

課題名 ショウジョウバエ脳神経回路の徹底解析にもとづく感覚情報処理モデルの構築

代表研究者 東京大学分子細胞生物学研究所 助教授 伊藤 啓

1. 代表研究者による成果概要報告

1-1. 研究開発のねらい

脳研究においては、ボトムアップ型とトップダウン型という2つのアプローチがよく提唱される。神経解剖学や神経生理学によって単一細胞レベルから神経回路の構造と機能を調べてゆくボトムアップ的手法に対し、神経回路の実体をいったん離れ、回路が持つべき構造や果たすべき機能をコンピューターシミュレーションなどによって情報科学的に推理するのが、トップダウン的手法である。脳研究の進展にともなって両手法は徐々に融合することが期待されてきた。しかし両手法が本格的に始まってすでに数十年、融合の兆しはなかなか見えない。

このような乖離の原因の一つは、ボトムアップ型手法で現在利用可能な技術や獲得された知識と、トップダウン型手法で関心が持たれている研究対象とに、差がありすぎる点にある。現在の生物学では、技術的限界から複雑な脳の神経回路をすべて明らかにすることはできない。解析が進んでいるのは、小脳や海馬、視覚野など明解な繰り返し構造を持つ領域だけであり、より複雑な、一見無秩序に見えるほど線維が絡み合った脳領域の回路構造は、ほとんど分かっていない。また、回路の動作原理を理解するためには入出力信号の性質に関する知識が本来は欠かせない。しかし離れた脳領域間を結ぶ長い投射線維の形態を克明に調べることは非常に難しく、ある脳領域に他のどの脳領域からどういう情報が入力され、出力が他のどこでどう処理されるのかを正確に知ることは、現状では事実上ほとんど不可能である。

このように脳回路に関するボトムアップ型研究の成果は未だに極めて断片的で、一部の脳領域のみに偏っているにもかかわらず、トップダウン型研究では認知・学習など、多数の脳領域の複雑な協調処理が不可欠な極めて高度な脳機能の解析に、むしろ大きな関心が持たれている。情報科学的解析のベースになる十分な回路情報をボトムアップ型研究が提供できないため、トップダウン型研究は、仮定を重ねた高度にモデル的なものにならざるを得ない。

結果として、両手法の研究者の相互の連携自体が、現状では円滑とはいいがたい。生物科学者は、神経回路や神経機能のデータをトップダウン型研究に利用しやすい形で提供する努力を十分行なっているとは言えず、情報科学者は、ボトムアップ型研究の最新の研究成果を積極的に取り入れて脳回路シミュレーションに反映させる努力を十分行なっているとはいえない。

そこで本研究では、ボトムアップ型アプローチとトップダウン型アプローチを強力に連携させるため、以下の基本方針にもとづくプロジェクトを計画した。

- 1: 現在の生物学の技術では複雑膨大な高等生物の脳全体を体系的に解析できない以上、発想を変えて、現状でも脳全体を解析できる程度にシンプルな脳システムを対象に用いる。
- 2: 従来のように神経細胞を解剖学的、生理学的に解析するだけでなく、細胞体の位置、線維の投射パターン、伝達物質と受容体、発現している主な遺伝子、他の細胞との接続状況などを総合的に記録したデータベースを構築する。これに基づいて、概念図レベルでなく実際の神経接続状況をなるべく忠実に反映した回路図を生成し、情報科学的解析やシミュレーションに利用しやすい形で提供する。

3: 従来のように高度にモデル化（抽象化）した仮想回路でなく、こうして明らかになった現実の神経回路に密着したトップダウン型解析を行なう。

4: 解析にあたっては、魅力的だが解析が難しい高度な脳機能にいきなり挑むのではなく、地味だが神経回路の動作を本質的に理解するための基本となるような、比較的低次の脳機能を十分に理解することを目指す。現実の回路図をもとに、入力に対してどの細胞がどのように動作するかを考え、回路の振る舞いをシミュレーションする。さらに特定の細胞を選択的に除去・機能阻害したり、特定の伝達物質の機能を薬理的に阻害した場合にどのような回路動作の異常が生じるかを予測し、個体の行動実験や神経細胞活性の光学計測などによって実験的に検証する。このような「回路解析→回路動作予測→実験による検証」という総合的アプローチが現時点で可能なレベルの、基本的な脳機能の解析を優先する。

