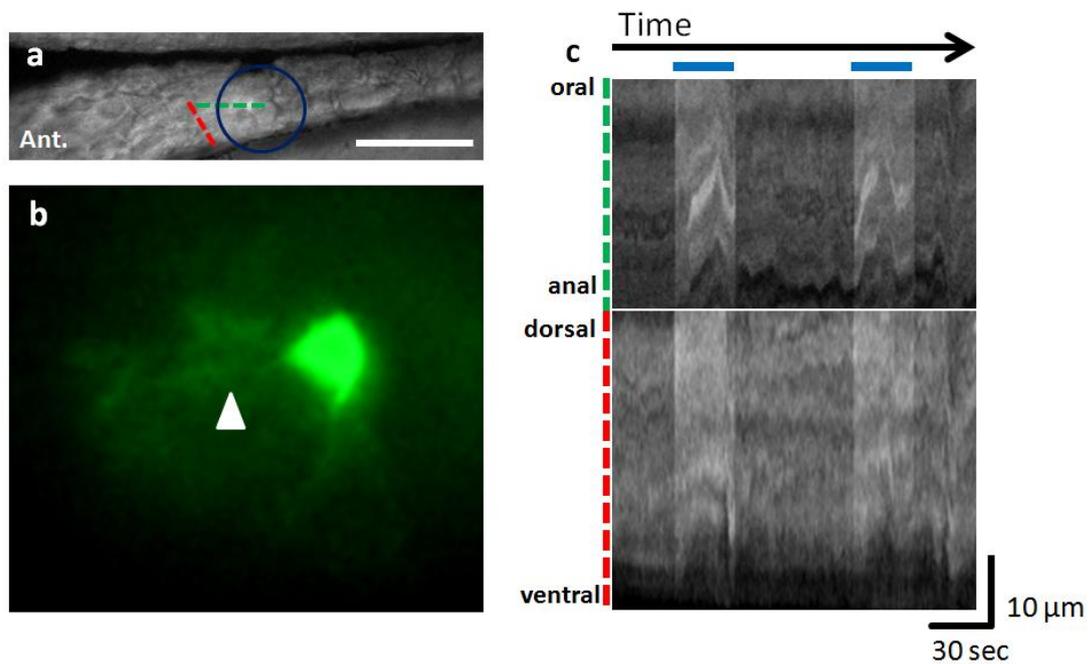


Fig. 22 : ChR2 による単一の神経細胞の活性

Tg(hsp70 : Gal4) ; Tg(UAS : ChR2-eYFP)の受精後 6 日目幼生に熱ショックを与えた後、8 日目幼生で ChR2 を発現する神経細胞に青色光を照射し、腸の動きを調べた。**a** : 8 日目幼生の腸を側方から観察した図。青色の丸は青色光の照射箇所。緑色の破線は頭尾軸に沿って解析した箇所。赤色の破線は青色光の照射箇所よりも口側の部分を背腹軸に沿って解析した箇所。スケールバーは 50 μm 。**b** : 青色光を照射した ChR2 が発現する神経細胞。口側と腹側に軸索を伸ばしている (白色三角)。**c** : **a** の緑色破線と赤色破線における時空間図。青色線は青色光を照射した時間を示している。

