

論文の内容の要旨

論文題目

Identification and functional analyses of interneurons in the neural network that regulates the peristaltic locomotion of *Drosophila* larvae

(ショウジョウバエ幼虫のぜん動運動を制御する神経回路内における
介在ニューロンの新規同定とその機能解析)

氏 名 板倉 由季

背景 神経系は、それを構成する個々の神経細胞（ニューロン）が適切に結合を作り、機能的なネットワークとして働くことで、個体の行動を生み出す。神経科学におけるここ数十年の研究は、個々のニューロンの性質や神経活動の様子、ニューロン間の結合部位であるシナプスの性質やそこで行われる情報伝達の仕組みについて、多くのことを明らかにしてきた。しかし、それらの知見と動物個体が示す行動との間にはまだ大きな隔りがあり、多くの場合、行動を中枢神経系の神経活動から説明することはできていない。これは、中枢神経系が膨大な数のニューロンからなり、それぞれのニューロンの神経突起が密に分布した非常に複雑な構造であるため、その中で個々のニューロンを区別して同定・機能解析をすることが困難なためである。しかし近年、こうした課題に対して有効な技術が急速に進歩してきた。人為的に神経活動を操作したり可視化するためのタンパク質ツールが開発され、さらにそれらを特定のニューロン群でのみ発現させる遺伝学的手法が発展したのである。個々のニューロンがどのように繋がって回路を形成し、その中で各々がどのような活動パターンを示すことで行動が生み出されるのか。神経科学におけるこの大きな未解決問題に対して、遺伝学的手法による回路レベルの研究は強力なアプローチとなっている。本研究では外来遺伝子発現システムが優れているショウジョウバエを実験動物とし、幼虫の前進

運動（ぜん動運動）を制御する神経回路をモデルとして、この回路が運動を生み出す動作原理の解明を目指した。この運動は中枢パターン発生器(CPG)と呼ばれる神経回路によって生み出される。CPGとは、動物の前進運動など、特定の動きを繰り返して作られる定型運動を制御する中枢回路で、外界からの信号や体の動きのフィードバックといった感覚入力が必要とせず、この回路自身によってリズム的な運動出力を生み出すことが知られている。この神経回路をモデルとしたのは以下の理由からである。第1に、CPGは昆虫からヒトを含む哺乳類まで多くの動物種で確認されており、異なる系や動物種の間で類似点が多いため、ショウジョウバエを用いた研究から種を超えた共通の原理を導くことができると期待されるためである。第2に、CPGが生み出す運動は反復的・定型的であり、実験や得られた結果の定量化に適しているためである。第3に、CPGは複数のニューロンが回路として機能してこそ実現される興味深い特徴をもつためである。CPGが生み出す運動は、動物の体の様々な部位の筋収縮・弛緩が複雑に組み合わせられて達成される。また、動物個体が置かれている状況によって運動出力が変化する。これらの性質がどのようにして生み出されるのかが明らかになれば、様々な神経回路の動作原理解明につながるだろう。ぜん動運動は、体の尾端から頭端へと各体節の体壁筋が順番に収縮することで体を前進させる運動である。ショウジョウバエ幼虫の中枢神経系は脳と腹部神経節（以下「神経節」）から成り、各体節を支配する運動ニューロンの細胞体は神経節内の地理的に対応する領域、各神経分節に位置する。よってぜん動運動の際の運動ニューロンの活動を可視化すると、神経節内を尾端から頭端へと伝播する波状の活動パターンが観察される。しかしこの波状の活動パターンがどのように生成されるのか、そもそもどのような介在ニューロンが回路を構成するのか、ほとんど分かっていない。

結果と考察 本研究ではこの回路内の介在ニューロンの新規同定と機能解明を目的とした。まず運動ニューロンに対して入力を行う介在ニューロンはこの回路に含まれる可能性が高いと考え、特定のニューロンと運動ニューロンとの間のシナプスを可視化しその有無を指標とする、蛍光タンパク質 GFP 再構成法 (GRASP 法) を用いたスクリーニングを行った。具体的には、様々なサブセットのニューロンで遺伝子発現を誘導するショウジョウバエ系統を用い、それらニューロンと運動ニューロンに、相補的な GFP 断片、GFP1-10、GFP11 をそれぞれ発現させた。両ニューロンがシナプスを形成するほど近接していれば、その部位で GFP が再構成されて蛍光シグナル (GRASP シグナル) を得られることが予想される。こうして 10 系統のスクリーニングを行った結果、神経節において GRASP シグナルを示す Gal4 系統 *RRC-Gal4* を同定した。神経節内で *RRC-Gal4* は比較的少数のニューロン (以下 RRC ニューロン) において遺伝子発現を誘導することがわかり、その中に運動ニューロンとの間にシナプスを形成しているニューロンが含まれると考えられた。