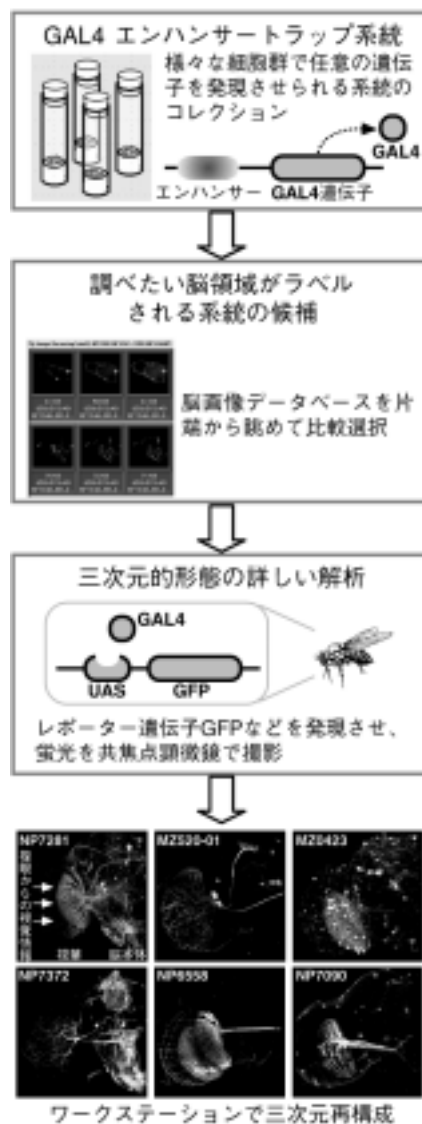
本研究で解析する実験動物は、A:脳全体が解析できるほどシンプルな神経系で、B:回路構造を調べるための強力な実験技術が利用可能であり、C:ある程度複雑な脳機能や行動パターンを持ち、D:それを解析する様々な実験手法が確立している生物である必要がある。この点でキロショウジョウバエは、現時点では最適のモデル系である。神経系の細胞総数は約 20 万、うち脳本体の細胞は 4~5 万個と少なく、しかも切片を作らずに脳全体が開口数 1.2~1.4 の高解像対物レンズの視野内に収まるため、脳内を縦横に走る神経線維の全貌を 3 次元再構成によって解析することが容易である。また、様々な特定細胞を遺伝的にラベルしたり、そこで任意の組み替え遺伝子を発現させたりする技術や、膨大な数の突然変異系統の蓄積、2000 年春に解読された全ゲノム配列のデータなど、モデル動物の中でももっとも完備した分子遺伝学的テクニックを利用できる。サルで行なわれている高度な訓練実験は不可能なものの、マウスやラットで行なわれているレベルの脳機能解析実験のほとんどは、ショウジョウバエでも実施可能である。細胞が小さいため電極刺入による電気生理学実験は一部の大型細胞でしかできないが、光学計測による神経活動度の測定技術が近年急速に進歩している。また、脳機能関連遺伝子の分子生物学的解析が急速に進行中のショウジョウバエでは、神経回路図の作成とそれに基づくトップダウン型解析の進展は、各遺伝子の機能を理解する基礎資料としても直接役に立つ。このようにショウジョウバエは、ボトムアップ型解析の研究効率の点でも、トップダウン型解析が他分野に及ぼす波及効果の点でも、両者の連携のメリットが最大限に期待できる。

1-2. 研究開発の成果

本研究の核になる詳細な脳神経回路図は、個々の神経細胞を同定して形態と投射パターンを記載する、地道な作業の網羅的な積み重ねによって作成される。そのためには、多数の神経線維を特異的に染め分ける効率的な技術が不可欠である。

ショウジョウバエでは、右の図 1 のように酵母由来の転写調節

図 1 スクリーニングと解析の流れ



因子 GAL4 をゲノムに 1 ケ所挿入し、近傍の遺伝子発現調節領域「エンハンサー」の活性に従って GAL4 が発現するようにした「GAL4 エンハンサートラップ系統」を用いて、細胞を特異的にラベルできる。ラベルされた細胞ではクラゲ緑色蛍光タンパク GFP やサンゴ赤色蛍光タンパク DsRed などのレポーター遺伝子を発現させて細胞全体の構造を可視化したり、シナプス小胞に局在するタンパクであるシナプトブレビン (nsyb) を GFP に融合させた遺伝子 nsyb::GFP を用いて、出力シナプスの位置だけを可視化したりできる。可能な限り多くの細胞種をラベルするため、我々は本研究室を中心に国内 8 つの研究グループの共同プロジェクトで作成された約 4000 系統のコレクションについて、脳での発現パターンを共焦点顕微鏡で撮影して約 20 万枚の画像データベースを完成させた。このデータを利用して脳の各領域の神経を特異的にラベルする系統をスクリーニングし、精密な共焦点顕微鏡撮影と 3 次元再構成を行なうことで、回路の投射パターンを詳細に解析している。また、発生期における回路の形成過程を動的に追跡することにより、一見複雑に見える回路構造を発生に即して体系的に理解する作業を進めている。