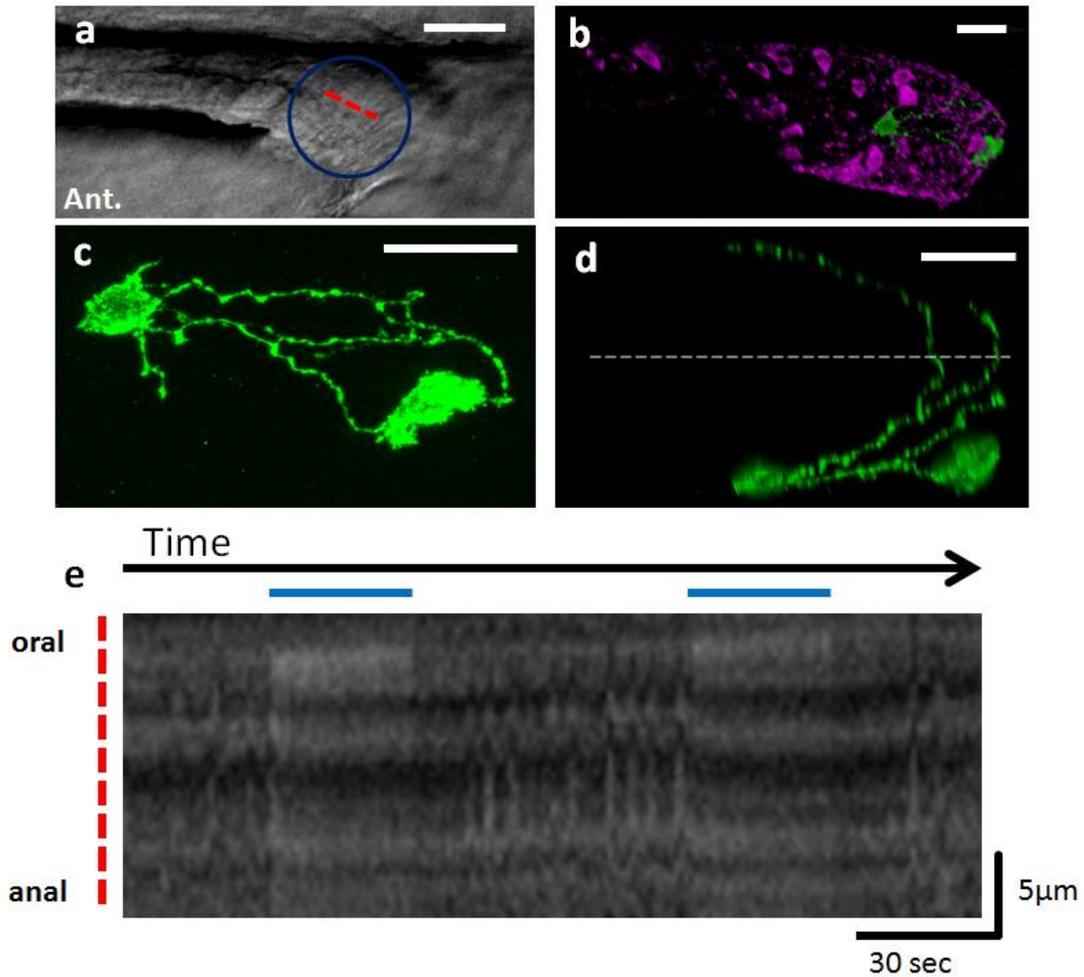


Fig. 23 : ChR2 による神経細胞の活性

Tg(hsp70 : Gal4) ; Tg(UAS : ChR2-eYFP)の受精後 6 日目幼生に熱ショックを与えた後、8 日目幼生で ChR2 を発現する神経細胞に青色光を照射し、腸の動きを調べた。**a** : 8 日目幼生の腸を側方から観察した図。青色の丸は青色光の照射箇所。赤色の破線は解析箇所。**b** : GFP 抗体 (緑色) と 5-HT 抗体 (マゼンタ) で染色した結果。**c, d** : GFP 抗体の結果のみを示した図。白色破線は正中線を示している。**e** : **a** 内の赤色線における時空間図。青色線は青色光を照射した時間を示している。スケールバーは 20 μm

