

"ものを見分ける"ために必要な遺伝的プログラムとは？

中越 英樹

■ 研究のねらい

我々は、視覚による認識、つまり"ものを見分ける"ということ通常特に意識することなく行っている。しかしながら、外部環境を瞬時に正確に認識できるというこの能力は、膨大な数の神経細胞によって構成される神経ネットワークが正確に機能した結果であるといえる。このような視覚認識の能力は、どのような遺伝的プログラムによって獲得され、また神経活動に依存してどのような修飾を受けるのであろうか？

本研究では、優れた遺伝学的解析システムが確立されているショウジョウバエ (*Drosophila*) を用い、視覚認識行動に異常をきたした突然変異体を単離し、その原因遺伝子を同定、解析することによって、視覚認識という脳の高次機能を分子レベルで解析するための手がかりとなることを目指した。

■ 研究成果

1. 視覚認識行動に異常を示す突然変異体の単離

ショウジョウバエの染色体ゲノム上の1箇所挿入突然変異を持つような独立の500系統の中から、視覚認識行動に異常を示す突然変異体を探した。これらの挿入突然変異系統は、転移因子(P因子)の転移によって単一遺伝子に変異が誘導されており、P因子内に存在する標識遺伝子 (*lacZ*) の発現は挿入突然変異を受けた遺伝子の発現を反映する(エンハンサー・トラップ系統)。

視覚認識に基づく行動を、簡便かつ高感度に検出するために、二者択一の迷路法(H-maze assay)を独自に開発した(図1)。この方法を用いて、挿入突然変異系統のなかから、ストライプパターンに対する指向性が有意に低下した突然変異体 *dve^{SH255}* を同定した。原因遺伝子の発現を反映する標識遺伝子の発現は、成虫脳の視覚中枢および視覚系の介在神経に認められた(図2 B, C)。

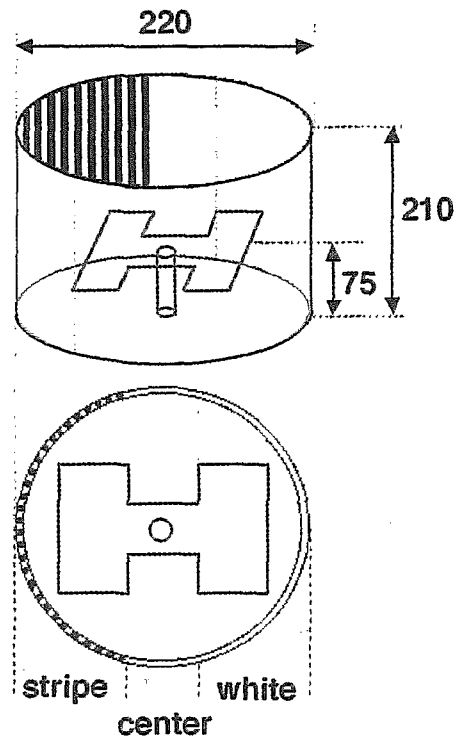


図1. 視覚認識行動のアッセイ

H型のアクリル板にチューブを連結した迷路装置(H-maze)のチューブの底に羽を切ったハエを入れると、壁をよじ登り、H型迷路の上に出てきた後、まわりの円形アリーナ(直径220 mm)に提示されたパターンをもとにH型迷路の上を自由に移動できる。1分後にハエがH型迷路上のどちらの区画にいるかをカウントすることにより、提示したパターンに対する指向性を数値化した。野生型のハエは、約90%がストライプパターンの方に集まる。

$$\text{Stripe/White (SW) index} = \frac{\text{stripe}(\%) - \text{white}(\%)}{\text{stripe}(\%) + \text{white}(\%)} = \frac{90 - 10}{90 + 10} = 0.8$$

