

研究報告書

「ショウジョウバエ視覚系における機能的な神経回路形成機構の解明」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成22年10月～平成26年3月

研究者: 佐藤 純

1. 研究のねらい

脳の動作原理を理解するためには神経回路の発生過程から機能発現までを一貫して解析することが必要である。例えば神経細胞の産生順や細胞系譜が神経回路の形成・機能において重要な役割を果たすと考えられる。しかし、ほ乳類の脳は神経細胞の数・種類が多すぎるため、神経回路の発生と機能を結びつけて解析することは困難を極める。ショウジョウバエ視覚中枢は層構造・カラム構造を示すなど、ほ乳類の脳と構造的および機能的な特徴を共有しているが、神経細胞の数・種類はほ乳類と比較して遙かに少ない。さらに産生順と関連した多様な神経細胞の産出、細胞移動を伴う層構造・カラム構造形成など、ほ乳類の脳においても見られる神経発生の様々な要素を合わせ持つだけでなく、高度な遺伝学的ツールが利用可能であり、行動実験によって神経回路の機能を詳細に解析することが可能な優れたモデル系である。このようなハエ視覚中枢の特徴を利用して、機能的な神経回路が形成されるメカニズムを明らかにすることが本研究のねらいである。

2. 研究成果

(1) 概要

ショウジョウバエ視覚中枢は層構造・カラム構造といったほ乳類の脳において見られる構造的特徴を有しており、精密な遺伝子操作が可能であるため、脳神経回路の発生を研究する上で優れたモデル系である。中でもメダラ神経節はハエ視覚中枢の中でも特に重要な機能を果たすと考えられているが、その発生機構は全く分かっていなかった。本研究では発生過程のメダラを用いて産生順に依存した神経細胞のタイプ決定、転写因子発現による同心円状の区画化、神経投射制御の分子機構を明らかにし、これらの発生過程が神経回路の機能とリンクしていることを示した。

(2) 詳細

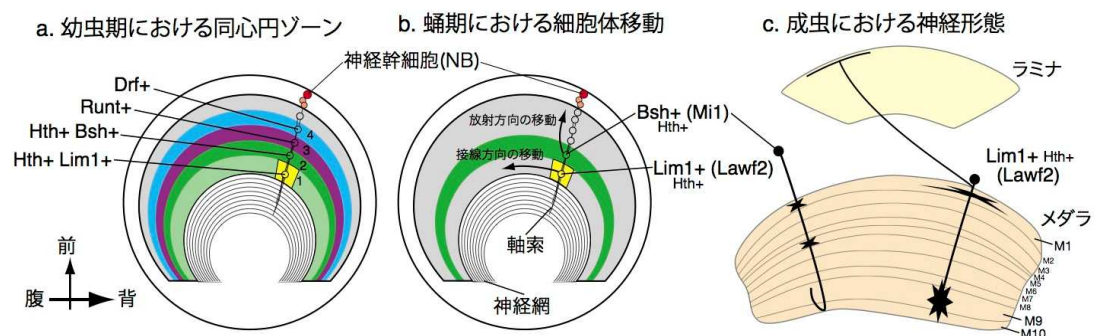
発生過程の視覚中枢を同心円状に区画化する転写因子の発見

メダラ神経節は約100種類4万個の神経細胞が10層の層構造とそれと直交する800のカラム構造を示し、動体・形態・色覚といった全ての視覚情報処理に関与すると考えられている(図1c)。このように、メダラは非常に複雑な神経回路を構成し高度な機能を持つと考えられるが、その神経回路の実体はほとんど分かっていない。また、メダラにおける多様な神経細胞を産み出す発生機構も分かっていなかったため、100種類もの神経細胞を正確に産み分ける分子機構を明らかにすることにより、メダラをモデル系とした神経科学分野の創出につながると考えられた。