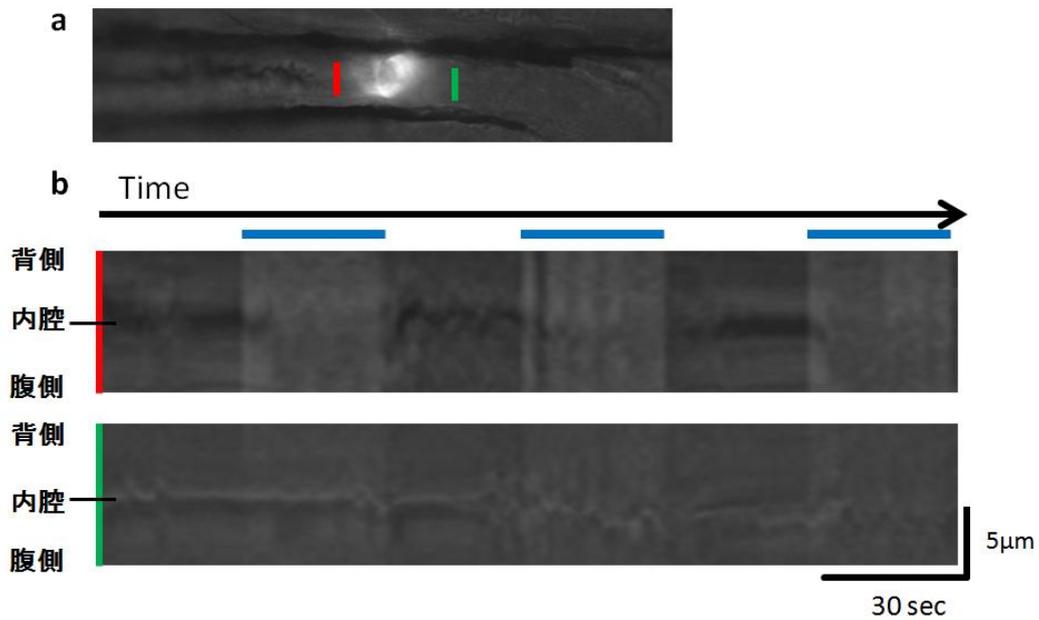


Fig. 24 : ChR2 による粘膜層の細胞の活性

Tg(hsp70 : Gal4) ; Tg(UAS : ChR2-eYFP)の受精後 3 日目幼生に熱ショックを与えた後、5 日目幼生で ChR2 を発現する粘膜層の細胞に青色光を照射し、腸の動きを調べた。**a** : 5 日目幼生の腸を横から見た図。赤色と緑色の線は解析箇所を示す。**b** : **a** 内の赤色線と緑色線における時空間図。青色線は青色光を照射した時間を示している。青色光を照射したとき、照射箇所よりも口側（赤色線）で内腔が閉じている。

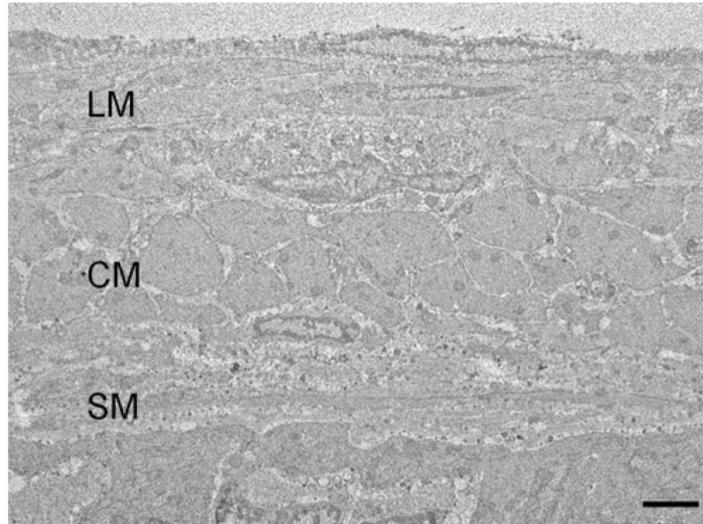


Fig. 25 : ゼブラフィッシュ (成魚) の腸の微細構造

LM : 縦走筋の層 CM : 輪走筋の層 SM : 粘膜下層と粘膜層 スケールバーは 2 μ m (Ball et al. 2012 から引用)

