

平成21年 5月 31日現在

研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19700316
 研究課題名（和文） ショウジョウバエ視覚中枢を用いた脳の層構造形成機構の解明
 研究課題名（英文） Elucidation of mechanisms underlying formation of laminar structures of the brain using *Drosophila* visual system

研究代表者
 佐藤 純 (SATO MAKOTO)
 金沢大学・フロンティアサイエンス機構・特任准教授
 研究者番号：30345235

研究成果の概要：

ショウジョウバエ視覚中枢のメダラ神経節の発生過程を制御する分子機構を解析し、転写因子 *Drf* の発現によって規定される神経細胞は約 60 種存在するメダラ神経細胞のうち9種の神経細胞を構成すること、高次の神経節であるロビュラの第1層および第4層特異的に投射すること、ロビュラに至る投射は幼虫期においてすでに見られることがわかった。また、神経細胞の種類と細胞体の位置には強い相関があることがわかった。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,700,000	0	1,700,000
2008年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	480,000	3,780,000

研究分野：神経発生

科研費の分科・細目：神経解剖学・神経病理学

キーワード：脳・神経、神経科学、発生・分化、遺伝学、遺伝子、ショウジョウバエ、視覚系、メダラ神経節

1. 研究開始当初の背景

脳の層構造は非常に複雑な神経回路から成り、脳の機能にとって非常に重要な役割を果たすと考えられている。その発生過程の初期において、各神経細胞の性質は領域特異的に発現した転写因子によって決定される。多くの神経細胞は大幅に移動し、正しい位置において特異的な投射パターンを示すことにより、最終的に脳の神経回路および層構造を構築する。このような発生過程を理解することは、脳の神経回路およびその機能を理解する上で

必要不可欠であると考えられるが、脳発生の全過程を通して一つ一つの神経細胞の挙動を追跡することは非常に困難である。

ショウジョウバエは神経発生の優れたモデル系であるが、脳形成の上記のような側面に関してはほとんど研究されていなかった。しかし本研究代表者はメダラと呼ばれるショウジョウバエ視覚中枢の一部が幼虫期において同心円状に発現した4種の転写因子の組み合わせによって区画化されていること(図1)、それぞれの転写因子の発現によって区別される

神経細胞が変態の過程で大幅に移動し、成虫においては全く異なる配置を示すことを見出した(図 2)。さらにメダラ神経細胞は最終的にメダラ神経節と呼ばれる層構造を形成することが知られている。このようなことから、メダラは脳の層構造形成機構を理解する上での優れたモデルと成りうると考えられる。

2. 研究の目的

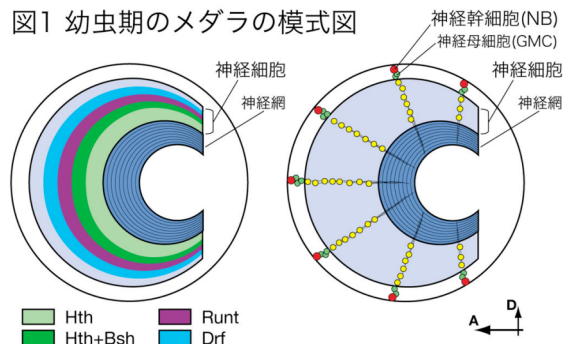
本研究ではショウジョウバエの分子遺伝学の手法を最大限に活用することにより、メダラの発生を一貫して解析できるような実験系を構築する。そのような系を用いることによって初期の領域区画化、細胞移動のパターン、神経回路形成の間に存在する有機的な関係を明らかにし、脳神経科学の基礎研究に貢献することが本研究の目的である。

3. 研究の方法

(1)同心円ゾーン形成機構

幼虫期においてメダラは半球状の構造を示し、その表層に位置する神経幹細胞(NB)が脳の内側に向かって神経細胞を生み出す(図 1)。メダラは同心円状に発現する転写因子によって区画化されるが、このような発現パターンはどのようにして決定されるのだろうか?ショウジョウバエ胚期中枢神経系では一連の転写因子が NB において順番に発現することによって神経細胞の運命が産生された順番に従って決定されることが知られている。メダラにおいても同様な転写因子が NB において順番に発現し、神経細胞の運命を決定しているかも知れない(内在性因子による制御)。もしくはメダラに近接するある特定の細胞において産生された分泌性因子が濃度勾配を形成し、その濃度に応じてメダラ神経の運命が決められているかもしれない(外来性因子による制御)。メダラ NB において発現する転写因子およびメダラ近傍において発現する分泌性因子を *in situ* ハイブリダイゼーションおよび抗体染色によって探索し、候補因子に関してはその機能欠失変異体の表現型および異所発現の影響を調べることにより、同心円状遺伝子発現の制御機構を明らかにする。