成虫においてみられるメダラ神経節は幼虫の時期にはメダラ前駆体として準備されて

いる。半球状のメダラ前駆体の表層には神経幹細胞(NB)が位置しており、これがメダラ前駆体の中心部に向かって多数の神経細胞を産み出す。本研究では進化的に保存された転写因子に着目し、幼虫期メダラ前駆体において特徴的な発現パターンを示す因子を探索した。その結果、Homothorax (Hth: Meis ファミリー), Brain-specific-homeobox (Bsh: Bsx ファミリー), Runt (Run: Runx ファミリー), Drifter (Drf: Brn ファミリー)の4つの転写因子の発現により、メダラ前駆体が同心円状に区画化されていることを見出した(図1a: 論文 1)。他にも、Lim1 など同心円ゾーンの一部においてのみ発現する転写因子も見出されており(図 1a)、このような転写因子発現の組み合わせによって神経細胞の多様性が制御されていると推測できる。

図1 メダラの発生機構



転写因子の発現と神経タイプとの間に相関関係があるかどうか調べるため、各転写因子の発現を正確に再現するような Gal4 系統を相同組換・BAC トランスジェニックなどの手法を駆使して作製した。このような Gal4 制御下で GFP を発現させることにより、特定の神経細胞を GFP でラベルすることができるが、さらにモザイク解析と組み合わせることにより、1つ1つの神経細胞の投射パターンを明らかにした。その結果、Bsh 陽性 Hth 陽性の神経細胞はかならず Mi1 と呼ばれるたった一種類のタイプの神経細胞に分化することがわかった(図 1c: 論文 1)。同様に、Lim1 陽性細胞は Lawf2 と名付けたこれまでに同定されていないタイプの神経細胞に分化することが分かった(図 1c)。しかし、Drf や Run 陽性細胞については単一の神経細胞タイプではなく、複数タイプの神経細胞に分化することがわかった。

ショウジョウバエの神経発生では能動的な細胞移動はほとんど知られていなかったが、メダラの神経細胞はそのタイプに応じて固有の移動パターンをしめすことが分かった。例えば Bsh 陽性細胞は蛹期に脳の内側から外側に向かって放射方向に移動し、逆に Lim1 陽性細胞は接線方向に移動する(図 1b)。このような細胞移動が神経回路形成においてどのような役割を果たしているのかは分かっておらず、今後の課題として残されている。

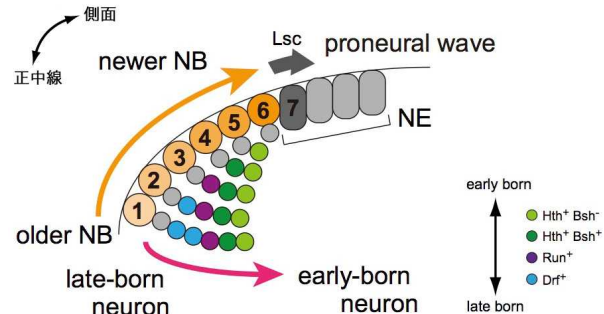
産生順に依存した神経細胞のタイプ決定機構

このような同心円状の発現パターンはどのようなメカニズムによって決められているのだろうか？神経細胞が産み出された時期と同心円状の転写因子発現の間には強い相関が見られ、NB から産み出される産生順に従って神経タイプが決定されているのではないかと推測された(論文 1)。

ハエの胚期中枢神経系においては体節形成において重要な役割を果たす転写因子群 Hb-Kr-Pdm-Cas が NB において経時的にそして順番に発現する。これら転写因子がある時期において NB から産み出される神経細胞のタイプを決定しているのである。もし同じようなメカニズムが働いているのであれば、メダラの NB においても経時的に発現する転写因子が存在すると考えられる。しかし、胚期 NB において発現する Hb-Kr-Pdm-Cas はメダラ NB においては発現していなかった。我々は、これら転写因子とは全く異なる転写因子群がメダラ NB において順番にそして経時的に発現していることを見出した(図 3: 論文 4)。