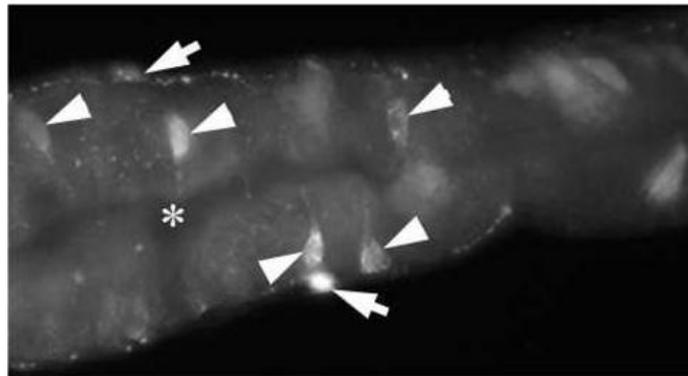


Fig. 26 : ゼブラフィッシュの腸の抗体染色 5-HT 抗体

受精後 5 日目の幼生を 5-HT 抗体で抗体染色した図。腸神経 (矢印)、腸クロム親和性細胞 (三角)。* は内腔を示している。(Njagi et al. 2010 から引用)

movie 1 : 蠕動運動時の輪走筋における Ca^{2+} イメージング

受精後 8 日目の SAGFF(LF)134A ; Tg(UAS : GCaMP3) 幼生を側方から撮影した。上が明視野と GCaMP3 の蛍光を重ねた動画、下が GCaMP3 の蛍光のみの動画。再生速度は 50 倍速。

movie 2 : 蠕動運動時の輪走筋と神経細胞における Ca^{2+} イメージング

受精後 8 日目の Tg(hsp70 : Gal4) ; Tg(UAS : GCaMP3) 幼生を側方から撮影した。上が明視野と GCaMP3 の蛍光を重ねた動画、下が GCaMP3 の蛍光のみの動画。再生速度は 50 倍速。

movie 3 : 光遺伝学を用いた輪走筋の機能解析

受精後 8 日目の SAGFF(LF)134A ; Tg(UAS : ChR2-eYFP) 幼生を側方から撮影した。左下に青色の丸が出たとき、青色光を照射している。再生速度は 5 倍速。

movie 4 : 光遺伝学を用いた輪走筋の機能解析

受精後 8 日目の SAGFF(LF)134A ; Tg(UAS : GFP) 幼生を側方から撮影した。左下に青色の丸が出たとき、青色光を照射している。再生速度は 5 倍速。

movie 5 : 光遺伝学を用いた神経細胞の機能解析

受精後 6 日目 Tg(hsp70 : Gal4) ; Tg(UAS : ChR2-eYFP) の幼生に熱ショックを与え、受精後 8 日目を側方から撮影した。左下に青色の丸が出たとき、青色光を照射している。再生速度は 5 倍速。

movie 6 : 光遺伝学を用いた神経細胞の機能解析

受精後 6 日目 Tg(hsp70 : Gal4) ; Tg(UAS : ChR2-eYFP) の幼生に熱ショックを与え、受精後 8 日目を側方から撮影した。左下に青色の丸が出たとき、青色光を照射している。再生速度は 5 倍速。

movie 7 : 光遺伝学を用いた神経細胞の機能解析

受精後 3 日目 Tg(hsp70 : Gal4) ; Tg(UAS : ChR2-eYFP) の幼生に熱ショックを与え、受精後 5 日目を側方から撮影した。左下に青色の丸が出たとき、青色光を照射している。再生速度は 5 倍速。

VII 謝辞

本研究をおこなうにあたり、ご指導、ご鞭撻を賜りました兵庫県立大学大学院理学研究科生体情報学 I 講座教授、八田公平博士に深く感謝いたします。

本研究をおこなうにあたり、pCMV-GCaMP3 を提供して下さった Loren Looger 博士に深く感謝いたします。

本研究をおこなうにあたり、多大なご助言とご助力を頂きました、兵庫県立大学大学院理学研究科生体情報学 I 講座助教、二階堂昌孝博士および中川将司博士に深く感謝いたします。

