

# 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

東京大学分子細胞生物学研究所

伊藤 啓

## **Comprehensive analysis of *Drosophila* brain neural circuits towards realistic modeling of sensory information processing**

Kei Ito

Institute of Molecular and Cellular Biosciences, The University of Tokyo

In order to establish computer models of information processing in the brain, it is a prerequisite to obtain comprehensive and detailed information about the neural circuits of the real nervous system. Considering the limitation of the current technology of bioscientific as well as computational science, it is more straightforward to model relatively simple brain functions of relatively simple brain systems. Towards this end we are aiming at generating a comprehensive circuit map of the whole *Drosophila* brain. In this project we analysed the circuits in the visual, olfactory, gustatory and auditory sensory systems. By screening GAL4 enhancer-trap strains, we visualised specific subsets of neurones connecting lower- and higher-order sensory centres. Connectivity patterns between afferent, local and efferent neurones were analysed. Systematic comparison between different sensory pathways revealed similarity and differences between different modalities. It also made us possible to identify the brain regions that integrate information of multiple modalities.

### 1. はじめに

脳研究においては、実際の生物を使って神経回路の構造と機能の解析を積み重ねてゆくボトムアップ的手法と、神経回路の実体をいったん離れてコンピューターシミュレーションなどによって回路の動作を情報科学的に推理するトップダウン的手法という、2つのアプローチがよく提唱される。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が、現実には融合の兆しがなかなか見えない。このような乖離の原因の一つは、ボトムアップ型手法では現在の生物科学の技術的制約から、複雑膨大な高等生物の脳の中の限定された一部の回路構造しか明らかにできていないのに対し、トップダウン型手法では多数の脳領域の複雑な協調処理が不可欠な、極めて高度の脳機能に大きな関心が持たれており、両者の間に差がありすぎる点にある。現状において2つのアプローチをより強力に連携させるためには、複雑な脳の高度な機能にいきなり挑むより、脳全体を解析できる程度にシンプルな脳を対象とし、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まず十分に理解することが大切である。

そこで本研究では、シンプルでしかも多様で強力な実験手法が駆使できるシステムとして、キイロショウジョウバエの脳に着目し、感覚情報の入力処理部から、異種の情報を統合する連合部に到るまでの神経回路について、個々の神経回路の形態や接続状況を徹底的に解析する作業を進めている。

## 2. 研究開発の成果

### 2.1 細胞を可視化する方法

本研究の核になる詳細な脳神経回路図は、神経細胞をひとつひとつ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。この作業を最大限効率よく行うために、本研究では酵母由来の転写調節因子GAL4をゲノムに1ヶ所挿入し、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システム」の世界最大規模のコレクション（約4000系統）[8]を用いて、多数の神経線維のうちの一部のサブセットだけを可視化して解析した（図1）。この手法は他の実験動物でも試行されているが、本格的に実用化しているのは現在のところショウジョウバエのみである。GAL4でラベルされた細胞では、クラゲ蛍光タンパクGFPやサンゴ赤色タンパク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nsybをGFPに融合させた遺伝子を用いて、出力シナプスの位置だけを可視化できる[7]。また、酵母由来の組み替え誘導遺伝子flippaseをさらに組みあわせて、GAL4でラベルされた一群の神経の中から単一の神経だけをさらに染め出し、1つの神経回路の全体の構造と、その中での個々の神経の投射パターンとを、組みあわせて解析することができる。

