

## 論文内容の要旨

### 論文題目 **Neural Architecture of the Primary Gustatory Center Visualized with the Enhancer-trap Systems in *Drosophila melanogaster***

(エンハンサートラップシステムによって可視化されたキイロ  
ショウジョウバエの味覚一次中枢の神経構造)

氏名 宮崎 隆明

味覚は、動物にとって食物を認識し毒物を避けるために欠かせない重要な感覚である。昆虫では、味覚は摂食行動に関与するだけでなく、個体間のコミュニケーションの手段や、連合学習の枠組みの中での報酬・罰刺戟としての役割をも持っている。哺乳類では、味蕾にある異なる種類の味に対応する味細胞が検知した情報は、味覚神経を介して間接的に脳へと送られる。これに対し、昆虫では末梢に存在する味覚感覚神経 (gustatory receptor neuron; GRN) が直接、軸索を中枢まで伸ばしているため、脊椎動物では未だ難しい味覚一次中枢の構造の解析が比較的容易である。

キイロショウジョウバエでは、主な GRN は口器の先端の唇弁に存在し、その軸索は下唇神経を経て脳の食道下神経節にある味覚一次中枢まで達している。ゲノム情報に基づき 7 回膜貫通型の味覚受容体遺伝子のファミリーが同定され、これらの遺伝子のプロモーターを使って緑色蛍光タンパク GFP などを発現させて GRN を標識することにより、甘味と苦味に対応した GRN が、それぞれ別の味覚受容体を発現し、味覚一次中枢の異なる領域に軸索を投射していることが分かっている。しかし、既知の遺伝子以外にも未知の味覚受容体が存在することが示唆されており、明らかにされた味覚神経回路は未だ一部分に過ぎないと考えられる。そこで私は受容体遺伝子に着目したリバース・ジェネティクス的なアプローチではなく、GAL4 エンハンサートラップ系統のコレクションの中から味覚神経を標識するものを捜すフォワード・ジェネティクス的なアプローチを採ることにした。

ハエにおいて味覚と並ぶ化学感覚である嗅覚系では、一次中枢である触角葉にグリアで仕切られた糸球体構造が存在し、個々の投射領域を容易に区画同定できる。一方、味覚一次中枢がある食道下神経節内にはそのような容易に可視化される明瞭な区画構造は存在せず、標識された味覚神経がどこに投射するかの精密な解析を困難にしている。この課題を克服するため、私は GAL4/UAS システムと同時に細胞を二重染色することが可能な、LexA 転写系を用いたエンハンサートラップシステムを新たに利用した。

味覚神経を標識する GAL4 エンハンサートラップ系統のスクリーニングのため、私はまず約 4000 系統のコレクションから下唇神経を標識するものを 100 系統選んだ。下唇神経には小髭鬚に存在する嗅覚神経等の軸索も合流しているため、これらの系統の唇弁と小髭鬚での GFP 発現を解析し、唇弁では発現があ

るが小髭鬚では発現がほとんど観察されない系統を選択した。その結果 6 系統を得て、それぞれ *LB1*~*6* と名付けた。

唇弁は、約 30 本の味覚感覚毛と 2 本の機械感覚毛が生えた外側の面と、約 30 本の味覚ペグと呼ばれる感覚突起が存在する内側の面からなる。1 本の味覚感覚毛の根本には 2 ないし 4 個の味覚神経と 1 個の機械感覚神経があり、機械感覚毛には 1 個の機械感覚神経が存在する。味覚ペグには味覚神経と機械感覚神経が一つずつ備わっている。得られた 6 系統のうち、*LB1* は外側の機械感覚毛と内側の味覚ペグの神経を、*LB2* は内側の味覚ペグのみを標識し、*LB3* と *LB4* は外側の味覚感覚毛と内側の味覚ペグの両方を、*LB5*, *6* は外側の味覚感覚毛のみを標識した。GAL4 エンハンサートラップ系統 *E409* は内側のペグにおいて炭酸を受容する GRN を標識することが報告されている。それぞれ LexA::VP16 エンハンサートラップ系統 *NV4* (後述) と二重染色を行うことにより、*E409* と *LB1* は唇弁の内側で別々の細胞群を標識することが判明した。これに基づき私は、*LB1* は唇弁の外側の機械感覚毛の神経と、内側の味覚ペグの機械感覚神経を標識すると結論づけた。