VIII 参考文献

- Ball, E. R. *et al.* Ultra-structural identification of interstitial cells of Cajal in the zebrafish *Danio rerio*. *Cell Tissue Res.* **349(2)**, 483-491 (2012).
- Barnes, K. J., Beckett, E. A., Brookes, S. J., Sia, T. C. & Spencer, N. J. Control of intrinsic pacemaker frequency and velocity of colonic migrating motor complexes in mouse. *Front Neurosci* **8**, 1-8 (2014).
- Berridge, M. J. Neuronal calcium signaling. *Neuron* **21**: 13-26 (1998).
- Bian, X. C., Bornstein, J. C. & Bertrand, P. P. Nicotinic transmission at functionally distinct synapses in descending reflex pathways of the rat colon. *Neurogastroenterol Motil* **15**, 161-171 (2003).
- Blair, P. J., Rhee, P. L., Sanders, K. M. & Ward, S. M. The significance of interstitial cells in neurogastroenterology. *J Neurogastroenterol Motil.* **20(3)**, 294-317 (2014).
- Boyden, E. S., Zhang, F., Bamberg, E., Nagel, G. & Deisseroth, K. Millisecond-timescale, genetically targeted optical control of neural activity. *Nat. Neurosci.* **8**, 1263-1268 (2005).
- Brookes, S. J. H. Classes of enteric nerve cells in the guinea-pig small intestine. *The Anatomical Record.* **262**, 58-70 (2001).
- Brookes, S. J. H., D'Antona, G., Zagorodnyuk, V. P., Humphreys, C. M. & Costa, M. Propagating contractions of the circular muscle evoked by slow stretch in flat sheets of guinea-pig ileum. *Neurogastroenterol. Mot.* **13**, 519-531 (2001).
- Camborova, P., Hubka, P., Sulkova, I. & Hulin, I. The pacemaker activity of interstitial cells of Cajal and gastric electrical activity. *Physiol. Res.* **52**, 275-284 (2003).
- Cannon, W. B. The movement of the intestines studied by means of the röntgen rays. *Journal of Boston Society of Medical Sciences.* 72-75 (1898).
- Costa, M., Brookes, S. J.H. & Hennig, G. W. Anatomy and physiology of the enteric nervous system. *Gut.* **47**, iv15-iv19 (2000).
- Deisseroth, K. *et al.* Next-generation optical technologies for illuminating genetically targeted brain circuits. *J. Neurosci.* **26(41)**, 10380-10386 (2006).

- Dinning, P. G. *et al.*** Neural mechanisms of peristalsis in the isolated rabbit distal colon: a neuromechanical loop hypothesis. *Neuroscience*. **8**, 1-15 (2014).
- Furness, J. B.** Types of neurons in the enteric nervous system. *J. Auton. Nerv. Syst.* **81**, 87-96 (2000).
- Furness, J. B.** The Enteric Nervous System Blackwell (2005).
- Gabella, G.** The number of neurons in the small intestine of mice, guinea-pigs and sheep. *Neuroscience*. **22**, 737-752 (1987).
- Hatta, K., Tsujii, H. & Omura, T.** Cell tracking using a photoconvertible fluorescent protein. *Nat. Protcol.* **1**, 960–967 (2006).
- Holmberg, A., Schwerte, T., Pelster, B. & Holmgren, S.** Ontogeny of gut motility control system in zebrafish *Danio rerio* embryos and larvae. *J Exp Biol.* **207**, 4085-4094 (2004).
- Holmberg, A., Olsson, C. & Holmgren, S.** The effects of endogenous and exogenous nitric oxide on gut motility in zebrafish *Danio rerio* embryos and larvae. *J Exp Biol.* **209**, 2472-2479 (2006).
- Holmberg, A., Olsson, C. & Hennig, G. W.** TTX-sensitive and TTX-insensitive control of spontaneous gut motility in the developing zebrafish (*Danio rerio*) larvae. *J Exp Biol.* **210**, 1084-1091 (2007).
- Holmqvist, B., Ellingsen, B., Forsell, J., Zhdanova, I. & Alm, P.** The early ontogeny of neuronal nitric oxide synthase systems in the zebrafish. *J Exp Biol.* **207**, 923-935 (2004).
- Jule, Y.** Nerve-mediated descending inhibition in the proximal colon of the rabbit. *J. Physiol.* **309**, 487–498 (1980).
- Kelsh, R. N. & Eisen, J. S.** The zebrafish colourless gene regulates development of non-ectomesenchymal neural crest derivatives. *Development.* **127**, 515-525 (2000).
- Kimmel, C. B., Ballard, W. W., Kimmel, S. R., Ullman, B. & Schilling, T. F.** Stages of embryonic development of zebrafish. *Dev Dyn.* **203**, 253–310 (1995).
- Kunze, W. A. A., Furness, J. B., Bertrand, P. P. & Bornstein, J. C.** Intracellular recording from myenteric neurons of the guinea-pig ileum that respond to stretch. *J. Physiology.* **506.3**, 827-842 (1998).
- Levanti, M. B. *et al.*** Calretinin in the peripheral nervous system of the adult zebrafish. *J. Anat.* **212**, 67-71 (2008).

