

論文内容の要旨

論文題目 JAK/STAT シグナルによる神経幹細胞形成の 時空間的制御機構 (Spatio-temporal regulation of neuroblast formation by the JAK/STAT signal)

氏名 八杉 徹雄

序論

神経ネットワークの形成には、種々の神経細胞やグリア細胞が正常に産生される必要がある。その為には、神経前駆細胞の増殖や神経分化のタイミングが正確に制御されなければならない。本研究では、ショウジョウバエ視覚系をモデルとし、神経上皮細胞 (NE 細胞) から神経幹細胞および神経細胞が時空間的に規則正しく産生されるメカニズムの解明を目指した。

視覚中枢の形成

ショウジョウバエ視覚系は複眼と脳の視覚中枢から構成される。後者は、ラミナ、メダラ、ロビュラ複合体の3視神経節から成る。3 齢期幼虫において、ラミナは視覚中枢の lateral 側に、メダラは medial 側に位置する (図 1A、B)。幼虫期に、ラミナとメダラの一部の細胞は共通の NE 細胞から分化する。このとき、ラミナは lateral 側から medial 側へ、メダラ神経幹細胞は medial 側から lateral 側へと、一定の方向に分化する (図 1C)。NE 細胞から分化したメダラ神経幹細胞は非対称分裂を開始し、apical 側の娘細胞は自己複製能を持つメダラ神経幹細胞に、basal 側の娘細胞は神経母細胞 (GMC) となる。GMC はさらに分裂してメダラ神経細胞となる。一方、複眼の発生において、個眼の分化は複眼原基の最も後方から始まり前方へと向かい、分化した個眼は視覚中枢に軸索を投射する。各個眼に含まれる 8 個の視神経細胞のうち、R1-R6 はラミナに、R7 と R8 はラミナを通過してメダラまで投射する (図 1C)。ラミナの分化は投射してくる視神経軸索から分泌される Hedgehog や Spitz に依存することがわかっているが、メダラの分化を制御する因子の同定は進んでいない。

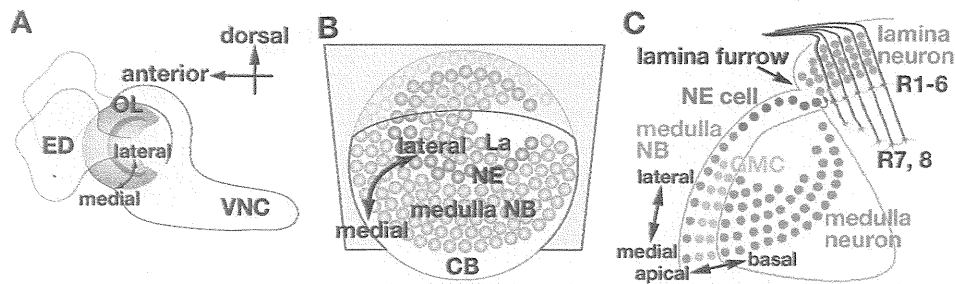


図 1 発生過程の視覚系の模式図。(A) 複眼原基と脳の模式図。ED:複眼原基, OL:視覚中枢, VNC:腹側神経索 (B) 腹側側方から見た視覚中枢の模式図。ラミナ(La 灰色)、神経上皮(NE 青)、メダラ神経幹細胞(medulla NB ピンク)、central brain を示す。(C) 水平方向の断面図 (B の水色の面の断面図)。ラミナ神経細胞(灰色)、NE 細胞(青)、メダラ神経幹細胞(マゼンタ)、神経母細胞(GMC, 黄色)、メダラ神経細胞(オレンジ)、ラミナ溝、視神経軸索(R1-R8)を示す。

Proneural Wave

当研究室梅津により、bHLH 転写因子をコードする proneural 遺伝子の一つである *lethal of scute (l(1)sc)* が最も medial 側の NE 細胞 (次にメダラ神経幹細胞に分化する細胞) において一過的に発現すること (図 2A-F)、L(1)sc が NE 細胞からメダラ神経幹細胞への分化に必要なことが示された。L(1)sc はメダラ分化のタイミングを制御していると考えられ、medial 側から lateral 側に波のように進行する L(1)sc の発現パターンを proneural wave と名付けた (図 2G)。

