

## 論文内容の要旨

論文題目 ショウジョウバエの視覚系神経節の形成に必要な  
神経細胞の相互作用

(Coordinated interaction between pre/post-synaptic neurons  
in the developing optic ganglion in *Drosophila melanogaster*)

氏名 梅津 大輝

### 1. 序論

高度の情報処理を司る中枢神経系には膨大な数の神経細胞が存在し複雑で精緻な神経回路を形成している。そこで、脳の高次機能の解明には、脳の基本的構成要素である神経細胞の構造や機能、および多種多様な神経細胞間のシナプス連絡形成の解明が不可欠である。本研究はモデル生物として様々な特性を有するショウジョウバエをモデルとし、脳形成に関わるメカニズムについて細胞及び分子レベルで理解することをめざした。特に本研究でモデルとして用いたショウジョウバエ lamina は視神経が最初に投射する比較的単純な神経節であり、神経節を構成する細胞についての解剖学的な知見が比較的集積しているなどの特徴を有する。Lamina 神経節の形成には視神経からのシグナルが必要なことが古くから知られていたが、Kunes らによって行われた一連の研究によってそれらの分子実体が視神経の軸索(R axon)から供与されるHedgehog(Hh)や Spitz などの分泌性シグナル分子であることが明らかになった。Hhを受容し、分化を開始した lamina 神経細胞は初期の分化マーカーであるDachshund(Dac)を発現することが知られている(図1A)。分化を始めた lamina 神経細胞は新しく投射してきた R axon とともに lamina 神経節に特徴的なカラム状の構造、すなわち lamina カラムを形成する。Lamina カラムは個々の個眼に由来する R axon の束が5つの lamina 神経細胞を一行に従えた構造を持つ(図1C 左)。本研究ではこの lamina 神経節の構成単位であるカラム構造の形成メカニズムとそれに関わる因子の

同定を試みた。

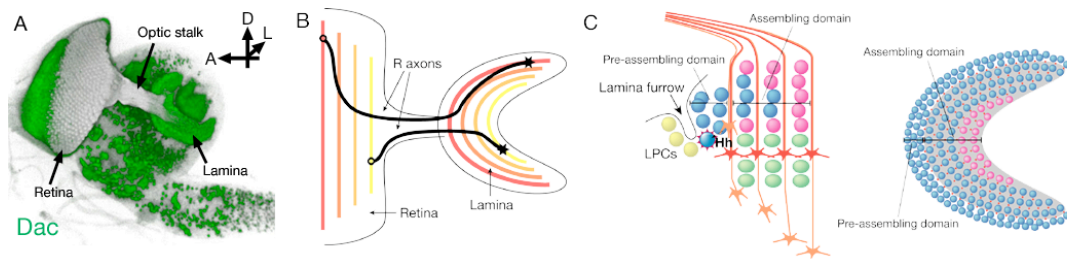


図1：発生中の lamina の構造

(A) 3令幼虫期のショウジョウバエ脳。R axon(灰)の投射と Dac(緑)の発現。A:前側、D:腹側、L:側方。

(B) 視神経軸索(R axon)投射パターンの模式図。

(C) 発生中の lamina を腹側(左)と側方(右)から見た模式図。腹側から見た時に lamina 神経細胞が5つ並んだ lamina カラム構造が認められる。分化し始めた lamina 神経細胞(青)、成熟 lamina 神経細胞(ピンク)。

## 2. Hh シグナルは lamina カラムの形成に必須である

Lamina カラムの形成メカニズムの解明をめざし、始めに Hh シグナルの必要性を検討した。Hh シグナルの必須構成因子の一つである *smoothened(smo)*の変異を用いてクローン解析を行った。*smo* の変異をホモに持つ体細胞クローンを脳に特異的に誘導することによって、クローンで細胞自律的に Dac の発現が消失することが確認された。*smo* のクローンの生じ方を詳細に観察するとコントロールと *smo* で興味深い違いがあった。ここで lamina を R axon の投射の最前列を境界として外側の領域と内側の領域とに分け、それぞれを pre-assembling domain と assembling domain と定義することにする(図1C)。コントロールのクローンは assembling domain に高頻度に生じるのに対し、*smo* のクローンは assembling domain には全く生じなかった。このことから lamina 神経細胞が lamina カラムに配置するためには Hh シグナルが必要であると考えられた。