1-2-1 視覚系の情報経路解析

ショウジョウバエの視覚系には、左右の複眼にある約 800 個の個眼に各 8 個の光受容細胞が存在する。1 次感覚野である視葉には個眼に対応した 800 のコラム構造があり、その神経回路は従来から詳しく解析されてきた。しかしそこから脳本体にある 2 次感覚野に投射する神経の構造は、ほとんど未知であった。そこで、これらの投射神経を特徴的にラベルする GAL4 エンハンサートラップ系統 90 系統を詳細に比較した結果、全部で 42 経路、約 740 個の投射神経を同定した（細胞数は個体によって数個単位の個体差がある）。

42 経路のうち 31 経路は、1 個またはせいぜい数個の細胞が視葉のコラムを横断的に連絡し、視野全体の情報を取得する「接線型」の神経回路を形成していた。これらの中には、細胞体が視葉でなく脳本体の側にあり、出力シナプスが視葉側にのみ分布するものがかなりの数存在した。これらは、情報を脳の 2 次感覚野から 1 次側に伝えるフィードバック回路である可能性が高い。残り 11 経路は、隣接する少数のコラムにしか投射しない「コラム型」の神経が、束を作って脳の 2 次感覚野に投射している。これらの経路のほとんどでは出力シナプスは 2 次側に存在し、1 次側から 2 次側への情報伝達を担うと考えられる。

脳本体には視覚系の 2 次感覚野が vlpr、plpr、spl、slpr、smpr、impr の 6 領域存在する。領域ごとに、出力シナプスの分布、接線型とコラム型の分布、連絡している視葉領域の種類などが大きく異なっており、現在それぞれの 2 次感覚野の特徴を解析している。

1-2-2 嗅覚系の情報経路解析

ショウジョウバエは触角にある左右約 1200 個ずつの嗅細胞で匂いを検知する。嗅細胞は発現する匂いレセプターの種類によって約 50 種類あり、レセプターごとに 1 次感覚野である触角葉にある 43 個の系球体の中の 1 つに特異的に投射する。匂いは多数の匂い物質の集合体であり、それぞれが特定の組み合わせの嗅覚細胞を刺激する。匂いの認知とは、刺激された嗅覚細胞の組み合わせを知ることにはならない。嗅覚細胞と 1 次感覚野の系球体の 1 対 1 の対応関係を考えると、このプロセスは「どの系球体の活動が活発化しているかを脳の高次領域が検出すること」に置き換えられる。このために必要な神経回路を理解することが、嗅覚系情報経路解析の目的である。

活動が活発化している糸球体の組み合わせを2次感覚野が知るためには、各糸球体からの情報経路が何らかの形で統合されなければならない。そこで、2次感覚野である「キノコ体」と「側角」の2つの脳領域においてどのような情報統合が起こりうるかを調べるため、1次感覚野からの投射神経に対して2次感覚野の神経がどのように結合しているかを調べた。

脳内の同じ場所に投射している神経は相互に結合している可能性が高く、投射位置が重ならない神経の間は結合の可能性は薄い。そこで、異なった神経をラベルした系統で2次感覚野の同じ部位を撮影した画像から、神経線維分布の空間的重複を定量的に評価するアルゴリズムを開発した。画像の各画素の明度値を座標とするベクトルで表わすと、空間的重複度の高い画像は各座標値の分布が近いので、ベクトルは同じような方向を向く。従ってベクトル間の距離を計算すれば画像の類似度を定量値で表わし、多数の画像をクラスター解析できる。

この方法で1次感覚野の8つの糸球体から投射する神経を調べた結果、図2に示すように2つの2次感覚野のどちらでも、1次感覚野からの投射はいくつかのゾーンに分かれていた。2次感覚野の個々のゾーンは、複数の糸球体からの情報を重複して受けている。キノコ体では、2次感覚野の神経群はこれらのゾーンをまたいで全体を覆う形で投射しており、嗅覚情報の全体を広く統合することが