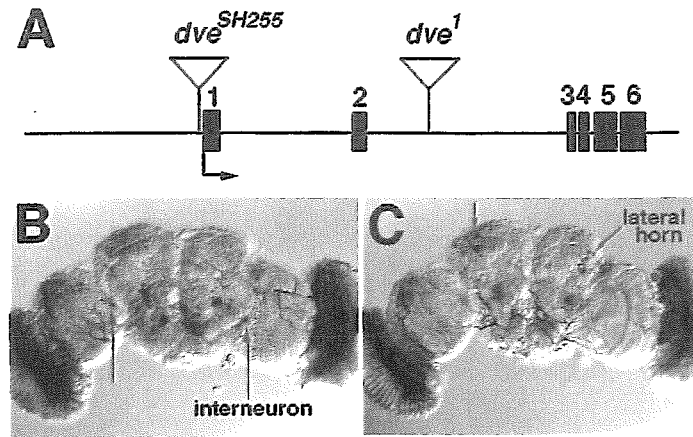


図2. *dve* 遺伝子のゲノム構造および *dve*^{SH255} 系統の *lacZ* 発現パターン
dve 遺伝子は6個のエクソン(黒四角)から成り、*dve*^{SH255} 系統は転写開始点のすぐ上流にP因子の挿入突然変異を持つ(A)。視覚認識行動に異常を示す *dve*^{SH255} 系統の標識遺伝子(*lacZ*)の発現パターン(B: 正面像, C: 背面像)。視葉と中心脳を結ぶ介在神経(interneuron)および高次視覚中枢として知られる lateral horn における発現を赤矢印で示す。

2. 視覚認識行動異常の原因遺伝子 *dve* の同定

視覚認識行動の突然変異体 *dve*^{SH255} においてP因子が挿入された部位の近傍ゲノムDNA断片をもとに、成虫頭部cDNAライブラリーを用いて、原因遺伝子のスクリーニングを行った。その結果、P因子挿入部位から167 bp離れたところに、遺伝子の転写開始点を持つ全長4.9 kbの転写産物が存在することが明らかとなった。この遺伝子の発現がほぼ完全に消失した突然変異体 *dve*¹ は、消化管の形成異常によって致死となることから、この遺伝子を *defective proventriculus (dve)* と命名した。*dve* 遺伝子産物(Dve)は1019アミノ酸から成り、ホメオドメインを有し、核に存在することから、遺伝子の発現制御に関わる転写制御因子であると考えられる。現在、*dve*^{SH255} 突然変異体と野生型の成虫脳において、*dve* 遺伝子の発現量には顕著な差が検出できていないが、P因子挿入によって引き起こされた微妙な発現バランスの変化、あるいはある特定の細胞群における発現低下が視覚認識行動の異常として現れている可能性が考えられる。

3. 初期発生過程における *dve* 遺伝子の機能解析

dve 遺伝子の発現は、胚発生過程の神経系および消化管において観察された。*dve* 遺伝子の発現がほぼ完全に消失した突然変異体 *dve*¹ においては、消化管の形態異常によって幼虫期に致死となるが、神経系の形態には異常が認められなかった。消化管における発現は、形態形成因子として知られる Decapentaplegic (Dpp), Wingless (Wg) (それぞれ TGF- β , Wnt スーパーファミリーに属する分泌性タンパク) によって制御されていた。また、中腸細胞においては、細胞の機能的な特異性を規定していることが明らかとなった。消化管において観察された形態異常は、機能的な異常に由来するものであると考えられるため、*dve* 遺伝子の機能は、細胞に機能的な特異性を与えることであるのかもしれない。*dve*¹ 突然変異体において胚神経系の形態に異常が認められなかった原因は、*dve* 遺伝子が神経ネットワークの形成ではなく、その機能特性を制御しているためであると解釈することができる。