- Li, Z. S. & Furness, J. B.** Nitric oxide synthase in the enteric nervous system of the rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *Arch. Histol. Cytol.* **56**, 185-193 (1993).
- Matsuda, K. et al.** Presence of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) and its relaxant activity in the rectum of a teleost, the stargazer, *Uranoscopus japonicus*. *Peptides* **21**, 821-827 (2000).
- Nagel, G. et al.** Channelrhodopsin-2, a directly light-gated cation-selective membrane channel. *PNAS.* **100**, 13940-13945 (2003).
- Nakai, J., Ohkura, M. & Imoto, K.** A high signal-to-noise Ca²⁺ probe composed of single green fluorescent protein. *Nature Biotechnol* **19**(2): 137-141 (2001).
- Nakayama, S., Ikenaga, T., Kawakami, K., Ono, F. & Hatta, K.** Transgenic line with gal4 insertion useful to study morphogenesis of craniofacial perichondrium, vascular endothelium-associated cells, floor plate, and dorsalmidline radial glia during zebrafish development. *Dev. Growth Differ.* **54**, 202-215 (2012).
- Ng, A. N. et al.** Formation of the digestive system in zebrafish: III. Intestinal epithelium morphogenesis. *Dev Biol.* **286**, 114-135 (2005).
- Njagi, J., Ball, M., Best, M., Wallace, K. N. & Andreescu, S.** Electrochemical quantification of serotonin in the live embryonic zebrafish intestine. *Anal Chem.* **82**(5), 1822-1830 (2010).
- Okamoto, S., Nakagawa, M. & Hatta, K.** Stochastic Ca²⁺ waves that propagate through the neuroepithelium in limited areas of the brain and retina imaged with GCaMP3 in zebrafish embryos. *Zoological Science* **30**, 716-723 (2013).
- Olden, T., Akhtar, T., Beckman, S. A. & Wallace, K. N.** Differentiation of the zebrafish enteric nervous system and intestinal smooth muscle. *Genesis.* **46**, 484-498 (2008).
- Olsson, C. & Holmgren, S.** The control of gut motility. *Comp. Biochem. Physiol.* **128**, 449-501 (2001).
- Olsson, C., Holmberg, A. & Holmgren, S.** Development of enteric and vagal innervations of the zebrafish (*Danio rerio*) gut. *J Comparative neurology.* **508**, 756-770 (2008).
- Palmer, A. E. & Tsien, R. Y.** Measuring calcium signaling using genetically targetable fluorescent indicator. *Nature.Chem.Biol* **1**: 1057-1065 (2006).