図1 幼虫期のメダラの模式図



(2)同心円遺伝子に対する Gal4/LexA ノックイン系統の作製

蛹期における神経細胞移動・神経回路形成といった、メダラの形成を一貫して解析できるような系を構築するため、同心円状に発現する4遺伝子(図 1)に対する Gal4 および LexA ノックイン系統を作製する。これらの系統は各遺伝子の機能欠失変異体であると同時に、外来の転写因子である Gal4 および LexA::VP16 を各遺伝子と全く同じパターンで発現させる。Gal4 および LexA の結合配列の下流で任意の遺伝子を発現させることにより、特定の同心円状遺伝子の発現細胞を蛍光蛋白質によってラベルしたり、特異的に体細胞組み換えを誘導したり、別の遺伝子の発現とスワップさせることが可能となる。しかも、Gal4 と LexA は異なる配列を認識するため、同時に用いることによって異なる遺伝子を発現する神経細胞の移動様式・回路形成を直接比較することも可能となる。このようにして作製された系統は以下の解析において非常に強力なツールとなる。

ショウジョウバエにおいてはノックインは技術的に非常に困難であり、目的 Gal4 系統が得られない可能性が考えられる。そのため、Gal4 を持った P 因子トランスポゾンが目的の遺伝子近傍に挿入された系統を取り寄せ、P 因子の再転移を試みる。このような方法によっても各遺伝子に対する Gal4 系統を作製しようと考えている。

(3)メダラ神経細胞の移動機構

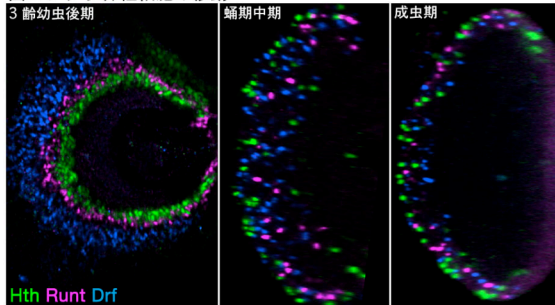
まず、蛹期におけるメダラ神経細胞の移動(図 3)をより厳密に実証し、また細胞移動の方向性を明らかにする。そのために、各同心円状遺伝子に対する Gal4 系統を用いて組み換え酵素である FLPase を発現させ、その標的である FRT 配列間の組み換えを誘導し、一部の細胞を GFP でラベルする。このような解析によって各神経細胞が発現する転写因子と細胞移動のパターンとの相関が明らかになると考えられる。

細胞移動開始以前の幼虫期においてすでにメダラ神経細胞は脳の内側に向かって軸索を伸ばしている(図 1)。この時、各メダラ神経は脳のより外側に存在する神経細胞の軸索に接している。メダラ神経細胞がそのような軸索に沿って移動するのか、またそうだとすれば軸索との接触が細胞移動に必要なかどうかを調べたい。そのために、メダラ神経の一部において細胞死誘導因子を発現させ、脳の外側に位置する神経細胞を除去する。このときにその細胞よりも内側に位置するメダラ神経の移動にどのような影響があるか解析する。

また同心円状に発現した各転写因子が細胞移動に関与しているかどうか調べるため、

Gal4 ノックイン系統を用いて一部のメダラ神経細胞を変異体にし、かつ GFP でラベルする(MARCM法)。このような細胞の挙動を調べることによって同心円状に発現した各遺伝子の細胞移動への関与を明らかにした

図2 メダラ神経細胞の移動



い。

(4)メダラ神経回路の形成機構

メダラ神経細胞は幼虫期においてすでに脳の中心部に向かって軸索を伸ばしているが、蛹期において細胞移動を完了させた後、さらに軸索・樹状突起パターンの成熟、シナプス形成という過程を経て機能的なメダラを完成させると考えられる。また初期の神経細胞の同心円状の配置・細胞移動といった現象は最終的な神経回路を実現する上で非常に重要な意義を持っているはずである。このような初期の遺伝子発現・細胞移動がもたらす意義を明らかにするため、まず各 Gal4 ノックイン系統と、Gal4 標的配列の下流で様々なレポーター因子を発現させる系統を用いて、各神経細胞が発現する同心円遺伝子と軸索・樹状突起パターンおよびシナプス結合標的との相関関係を調べる。その後、これらメダラ神経細胞の性質が各同心円状遺伝子の機能欠失変異体もしくは他の転写因子とのスワップによってどのように影響されるかを調べることにより、同心円状の遺伝子発現から最終的な神経回路が生み出されるメカニズムを明らかにしたいと考えている。