4. *dve* 遺伝子の発現制御領域によって標識される脳内の神経ネットワーク

視覚認識行動の突然変異体 *dve*^{SH255} においては、転写開始点のすぐ上流に P 因子が挿入されていた。つまり、突然変異体においては、遺伝子上流に存在する発現制御領域に依存した *dve* 遺伝子の発現に変化をきたしていることが予想される。そこで、*dve* 遺伝子上流発現制御領域によって発現が支配される神経細胞群を遺伝的に標識することを試みた。まず、*dve* 遺伝子上流 13 kb の DNA 断片の制御下に転写因子 GAL4 を発現するトランスジェニック系統 (*dve* 13 kb-GAL4) を樹立した (図 3)。これらの系統は、*Dve* 発現細胞の一部を標識していると考えられる (*Dve* 標識細胞)。標識細胞において発現する GAL4 は UAS 配列に結合するため、UAS の制御下に任意の遺伝子 (X) を発現するトランスジェニック系統 (UAS-X) と交配することにより、*Dve* 標識細胞に任意の遺伝子 (X) を発現させることができる (GAL4/UAS システム)。遺伝子 X として微小管結合タンパク Tau を用いると、標識された神経細胞の軸索投射パターンを詳細に追跡することが可能である。

dve 13 kb-GAL4 系統 (43B1) と UAS-tau 系統 (24-7) を交配し、成虫脳における *Dve* 標識細胞の軸索投射パターンを観察した (図 4)。視覚情報処理を行う視葉 (optic lobe; OL) と中心脳 (central brain; CB) を結ぶ介在神経の分岐パターン、および高次視覚中枢として知られる ventro-lateral protocerebrum (v-l pr), lateral horn (l ho)、連合野として知られる superior protocerebrum (s pr) に分岐を持つ軸索投射パターンが観察された。

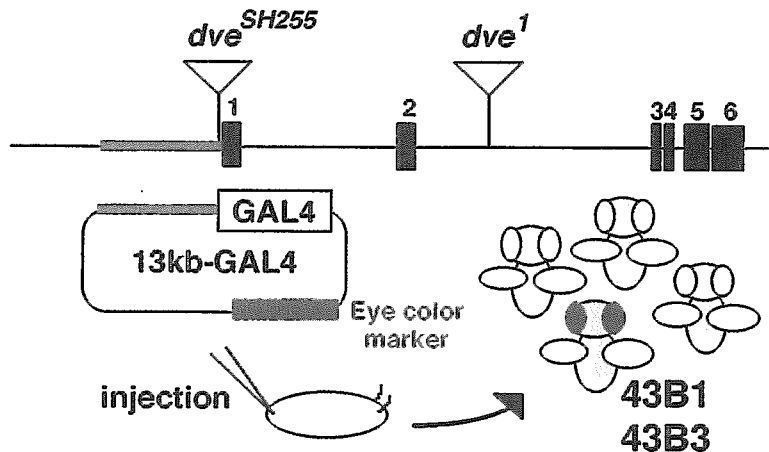


図 3. *dve* 遺伝子上流発現制御領域によって発現が支配される神経細胞群の遺伝的標識

dve 遺伝子上流 13 kb の DNA 断片 (青線) の制御下に転写因子 GAL4 を発現できるプラスミドを構築し、受精卵へのインジェクションにより形質転換個体を樹立した。このトランスジェニック系統 (*dve* 13kb-GAL4) は、*dve* 遺伝子を発現する細胞群の一部で GAL4 を発現することにより、同じ細胞群を再現性良く標識できるとともに、標識細胞に任意の遺伝子発現を誘導できる。

