

令和 3 年 6 月 23 日現在

機関番号：32610

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16H04658

研究課題名(和文) ショウジョウバエ近縁種を利用した脳構造の進化・多様化を生み出す遺伝的機構の解析

研究課題名(英文) Diversity of genetic programs for brain development and structure in Drosophila species

研究代表者

栗崎 健 (Awasaki, Takeshi)

杏林大学・医学部・教授

研究者番号：60359669

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,500,000円

研究成果の概要(和文)：動物種間における脳の構造の違いは、本能行動をはじめとする様々な脳機能の種間の違いを生み出すと考えられる。異種間における脳構造の違いがどのように生じているのか、これを分子・細胞学レベルで理解するために、モデル生物であるキイロショウジョウバエとその近縁種の脳構造と脳発生の比較によりこれを解析した。その結果、脳組織の発生を通して発現パターンが保存されている遺伝子群と発現パターンが全く異なる遺伝子群を明らかにすることができた。また、近縁種間における脳構造は全体としては類似しているがその微細構造に多様性があることが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

突然変異と自然選択によるゲノムの多様化が、多様な動物の形態から行動までを作り上げたことは疑いもない事実である。しかしながら、多様な動物の行動を支配する脳がどのように進化してきたのか？これを遺伝子レベルで解明するには至っていない。詳細に遺伝子レベルでの研究のためのモデル系として、わたしたちはショウジョウバエ近縁種の脳構造の違いとその発生プログラムの違いに着目して研究を行い、新たに種間で発現パターンの異なる遺伝子群、即ち脳発生プログラムの違いを生み出す候補遺伝子群の同定に成功した。

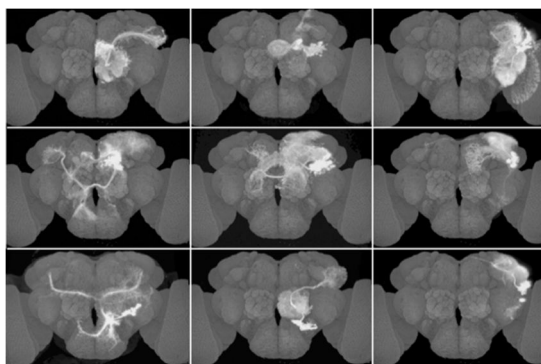
研究成果の概要(英文)：Differences in brain structure between animal species are thought to produce differences in various brain functions, including instinctive behavior. In order to understand how the difference in brain structure between different species occurs at the molecular and cellular level, the diversity of the brain structure and brain development of various Drosophila species were analyzed. As a result, we identified gene groups whose expression patterns are conserved throughout the development of brain and whose expression pattern is completely different in the developing brain among analyzed species. In addition, we found that the brain structures among closely related species are similar as a whole, but their microstructures are diverse.

研究分野：キイロショウジョウバエ

キーワード：キイロショウジョウバエ 脳神経 幹細胞 進化

1. 研究開始当初の背景

脳神経系の構造は、その基本構成要素である神経細胞の特徴に大きく依存する。どのような個性を持った神経細胞を脳のどの領域にどれくらい作るのか、これによって脳神経系の基盤となる神経回路構造が規定される。脳神経細胞は、神経系の前駆細胞である神経幹細胞から、個体の発生ステージに応じて時系列的に作りだされることが知られている(Kohwi & Doe 2014 *Nat Rev Neurosci*)。つまり、脳神経幹細胞の発生・分化を制御する発生プログラムが、脳機能の根幹である脳神経回路構造の大きな決定要因となっているのである。



図：キイロショウジョウバエ成虫脳における 1 つの神経幹細胞から誕生する子孫神経細胞群 (クローナルユニット) の例 (右)
(Yu, Awasaki, et al 2013 *Curr Biol*)