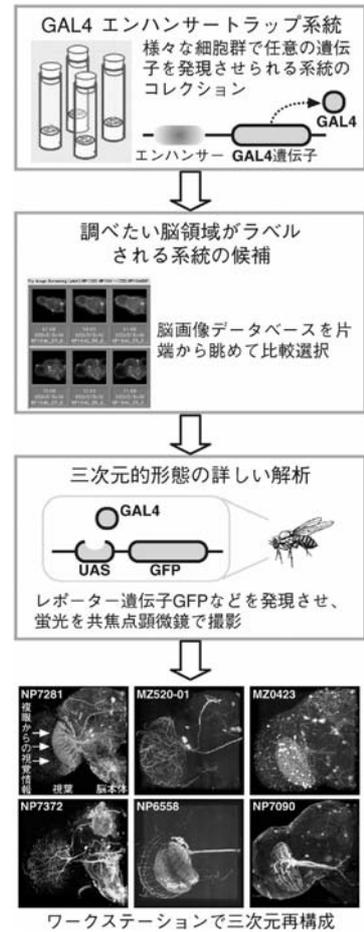


図1

### 2.2 脳のマップシステムの確立

個々の神経が脳のどこからどこに投射し、どこに樹状突起や軸索分枝を形成するのかをきめ細かに解析するためには、脳内の微小な領域を区別して一義的に指し示す詳細なマップシステムが確立していることが不可欠な大前提になる。哺乳類の脳では皮質領野や神経核のレベルで脳のマップが定められ、広く利用されているが、ショウジョウバエの脳は哺乳類脳の1つの神経核よりもはるかに小さく、その内部は神経線維が一見無秩序に見えるほど複雑に錯綜している。このため、視葉・触角葉・キノコ体・中心複合体などごく一部の部分を除き、脳内の細かな領域はこれまで厳密には定義されていなかった。

そこで我々は、グリア細胞による仕切り構造と、容易に同定可能なランドマークになる脳構造とを指標にして、脳本体を16の小領域に分割するマップ法を定義した（図2）[2]。従来から一部で用いられていたマップをベースに、あいまいだった各領域の境界を明確に定義し、それぞれの領域をさらに細かく分割した。これによって、異なるGAL4系統や抗体などでラベルされた様々な神経の投射部位を統一



図2

的な方法で記録できるようになり、回路構造の比較が容易になった。

### 2.3 視覚系の情報経路解析

視覚情報は眼に配置された多数の視細胞から、空間的配置を保ったまま低次視覚中枢に伝えられ、そこで輪郭や動きの抽出など様々な処理が行われる。これらの情報はさらに脳の様々な高次中枢に伝えられ、他の感覚情報と統合される。シンプルな繰り返し構造から成る低次視覚中枢は回路構造の解析が比較的容易であり、これまで詳しく解析されてきた。しかし低次視覚中枢と高次中枢を結ぶ神経の実際の回路構造については、いまだ知見が非常に限られている。ショウジョウバエでも、低次視覚中枢である視葉は複眼の配列に対応した約800のコラムの整然とした繰り返し構造であり、その回路は従来から詳しく解析されてきたのに対し、そこから脳本体の高次視覚中枢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システムを詳細に比較し、合計44種類の視覚投射神経を同定した。その中でも、脳の視葉の中で最も高次側に位置するlobula領域からの投射神経は24経路（約770細胞）を占める（図3）[2]。このうち、低次視覚中枢において視野の狭い範囲に相当する一部分のみに投射する神経が多数集まって束になった「コラム型」構造の回路が11経路約700細胞、視野全体に接線状に投射する少数の神経から構成される「接線型」構造の回路が13経路65細胞であった（接線型の1経路のみ40細胞以上から構成されるが、残りは1経路あたり1~4細胞であった）。

ラベルされた各神経におけるシナプス小胞の局在を特異的に可視化して、その分布を解析した結果、コラム型回路はすべて、出力シナプスが高次中枢側にある求心性経路だったのに対し、接線型回路では半数以上が、出力シナプスが低次中枢側にある遠心性経路であった。これら遠心性経路は、高次中枢が低次中枢の作動を修飾するための制御経路になっていると推測される。

脳本体の16領域のうち、視葉からの求心性経路を受けるのはvlpr, plpr, optuの3領域のみに限られていた。このうち、視葉のlobulaのみから情報を送る回路はほとんどがvlprに投射し、視葉の複数領域から情報を送る回路はplpr, optuに投射していた。vlprはコラム型5経路に加え接線型4経路の入力も受けているのに対し、plprとoptuはコラム型のみを入力を受けていた。これらの高次視覚中枢は、それぞれ異なった種類の視覚情報を受け取って処理している可能性が高い。

一方、視葉に情報を送る神経経路を持っている脳領域は、mslpr, pslpr, msmpr, mimpr, pilpr, plpr, ipslの7領域であった。このうち、視葉から直接入力を受ける領域と重なるのはplprしかな