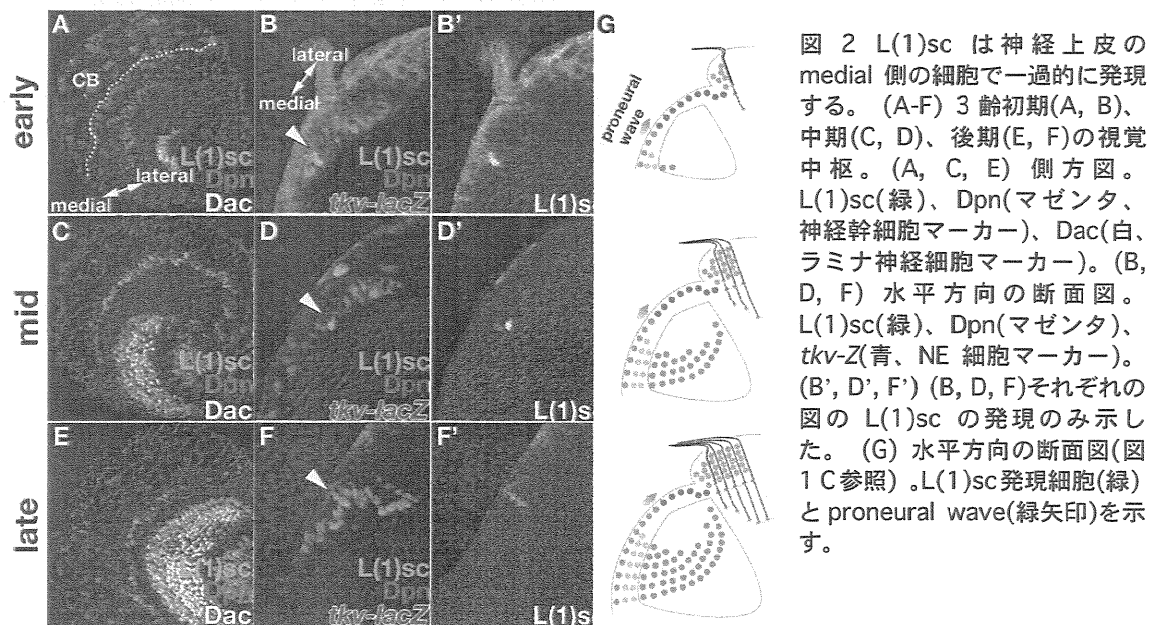


図 2 L(1)sc は神経上皮の medial 側の細胞で一過的に発現する。(A-F) 3 齢初期(A, B)、中期(C, D)、後期(E, F)の視覚中枢。(A, C, E) 側方図。L(1)sc(緑)、Dpn(マゼンタ、神経幹細胞マーカー)、Dac(白、ラミナ神経細胞マーカー)。(B, D, F) 水平方向の断面図。L(1)sc(緑)、Dpn(マゼンタ)、tkv-Z(青、NE 細胞マーカー)。(B', D', F') (B, D, F)それぞれの図の L(1)sc の発現のみ示した。(G) 水平方向の断面図(図 1 C 参照)。L(1)sc 発現細胞(緑)と proneural wave(緑矢印)を示す。

JAK/STAT シグナルは NE 細胞で活性化される

proneural wave の進行のメカニズムを解明するため、エンハンサートラップシステムを用いた発現解析スクリーニングを行った。その結果、JAK/STAT シグナルのリガンドをコードする *unpaired (upd)* が NE 細胞において興味深い発現を示すことがわかった。*upd-Gal4* システム