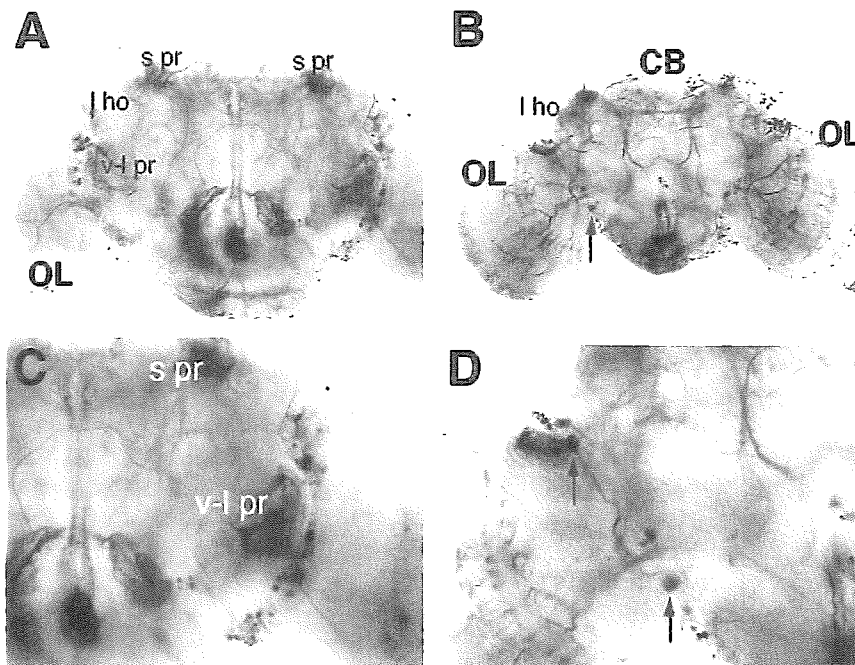


図 4. Dve 標識細胞の軸索投射パターン

43B1 系統と UAS-tau 系統を交配し、成虫脳を Tau 抗体で染色した (茶色). A, C: 正面像. B, D: 背面像. 視葉 (OL) と中心脳 (CB) を結ぶ介在神経の細胞体を赤矢印で示す.

5. Dve 標識細胞が構成する神経ネットワークの機能解析

Dve 標識細胞の構成する神経ネットワークは視葉、高次視覚中枢、連合野に分岐を持っていることから、視覚認識能の獲得に関与していることが予想される. そこで、Dve 標識細胞に、テタヌス毒素 (tetanus toxin; TNT) を発現させることによって、その神経活動を特異的に阻害した条件下で視覚認識行動を調べた. 対照実験としては、アミノ酸置換によって不活性型となった毒素 (TNT-VA) を同様に発現させた場合の行動を調べた.

また、43B1 系統よりも強い発現を示す系統として、独立に樹立された 43B3 系統、43B1 系統の再転移によって得られた 43B1-27A, 43B1-30A, 43B1-35A, 43B1-39A 系統を用いて同様の実験を行った. いくつかの系統においては、致死あるいは運動障害をきたしてしましたが、43B1-27A, 43B1-35A 系統では明らかな視覚認識行動の異常が観察された (図 5). この結果は、Dve 標識細胞群の構成する神経ネットワークの機能が視覚認識能に必須であることを示している.

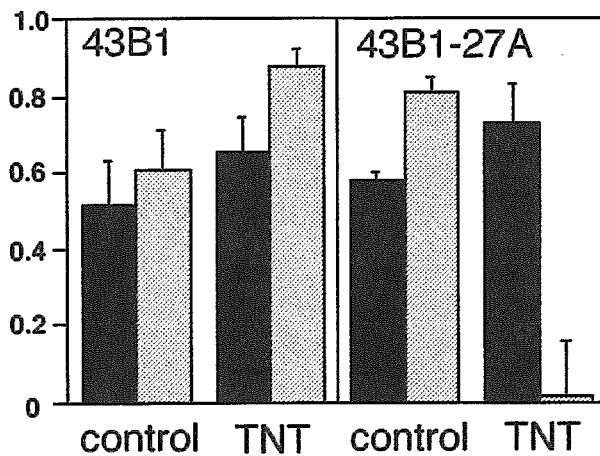


図5. Dve 標識細胞の機能阻害

Dve 標識細胞にテタヌス毒素 (TNT) を発現させ、その神経活動を阻害した条件下で、視覚認識行動を調べた。

■ : Black /White index
 ▨ : Stripe /White index (対象物認知)