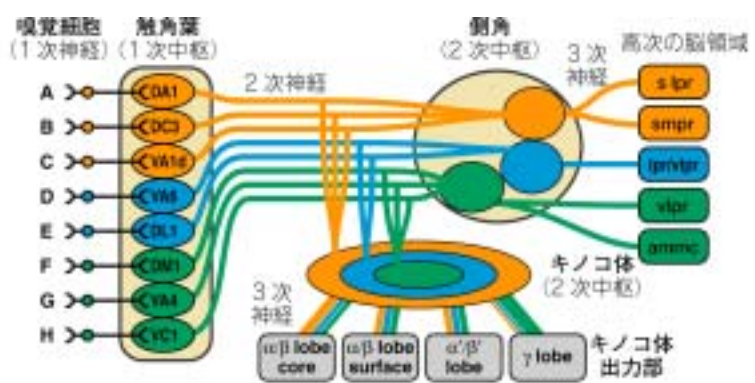


図2 嗅覚情報の流れ
8種類の嗅覚細胞の情報経路を模式的に示す。

ができる構造になっていた。これに対し側角の2次感覚野神経群は、どれも投射が単一のゾーンの中だけに限られ、軸索の他端もゾーンごとに脳の異なる高次領域に投射していた。つまり側角では、嗅覚情報の統合は限られた範囲の中でしか起こらないことになる。

行動実験から、キノコ体は嗅覚連合学習に必須であり、定型的な嗅覚行動には側角だけがあれば十分なことが分かっている。神経投射の相互関係と考え合わせると、連合学習には幅広い糸球体からの情報の統合が重要であり、定型的な匂い認識には少数の糸球体の間での限定した情報統合だけで十分であることが示唆される。

1-2-3 聴覚系の情報経路解析

昆虫の聴覚器官は触角の基部にあるジョンストン器官と呼ばれる構造で、空気の振動による触角の微小な変位を検知する。ジョンストン器官には張力検知細胞が数百あり、脳の下部にある1次感覚野へ投射することが分かっているが、1次感覚野内部の構造は全く分かっていなかった。

そこでジョンストン器官の感覚細胞を特異的にラベルするGAL4システムをスクリーニングして解析した結果、ジョンストン神経は投射する領域によって4グループに分類されることが分かった。それぞれの領域はさらに細かく分かれ、全部で11の領域からなる。ジョンストン器官内部では、4グループの神経は同心円状に分布するものと、上端部と中間部にクラスター状に局在するものとがあった。触角の振動モードを考えると、聴覚と重力/加速度など異なる種類の感覚情報が、異なる神経群によって脳へ伝え

られる可能性がある。

1-2-4 細胞の位置と数の定量データ抽出技術の開発

現実の神経回路を定量的にコンピューター内にデータベース化するためには、どの神経が脳のどこからどこに伸びるかの位置データが必要である。そのためには細胞の位置を数値座標で表わし、そこから伸びる神経線維の軌跡をベクトルの集合として数値化する必要がある。脳画像からこのようなデータを自動的に抽出する第一段階として、まず細胞体の位置情報を抽出するアルゴリズムを開発した。神経系では細胞が密集して存在しており、隣接する細胞のラベルが癒合して見える場合が多い。また抗原物質の量の差などによりラベルには強弱があり、非特異的なノイズも多い。従来技術でこのような画像を処理すると、密集した細胞群の全体を1つと数えてしまったり、ノイズに惑わされて余計な構造を細胞にカウントしてしまったりする場合が多かった。

そこで発想を変え、細胞を球体と近似して、それを3次元空間にどのように配置してゆけば得られた画像に一番近いシグナル分布が得られるかを評価する方法を開発した(図3)。この結果、人間の目とほぼ同等の精度で細胞の位置を認識できるようになった。この方法の大きな長所は、人間と異なりコンピューターは10万個を超える大量の細胞でも混乱せずに数え上げられることである。これによって、多数の脳細胞を持つ生物で始めて脳細胞の全数の正確な測定が実現し、多数の脳標本を比較して細胞数の個体差を調べたり、雌雄や老若による微妙な細胞数の差を定量的に比較したりすることが可能になった。