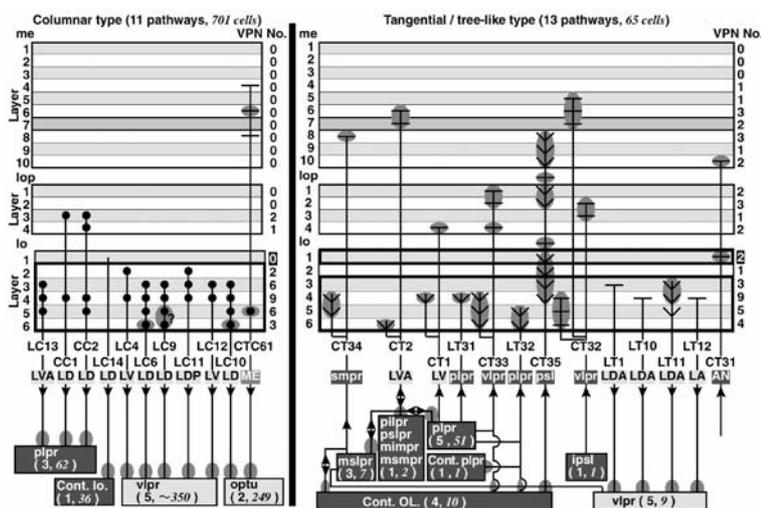


図3

い。これは、視葉から入力を受ける3つの高次視覚中枢から低次中枢に対して直接フィードバック制御を行っている回路は、ほとんど存在しないことを意味している。高次視覚中枢から他の脳領域に伝えられてさらに高次の処理を受けた情報を低次中枢にフィードバック制御している可能性と、視覚以外の感覚中枢からの情報を視覚低次中枢に伝えている可能性が考えられる。

## 2.4 嗅覚系の情報経路解析

ショウジョウバエの嗅細胞は発現する受容体の違いによって約50種類あり、1つの種類の嗅細胞からの情報は一次嗅覚中枢（触角葉）にある43個の糸球体のうちの1つに特異的に送られる。嗅覚情報がここから先どのように脳の高次領域に送られてゆくのかの全貌は、これまで調べられていなかった。そこで視覚系の場合と同様に、高次領域への投射神経を網羅的に同定し、その構造を解析した（図4）。

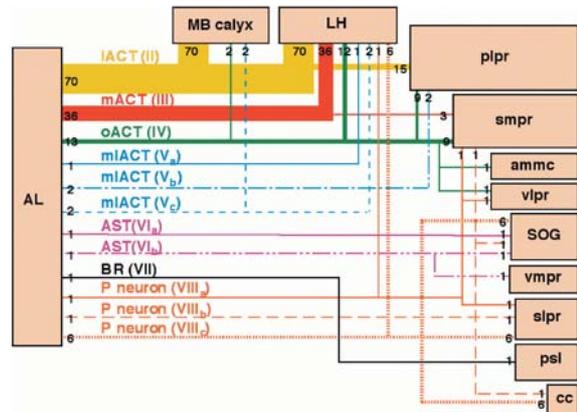


図4

投射神経には、1つの神経が一次中枢の1つの糸球体だけに樹状突起を伸ばし、そこから高次中枢へ情報を送る単糸球体性の回路と、1つの神経が複数（多くの場合数十個）の糸球体に樹状突起を伸ばし、全体の情報を高次中枢へ送る多糸球体性の回路とがある。単糸球体性の回路はiACT経路に集中しており、この回路に属する個々の神経は、枝分かれしてMB（キノコ体）とLH（側角）という2つの二次中枢に投射する。それぞれの単糸球体性神経は、二次中枢の中のごく一部の領域にしか投射しない。また、異なる糸球体に由来する複数の神経は、二次中枢内の同じ領域に重複して投射し、1つのゾーンを形成している。二次中枢は、どのグループの糸球体群から嗅覚情報を受けるかによって、少なくとも3つのゾーンに分かれていることが分かった[5]。

さらに高次の神経も同定して解析したところ、これら高次神経の側角での樹状分枝は、投射神経が作るいくつかのゾーンのうちの1つの内部だけに限られており、嗅覚情報の統合は限られた範囲の中でしか起こらない。一方キノコ体では、高次神経の樹状分枝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できる構造になっていた。

