

ショウジョウバエ初期胚培養系における神経発生

酒井邦嘉/堀田凱樹

神経の初期発生の研究と分子生物学技術を組合わせる実験系として、ショウジョウバエの初代培養系が、近年再び注目されるようになってきた。その利点として、致死突然変異体の解析が可能なことと、各個体をその遺伝子型に応じて調べられることなどがある。ショウジョウバエの分子遺伝学の蓄積とともに、薬理学や電気生理学、生化学などの手法を用いて、神経発生における機能分子の同定や、分化・決定の機構の解明に、この培養系を活用することができる。一例として、筆者らの実験から、Naチャンネル遺伝子の突然変異体を用いた、培養ニューロンの薬理的解析について紹介する。

はじめに

神経系の初期発生を解析するためには、発生段階という時間情報と同時に、空間的パターンといった位置情報にも注目しながら、その構造の驚くべき合目的性を追求していく必要がある。近年の分子神経生物学の発展をうけて、これまでとは異なった新しい実験系を採用することが必要になってきた。1970年代の初頭を振り返ってみると、分子遺伝学の進歩に貢献した科学者達が、新分野の開拓を目ざして、それぞれの見通しに基づいた実験系を確立しようとしていた。単純さをより重視して、線虫を材料に用いたBrennerらのグループがあり、遺伝学の蓄積に注目して、ショウジョウバエを採用したBenzerのような人々もあった。また、Nirenbergのように、神経系の腫瘍であるneuroblastomaの培養系を用いて、*in vitro*で神経細胞の分化を研究しようとした人達もいた。これらの先駆者の洞察力が、今日に至るさまざまな学問の流れの源であったといえよう。新しく実験を始めようとする者は、こうした流れの影響を受けながらも、おのおのの独自性に基づいた支流を開拓するよう努めねばならない。

神経科学の実験において、まず初めに問題となるの

は、対象とする神経系を取り巻く環境をいかにしてコントロールするかということである。「学習」に象徴されるように、生物における神経系の存在意義として、環境への適応ということが重要であると考えられるから、適切な環境の設定がなくては実験は成立しえない。この観点から、神経細胞の培養という方法は、外部環境を人為的に制御できるため、理想的な実験系を提供しうるものと考えられる。

ここに紹介するショウジョウバエの初期胚を用いた培養細胞系は、技術的には1970年代に確立されたものであるが、最近になって再び注目されるようになってきた。上で述べたBenzerとNirenbergからの流れが合流するということに、この実験系の意義があるのである。本稿では、ショウジョウバエ初期胚培養系の利点について述べ、実際にいかなる実験が可能であるかを明らかにし、その一例として、筆者らの研究の一部を紹介したい。

1. ショウジョウバエ初期胚培養系の概観

まず、われわれの用いている培養系について簡単に説明しよう。材料は、キイロショウジョウバエ(*Drosophila melanogaster*)の単一胚であり、各個体を個別に初代培養する。初めに、生きたまま外から観察して容易に形態を識別できる初期囊胚(gastrula)を選び²⁾、ガラス毛细管でその内容物を吸引する。特別な酵素処理や化学処理を施すことなく、そのままシャーレ中で培養する。培養液は、M3(BF)と呼ばれるもの

[キーワード]