メダラ神経回路の解析においては注目している神経細胞に加えて、近傍に存在する神経細胞の投射パターンを可視化し、互いの関係を調べる必要がある。東京大学の伊藤啓博士らのグループはハエの脳内の特定の神経細胞において発現する Gal4 系統の網羅的なデータベースを構築しており、共同研究によって特定のメダラ神経を可視化できるような Gal4 系統を探索する予定である。このようにして得られた Gal4 系統と上述の LexA 系統を組み合わせることで、注目している神経細胞の軸索・樹状突起・シナプスの位置・形態の変化を正確に解析することができると考えられる。

4. 研究成果

(1)同心円ゾーンの形成機構

同心円ゾーン形成を制御する“内在性因子”および“外来性因子”の候補を得るため、神経細胞の運命をその産生順に従って決定することが知られている birth order 遺伝子群、Hox 遺伝子群、Hh/Wnt/BMP などの分泌性蛋白質をコードする遺伝子群の発現パターンを調べた。その結果、Wnt ファミリーに属する Wingless の発現が幼虫期メダラの同心円ゾーンの内側において認められたため、Wnt シグナルが活性化するような細胞群を誘導し、同心円遺伝子の発現に対する影響を調べた。その結果、Wnt シグナルが活性化されると同心円ゾーンのパターンが外側に向かってずれる表現型が得られたため、Wingless の濃度勾配によって同心円パターンが決められている可能性が考えられた。しかし、Wnt シグナルを不活性化しても何の異常も見られなかったため、Wnt と何か別の他のシグナルが協調して働いている可能性が考えられる。

(2)同心円遺伝子に対する Gal4/LexA ノックイン系統の作製

4種の同心円遺伝子のうち hth, bsh, run, drf については Gal4 ノックインを、hth, bsh については LexA ノックイン系統の作製を試みたが、非常に効率が悪く、期待したような系統はほとんど得られなかった。しかし、drf に関してはその発現を完全に再現する drf-Gal4 系統が得られた。

また、hth の Gal4 ノックイン系統作成用の P 因子 Gal4 ベクターを hth 遺伝子座内に再転移させ、これによって hth の発現の大部分を再現できる hth-Gal4 系統が得られた。drf-Gal4 と hth-Gal4 を用いることにより、Drf 陽性および Hth 陽性神経細胞の投射パターン、移動パターンを比較検討することができる。

東京大学分子細胞生物学研究所の伊藤啓博士よりハエ脳内の特定の神経細胞において発現する Gal4 系統データベースを利用していただき、hth, bsh, drf と似た発現を示す系統が得られた。これらの系統と各遺伝子の変異体を組み合わせることにより、ノックインを用いたときと同様な実験を行うことができると考えられる。

(3)メダラ神経細胞の移動機構

drf-Gal4 系統を用いて Drf 陽性細胞特異的に組み換え酵素 FLPase を発現させ、FLPase 標的である FRT 配列間の組み換えを誘導し、一部の細胞のみを恒常的に LacZ でラベルした実験から、Drf の発現は発生過程においてほとんど変わっていないということが示さ

れた。従って、幼虫期において Drf を発現した細胞は蛹期においても Drf 抗体および drf-Gal4 を用いて追跡することが可能であると言える。しかし、Drf は比較的多数のメダラ神経細胞で発現するため、その移動パターンに法則性を見出すことはできなかった。

Bsh は Hth 陽性細胞の約半数において発現するため、幼虫期において Bsh 陽性細胞は脳の内側の領域に位置している。しかし、蛹期において Bsh 陽性細胞は脳の外側に向かって移動し、最終的には必ず脳の最も外側に位置するということがわかった。このように、ごく少数のメダラ神経細胞を特異的に可視化することができれば、個々のメダラ神経細胞の移動パターンを明らかにすることができると考えられる。今後は同心円遺伝子の変異体においてこのような移動パターンにどのような影響が見られるか解析していきたい。

一部のメダラ神経細胞において細胞死を誘導する実験は、細胞死を誘導する神経細胞の位置・数を制御することが困難であったため、はっきりした結論を得ることができなかった。