*各クローナルユニットの形態 (投射パターン) は、ステレオタイプであり、見分けることが可能である。

モデル生物として知られるキイロショウジョウバエは、複雑な脳機能を有する一方で、脊椎動物や他の高等モデル動物に比べて小さくてシンプルな脳を持っている。こうした利点を生かし、近年、体系的な脳神経細胞のマッピングや、細胞レベルでの神経活動の可視化技術や操作技術の開発が国際的に展開されてきた。その結果、本能行動、学習・記憶、等を制御する神経細胞ならびに神経回路が明らかにされている (*Behavioral Genetics of the Fly*, Ed. Dubnau 2014)。また、多様な脳神経細胞を作り出す機構についても、細胞・分子レベルで盛んに研究が行われている。また、多様な脳神経細胞を作り出す機構についても、細胞・分子レベルで盛んに研究が行われている。研究代表者らの研究から、中心脳を構成する神経細胞は、片半球あたり約 100 個の神経幹細胞からステレオタイプに作られ、それぞれの神経幹細胞から生まれた子孫神経細胞群は、クローナルユニットと呼ばれる機能ユニットを形成すること (図参照) を明らかにした。このことは、脳は神経幹細胞クローンをモジュールとする複合体として構成されていることを示している (Yu*, Awasaki* et al., 2013 *Curr Biol*, Yang*, Awasaki*, et al., 2013 *J Comp Neurol* *同等貢献, Ito et al., 2013 *Curr Biol*)。このような、神経幹細胞から作られるクローナルな神経集団が機能ユニットとして重要であることについては、最近、脊椎動物でも報告されている (Gao et al 2013)。よって、脳神経回路が神経幹細胞クローンを基本として構築されることは、動物において普遍的な原理であると考えられる。

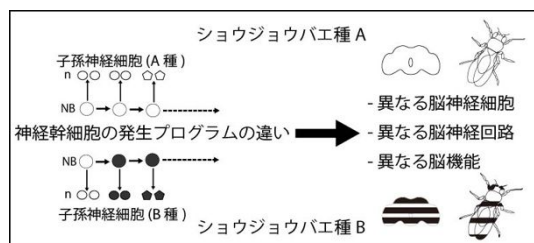
異種間における脳構造の違いは、脳の構成要素であるクローナルユニットの発生、即ち、これを作り出す神経幹細胞の発生プログラムの違いにより生じたと考えることができるが、これが進化的にどのように生じ、これがどのように脳機能に影響してきたのか、これを分子・細胞レベルで理解できれば、脳機能の進化について分子・細胞レベルで理解することが可能である。しかしながら、これまでにこの問題に挑んだ研究はない。

2. 研究の目的

私たちは、これまでの研究から、ショウジョウバエの脳は神経幹細胞クローン (クローナルユニット) をモジュールとする複合体として構成されていることを明らかにした。このことより、モジュールの多様化が脳構造の違いを生み出す基盤となっていると考えた。キイロショウジョウバエは、約 2000 種が同定されているショウジョウバエ族, *Drosophilidae*, の 1 種であり、その分岐は霊長類の分岐とほぼ同じの 6 千万年前である (Yassin 2013)。ショウジョウバエ族には、特徴的な生態、形態、行動を持つ多様な種が属している。そこで本研究ではショウジョウバエ近縁種に注目して、異種間におけるクローナルユニットの多様化に着目し、これを生み出している遺伝的機構の解明を目指した。

3. 研究の方法

本研究ではショウジョウバエ近縁種間の比較により、相同の神経幹細胞が作り出す子孫神経細胞群（クローナルユニット）の種間の違いと、その違いを生み出す発生プログラム（下図）を解析するために：



(a) 発生スピードの異なるショウジョウバエ種を用いて、脳神経系の発生に伴う遺伝子発現の変化をNGSによるトランスクリプトーム解析により調べる。これにより、**異種間で共通に発現変動する遺伝子群や種特異的に発現変動する遺伝子群**を明らかにし、神経幹細胞の発生の共通性と多様性に関与すると考えられる遺伝子について解析した。

(b) クローナルユニットの多様性について解析するために。i) 脳の一部を特異的にラベルする抗体や化学標識マーカ―を検索して、種間における脳構造の差異を可視化できるマーカ―を同定し、**種間の脳構造の違いの解析**を行った。ii) トランスジェネシスの技術を用い、キイロショウジョウバエで開発された神経幹細胞の子孫神経細胞群（CU:クローナルユニット）の可視化技術を近縁種において導入し、**近縁種におけるクローナルユニットを可視化するシステムの確立**を試みた。