ショウジョウバエ、初期胚培養系、ニューロブラスト、突然変異体、Naチャンネル

Kuniyoshi Sakai/Yoshiki Hotta, 東京大学理学部物理学教室

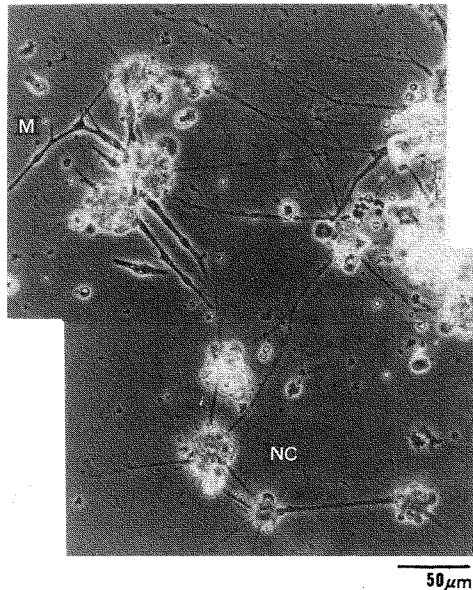


図1 ショウジョウバエ初期胚の培養細胞
 正常な単一胚より初代培養を行って、
 3日目のもの、典型的なニューロン・
 クラスター (NC) や、筋肉細胞 (M)
 などが見られる

で³⁾、10%のウシ胎児血清と、2.6mU/mlのインスリンが加えてある⁴⁾。この最後の段階で、2枚のカバーガラス上に1個体を2等分して培養する方法をわれわれは確立し、後に述べるように、そのおのおのを独立な実験に用いることが可能となった⁵⁾。

図1は、こうして得られた3日目の正常な培養細胞を示したものである。よく分化した典型的なニューロン・クラスターや、筋肉細胞、脂肪体細胞、血液細胞、成虫原基細胞などが観察される³⁾⁵⁾。これらの細胞は、4~5日目まで細胞分裂と分化が進み、その後10日以上、安定に維持することができる。この系で見られるニューロンは、初期囊胚のニューロブラストより分化したもので、おのおののニューロブラストが数回分裂を繰り返すために、クラスター状となっている。その

周囲には放射状に神経線維が伸びており、その中のあるものは、個々のクラスターを結びつけている。

この培養系の利点として、次の2点を挙げるができる。第1に、早い発生段階を用いているため、致死突然変異体をも解析できるということが重要である。ショウジョウバエにおいては、過去の遺伝学の蓄積とともに、多くの興味深い突然変異体が同定されている。特に、神経系の初期発生において重要な役割を果たしていることが示唆される遺伝子については、その突然変異体を細胞生物学的に解析することが必要である。ところが、この遺伝子が重要であればあるほど、その突然変異体は症状が重く、多くの場合致死性である。もし劣性であれば、突然変異系統としてはヘテロ接合として維持することができるが、そのホモ接合体の解析は難しい。なぜなら、生存しうる時間が限られているからである。初期胚の培養系を利用すると、この困難を克服することができる。個体としては生存できなくても、培養細胞として長く維持することができ、注目する突然変異遺伝子の作用を詳しく解析することが可能である。

第2に、単一胚を用いているため、各個体の性質をその遺伝子型に応じて独立に調べることができる。つまり、ある突然変異体について、ヘテロ接合体とホモ接合体を分離して解析できるのである。なお、各個体の遺伝子型を培養細胞でどのように決定するかという問題については、後に詳しく述べることにする。以上のように、遺伝学に強力なショウジョウバエの利点を最大限に生かせるという意味で、この実験系はほかの培養系に見られない特徴を持っているといえる。神経系の初期発生において発現する重要な遺伝子を調べるには、その突然変異体が致死となる段階も早いので、このような実験系を有効に活用することが重要なのである。

Summary

Drosophila embryonic cultures have been recently exploited as a model system for studying early neuronal development. This system is useful for analyzing lethal mutations that affect essential neuronal properties. Moreover, each individual can be studied separately according to the genotype, by using 'twin-culture' method. In addition to the rapidly accumulating genetic and molecular biological data in *Drosophila*, the primary culture can be combined with techniques of pharmacology, electrophysiology, and biochemistry. These approaches are expected to unravel functional molecules in neuronal development, as well as to solve the mechanisms of cellular differentiation and determination. Here we describe about our pharmacological experiments analyzing cultured neurons of a mutant deficient in a putative sodium channel gene.