(4)メダラ神経回路の形成機構

drf-Gal4 を用いたモザイク解析の結果から、Drf 陽性メダラ神経細胞については(1)少なくとも約 60 種存在するメダラ神経細胞のうち、9種の神経細胞を構成すること、(2)細胞体の位置がバラバラであっても、高次の神経節であるロビュラの第1層および第4層特異的に投射すること、(3)ロビュラに至る投射は幼虫期においてすでに見られることがわかった。Drf 陽性メダラ神経細胞は幼虫期において最終的な標的の近くまで投射した後、蛹期に細胞体の位置を大幅に変化させると考えられる。

この細胞移動に重要な意味があるならば、細胞体の移動パターンと神経細胞の種類・転写因子発現の間には何らかの相関関係があるはずである。実際、成虫において Drf 陽性神経細胞のうちあるサブタイプについては細胞体が必ず脳の最も外側の領域に位置し、他のサブタイプについては脳のより内側というように、神経細胞の種類と細胞体の位置には強い相関があることがわかった。

Hth 陽性メダラ神経細胞についてはほとんどの場合ロビュラには投射せず、メダラ神経節内の特定の層に投射していること、さらにこのような投射パターンの傾向は幼虫期においてもほぼ同様に見られることがわかりつつある。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計3件) 全て査読有

(1) **Sato, M.**, Kitada, Y. and Tabata, T. Larval cells become imaginal cells under the control of *homothorax* prior to metamorphosis in the *Drosophila* tracheal system. **Developmental Biology** 318 (2008) 247-57.

(2) Yasugi, T., Umetsu, D., Murakami, S., **Sato, M.** and Tabata, T. *Drosophila* optic lobe neuroblasts triggered by a wave of proneural gene expression that is negatively regulated by JAK/STAT. **Development** 135 (2008) 1471-80.

(3) Murakami, S., Umetsu, D., Maeyama, Y., **Sato, M.**, Yoshida, S. and Tabata, T. Focal adhesion kinase controls morphogenesis of the *Drosophila* optic stalk. **Development** 134 (2007) 1539-48.

[学会発表] (計7件)

口頭発表

(1) **佐藤純** “Concentric zones, cell migrations and neuronal circuits in the *Drosophila* brain” 金沢大学革新脳科学COEシンポジウム Neurobiology of *Drosophila* (2008.8.21. 金沢)

(2) **Sato, M.** “Concentric zones, cell migrations and neuronal circuits in the *Drosophila* brain” International Symposium on Innovative Brain Science for Development, Learning, Memory and Autism (2008.7.19. 金沢)

(3) **佐藤純**、田井美也子、梅津大輝、北田祐介、多羽田哲也 “ショウジョウバエ成虫脳における同心円ゾーンと細胞移動による神経回路の構築” 第30回日本分子生物学会年会 (2007.12.14. 横浜)

(4) **Sato, M.** “Concentric zones, cell migrations and neuronal circuits in the *Drosophila* brain” Kornberg Family Symposium: Developmental Biology of Compartment and Signaling Center (2007.7.24. 東京)

ポスター発表

(5) **佐藤純**、北田祐介、田井美也子、梅津大輝、多羽田哲也 “Concentric zones, cell migrations and neuronal circuits in the *Drosophila* brain” 第41回日本発生生物学会大会 (2008.5.28. 徳島)

(6) **Sato, M.**, Kitada, Y., Tai, M., Umetsu, D. and Tabata, T. “Concentric zones, cell migrations and neuronal circuits in the *Drosophila* brain”

Cold Spring Harbor Laboratory Meeting on
Neurobiology of *Drosophila*, (2007.10.6. ニュー
ヨーク)

- (7) **佐藤純**、田井美也子、梅津大輝、多羽田
哲也 “ショウジョウバエ成虫脳における同
心円ゾーンと細胞移動による神経回路の構
築” 東京大学生命科学研究ネットワークシ
ンポジウム 2007 (2007.9.15. 東京)

〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページアドレス

<http://fsosato.w3.kanazawa-u.ac.jp/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐藤 純 (SATO MAKOTO)

金沢大学・フロンティアサイエンス機構・特

任准教授

研究者番号：30345235

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

多羽田哲也 (Tabata Tetsuya)

東京大学・分子細胞生物学研究所・教授

研究者番号 10183865

伊藤啓 (Ito Kei)

東京大学・分子細胞生物学研究所・准教授

研究者番号 00311192