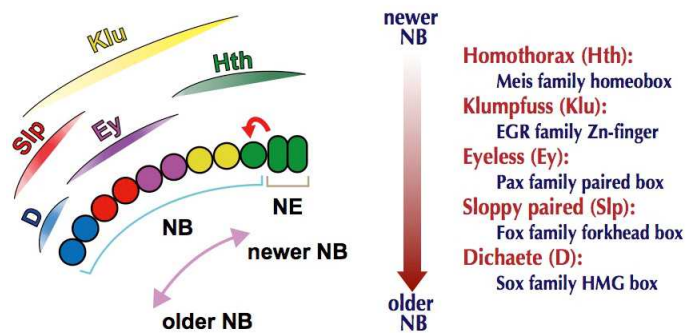
発生初期のメダラ前駆体は神経上皮細胞(NE)から成るが、正中線側から順に NE が NB に分化する(図 2: 論文 4)。この時、最も正中線側に位置する NE が bHLH 転写因子の Lethal-of-scute(Lsc)を発現し、これによって NB への分化がトリガーされる。

図2 Proneural WaveとNBの産生



このような分化の波は Proneural Wave と呼ばれ、Lsc の発現によって可視化される。NB は Proneural Wave の後方で順番に分化するので、正中線側の NB ほど古く、側面側の NB ほど新しい(図 2)。もし、メダラ NB においても胚期 NB と同様に経時的に発現する転写

図3 NBにおいて経時的に発現する転写因子



因子が存在するとすれば、それらは Lsc の発現によって可視化される Proneural Wave からの距離に応じてストライプ状に発現すると考えられる。実際、我々はそのような発現パターンを示す転写因子を5つ同定した(図 3: 論文 4)。Hth は NE および分化したばかりの NB において発現するが、Klumpfuss(Klu)はより正中線側の領域で、Eyeless(Ey), Sloppy-paired(Slp)はさらに正中線側の領域で発現し、Dichaete(D)は最も正中線側の古い NB で発現する。また、これらの発現は徐々に発現が減衰するため隣り合う発現ドメインどうしはオーバーラップする。これら転写因子の働きによって産み出される神経細胞のタイプが決定されている可能性が考えられた。

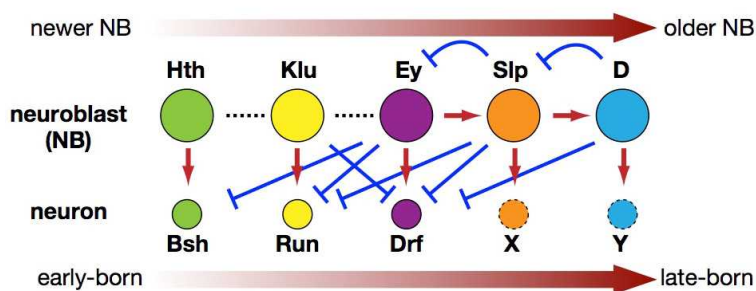
このような NB における転写因子の経時的な発現はどのようにして制御されているのだろうか? 変異体と過剰発現をもちいた実験から、Ey は Slp の発現を誘導するが、Slp は Ey の発現を抑制すること、Slp は D の発現を誘導するが、D は Slp の発現を抑制することを見出した(図 4: 論文 4)。このような関係から Ey-Slp-D という転写因子発現の経時的な移り変わりを説明することができる。しかし、Hth および Klu に関してはこのような関係を見出すことはできなかった。Hth と Klu の発現は Ey-Slp-D とは別のメカニズムによって制御されているか、Hth や Klu の上流で働く別の転写因子が Ey-Slp-D

のような発現制御を受けている可能性が考えられる。

これら NB において経時的に発現する転写因子は産み出される神経タイプの決定においてどのような役割を果たしているのだろうか？一部の NB とその娘細胞を GFP によってラベルした実験から、Hth 陽性 NB は Bsh 陽性神経を、Klu 陽性 NB は Run 陽性神経を、Ey 陽性 NB は Drf 陽性神経を産み出すことが示唆された(図 4: 論文 4)。実際、変異体および過剰発現を用いた実験から、Hth, Klu, Ey はそれぞれ Bsh, Run, Drf 陽性細胞の産生を正に制御する

