

ショウジョウバエ脳の可塑的神経活動に伴って発現量が変化する遺伝子の系統的探索

●伊藤啓^{1,2)}

1) 岡崎国立共同研究機構基礎生物学研究所（当時） 2) 東京大学分子細胞生物学研究所（現在）

＜研究の目的と進め方＞

長期記憶に伴う神経細胞の可塑的变化では、CREB遺伝子群を介した一連の新たな遺伝子の発現活性化が必須であるとされている。このような変化を示す遺伝子を探索するため、ディファレンシャル・ディスプレイやマイクロアレイを用いた解析が世界各地で盛んに行なわれてきた。しかし特定のパラダイムの学習・記憶においては、ある領域の脳細胞全体が一様に反応するのではなく、少数の細胞のみが特異的に反応している可能性も少なくない。このような場合、組織全体をすりつぶしてmRNAを精製する方法では、少数の細胞における顕著な変化も他の細胞と平均化され、全体としては統計誤差の範囲内の僅かな差として見過ごされる危険がある。本研究では、脳が小さくホルマウントで容易に染色・検鏡が行なえるショウジョウバエ脳の利点を活かし、大規模にin situ染色を行なって個々の細胞レベルで発現量を解析することにより、一部の細胞のみで発現変化を起こすような遺伝子を効率的に捉えることを目的とした。

しかし細胞体しか染まらないin situ染色では、その細胞の投射パターンを直接解析できない。我々は本研究と並行して、ショウジョウバエの脳神経回路構造を脳全域にわたって解析する世界で唯一の作業を、4500のGAL4エンハンサートラップシステムを用いて行なってきた。適当なGAL4システムを画像データベースから検索して二重染色で比較対照することで、in situ染色で検出された細胞が作る神経回路を同定できる。このシステムを活用して、まず伝達物質／受容体のマップを作製することを目標とした。この種の研究は従来、伝達物質産生酵素や受容体タンパクに対する抗体を使って行なわれていたが、良い抗体が存在する伝達物質／受容体はごく僅かなうえ、生物種が異なると使えないことも多く、研究は断片的なものに留まっていた。本研究では全ゲノム塩基配列情報を利用することで、生物種を問わず既知の伝達物質／受容体に対してホモログを検索して染色する。このデータは、GAL4システムで同定した細胞の形態的情報にさらに機能的情報を付加し、可塑的神経活動の基盤となる神経回路網に関する理解を前進させることが期待できる。

＜研究開始時の研究計画＞

この目的を実現するため、以下の4つのステップに分けて、研究を進めることとした。

A：マイクロアレイ解析やゲノム配列データのホモロジーサーチなどで得られる多数の候補遺伝子について脳での発現量変化を個々の細胞レベルで迅速に調べるのに使えるような、多標本・多プローブの効率的なin situ RNAハイブリダイゼーション染色によるスクリーニング法を確立する。

B：2000年春に公開された全ゲノム塩基配列のデータベースから、他の生物も含め既知の神経伝達物質（トランスマITTER）と受容体（レセプター）に関連する遺伝子のホモログを検索して、網羅的にin situ染色を行なう。

C：4500のGAL4エンハンサートラップシステムの中から、特

異的神経回路をラベルする系統を選び出し、クラゲ緑色蛍光タンパクGFPを発現させて神経線維全体をラベルする。これと上記in situ染色を組みあわせて行うことにより、各神経回路で使用されている伝達物質／受容体のマップを作製する。

D：上記遺伝子を含め神経可塑性への関与が考えられる候補数百～千遺伝子について学習前後の個体の脳標本で比較スクリーニングを行ない、可塑的神経活動に伴う発現変化を示す遺伝子を探索する。

＜研究期間の成果＞

ショウジョウバエの成虫脳において、ホルマウントの状態安定してin situ染色を行う方法は確立していなかった。そこでまず、比較的容易に安定した結果が得られるBCIP/NBT法を用いて、染色プロトコルを確立した。これと並行して、in situ染色を行う候補遺伝子として、伝達物質産生酵素と受容体の遺伝子が最も網羅的に同定されており、神経系の機能に重要な役割を果たすものとして、抑制性伝達物質GABAを対象を絞り、GABA産生酵素と、代謝型とイオン型のさまざまなGABA受容体の遺伝子を全ゲノム塩基配列のデータベースから同定した。これら遺伝子のESTクローンを用いてプローブを作成し、上記プロトコルに従って染色を行った。