2. 初期胚培養系における遺伝子型の決定法

劣性致死突然変異体は、balancerと呼ばれる組換えを抑えるための染色体と対にして継代される。そのため、次の世代の胚には、遺伝子型の異なるものが混在している。これらは、外見上は区別ができない。従って、ヘテロ接合の雌雄をかけあわせて4分の1の割合で現われてくる、突然変異のホモ接合体をほかと区別する必要がある。そのための方法として、小穴および三宅は、X染色体上の劣性突然変異、 Zw^n をマーカーとして利用することをすでに報告している⁴⁾。これは、G6PD (グルコース6リン酸脱水素酵素)を欠く突然変異であり、培養細胞において、その活性の有無を組織化学的に検出する。もし、着目する突然変異がこれと同じ染色体上にあるならば、そのホモ接合体はG6PD活性を欠くという特徴によって区別されるわけである。しかし、この方法は、X染色体上の突然変異のみしか応用できないという難点があった。

われわれは、第2染色体上にある突然変異を解析する必要から、balancer染色体上に人為的に導入したマーカー遺伝子を用いて、より簡便に遺伝子型を決定する方法を工夫した⁵⁾。ショウジョウバエで、人為的に遺伝子を導入する方法は、P因子形質転換法と呼ばれており、P因子というトランスポゾンを利用するものである⁶⁾。この手法が技術的に確立されたことが、現在のショウジョウバエ分子生物学の隆盛を支えているといっても過言ではない。われわれの場合では、図2に示すように、熱ショック蛋白遺伝子のプロモーター(*hsp*)と、大腸菌の β -ガラクトシダーゼ遺伝子(*lacZ*)

との融合遺伝子を、マーカーとしてbalancer染色体に導入してある。これは、培養細胞に37°C・1時間の熱ショックを与えることによって発現され、組織化学的な染色で確認することができる。突然変異のホモ接合体はbalancer染色体を持たないわけであるから、 β -ガラクトシダーゼ活性がないということから容易に同定される。実際に、欠失突然変異のヘテロ接合のかけ