ことが示された。Slp や D によって産み出される神経タイプは明らかになっていないが、今後の研究によりそのような後期に生まれる神経タイプ特異的なマーカーが見出されるかもしれない。

図4 産生順に従って神経タイプを決定する分子機構



転写因子の組み合わせによる神経細胞のタイプ決定機構

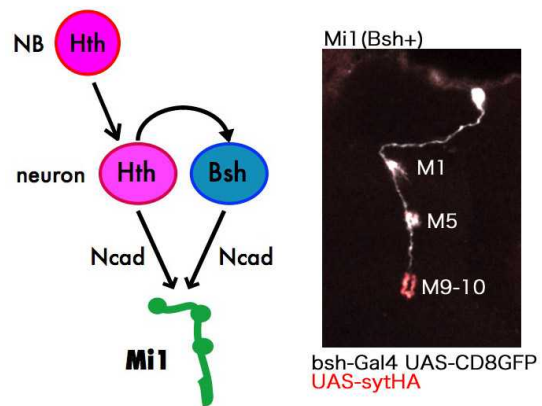
Hth を発現する同心円ゾーンから生まれた神経細胞は Mi1, Lawf1, Lawf2, Pm3 の 4 種類の神経細胞に分化する(図 1: 論文 1)。Bsh は Hth 発現領域の外側半分で発現し、Hth と Bsh 両方を発現する細胞が Mi1 となる。Mi1 の分化および形態形成において Hth と Bsh はそれぞれどのような役割を果たすのだろうか？

Mi1 はメダラにおいて投射が完結する local interneuron だが、*hth* 変異体および *bsh* 変異体では大きく形態が変化し、より高次の神経節であるロビュラに投射する Tm タイプの projection neuron となる(論文 1,2)。しかし、Hth は Bsh の発現を正に制御することから、*hth* 変異体において見られた Mi1 の形態異常は Bsh の発現が失われたためであるという解釈も可能である。*hth* 変異体の Mi1 に外来の Bsh を発現させても Mi1 の形態異常は抑圧されなかったことから、Mi1 の運命決定および形態形成には Hth と Bsh の両方の寄与が必要であると言える(図 5: 論文 2)。

Drf 陽性細胞は通常ロビュラに投射する Tm タイプの projection neuron に分化するが、Drf 陽性細胞において Hth および Bsh を異所的に発現させると Mi1 と似た神経細胞の分化を誘導することができた。このことから、Hth および Bsh は Mi1 の形成を誘導する能力があると言える。しかし、この異所的な Mi1 は樹状突起が通常の Mi1 よりも幅広く、形態的には異常な Mi1 であった。Drf 陽性細胞において Hth と Bsh の両方を同時に発現させたところ、通常の Mi1 により近い形態の神経細胞が誘導されたことから、Hth と Bsh が協調的に働くことが Mi1 の運命決定および形態形成において重要であると言える(図 5: 論文 2)。

Hth と Bsh は転写因子なので、他の下流因子の発現を制御することで Mi1 の形態を制御していると考えられる。我々は幼虫期メダラ前駆体の Hth および Bsh の発現ドメインにおいて細胞接着因子である N-cadherin(Ncad)の発現が上昇していることを見出した(論文 1,2)。 *hth* 変異体では Ncad の発現が減少し、逆に Hth 過剰発現によって Ncad 発現が誘導された。 Bsh 過剰発現によっても Ncad が誘導されたが、 *bsh* 変異体においては Ncad 発現の減少は見られなかった。 *bsh* 変異体において Hth 発現が残存するためと考えられる。 Mi1 は軸索を投射する過程で Ncad 発現の強い領域に仮足を伸長させるが、 *Ncad* 変異体の Mi1 ではそのような仮足の形成が失われ、最終的な Mi1 の形態に異常をきたすことが分かった。このことから、 Hth と Bsh の協調作用によって Ncad の発現が制御され、これによって Mi1 の形態形成の一部が制御されていると考えられる(論文 1,2)。