各系統がラベルする神経の食道下神経節での投射パターンを解析したところ、従来知られていた最前部と前部へ向かう 2 つの枝に加え、中部に伸びる第三の枝が存在することが判明した。私は、最近提案された体系的な脳領域の名称に基づき、これらの 3 本の枝を前から AMS 枝 (最前部)、PMS 枝 (前部)、LS 枝 (中部) と命名した。*LB1* が標識する細胞は AMS と LS の枝に投射し、*LB2* は AMS・PMS・LS の 3 つの枝すべて、*LB3* は AMS と PMS、*LB4*~*6* は PMS の枝のみを標識していた。

次に、味覚神経の投射領域を精密に同定する目印となる構造を得るため、約 320 系統の LexA::VP16 エンハンサートラップ系統の中から上記の味覚一次中枢の 3 本枝構造を可視化するものを探索した。その結果、この条件を満たすものを 1 系統得た。この *NV4* と名付けられた系統は、*LB1*~*6* より特異性は低く、唇弁内の GRN の他に小髭鬚の嗅覚神経なども標識していたが、標識された嗅覚神経はすべて味覚一次中枢の脇を通過して嗅覚中枢に直接投射していることが確かめられた。そこで、この系統と、*LB1*~*6* 及び既知の味覚神経を標識する系統群を用いて二重染色を行うことで、AMS・PMS・LS のそれぞれの枝の中の投射位置を精密に解析した。

AMS 枝では、味覚神経と考えられる *LB2* と *LB3* の投射領域は *NV4* の投射領域と一致した一方、機械感覚神経を標識する *LB1* の投射領域は *NV4* のそれとは重なりがなく、より腹側で、外側と内側の両方に広がっていた。これに基づいて AMS 枝の投射領域を、*NV4* の投射領域である背側の AMS1、*LB1* の投射領域の外側・内側部分である AMS2、AMS3 の 3 領域に区分けした。AMS 枝に投射する既知の GRN としては 2 つの GAL4 エンハンサートラップ系統、*NP1017* と *E409* によって標識されるものがあり、炭酸水の受容に関与している。これらの系統の投射先は AMS1 と一致した。

PMS 枝では、*LB4* と *LB5* の投射先は *NV4* の投射領域のうち外側の部分に限局していた。*LB6* の投射領域はこれに加えて内側にも広がっていたが、内側部については *NV4* の投射領域の背側のみに限局していた。そして、*LB2*、*LB3* の投射は *NV4* の投射領域全体に広がっていた。これらの結果に基づき、PMS 枝の投射先を外側の PMS1、内側の背側の PMS2、内側の腹側の PMS3 の 3 領域に分けた。既知の味覚神経で PMS 枝に投射するものには、苦味を受容する神経で発現する *Gr32a*、*Gr47a*、*Gr66a* の各味覚受容体遺伝子で標識されるものがあるが、*Gr32a*、*66a* の投射先は PMS1~PMS3 の全体をカバーしていたのに対し *Gr47a* の投射先は PMS2、PMS3 のみであった。また、甘味を受容する神経を標識する *Gr5a* 遺伝子や、水の受容に関与する神経を可視化する *NP1017* も PMS 枝に投射するが、これらの投射領域は *NV4* で標識される領域とは重なりがなく、もっと腹側であった。この投射領域は外側の部分と内側の部分に広がっていたので、それぞれ PMS4、PMS5 と名付けた。