## 3. Single-minded は Hh 制御下にあり lamina カラム形成に必須である

Hh シグナルによって発現が誘導される何らかの因子が lamina 神経細胞の lamina カラムへの取り込みに機能しているものと考えられる。その因子を同定するために、エンハンサートラップシステムのスクリーニングを行い、*single-minded(sim)*遺伝子のエンハンサーが lamina 神経細胞に特異的な発現を制御していることを見出した。抗 Sim 抗体によって発現パターンを調べたところ、Sim は lamina 神経細胞に特異的に発現していることが確かめられた。*sim* 遺伝子は basic-Helix-loop-helix-PAS(bHLH-

PAS)型の転写因子をコードしており、別の bHLH-PAS 転写因子の dARNT(Tgo とも呼ばれる)とヘテロダイマーを形成し、核内に移行することで転写因子として機能を発揮することが知られている。Lamina 神経細胞における Sim の発現は Hh シグナルに依存的かどうかを調べるために、*smo* のクローンで Sim の発現を調べた。その結果、クローンで細胞自律的に Sim の発現が消失した。したがって、Sim は R axon からの Hh によって発現が制御されていることが示された。

Sim が Hh シグナルの標的として lamina カラム形成に機能しているとすれば、*sim* 変異クローンは *smo* のクローンと同様に assembling domain には生じないはずである。*sim* のクローンを誘導してみると実際に assembling domain にはほとんどクローンが生じなかった。ただし、*smo* のクローンの生じ方とは違いがあった。それは *sim* のクローンは *smo* のクローンよりも大きく、Dac を発現している点である。このことは細胞の増殖と神経分化への最初のステップには異常がないことを示している。したがって *sim* は lamina カラムの形成に特異的に機能していると考えられる。

次に *sim* ヘテロ変異体を用いて *sim* の働きを解析した。*sim*<sup>2</sup>/*sim*<sup>ry75</sup> 変異体の幼虫の脳では、pre-assembling domain の lamina 神経細胞が増加していた (図 2 A, C 矢頭)。また、R axon は野生型の脳よりもずっと狭い領域に投射しており、assembling domain の lamina 神経細胞の数は著しく減少していた (図 2 A, C 矢印及び黄色で囲んだ円内)。*sim* 変異体の Dac ポジティブな lamina 神経細胞の全体数は野生型の脳のそれとほとんど違いがなかった。また、pre-assembling domain の細胞分裂のパターンを細胞分裂促進因子の E2F に対する抗体の染色によって調べたところ、*sim* 変異体を観察した時も、lamina における発現パターンは野生型のそれとほとんど違いはなかった。以上の結果から、*sim* 変異体で見られた pre-assembling domain における細胞数の増加は有糸分裂完了後の lamina 神経細胞が蓄積してしまった結果と考えられる。