- Rich, A. et al.** Kit-like immunoreactivity in the zebrafish gastrointestinal tract reveals putative ICC. *Dev Dyn.* **236**, 903-911 (2007).
- Rich, A., Gordon, S., Brown, C., Gibbons, S. J., Schaefer, K., Hennig, G. & Farrugia, G.** Kit signaling is required for development of coordinated motility patterns in zebrafish gastrointestinal tract. *Zebrafish.* **10**, 154-160 (2013).
- Sasselli, V., Pachnis, V. & Burns, A. J.** The enteric nervous system. *Dev. Biol.* **366**, 64-73 (2012).
- Scheer, N., Riedl, I., Warren, J. T., Kuwada, J. Y. & Campos-Ortega, J. A.** A quantitative analysis of the kinetics of Gal4 activator and effector gene expression in the zebrafish. *Mech. Dev.* **112**, 9-14 (2001).
- Spencer, N. J. et al.** Mechanisms underlying distension-evoked peristalsis in guinea pig distal colon: is there a role for enterochromaffin cells? *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **240**, 235-245 (2011).
- Spencer, N. J., Kyloh, M., Wattchow, D. A., Thomas, A., Sia, T. C., Brookes, S. J. & Nicholas, S. J.** Characterization of motor patterns in isolated human colon: are there differences in patients with slow-transit constipation? *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **302**, G34-G43 (2012).
- Tack, J. & Smith, T. K.** Calcium imaging of gut activity. *Neurogastroenterol Motil.* **16**, 86-95 (2004).
- Tian, L. et al.** Imaging neural activity in worms, flies and mice with improved GCaMP calcium indicators. *Nature Methods* **6**, 875-881(2009).
- Ungos, J. M., Karlstrom, R. O. & Raible, D. W.** Hedgehog signaling is directly for the development of zebrafish dorsal root ganglia neurons. *Development.* **130**, 5351-5362 (2003).
- Uytenbroek, L. et al.** Neurochemical coding of enteric neurons in adult and embryonic zebrafish (*Danio rerio*). *J Comp Neurol.* **518**(21), 4419-4438 (2010).
- Wallace, K. N. & Pack, M.** Unique and conserved aspects of gut development in zebrafish. *Dev Biol.* **255**, 12-29 (2003).
- Wallace, K. N., Akhter, S., Smith, E. M., Lorent, K. & Pack, M.** Intestinal growth and differentiation in zebrafish. *Mechanisms of Development.* **122**, 157-173 (2005).
- Ward, S. M., Burns, A. J., Torihashi, S. & Sanders, K. M.** Mutation of the proto-oncogene *c-kit* blocks development of interstitial cells and electrical rhythmicity in murine intestine. *J Physiology* **480**, 91-97 (1994).

Ward, S. M., Sanders, K. M. & Hirst, G. D. S. Role of interstitial cells of Cajal in neural control of gastrointestinal smooth muscles. *Neurogastroenterol Motil* **16**, 112-117 (2004).

Westerfield, M. The zebrafish book: a guide for the laboratory use of zebrafish (*Danio rerio*) 3th edn. (Univ. of Oregon press, Eugene, Oregon, 1995).

Yamazawa, T. & Iino, M. Simultaneous imaging of Ca²⁺ signals in interstitial cells of Cajal and longitudinal smooth muscle cells during rhythmic activity in mouse ileum. *J Physiology* **538**, 823-835 (2002).

小室 輝昌 『消化管の構造と運動』総説 人間科学研究 **25**, 9-15 (2012)

福土 審 『内臓感覚 脳と腸の不思議な関係』日本放送出版協会 (2007)

藤田 恒夫 『腸は考える』 岩波新書 (1991)

藤田 秋一, 置塩 豊, 竹内 正吉, 畑 文明 『マウス腸管運動調節におけるカハールの介在細胞の役割』 日本薬理 (*Folia Pharmacol. Jpn.*) **123**, 170-178 (2004)

<http://www.nig.ac.jp/labs/FishDev/protocol.html>