LS 枝では、*LB1* の投射先は *NV4* の投射領域とは重ならず、その前側かつ内側の領域になっていた。*NV4* の投射領域には腹側に飛び出した部分があり、*LB2* の投射領域は *NV4* の投射領域全体に広がって

いた。そこで LS 枝の投射先を、NV4 の投射領域の背側にあたる LS1、腹側の突起である LS2 と、LB1 のみが投射する LS3 の 3 領域に分けた。

私が見つけた 6 系統のうち、LB1 を除く 5 系統はすべて PMS1~PMS3 の領域への投射を持っていた。これらの投射を持つ神経が既知の神経と同じか否かを解析するため、PMS1~PMS3 に投射する既知の神経の中で最も多くの細胞を標識する *Gr66a* と二重染色を行った。その結果、唇弁の外側の面において、LB3、LB6 は *Gr66a* で標識される細胞を標識したのに対し、LB5 で標識された細胞は *Gr66a* で標識されないにもかかわらず、すべて *Gr66a* と重なる領域に投射していた。

さらに、感覚神経が一次中枢のどこに出力シナプスを作って二次神経への情報伝達を行っているかを調べるため、プレシナプスマーカーとしてシナプス小胞に局在する神経性シナプトブレビンと GFP の融合タンパクを発現させて解析したところ、下唇神経が 3 つに分岐して 3 つの枝へと向かう軸部分にはシナプスは観察されず、それぞれの枝の先のゾーンを定義した領域にのみシナプスが局在すること、それぞれのゾーン内ではすべての領域にシナプスがあることが確認された。

ハエは、唇弁の他に、口器内部の食道に面した部分と、足の先端の跗節にも GRN を持つ。前者の軸索は咽頭神経を経て食道下神経節まで伸び、後者はまず胸部神経節に投射して一部はさらに食道下神経節まで到達している。私は、これらの GRN の投射先が、上記の研究で明らかにした唇弁の GRN の投射先とどのような関係になっているかを調べるため、口器内部と足の GRN を標識することが既に報告されている *Gr2a*, *66a* と NV4 との二重染色を行った。その結果、口器内部の GRN は、これらに特有の 2 つのゾーン (VPS1, 2) と PMS1 に投射していること、および、跗節の GRN は頸を経て PMS 枝の後側に隣り合った領域 (aCCF-G1) に投射していることが判明した。

以上の結果に基づき、私は、食道下神経節内の味覚一次中枢を AMS3 つ、PMS5 つ、LS3 つの合計 11 個のゾーンに区画する投射地図を構築した。本研究で解析した神経細胞は、新たに同定した GAL4 系統で標識されるものと既知のものを併せて、唇弁の全ての味覚神経細胞の大変を占め、残りは約 5 個に過ぎず、さらに機械感覚神経をも含んでいる。また、この成果からは以下のことが判る。まず、唇弁での神経細胞の位置と投射領域の関係について、既に記載されていた唇弁の内側と外側からそれぞれ一次中枢の AMS と PMS の枝に伸びる神経に加えて、唇弁の内側から AMS、PMS、LS の 3 本の枝に投射するものがあると考えられる。次に、*Gr66a* 発現細胞が投射する、苦味の受容に関与すると考えられていた領域は PMS1~PMS3 の細かい領域に分けられ、別々の役割を持っている可能性があること、また *Gr66a* を発現しない神経も同じ領域に投射していて、異なる種類の味覚情報が一次中枢で統合されている可能性があることを示した。同様の統合の可能性は、甘味と水分受容についても示された。また、LB1 が標識する味覚感覚器の機械感覚神経は、他の系統が標識する味覚神経の投射先とは異なる場所に投射しており、味覚感覚器からの二種の情報は一次中枢への最初の投射の段階では統合されていないことを示唆した。さらに、唇弁、口器内部、跗節の異なる感覚器からの味覚投射について、口器内部からと唇弁からは一部重なり合う一方、跗節からと唇弁からは別の領域になっていることを明らかにした。