43B1-27A 系統によって標識される Dve 標識細胞の機能は、対象物認知に基づく視覚認識行動に必須である。

■ 今後の展開

視覚認識行動に異常を示す突然変異体の解析から、*dve* 遺伝子を同定することに成功した。*dve* 遺伝子が細胞の機能的な特異性を制御していることは、中腸細胞において明確に証明できた。対象物認知に必須な Dve 標識細胞においては、視覚認識に関わる機能特性を制御していると考えられるが、現時点では間接的な証明でしかない。今後は、神経細胞における機能をより直接的に証明するとともに、いかなる分子メカニズムを介して細胞に機能的な特異性を与えているのかを明らかにしていきたい。また、テタヌス毒素発現系を用いて、視覚認識に関わる神経ネットワークを系統的かつ網羅的に同定し、そこで機能している分子を明らかにしていくことによって、脳の高次機能発現のメカニズムを分子レベルで解析していくことが可能になるものと思われる。

■ 成果リスト

原著論文

- Nakagoshi H., Hoshi M., Nabeshima Y-i., Matsuzaki F. (1998) A novel homeobox gene mediates the Dpp signal to establish functional specificity within target cells. *Genes Dev.* 12: 2724-2734.

口頭発表

- 中越英樹、星美奈子、鍋島陽一、松崎文雄
視覚認識行動に関与する新規遺伝子のクローニング
(日本神経科学大会第 19 回大会、1996 年 7 月、神戸)
- 中越英樹、鍋島陽一、松崎文雄
視覚認識行動に関与する SH255 遺伝子の機能解析
(日本分子生物学会第 19 回年会、1996 年 8 月、札幌)

- Nakagoshi, H., Hoshi, M., Nabeshima, Y-i., Matsuzaki, F.
defective proventriculus encodes a homeodomain protein required for midgut development.
(38th Annual Drosophila Research Conference, Chicago, USA, April, 1997)
- 中越英樹、鍋島陽一、松崎文雄
Dpp, Wg の標的遺伝子 *dve* による midgut の cell-type specification
(日本ショウジョウバエ研究会第3回集会、1997年8月、福岡)
- 高松芳樹、中越英樹、西田育功、山内卓、大迫俊二
ショウジョウバエ CaM キナーゼ II 遺伝子の転写制御解析
(日本ショウジョウバエ研究会第3回集会、1997年8月、福岡)
- Takamatsu, Y., Nakagoshi, H., Nishida, Y., Yamauchi, T., Ohsako, S.
Transcriptional regulation of the Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II gene
in *Drosophila*.
(Kinases and Phosphatases in Lymphocyte and Neuronal Signaling, Tokyo, Japan, October,
1997)
- 中越英樹、鍋島陽一、松崎文雄
Dpp, Wg の標的遺伝子 *dve* による中腸の細胞型特異性の決定機構
(日本分子生物学会第20回年会、1997年12月、京都)
- 高松芳樹、中越英樹、西田育功、山内卓、大迫俊二
ショウジョウバエ CaM キナーゼ II 遺伝子の転写制御解析
(日本分子生物学会第20回年会、1997年12月、京都)
- 中越英樹、鍋島陽一、松崎文雄
dve 遺伝子によるモルフォゲン濃度勾配の確立
(日本分子生物学会第21回年会、1998年12月、横浜)
- 高松芳樹、中越英樹、西田育功、山内卓、大迫俊二
ショウジョウバエ CaM キナーゼ II 遺伝子の神経系での
発現パターンに必要なパリンドローム配列
(日本分子生物学会第21回年会、1998年12月、横浜)

その他

- Takamatsu Y., Nakagoshi H., Nishida Y., Yamauchi T., Osako S. (1997) Transcriptional regulation of the Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II gene in *Drosophila*. **Kinases and Phosphatases in Lymphocyte and Neuronal Signaling** (edited by H. Yakura) pp. 297-298. Springer-Verlag.