図5 HthとBshによるMi1の運命決定



3. 今後の展開

Mi1(Hth/Bsh 陽性)は光の ON センサーとして働く L1 神経の入力を受け、動体認識において重要な役割を果たすことが知られている。また、 *Lawf2*(*Lim1* 陽性)の樹状突起は Mi1 の軸索終末と同じ層において形成されるため、 *Lawf2* は Mi1 から入力を受けていると考えられる(図 1c)。さらに *Lawf2* は複数カラムをカバーする幅広い樹状突起を持つことから、隣り合うカラムに入力された情報を比較し演算処理している可能性が考えられる。これら神経細胞の動体認識における働きを解析することで、神経回路の発生と機能を包括的に理解できるよう研究を進めていきたい。

4. 評価

(1) 自己評価

研究期間内の研究によって、ハエ視覚中枢のメダラ神経細胞において神経細胞の多様性を産み出すメカニズムを明らかにした。中でも Mi1 と呼ばれる神経細胞に関しては、神経幹細胞から初期に産み出された神経細胞が Mi1 に分化し、 Bsh と Hth の協調作用によって Mi1 の運命が決めること、この時 Bsh/Hth の制御下で細胞接着因子である Ncad が発現し Mi1 の樹状突起形成を制御していることを明らかにした。 Mi1 は動体認識に関与することが強く示唆されるので、この一連の研究によって神経回路の発生と機能を一貫して解析するという本研究のねらいを達成したと言えるだろう。

しかし、 Mi1 の機能解析自体はまだ十分な結果が出ていない。視覚行動実験・カルシウムイメージングのための装置をセットアップし、データが取れる段階まで来ているので、近いうちに Mi1 および Mi1 と関連する他の神経細胞の機能を明らかにしたいと考えている。

(2) 研究総括評価

昆虫脳で重要な視覚情報処理が行われるメダラ神経節は精妙な層構造と直行するカラム構造を有しており、その形成メカニズムと神経回路構築におけるその意義を解明できれば、脊椎動物脳神経回路形成機構の理解にも大きな手掛かりが得られる予想される。本研究ではまずショウジョウバエのメダラ前駆体神経上皮における発現パターンとその経時変化から転写制御因子を絞り込んだ。そして、実際に Hth を始めとする一群の転写制御因子の働きによりまず同心円状の区画化と神経細胞タイプの運命決定が起こること、そしてストライプ状に神経前駆細胞で発現する転写制御因子を5個同定してこれらの間の作用によって特定の神経細胞種例えば Mi1 神経細胞が誘導されることを示した。さらに特定の転写制御因子のもとに細胞接着因子 N-cadherin が発現して Mi1 に特徴的な神経突起の敷設が起こることも示した。これらは特に重要な発見であり、すでに論文発表を行なっている。今後、このような解析を異なる細胞系譜についても展開して原理の普遍性を確立し、また敷設途上の神経突起を介する神経細胞間のクロストークの解析も推進できれば、脊椎動物脳の神経回路構築の理解にも大きい先導的インパクトを与えるものと十分に期待できる。

5. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

- | |
|--|
| 1. Hasegawa, E., Kitada, Y., Kaido, M., Takayama, R., Awasaki, T., Tabata, T. and Sato, M. Concentric zones, cell migration and neuronal circuits in the <i>Drosophila</i> visual center. <i>Development</i> 138, 983-993, 2011. |
| 2. Hasegawa, E., Kaido, M., Takayama, R. and Sato, M. Brain-specific-homeobox is required for the specification of neuronal types in the <i>Drosophila</i> optic lobe. <i>Developmental Biology</i> 377, 90-99, 2013. |
| 3. Sato, M., Suzuki, T. and Nakai, T. Waves of differentiation in the fly visual system. <i>Developmental Biology</i> 380, 1-11, 2013. |
| 4. Suzuki, T., Kaido, M., Takayama, R. and Sato, M. A temporal mechanism that produces neuronal diversity in the <i>Drosophila</i> visual center. <i>Developmental Biology</i> 380, 12-24, 2013. |

(2) 特許出願

研究期間累積件数:0 件

(3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

平成24年度 文部科学大臣表彰 若手科学者賞 受賞