は 3 齢初期から中期にかけて、lateral 側の NE 細胞で発現が観察された (図 3A)。次に、JAK/STAT シグナルの活性を *in vivo* で調べるために、10xSTAT-GFP 系統を用いて、JAK/STAT シグナルが活性化されている領域を調べたところ、3 齢初期から中期にかけて、神経上皮の lateral 側で強く、medial 側で弱く GFP が発現していた (図 3B)。これらの結果は、3 齢初期から中期において、JAK/STAT シグナルが NE 細胞において機能しており、かつそのシグナルは lateral 側で強く、medial 側で弱い勾配をもつことを示している。

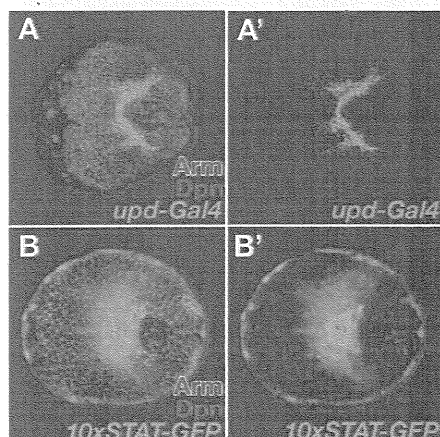


図 3 JAK/STAT シグナルは NE 細胞において活性化される。(A) 3 齢中期の *upd-Gal4* の発現。(A') *upd-Gal4* の発現のみ示す。(B) 3 齢中期の 10xSTAT-GFP の発現。(B') 10xSTAT-GFP の発現のみ示す。(A,B)ともに NE 細胞を Arm(青)の発現で、メダラ神経幹細胞を Dpn(マゼンタ)で示す。

JAK/STAT シグナルは proneural wave の進行を負に制御する

次に、JAK/STAT シグナルが視覚中枢の形成に働いているか調べるために、JAK のショウジョウバエホモログをコードする *hopscotch* (*hop*) および *Stat92E* の機能欠失変異体の表現型解析を行った。これらの変異体では、3 齢後期において、メダラ神経細胞は野生型株と比較して減少し、ラミナは全く形成されなかった。

JAK/STAT シグナルの細胞自律性を調べる為に、*Stat92E* 変異クローンおよび Hop の活性化型フォームである Hop^{Tum-1} を発現するクローンを視覚中枢で誘導し、メダラ分化への影響を調べた。*Stat92E* 変異クローンおよびその周辺において、L(1)sc はより lateral 側の細胞で発現した (図 4A)。反対に、 Hop^{Tum-1} 発現クローンおよびその周辺では、L(1)sc の発現は medial 側にずれ、メダラ神経幹細胞の分化は遅れた (図 4C)。同様の結果は、Upd を NE 細胞において過剰発現した際にも観察された (図 4D)。これらの結果は、JAK/STAT シグナルが細胞非自律的に proneural wave の進行を負に制御することで、メダラ分化のタイミングを制御していることを示唆する。

JAK/STAT シグナルはメダラとラミナの細胞数を調節する

NE 細胞からはメダラ神経細胞とラミナ神経細胞の 2 種の神経細胞が産生されること、*hop* や *Stat92E* の変異体ではラミナが欠失することから、JAK/STAT シグナルがラミナとメダラ両神経細胞のバランスの維持に寄与する可能性が考えられる。視覚中枢において、本来のメダラ神経幹細胞からラミナ領域にまたがる大きな *Stat92E* 変異クローンを誘導したとこ

ろ、クローンの中および近傍において、メダラ神経幹細胞は本来ラミナ神経細胞が生じる部分でも観察され、このときラミナの分化は抑制された (図 4B)。この結果は、JAK/STAT シグナルはメダラ神経幹細胞への分化を負に制御することで、ラミナ神経細胞の産生、さらにはラミナとメダラの神経細胞数のバランス調節に寄与する可能性を示唆する。