次に、RRC ニューロン特異的に神経活動を抑制または亢進し、ぜん動運動に影響が現れるかを調

べた。結果、抑制するとぜん動運動の伝播が遅くなり、逆に亢進するとぜん動運動がほとんど起こらず、前進できなくなるという結果を得た。これは **RRC** ニューロンがぜん動運動に関与するニューロンを含むことを示唆する。

RRC ニューロンのうち、複数の神経分節に一对ずつ存在する介在ニューロン 2 種類 (**R1s**, **R2s** とする) は、活動パターンからぜん動運動を制御する神経回路内に含まれていることが明らかになったため、以下それぞれの結果について個別に記述する。

R1s の細胞体は神経節内の腹外側に位置し、神経突起を、1～2つ前方の神経分節と、同じ神経節内の背側領域の 2 カ所に伸ばす。**GRASP** 法の結果を照らし合わせると、この後者の領域において **GRASP** シグナルが確認され、さらに同じ領域でグルタミン酸作動性のシナプス前構造に局在するマーカーが確認された。先行研究によると、運動ニューロンはグルタミン酸を受容するとその活動が抑制される。よって **R1s** はこの部位において運動ニューロンとシナプスを作っており、抑制性の入力を行うことが示唆された。次にカルシウムイメージング法を用い、**R1s** と運動ニューロンの活動を同時に、かつそれぞれを区別できるように可視化した。結果、**R1s** は運動ニューロンの波状の活動に少し遅れて波状の活動パターンを示すことが明らかになった。つまり各神経分節の **R1s** はぜん動運動の際に、運動ニューロンの活動に少し遅れて運動ニューロンへの抑制性入力を行うと考えられる。また、**R1s** が前方の神経分節へと伸ばした突起上にはシナプス前構造マーカーが見られないため、これらの突起は情報を受け取る部位であると考えられる。したがって、**R1s** はぜん動運動の際、あとに活動する前側の神経分節での活動情報を受け、すでに活動している神経分節の運動ニューロンの活動を抑える、神経分節間の協調を助ける役割を果たす可能性がある。

R2s の細胞体は **R1s** と比べてより腹内側に存在する。神経突起は二つに分かれ、一方は外側から、もう一方は正中線近くからそれぞれ同神経節内を背側へと伸び、背内側で合流し、神経終末を同側・反対側の両方に分布する。この領域でも **GRASP** シグナル、グルタミン酸作動性シナプス前構造マーカーの局在が確認された。よって **R2s** も運動ニューロンに対し抑制性入力を行うと考えられる。**R2s** の活動は **R1s** や運動ニューロンの波状の活動とは異なり、複数の神経節内の **R2s** が同時に活動することがわかった。活動のタイミングは運動ニューロンの波状の活動が始まるタイミングと近い。これらのことから、**R2s** は分節間の協調、さらにはぜん動運動の開始に関わる可能性がある。

結論 本研究ではショウジョウバエ幼虫のぜん動運動回路に関わる二種類の介在ニューロン、**R1s** と **R2s** を同定した。これらは運動ニューロンに対し抑制性入力を行う可能性が高い。**R1s** は運動ニューロンの活動にやや遅れて尾端から頭端へと伝播する活動パターンを、**R2s** は運動ニューロンの活動の前に複数の分節で同時に活動するパターンを示した。

運動ニューロンは複数の介在ニューロンからの入力を統合し最終的な運動出力を生み出す。それ

ゆえ、運動ニューロンへと入力を行うニューロンの同定、そしてその活動パターンの記述は、運動パターン生成機構を介在ニューロンの活動から説明するために必要不可欠である。本研究ではこのようなニューロンの候補と言える二種類のニューロンを同定し、各々の特徴的な活動パターンについて記述することに成功した。

また、筋収縮とそれに対応する運動ニューロンの活動パターンとは異なるタイミングで固有の活動パターンを呈する介在ニューロンをこの系において初めて見出した。先行研究より、一回のぜん動運動を一周期とすると、伝播速度によらず各体節は適切な位相差を保って活動する。また各周期は重ならない。このようなぜん動運動を実現するためには、介在ニューロン群は、一過的な運動ニューロンの活動を順番に引き起こすだけでなく、周期内のそれ以外の時間は運動ニューロンの活動を抑制するなどして体全体の協調を生む必要がある。一周期の中で運動ニューロンとは異なるタイミングで活動する介在ニューロンを同定した本研究は、中枢神経系において運動のパターンが生み出される機構を明らかにしていく上で重要な知見を与えるものと言えるだろう。