単糸球体性の神経はiACT経路のほぼ全ての細胞と、mACTとoACT経路の一部の細胞のみであり、mACTとoACTの残りを含む6経路約60細胞は多糸球体性であった。上述のように単糸球体性の神経はほとんどがキノコ体と側角に投射するのに対し、多糸球体性の神経はこれら以外の多くの脳領域に投射するものが多かった。また、キノコ体は単糸球体神経からの投射しか受けていないのに対し、側角には単糸球体と多糸球体性神経の投射が共存していた。

## 2.5 視覚系と嗅覚系の情報処理過程の比較

このように視覚系と嗅覚系の投射神経を体系的に解析した結果、両者の回路構造には意外な類似点と一定の相違点があることが分かった。

視覚系では、目に写る外界の景色の連続した明暗分布を、視細胞が一定の数の画素（ショウジョウバエでは800画素）に区分して検知し、一次視覚中枢の対応するコラムに伝達する。一方嗅覚系では、多数の匂い物質の集合体である匂いを特異的な受容特性を持つ様々な嗅細胞（ショウジョウバエでは約50種類）が区分して検知し、一次嗅覚中枢の対応する糸球体に伝達する。明暗分布も匂い分子の存在状況も、一次中枢では「どのコラム／糸球体の活動が活発化しているか？」という機能マップとして表現されている。

視覚系でも嗅覚系でも、このマップは2種類の投射神経によって上位中枢へと伝えられる。視覚系の接線型投射神経と、嗅覚系の多糸球体型投射神経は、どちらも低次中枢のほぼ全体に投射して情報を収集し、その演算結果を高次中枢に送っている。これらの神経は1回路あたりわずかな細胞数しかないので、低次中枢の感覚マップの位置情報が失われてしまうという点は2つの感覚系に共通である。一方、視覚系ではこのタイプの神経はv1prという1つの脳領域に集中して投射しているのに対し、嗅覚系では10近い脳領域に幅広く投射している点に違いがある。

視覚系のコラム型と嗅覚系の単糸球体型の個々の神経は、低次中枢の特定の部位の情報のみを高次中枢に送る。1つの経路は、異なるコラムや糸球体に由来する多数の神経が束になって構成されており、全体として、低次中枢の感覚マップを保ったまま高次中枢に伝達可能な形になっている。視覚系でも嗅覚系でも、感覚マップの分解能はこの段階で大幅に減少する。しかしその様式には違いがある。視覚系では、1つのコラム型投射経路は30細胞から最大でも150細胞程度で構成されており、低次中枢のコラムの数よりもずっと少ない。個々の神経は低次中枢の単一のコラムでなく、隣接する複数のコラムにまたがって樹状突起を伸ばしている。従って投射神経が低次中枢を発するレベルで、情報はすでにある程度統合され、感覚マップの分解能は減少している。また、一部の経路を解析した結果では、1つのコラム型回路の個々の神経の投射領域は、高次中枢の内部において空間的に大きく重複しており、分解能はさらに低下している。一方嗅覚系では、視覚系と異なり単糸球体型投射神経は低次中枢の1つの糸球体の情報のみを高次中枢に送るので、このレベルでの情報統合や分解能の減少はない。しかし異なる糸球体に由来する神経の投射領域は二次中枢の内部で空間的に大きく重複し、この時点で分解能の減少が生じる。

視覚系でも嗅覚系でも、低次中枢は全体が単一の機能マップを構成しているのに対し、高次中枢ではこのマップが異なる領域の複数のマップに重複して射影される。しかしこの重複射影の過程は多少異なる。視覚系では、低次中枢から発した少なくとも8つの独立なコラム型経路が、それぞれ高次中枢の異なる領域に投射している。これに対し嗅覚系では、低次中枢からの単糸球体型投射経路は事実上1つだけであり、それに属する個々の細胞が、2つの高次中枢に枝分かれして投射している。嗅覚系では2つの高次中枢に投射する神経回路は同じ細胞に由来するものなので、入力信号の発火パターンなどの生理学的特性は同一であると推察できる。一方視覚系では、それぞれの高次中枢に投射する8つのコラム型経路の低次中枢での樹状分枝の構造はかなり異なっている。従って入力信号も中枢ごとにかなり異なっていると考えられる。