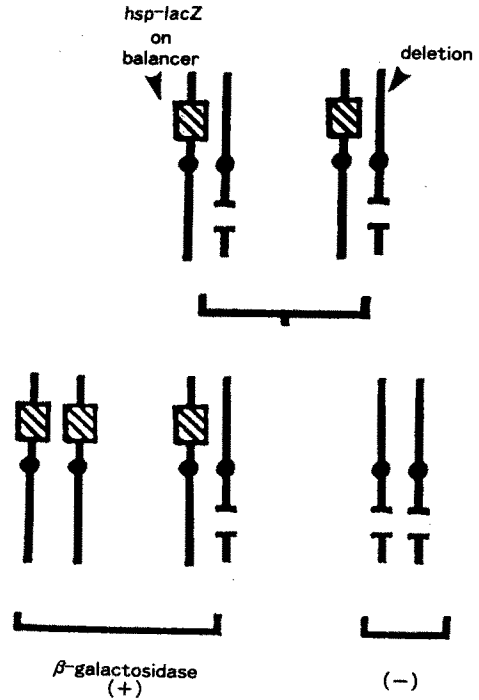


図2 マーカー遺伝子のある染色体を用いた欠失ホモ接合体の検出法
この方法により、各個体由来の培養細胞について遺伝子型を決めることができる。詳しくは本文参照

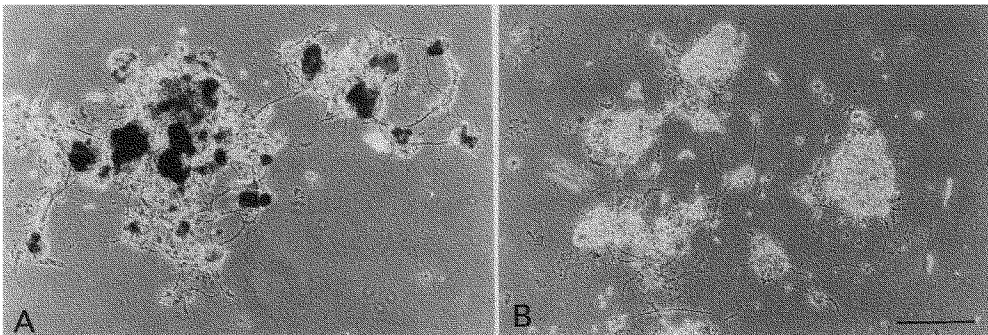


図3 初期胚培養細胞における遺伝子型の決定法

Df (2R) M-c^{33a}/CyO (CyOはbalancer染色体)の親より得られた単一胚培養細胞。5日目のものに熱ショックを与えて、 β -ガラクトシダーゼの活性を組織化学的に調べた。Aでは活性あり、Bでは活性なし。従ってBはDf (2R) M-c^{33a}のホモ接合体である。スケール・バーは200 μ m

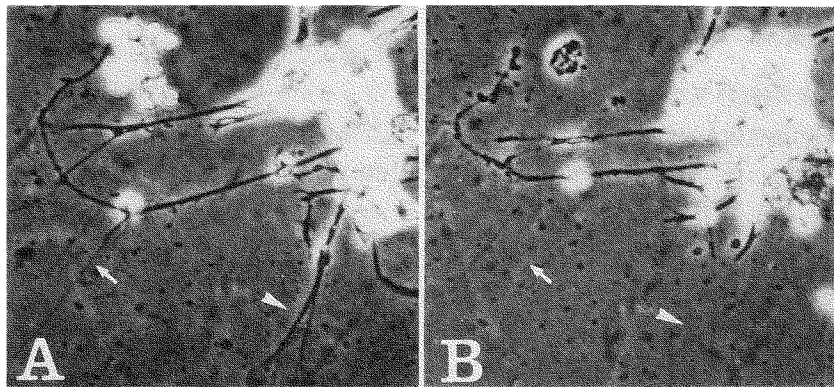


図4 培養ニューロンに対する薬理学的効果

A: 神経毒を加える直前の5日目の培養細胞

B: 500 μ M ベラトリジンと1.0mM ウアバインを加えて2日後の様子。矢印で示した神経線維に、顕著な変性が認められる

あわせから得られる F₁ 胚の約 4 分の 3 の初期培養では、図3Aのように *lacZ* 遺伝子による強い染色が検出された。一方、約 4 分の 1 の割合で、図3Bのように β -ガラクトシダーゼ活性が全く見られないものが現われてくるので、これが欠失ホモ接合体であると判定される。培養細胞における β -ガラクトシダーゼ活性は、不均一な variegation として現われるが、これは実験条件をいろいろ変えても同じように起こる現象である。同一個体を 2 分して培養を行い、その両方を染色すると、どちらにも同じようなパターンの活性が見られるので、染色の有無はマーカー遺伝子の有無を反映しており、この判定法は十分に信頼できると結論される。この方法は、同様にほかの染色体にも適用することができ、さらにほかの劣性致死突然変異体を解析する際にも有効に用いることができよう。

3. 初期胚培養系における薬理学的解析

上で述べたように、培養系では簡便に組織化学的な実験ができる。従って、酵素などの遺伝子が初期の発生段階でどのように発現しているか、という問題は、容易に調べることができる。また、神経毒を用いて、その薬理作用を調べる時は、培養液に加えて変化を見れば良い。この際、細胞周辺での濃度を厳密に定めることができるという点においても、生体内よりも明解な実験ができる。はじめに述べたような外部環境を精度よくコントロールするという事は、こうした実験において大切な意味を持っている。電気生理学の実験を行うにしても、外液のイオン組成などを適切に設定