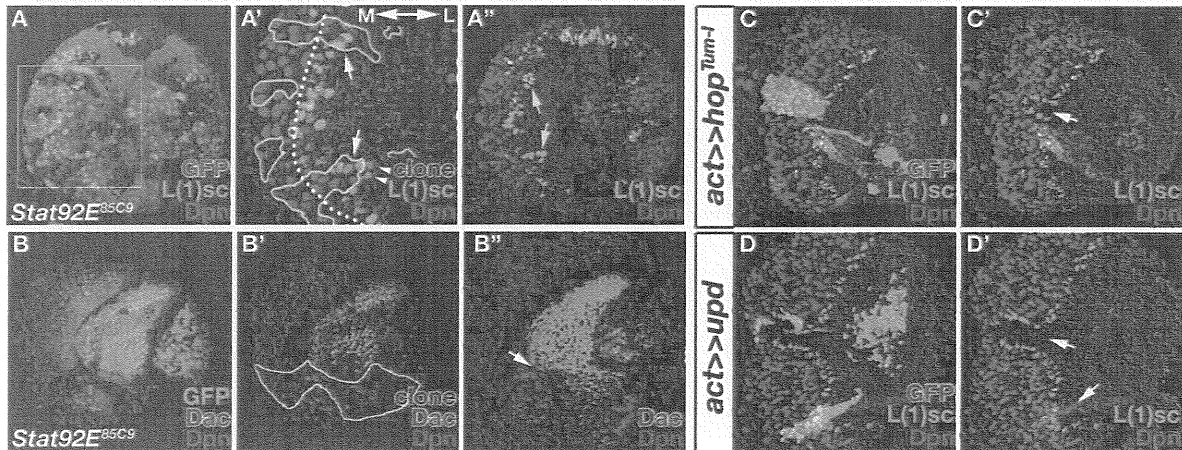


図 4 JAK/STAT シグナルは proneural wave の進行を負に制御する。(A) *Stat92E^{85C9}* クローン(GFP シグナルの欠失領域、(A')では黄線で囲まれた領域)では、L(1)sc(緑)および Dpn(マゼンタ)は、より lateral 側の細胞で発現する。(A'') (A)の拡大図。白点線は NE とメダラ神経幹細胞領域の境界を示す。白矢印は早期の Dpn と L(1)sc の発現を示す。L(1)sc は *Stat92E^{85C9}* クローンに隣接する細胞において異所的に発現する(白矢頭)。(B) *Stat92E^{85C9}* 変異クローン(GFP シグナルの欠失領域、(B')では黄線で囲まれた領域)ではラミナの分化(Dac、青)が抑制され、本来のラミナ領域においてもメダラ神経幹細胞(Dpn、マゼンタ)が観察される。(B'') (B)を含む視覚中枢の 3 次元構築図。矢印で示した領域で Dpn が lateral 側で発現し、Dac 発現細胞の欠失が観察される。(C) *Hop^{Tum-1}* を過剰発現細胞(青、(C')では矢印)およびその近傍では L(1)sc (緑)および Dpn(マゼンタ)の発現が medial 側に残る。(D) *Upd* を過剰発現した細胞(青、(D')では矢印)の周辺では L(1)sc(緑)および Dpn(マゼンタ)の発現が medial 側に残る。

結論

本研究では、ショウジョウバエ視覚中枢発生過程において、JAK/STAT シグナル伝達系が L(1)sc の発現で示される proneural wave の進行を負に制御することで、メダラ分化のタイミングを調節していることを明らかにした (図 5)。そして、この JAK/STAT による調節が、ラミナとメダラの両神経細胞の産生のバランスの維持に寄与する可能性を示した。また、本研究は、JAK/STAT シグナルの活性の勾配が神経幹細胞分化のタイミングを制御することを示した最初の研究となる。

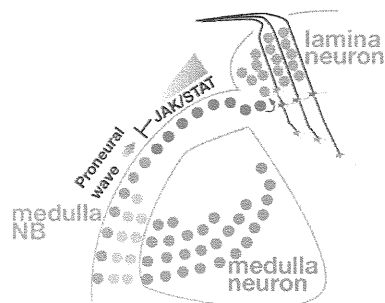


図 5 JAK/STAT シグナルの作用機構のモデル図 (視覚中枢の水平方向の断面図、図 1C 参照)。JAK/STAT シグナルは NE 細胞において lateral 側で強く medial 側で弱い活性を持つ。proneural wave の進行は JAK/STAT シグナルにより負に制御される。