4. 研究成果

(a) キイロショウジョウバエ (*D. melanogaster*)、アナナスショウジョウバエ (*D. ananassae*)、カスリショウジョウバエ (*D. hydei*) の3種について、幼虫期の4ステージ：1 齢、2 齢、3 齢前期、3 齢後期の脳において発現している遺伝子を、RNA-seq により調べた。得られたデータについて、まずこれまでキイロショウジョウバエを用いた研究において、神経幹細胞の発生運命決定に関連することが示されている遺伝子（10 遺伝子 Dpn, Syp, chinmo, Ipm, pros, Castor, svp, mammo, Broad, EcR）に注目して、3 種における発現変動の比較を行なった。その結果、一部の遺伝子においては、発現パターンならびに発現量が大きく異なることが明らかになった。

次に、各種における時系列的な遺伝子発現変動パターンに基づきクラスタリング解析ソフト Mfuzz を用いたクラスター解析を行ない、Class 1 発生に従い発現が上昇する遺伝子群、Class 2 発現が減少する遺伝子群、Class 3 ステージ特異的に発現が上昇する遺伝子群 Class、4 ステージ特異的に発現が減少する遺伝子群、Class 5 発現変動がない（図 2）に分け、比較を行なった。オルソログが 1：1 で同定できかつ一定量以上の発現がある遺伝子に注目して比較した。その結果、3 種において共通のクラスに分類される遺伝子群（= 異種間で共通に発現変動する遺伝子群）と、1 種だけ異なるクラスに分類される遺伝子（= 種特異的に発現変動する遺伝子群）を、それぞれ、神経幹細胞の発生の共通性をもたらす遺伝子と多様性候補遺伝子として同定した。

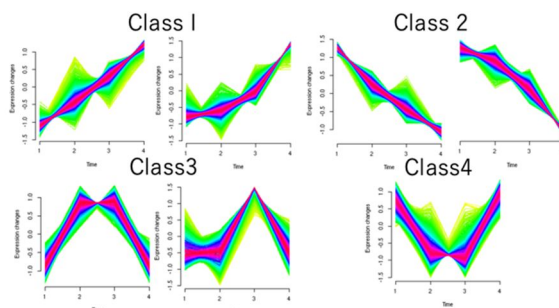


図 2

以上の解析から、ショウジョウバエ近縁種において脳神経を作り出す発生プログラムは、予想以上に多様化している可能性が明らかになった。

(b)(i)キイロショウジョウバエにおいて脳構造の一部をラベルすることができる抗 FasII 抗体、ならびに抗 Tyrosine hydroxylase (TH) 抗体で染色し、脳構造の比較を行なった。抗 FasII 抗体によりキノコ体ローブならびに一部の嗅覚系球体をラベルできるが、ラベルされる細胞には種特異性があることがわかった。また、抗 TH 染色により、ドーパミン (DA) 神経をラベルすると、DA 神経クラスターと投射パターンは比較的保存されているが、DA 神経の数には種間で差があることがわかった。

(ii) 近縁種におけるクローナルユニットのラベルのため、*D. simulans*, *D. ananassae*, *D. elecata*, *D. hydei* において、piggyback ベクターを用いたトランスジェニック系統の作成を行なった。*D. simulans* と *D. ananassae* において、nSyb-GFP, UAS-FRT-stop-FRT-mGFP, hs-FLP 系統を作成し、熱刺激を利用したクローナルユニットのラベルを試みた。その結果、キノコ体クローンと一部の触覚葉クローンをラベルすることができた。この結果は、*D. melanogaster* 以外の種における、世界ではじめての神経幹細胞クローンのラベルであった。種間における神経幹細胞クローンの比較を体系的に行うために、異なる複数の系統を用いて多くの条件を試したが、上記の神経幹細胞クローン以外の幹細胞クローンはほとんどラベルすることができなかった。