ことができ、イオンチャネル活性などの解析においてもたいへん重要である。

次に、われわれの実験例として、初期胚培養系を用いた Na チャネルの薬理学的解析を紹介しよう。最近、Salkoff ら⁷⁾ およびわれわれの研究室において、電気ウナギの Na チャネルと相同性の高い遺伝子が、ショウジョウバエより単離された⁸⁾。われわれは染色体上への *in situ* ハイブリダイゼーション法により、この遺伝子が第 2 染色体上 60E に位置することを示し、DIC 60 と命名した。さらに同様の手法によって、Df (2R) M-c^{33a} なる突然変異体(ホモ接合体は致死)では、DIC 60 を含む染色体領域が欠失していることを証明した⁸⁾。そこで単一胚細胞の初期培養を行い、それより分化してくるニューロンのチャネル活性を調べることに、DIC60 の機能の解析を試みた。スタンフォード大学の Aldrich らは、神経線維を伸ばす以前のニューロンを用いて、whole cell clamp 法による電気生理学的解析を行っているが、われわれは十分、分化したニューロンの方がイオンチャネルの分化もすすんでいると考え、神経線維を伸ばしたニューロンの薬理学的性質を、初代培養系を用いて解析した。

正常培養細胞における Na チャネルの存在は、500 μ M ベラトリジンと 1 mM ウアバインの存在下で生ずる神経線維の変性によって確認された⁹⁾(図4)。ベラトリジンは、特異的に Na チャネルの活性化を促進する神経毒であり、この薬理作用は、強制的に開いた Na チャネルを通して Na イオンや Ca イオンが流入することによるものと考えられる。ベラトリジンによ

表1 Naチャンネルに特異的な神経毒に対する神経線維の感受性

Neurotoxins	Survival ratio of neurites (%)	
	Df/Df	Df/CyO or CyO/CyO
100 μ M veratridine	22.2 \pm 4.7	24.5 \pm 6.8
1 μ M TTX & 100 μ M veratridine	76.2 \pm 8.0	75.3 \pm 17.3

1.0 mM ouabain was also added

数字は神経線維の生存率 (%) を表す。Df は Df (2R) M-c^{33a} なる欠失突然変異体を、CyO は、バランス染色体を表す。1 μ M テトロドトキシン (TTX) は、100 μ M ベラトリジンと 1.0 mM ウアバインによる神経線維の変性作用を抑制する。欠失ホモ接合体 (Df/Df) とバランスをもつコントロール (Df/CyO or CyO/CyO) との間に差は認められない

る神経線維の顕著な変性効果は、Naチャンネルの特異的阻害剤であるテトロドトキシン (1 μ M) で、ほぼ完全に抑制された。従って、ここに観察されたベラトリジンとウアバインの効果は、この培養系におけるNaチャンネルの有無を反映していると結論できる。

この薬理作用は、初期胚培養系では初めて確認されたものであるが、ショウジョウバエ3齢幼虫の中枢神経の培養系では、ベラトリジンのみによる同様な神経線維の変性と細胞死が、アイオワ大学のWuおよび鈴木らにより報告されている⁹⁾¹⁰⁾。ウアバインはNaポンプの(Na⁺K⁺-ATPase)阻害剤であり、われわれの系ではベラトリジンとウアバインが共存する場合のみ、神経線維の変性が認められた。

以上の薬理的なNaチャンネル検出法と、胚遺伝子型の決定法を、欠失突然変異体Df (2R) M-c^{33a}の各個体に適用するため、単一胚を2分して培養を行うtwin-culture法を確立したり、1対の培養細胞の一方を用いて、 β -ガラクトシダーゼの活性を調べることにより、おのおのの個体の遺伝子型を決定した。もう一方で、100 μ M ベラトリジンと 1 mM ウアバインの存在下での神経線維の変性を調べ、その変性の程度を、生存率として定量化した。結果は、表1に示す通りである。欠失ホモ接合体は、Naチャンネル遺伝子DIC60を欠いているにもかかわらず、Naチャンネルによる神経線維の変性を示し、正常と比べて差は認められなかった。さらに、テトロドトキシンによる抑制作用がこの場合でも確かめられたので、この神経線維にはDIC60遺伝子の有無にかかわらず、Naチャンネルが存在していると結論される。以上の実験結果より、この早い発