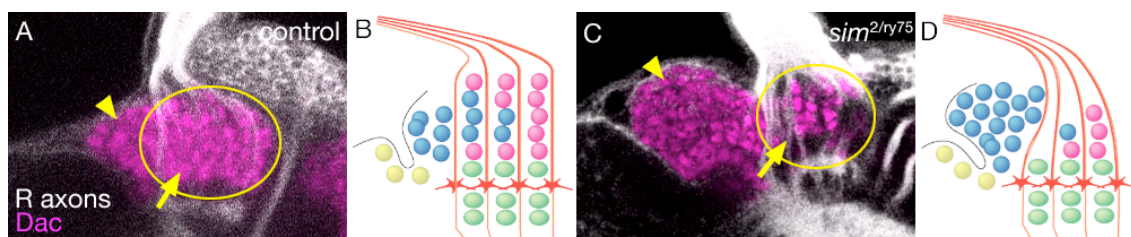


図 2 : *sim* 変異体における lamina カラム形成異常

(A, B) 野生型の R axon(白)と lamina 神経細胞(マゼンタ)を腹側から見た図。B は A の模式図。

(C, D) *sim* ヘテロ変異体の lamina。D は C の模式図。

#### 4. Sim の過剰発現は lamina カラム形成の早発を招く

*sim* を lamina 神経細胞に過剰発現すると、pre-assembling domain の lamina 神経細胞の数が減少した。これは lamina 神経細胞が早発的に assembling domain すなわち lamina カラムに取込まれていることに起因すると考えられる。このことを確かめるために、LacZ エンハンサートラップ系統の *tkv-lacZ* の発現を指標として細胞の軌跡を調べた。野生型の脳においては、*tkv-lacZ* の発現は lamina の前駆細胞で最も強く、lamina 神経細胞が分化するにつれて発現が弱まる。この時、*tkv-lacZ* を発現している lamina 神経細胞は pre-assembling domain にだけ見られ、assembling domain 内の lamina 神経細胞は *tkv-lacZ* をほとんど発現していない。その一方で、*sim* を lamina 神経細胞で過剰に発現した脳では pre-assembling domain が消失しており、*tkv-lacZ* を発現する lamina 神経細胞が assembling domain 内に多数見られた。このことから、*sim* 過剰発現細胞が早発的に lamina カラムに取込まれていることが確認された。過剰に *sim* を発現する lamina 神経細胞が早熟に R axon との相互作用能を獲得したものと考えられる。以上のことから、*sim* は lamina カラム形成の最初のステップに必要であり、おそらく R axon との相互作用に必要な遺伝子セットの発現を制御していることが推察できる。

#### 結論

本研究ではショウジョウバエ lamina カラムの形成に Hh シグナルが必須であることを示した。また、Hh シグナルによって発現が制御される bHLH-PAS 型の転写因子 Sim が lamina 神経細胞の R axon との相互作用に特異的に機能し、その相互作用は lamina カラムを形成するのに必須であることを示した。同時に、lamina 神経節において神経間の連結を確立するためには後シナプス神経の動的なふるまいが必要であることも示した。

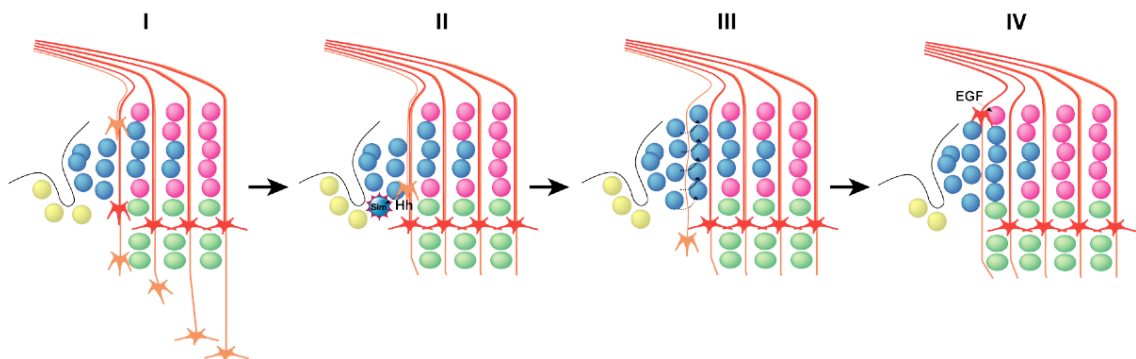


図3. Lamina カラム形成のモデル図

R axon から Hh を受容した lamina 神経細胞が *sim* を発現し、lamina カラムに会合していく。