## 2.6 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約500個あり、脳の下部にある一次聴覚中枢に投射することが分かっているが、その構造は全く分かっていなかった。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、一次聴覚中枢は5つのゾーンに分かれており、それぞれはさらに細かく19の部位に分かれていた(図5)。ジョンストン神経自身も5つのグループに分かれており、それぞれ5つのゾーンのうちの1つのみに投射していた。各ゾーンに投射する聴覚神経の細胞体は、行き先である各ゾーンに応じて聴覚器官内部でそれぞれ特定の位置に配置していた。つまり聴覚においても、視覚や嗅覚と同様に、感覚器と脳の一次中枢との間に厳密な相関地図が存在することが分かった[1]。

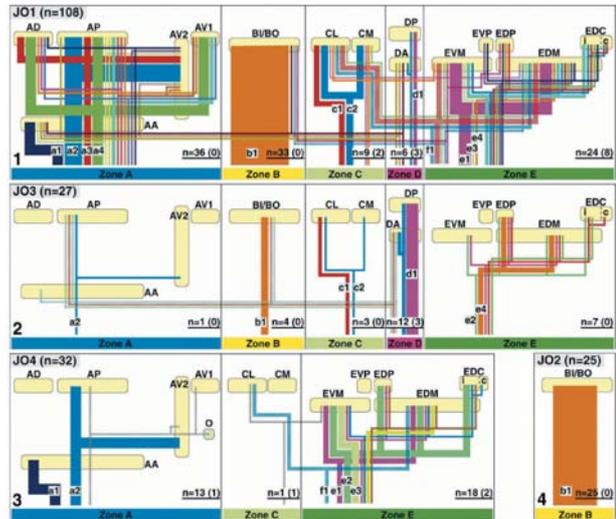


図5

## 2.7 味覚系の情報経路解析

昆虫は脚や産卵管の先など様々な場所に味覚細胞を持つが、主要な味覚感覚器は口吻の先端に集中している。ここには水や塩や糖分を検知する様々な味覚細胞が分布し、食道下神経節に投射する。クローニングされた味覚レセプター遺伝子を利用していくつかの味覚神経の投射パターンが解析されているが、全貌の理解にはほど遠い。口吻部の味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、従来知られているより外側にも投射神経の終末が存在することが分かった。また一次味覚中枢に6つの領域を同定し、それらの組み合わせで合計26種類もの異なる投射パターンが見つかった。

## 2.8 異種の感覚情報を統合する脳領域の解析

本研究は、感覚情報の入力処理部から、異種の情報を統合する連合部に到るまでの神経回路を明らかにすることが大きな目的であった。このような統合が脳のどこで起きるのかは、実はこれまで明らかでなかった。

感覚情報が統合されるためには、異なる感覚系の低次中枢からの情報伝達経路が脳の同一の領域に収束することが不可欠である。感覚情報の統合の部位としてはキノコ体が従来から大きく取り上げられている。しかしこの領域に直接入力するのは嗅覚情報のみであり、視覚情報など他の感覚情報は、直接の入力は見られない。もう一つの統合部位として注目されている中心複合体には、どの種類の感覚情報も直接入力することはない。今回の解析で、このような直接的な情報収束が起きる場所としてクローズアップされたのが、vlpr領域である。これは意外な結果で、vlprは従来は視覚の高次中枢としてのみ知られていたが、今回の研究で少なくとも視覚・嗅覚・聴覚の3情報種が集中して投射していることが分かった。

そこで、vlprの内部をさらに詳しく解析して、情報統合がどのように起きるのかを調べた。vlprの内部構造はこれまで全く調べられていなかったため、まずシナプスの分布を可視化してランドマークになる構造を同定し、それを指標に各情報経路の投射終末の位置をマップした(図6)。vlprには、シナプス密度が局所的に高く、周囲をグリア突起で囲まれた、触角葉の糸球体に似た構造(GL)が12個見つかった。視覚系のコラム型投射回路(LC)は全て、糸球体のどれか1つに投射していた。一方接線型投射回路(LT)は、これら糸球体の近傍だが若干外れた位置に、散在して投射していた。嗅覚系回路と聴覚系回路は、糸球体には投射していない。経路が異なる複数の嗅覚系回路はvlprの前内側部にまとまって投射していたが、それと視覚系や聴覚系の投射位置は大きく異なっていた。つまり、vlprには3種類の感覚情報経路が収斂して投射するが、その内部を詳しく見ると3種の投射部位は別個に分かれていた。従って、情報の統合は感覚情報が入力した位置で直接起こるのではなく、vlpr内部のさらに高次の神経によって間接的に行われている可能性が高い。