この結果、GABA産生酵素を発現する細胞は比較的少ないのに対し、GABA受容体はどれも脳の非常に広範な細胞で発現していることがまず分かった。また、GABA受容体の発現パターンはどれも似ており、大きな差は見られなかった。これは、代謝型とイオン型のチャンネルは別々の細胞群でなく、概ね同一の細胞群に共存していることを示唆している。

産生酵素と受容体がそれぞれどのような細胞種で発現しているかをさらに厳密に調べるため、モデル神経回路系として、嗅覚の一次中枢である触角葉に着目した。触角葉は匂いの弁別に重要な役割を果たす神経回路で、多数の糸球体構造に分かれている。嗅覚系では、ひとつの匂い情報に関連する糸球体が活動すると他の糸球体の活動が抑制される側抑制や、糸球体から嗅覚二次中枢に延びる投射神経の活動が時間的に周期変動する振動現象が知られており、これらには抑制性伝達物質の機能が不可欠である。また触角葉は、触角葉内の異なる糸球体を結ぶ局所神経LNと、iACT, mACT, oACTと呼ばれる3つの経路で嗅覚二次中枢に延びる投射神経から構成される、比較的シンプルな構造を持つ。そのため、それぞれの神経種においてGABAの産生酵素と受容体がどのように発現しているかを網羅的に解析することが容易である。

触角葉の神経のうち、投射神経についてはすでに当研究室でこれらを特異的にラベルするGAL4エンハンサートラップシステムが同定されていたが、局所神経については、そのような系統が見つかっていなかった。そこで大規模なスクリーニングを行い、糸球体の中心部のみに投射するタイプと、周縁部にまで投射するタイプの、2種の局所神経を発見し、それらを別々にラベルする独立の系統を

同定した。

BCIP/NBT法のような明視野検鏡による観察では、ラベルされた細胞が密集していると奥の方にある細胞が手前の細胞に覆い隠されてしまい、鮮明な像を得ることができない。そのため、GAL4エンハンサートラップ系統でラベルされた細胞のうちの何個がGABAの産生酵素や受容体を発現しているかを、厳密に数えることは不可能である。そこで精密な二重染色に適した、蛍光色素を用いたin situ 染色のプロトコルを新たに確立した。(in situ 染色の過程でGAL4発現細胞のラベルに用いたGFPの蛍光は失われてしまうので、抗GFP抗体を用いて再度染め直すことで二重染色を可能にした。)

2種の局所神経と3種の投射神経をラベルする5つのGAL4エンハンサートラップ系統と、GABA産生酵素と3種の代謝型受容体、2種のイオン型受容体の6つのin situ プローブを用いて、すべての組み合わせについて二重染色を行った。この結果、(1) GABA産生酵素は2種類の局所神経のほぼ全てと、mACT投射神経のほぼ全てで発現しており、iACTとoACT投射神経では発現していない。(2) 5種類のGABA受容体はどれも、2種類の局所神経と3種類の投射神経のほぼ全ての細胞で発現している。という結果が得られた。

さらに、GABAの信号が出力される部位を厳密に調べるため、GFPのかわりにシナプス小胞に特異的にドッキングするシナプトブレブリン-GFP融合タンパクを発現させて、出力シナプスの分布を調べた。その結果、3種の投射神経のうち、iACTとoACT投射神経は投射標的だけでなく触角葉にも出力シナプスを持つのに対し、mACT投射神経だけは、触角葉には出力シナプスを持たないことが分かった。

以上を組み合わせて考えると、mACT投射神経はGABAを産生するが、触角葉には出力シナプスがないので、触角葉における抑制性信号は局所神経のみから出力されていることが分かった。また、この抑制性信号は全てのタイプの局所神経、投射神経によって受容される可能性が高いことが分かった。

この研究の基盤となったGAL4エンハンサートラップコレクションとそのデータベースについては文献1で、in situ 染色などの技術的側面については文献2で発表した。同定された触角葉嗅覚神経の構造については、一部の成果を文献3で発表した。触角葉内の詳細な解析についてはその後の知見も加え、現在論文の完成を進めている。

＜達成できなかったこと、予想外の困難、その理由＞

本研究を実際に遂行して明らかになった困難はふたつあった。ひとつは、網羅的な解析のスループットと品質のトレードオフの問題、もうひとつは、発現を評価する際の定量性の確保の問題である。

