

細胞系譜に依存したショウジョウバエ脳の神経回路モジュール構造の解析

伊藤 啓

(岡崎国立共同研究機構・基礎生物学研究所・細胞増殖研究部門)

1. 研究のねらい

脳を構成する神経細胞やグリア細胞は、神経幹細胞と呼ばれる少数の特殊な細胞が、不等分裂を繰り返して作られる。言い換えれば脳の細胞集団は、幹細胞の子孫のファミリー(クローン)ごとに区分できるわけである。では幹細胞は単に未分化の細胞集団を作るだけで、子孫細胞は出自に関係なく、それぞれ独自に分化していくのだろうか?それとも子孫細胞は、細胞系譜に応じて特定の神経回路を作るのだろうか?もしそうだとしたら、クローン単位の回路構造はどのような仕組みで作られるのだろうか?本研究ではこれらの問いに答えることを目標にした。

2. 研究結果及び自己評価

研究結果

胚発生だけでなく、成体の脳まで細胞系譜を追うことは技術的に難しく、上記のような問いに答えることはこれまで殆ど不可能だった。そこで私は、合成遺伝子の個体への導入が極めて容易なショウジョウバエの利点を活かし、一部の神経幹細胞とその子孫の細胞のみをラベルする技術「FRT-GAL4システム」を開発した。ショウジョウバエの脳には片半球2~2.5万個の細胞があるが、これらはずか85個程度の神経幹細胞から産み出される。このうち少なくとも半数近い幹細胞で、1つの幹細胞の子孫は限られた種類の回路だけを形成していることが分かった。こうして発見された細胞系譜単位のモジュール回路構造を「クローナルユニット」と名付けた。ショウジョウバエ脳のかなりの部分は、クローナルユニットがモザイク状に組み合わさった構造だと言える。

このようなユニット構造は、どのようにして作られるのだろうか?成虫脳の細胞の大多数が作られる幼虫期に神経幹細胞とその子孫をラベルすると、1つのクローナルユニットの細胞群から伸びる神経線維は、全体が1本の束にまとまって脳を中心へ向かっていた。線維がこのような束を作るメカニズムとして、隣り合う兄弟細胞や線維同士が、互いに強く接着している可能性が考えられる。このような細胞接着を担う細胞接着因子に対する特異的な抗体を用いて分布を調べた結果、Fasciclin II (Fas II), Fas III, Connectinなどの細胞接着因子が、それぞれ特異的な一部のクローナルユニットで細胞の間に分布しているのが観察された。

では、細胞接着因子の分布を乱したらどうなるだろうか?接着因子の1つFas IIについて詳しく解析した。本来Fas IIが存在しないクローナルユニットにおいて強制的にFas II遺伝子を発現させてみても、逆に本来Fas IIが存在するユニットでFas IIを無くしてみても、線維束の形成状況には顕著な影響は見られなかった。この結果には2つの解釈が可能である。さまざまな細胞接着因子が同時に作用しているため、1つを異常にしても顕著な影響が出ないという可能性と、クローナルユニットの構造を保つメカニズムが細胞接着因子以外にも存在する可能性である。

Fas IIを隣接するクローナルユニットで強制的に発現させると、Fas IIタンパクはクローナルユニット内の細胞間の境界には分布するが、ユニット間の境界には分布しない。詳しく調べると「細胞体グリア」と呼ばれるグリア細胞が1つ1つのクローナルユニットを包むように存在していることが分かった。グリア細胞が隣り合うクローナルユニットの間の障壁となることで、異なるユニットに属する細胞間の接着を阻止しているのだと推察できる。

幹細胞から生まれた子孫細胞の神経線維は、どのように1つの束を形成するのだろうか?これを調べるため、もともとある細胞の線維と新しく出来た細胞の線維を染め分ける新しい方法を開発した。クラゲ由来の緑色蛍光色素GFPに比べ、サンゴ由来の赤色蛍光色素DsRedは、タンパクが作られてから蛍光を発するようになるまでの時間が長い。DsRedとGFPをクローナルユニットの細胞で共発現させると、線維束の中心部はGFPのみ、外側はGFPとDsRed両方の蛍光が観察された。つまり、中心部の線維は外側より新しい。新しく生まれた細胞の線維は、古い線維の束の芯部へ伸びることで伸長方向が制限され、結果的に同じ方向に投射していると推察される。

以上のように本研究では、ショウジョウバエの脳には細胞系譜に依存したユニット回路構造が存在すること、その形成には細胞接着因子、グリア細胞の障壁、線維の同心円的新旧関係など様々な要素が関与していることを明らかにした。一方で、クローナルユニットによっては単一でなく複数の標的

へ線維束が分岐するが、この分岐の形成がどのように制御されるかを時系列的に調べる点では、当初計画したレベルの解析を終えることができず、今後の課題となった。

自己評価

複雑な脳神経回路の中に、従来まったく知られていなかった単純で整然とした構造が潜んでいることを明らかにできた。しかし評価の高い論文にまとめるためには、単にこのような構造を発見したことを報告するだけでなく、この構造がどのようにして出来てくるのか、メカニズムにまで踏み込んだ解析が要求される。神経細胞間の相互接着を阻害しても大きな影響がなく、グリア細胞を選択的に除去する実験が難航しているため、さきがけ期間終了までに最終的な成果を論文発表できなかったのが残念である。

3．領域総括の見解

組織分化の機構解明を目標に、本研究者は複雑なショウジョウバエの脳神経回路に焦点を合わせて形態学的な研究を続けている。研究過程では、任意の神経幹細胞とその子孫のみをラベルする技術、また既存の細胞と新生細胞を染め分ける技術は、いずれも本研究の独創性によるものであり、その成果は未発表の部分が多いが、複雑な昆虫の脳神経を選びながら実り多い成果を挙げていることを高く評価したい。

4．主な論文

1. Verkhusha, V. V., Otsuna, H., Awasaki, T., Oda, H., Tsukita, S., and Ito, K. (2001). An enhanced mutant of red-fluorescent protein DsRed for double labeling and developmental timer of neural fiber bundle formation. *J. Biol. Chem.* 14, 29621-29624.

5．その他

招待講演数 国内 1 回 海外 4 回

6．謝辞

本研究の遂行にあたっては、基礎生物学研究所細胞増殖研究部門教授の勝木元也、科学技術振興事業団戦略的基礎研究推進事業「脳を知る」勝木グループの研究員栗崎健（現さきがけ研究 21「認識と形成」研究員）、科学技術振興事業団創造科学推進事業月田細胞軸プロジェクトの研究員 Vlad Verkhusha の各氏を始め、多くの方に協力をいただいたことを篤く感謝します。