効率的に神経幹細胞クローンをラベルするために、Awasaki et al 2014, Ren, Awasaki et al 2018 で開発されたシステムを応用した、Dpn-KDRT-stop-KDRT-FLP, hs-FD1, nSyb-GAL4, UAS-FRT-stop-FRT-mGFP を利用した神経幹細胞クローンのラベルシステムの開発を *D. simulans* において行なった。トランスフォーマントの作成には成功したが、この方法においては、多くの条件をテストしたが、体系的なクローンのラベルの成功には至らなかった。

2 種の近縁種における一部の神経幹細胞クローンがラベルできたことは今後の研究の発展のための貴重な第一歩である。一方で、近縁種における神経幹細胞クローンのラベルとその比較解析は当初考えていたより大変困難な研究であることがわかった。新たな手法にもチャレンジしたにも関わらず結果がでなかったことは大変残念ではあるが、まだまだ改善の余地があるので、今後、上述の方法をさらに改良して近縁種においてより多くのクローナルユニットを体系的に同定し比較解析したいと考えている。

このほか、研究対象とするショウジョウバエ種の選定のために、野外からショウジョウバエ属以外にショウジョウバエ種 (ショウジョウバエ族) を採集し飼育条件の検討、脳形態の観察を行なった。また研究手法の確立とその有用性の検討のために、キイロショウジョウバエにおける Type II 神経幹細胞の細胞系譜解析 (Ren, Awasaki et al 2018) やグリア細胞系譜の解析 (Kato et al 2020) についても、関連する研究として研究を展開し、今後近縁種との比較のための基礎的な結果を得ることができた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kudo Ayumi, Awasaki Takeshi, Ishikawa Yukio, Matsuo Takashi	4. 巻 92
2. 論文標題 <i>piggyBac</i> and phiC31 integrase-mediated transgenesis in <i>Drosophila prolongata</i>	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Genes & Genetic Systems	6. 最初と最後の頁 277 ~ 285
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1266/ggs.17-00024	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Ren Qingzhong, Awasaki Takeshi, Wang Yu-Chun, Huang Yu-Fen, Lee Tzumin	4. 巻 145
2. 論文標題 Lineage-guided Notch-dependent gliogenesis by Drosophila multi-potent progenitors	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Development	6. 最初と最後の頁 dev160127
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1242/dev.160127	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kato Kentaro, Orihara-Ono Minako, Awasaki Takeshi	4. 巻 147
2. 論文標題 Multiple lineages enable robust development of the neuropil-glia architecture in adult Drosophila	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Development	6. 最初と最後の頁 dev184085
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1242/dev.184085	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 3件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Takeshi Awasaki
2. 発表標題 Clonal Development and Organization of the Adult Drosophila Central Brain
3. 学会等名 50th Annual meeting of japan society of developmental biologists (招待講演)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Ueda R, Saito K, Takano T, Watada M, Awasaki T.
2. 発表標題 National BioResource Project "Drosophila"
3. 学会等名 THE 4TH ASIA-PACIFIC DROSOPHILA RESEARCH CONFERENCE (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Takeshi Awasaki
2. 発表標題 Temperature Preference of Drosophila species
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会 ワークショップ (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 栗崎 健
2. 発表標題 脳機能を支えるグリア組織網
3. 学会等名 公開シンポジウム「昆虫コネクトーム研究の最前線」(招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Fumihiro Ito, Takeshi Awasaki
2. 発表標題 Molecular Basis for Diversity of Temperature Preference in Drosophila Species.
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 伊藤史博、粟崎健
2. 発表標題 Molecular Basis for Diversity of Temperature Preference in Drosophila Species
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 伊藤史博、粟崎健
2. 発表標題 Diversity of hot- and cold- avoidance behaviors in Drosophila species
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	加藤 健太郎 (Kentaro Kato) (30733068)	杏林大学・医学部・講師 (32610)	
研究分担者	平井 和之 (Kazuyuki Hirai) (70597335)	杏林大学・医学部・講師 (32610)	
研究分担者	佐藤 玄 (Hajime Sato) (70301299)	杏林大学・医学部・講師 (32610)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------