図3 左：ジョンストン器官（聴覚）の感覚神経細胞とその神経線維をラベルした画像。中：細胞体だけのラベルの画像。右：球近似法によって細胞の位置を抽出。表皮の薄膜状のノイズ染色が細胞として誤認識されることはなく、多数の細胞が集団状に集まってラベルが癒合した部分でも、微妙な濃淡差から細胞位置を正確に同定できる。この標本では566個の細胞が染まっていることも自動的に計算できる。

1-3. まとめ

これまでに、視覚・嗅覚・聴覚の3種の感覚情報について、感覚細胞から順にステップを追って神経回路の網羅的同定を進めてきた。これによって、本研究の開始前に比べはるかに多くの部分の神経回路について、感覚情報が上位の感覚野に伝えられる回路構造を明らかにすることができた。しかし感覚細胞から高次統合野への全過程を明らかにするには、まだ道のりは遠い。視覚系については、1次感覚野からの情報を受ける2次感覚野を今回初めてすべて同定することができたので、今後は2次感覚野内部の神経回路と、2次感覚野とさらに高次の統合野とを結ぶ神経回路を同定してゆく必要がある。嗅覚系については、2次感覚野の内部構造までが詳しく解明できたので、それらから情報を受ける3次感覚野をさらに精密に同定し、その神経回路構造を解析してゆく。聴覚系についてはこれまで全く知見がなかったため、1次感覚野の構造が解明できたばかりだが、今後はまだまだ同定されていない聴覚2次感覚野が脳のどこにあるのかを求めて、1次感覚野からの神経線維を網羅的に追跡してゆく。

本研究の目的は、脳の特定の細胞を可視化して形態を解析することにより、膨大な神経回路の構造を明らかにする点にある。しかし他の生物での神経形態学研究と異なり、細胞のラベルに GAL4 システムを利用しているため、単に細胞の形態を可視化できるだけでなくその細胞で任意の遺伝子を自由に特異的発現させることができる。特定の細胞の神経機能を阻害してその神経回路の機能を解析したり、細胞内 Ca 濃度の変化をモニターして神経回路の活動をイメージングする研究を行なっている世界の研究者に対し、我々が同定した神経回路をラベルする GAL4 システムを供与して、機能的な解析が現在進行中である。この意味で、本研究は単に我々が自分の研究室で神経回路の構造を地道に解析するプロジェクトであるという面だけでなく、世界中の脳機能研究者に有用な情報と研究材料を公共財として提供するプロジェクトであるという側面も併せ持っている。

本研究では、単に生物科学の研究室と情報科学の研究室が共同研究を行なうのではなく、培養液や染色液を扱って脳標本を直接解析する生物科学の研究者と、コンピューターを駆使して神経回路を解析する情報科学の研究者が、同じ部屋で共同して研究を進め、日夜議論を重ねる環境を実現させることが大きな目的であった。情報科学の研究者が、さまざまな実験技術の制約がある生物の実験の現場に身を置くことにより、生物科学の現実的ニーズに合った情報解析手法を短期間に効率よく開発することができた。また、情報科学の素養を積んだ人間ならフツと口に出るような何気ない意見も、生物系の研究者には非常に新鮮な発想の転換につながることも多くあった。このような相互作用は、離れた場所で研究する生物系と情報系の研究者が会議室や電子メールやテレビ会議で打ち合わせをするだけでは、絶対に得られない成果であった。

2 . 統括の見解

代表研究者らが作製した「GAL4 エンハンサートラップシステム」を用いて、脳の神経細胞の狙った部分だけを可視化する技術の開発や、脳細胞の位置と数の定量データを抽出する技術の開発により、視覚系に加えて嗅覚系、聴覚系など詳細な脳内地図のデータベース化に成功している。この成果はショウジョウバエの神経生物学に対して大きな影響を与え始めているが、脳神経科学全体への寄与はまだこれからであろうと思われる。本課題における情報科学的なアプローチとしては、神経回路の実験的計測を支援する方法の確立に重きを置かれた感があるが、今後は代表研究者の構想にあったように神経回路の持つべき構造および機能を情報科学的に推理する手法の確立を行うことが期待される。

3 . 主な論文発表

国内 0 件、国外 7 件 主なものを以下に記す

1. 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).
2. Awasaki, T. and Ito, K. Engulfing action of glial cells is required for programmed axon pruning during *Drosophila* metamorphosis. *Current Biology* **14**, 668-677 (2004).
3. 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).
4. Kido, A. and Ito, K. Mushroom bodies are not required for courtship behavior by normal and sexually mosaic *Drosophila*. *J Neurobiol.* **52**, 302-311 (2002).

5. 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).