当初の計画では、数百～数千の遺伝子についてin situ 染色を実施して、脳における発現データベースの作成を目標としていた。プローブは数千のESTクローンのコレクションが利用可能であったし、BCIP/NBT染色法で大量の標本を作成し、写真撮影することも、不可能ではなかった。従って、単に多くのプローブについてその発現パターンの概略を記録するだけなら、人手と時間をかければ十分に実現可能であった。

しかし、実際にBCIP/NBT染色法でGABA関連以外も含む数十の遺伝子についてパイロット実験的に標本を作成したところ、ほとんどの遺伝子において、ラベルされる細胞は脳の中で局在することなく全体に広く散在し、これらの標本から脳のどの神経細胞群が当該遺伝子を発

現しているかを推定することは、ほとんど不可能であった。より有効なデータを得るためには、ラベルされた細胞の3次元的な分布を精密に記録できる蛍光in situ 染色と共焦点顕微鏡撮影の組み合わせが有効であったが、これだと標本作製や顕微鏡撮影に高度な技術と長い作業時間が要求され、アルバイト職員には荷が重すぎた。本研究室ではGAL4エンハンサートラップ系統の脳での発現パターンの画像データベース化を、アルバイト職員だけに頼ってすでに完成させていたが、固定・染色の不要なGFPによる観察と、蛍光in situ 染色による観察との技術的困難の差は、予想以上であった。結局、アルバイト職員で十分なスループットが期待できる技法では利用価値の低いデータしか得られず、有効なデータを得るには十分なスループットが期待できないというトレードオフを迫られた。

第二の点は、ある遺伝子を「発現する細胞」と「発現しない細胞」の差が、予想以上に連続的であったことに起因する。BCIP/NBTのような染色法では、発現の強い細胞は非常に強く染色され、弱い細胞はほとんど染色されないため、定量性はほとんどないが、一見すると非常に特異的なラベルが得られる。しかし同じプローブを用いて、発現量とラベルの関係がよりリニアな蛍光染色を行うと、実際には様々なレベルのシグナルが観察され、どこまでがバックグラウンドで、どこからがラベルであるかを区切るのが非常に難しいケースが見られた。しかも、染色や撮影の条件を揃えても、検出された蛍光ラベル量の絶対値にはばらつきが生じ、可塑的神経活動に伴う発現量の微妙な変化を定量的に評価するには、繰り返し精度が足りなかった。可塑的神経活動に関する世界の他の研究室の動向を見ても、発現量の変化に着目した研究はあまり成功しておらず、今後も大きな困難が予想されたため、特定の神経の機能を選択的に阻害して可塑的脳機能への影響を解析するアプローチへと研究の重点を移した。

＜国内外での成果の位置づけ＞

本研究で確立されたホールマウント脳標本の安定したin situ 染色技法は、すでに世界中で広く使われている。また、上記のような技術的問題をまとめた文献(2)は、分子生物学的手法を使って脳標本の染色を評価する際に注意すべき点を示す、他に類のない貴重な報告としての評価を得ている。

＜今後の課題＞

ゲノムプロジェクトで同定された遺伝子の脳における発現パターンをマップするという作業は、国内外の関心も高く、もし実現できればそのインパクトは大きい。しかし本研究の結果、これを実現するには、ポストドクか少なくとも修士卒以上のレベルの技術職員を、数年間この作業に専従させることが不可欠だと分かった。だがこのようなプロジェクトは、それ自体では論文につながるような何らの直接的成果も生み出さない。短期的な業績評価を迫られ、作業に従事するポストドクや技術職員のその後のキャリア形成にも発表論文の有無が大きな尺度とされている現在の科学環境において、このようなプロジェクトを実際に行うのは非常に困難である。このようなプロジェクト、およびそれに携わる人たちの業績をどのように評価してゆくのかが、今後の課題であろう。

＜研究期間の全成果公表リスト＞

1. Hayashi, S., Ito, K., Sado, Y., Taniguchi, M., Akimoto, A.,

- Takeuchi, H., Aigaki, T., Matsuzaki, F., Nakagoshi, H., Tanimura, T. et al. GETDB, a database compiling expression patterns and molecular locations of a collection of Gal4 enhancer traps. *Genesis* 34, 58-61 (2002).
2. Ito, K., Okada, R., Tanaka, N. K. and Awasaki, T. Cautionary observations on preparing and interpreting brain images using molecular biology-based staining techniques. *Microsc Res Tech* 62, 170-186 (2003).
3. Tanaka, N. K., Awasaki, T., Shimada, T. and Ito, K. Integration of chemosensory pathways in the *Drosophila* second-order olfactory centers. *Current Biology* 14, 449-457 (2004).