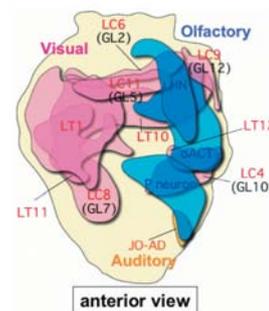


図6

### 3. まとめ

本研究では、視覚・嗅覚・味覚・聴覚の4つの感覚系について、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。その結果、従来注目されていたとは異なる場所に、感覚情報が収斂していることが明らかになった。多数の感覚種の情報処理回路を同一の手法を使って同時進行で体系的に同定してゆくような研究は従来ほとんど行われておらず、ショウジョウバエの比較的シンプルな脳構造と強力な分子遺伝学的手法のメリットを活かすことができた。

今回の研究で個々の感覚低次中枢とそこからの投射神経の構造が詳しく解明でき、この点の理解は大きく前進したが、そこから新たな課題も浮上してきた。今回新たに明らかになった各感覚種の高次中枢と、キノコ体や中心複合体など従来から注目されてきた感覚統合の中枢とを結ぶ情報伝達経路は、一切明らかになっていない。行動実験の結果ではキノコ体や中心複合体に視覚情報が入力していることは確実であり[4]、その経路を解明することは行動実験の結果を解釈したり、感覚情報の受容から行動の制御に至る過程を計算機上で再現したりするためには欠かせない。次のステップとして、今回新たに同定された各感覚種の高次中枢の内部構造や、視覚情報のフィードバック経路の解明も含め、神経線維があまりに錯綜しているためにこれまで誰も手をつけていなかった高次脳領域の構造解明を、今後本格的に進めていくことが重要であろう。

### 4. 研究開発実施体制

代表研究者 伊藤 啓 (東京大学分子細胞生物学研究所)

研究開発題目

(1) 神経回路の画像情報抽出・発生学的解析グループ

グループリーダー 伊藤 啓 (東京大学分子細胞生物学研究所)

## 5. 参考文献

- [1] Kamikouchi A, Shimada, T. and ITO, K. (2006) Comprehensive classification of the auditory sensory projections in the brain of the fruit fly *Drosophila melanogaster*. *Journal of Comparative Neurology*(499)317-356.
- [2] Otsuna, H. & Ito, K. (2006) Systematic Analysis of the Visual projection neurons of *Drosophila melanogaster* - I: Lobula-specific pathways. *Journal of Comparative Neurology*(497)928-958.
- [3] Awasaki, T., Tatsumi, R., Takahashi, K., Arai, K., Nakanishi, Y., Ueda, R., and Ito, K. (2006) Essential role of the apoptotic cell engulfment genes *draper* and *ced-6* in programmed axon pruning during *Drosophila* metamorphosis. *Neuron* (50)855-867
- [4] Liu, G., Seiler, H., Wen, A., Zars, T., Ito, K., Wolf, R., Heisenberg, M. & Liu, L. (2006). Distinct memory traces for two visual features in the *Drosophila* brain. *Nature* (439)551-556.
- [5] Tanaka, N. K., Awasaki, T., Shimada, T. and Ito, K. (2004). Integration of chemosensory pathways in the *Drosophila* second-order olfactory centers. *Current Biology*(14)449-457,.
- [6] Awasaki, T. and Ito, K. (2004). Engulfing action of glial cells is required for programmed axon pruning during *Drosophila* metamorphosis. *Current Biology*(14)668-677.
- [7] Ito, K., Okada, R., Tanaka, N. K. and Awasaki, T. (2003). Cautionary observations on preparing and interpreting brain images using molecular biology-based staining techniques. *Microscopic Research and Technology*(62)170-86.
- [8] Hayashi, S., Ito, K., Sado, Y., Taniguchi, M., Akimoto, A., Takeuchi, H., Aigaki, T., Matsuzaki, F., Nakagoshi, H., Tanimura, T., Ueda, R., Uemura, T., Yoshihara, M. and Goto, S. (2002). GETDB, a database compiling expression patterns and molecular locations of a collection of Gal4 enhancer traps. *Genesis* (34)58-61.