生段階においては、DIC60以外のNaチャンネルをコードする別の遺伝子が発現していることが明らかとなった。この未知のNaチャンネル遺伝子を同定すること、および、DIC60の遺伝子産物とその発現を確認することは、残された課題である。

4. 神経の初期発生への応用

ショウジョウバエにおいて、最も初期に同定される中枢神経系の前駆細胞は、ニューロblastである。これは、胚帯の伸長の開始より約2時間にわたって、外胚葉より分離してくるものである¹¹⁾¹²⁾。われわれの培養に用いている初期胚がこの直前の段階であるという事実は重要である。つまり、この初期胚培養系を用いて、神経の初期発生におけるニューロblastの分化という重要な問題に取り組むことができるわけである。ニューロblastの分化のスイッチ機構に関与するneurogenic genesの同定とその分子遺伝学的解析がすすんでいるので、それらを初代培養系で解析することにより、神経細胞への分化や決定といった、発生生物学上のテーマにまで発展させていくことが可能である。

初期胚培養系における1つの困難は、ニューロン・クラスターを形成する個々のニューロンを分離することができないという点である¹³⁾¹⁴⁾。この点をいかに克服するかは、将来の課題である。それでも、個々のニューロblastが、それぞれどのような固有の特性をもって分化していくか、という問題は興味深く、また解析可能である。なぜなら、ニューロblastが分離してくる時点で、その位置に応じた「決定」がなんらかの意味でなされているはずであり、それが中枢神経のどの部分を構成する運命にあるのかといったことを反映しているに違いないからである。そうした一様性からのゆらぎがどの段階で生じ、かつ固定化されて、その後の分化を左右するようになるのか、細胞間相互作用はどの程度必要であるのか、などの疑問に答えるような実験が工夫できるはずである。ニューロblastへの分化に関与する遺伝子の突然変異は、ショウジョウバエでは多数同定されており、中には、Notch (N)のように古典的なものもある。体節構造を決定する遺伝子群のように、役者が出そろって完全解明を目指しうるほどに発展するかは将来の問題であるが、十分に可能性はあると思う。体節構造については、卵と

いう枠の中で仕切りが入っていく過程を追うのが正攻法であろうが、細胞分化を問題にする際には、むしろ部分に分解してから再構成するという方法も役に立つのではないと思われる。

おわりに

培養細胞系の応用可能性を考えていくと、ついには、ニューロンを素子とした神経回路を人工的に構成して *in vitro* の「ミニブレイン」を作るという夢にまで広がっていく。特定のニューロンを精製して培養し、シャーレ上でニューロン・ネットワークを作らせる。そのうえで、電気生理学的に、あるいは電位感受性色素などを用いて、その反応特性を解析していく。 *in vitro* で脳を解析するというのが、生化学だけでなく、生理学的にも可能になるような方向へ発展していく。神経回路という複雑なシステムの解析を行えるようになれば、ショウジョウバエの分子生物学¹⁵⁾ と脳との接点もより広がるはずである。

文献

- 1) Sakai, K., Okamoto, H. & Hotta, Y.: Cell Differ. Dev., 26: 107-118, 1989
- 2) Seecof, R. L., Alléaume, N., et al.: Exp. Cell Res., 69: 161-173, 1971
- 3) Cross, D. P. & Sang, J.H.: J. Embryol. Exp. Morphol., 45: 161-172, 1978
- 4) Koana, T. & Miyake, T.: Jpn. J. Genet., 57: 79-87, 1982

- 5) Shields, G., Dübendorfer, A. & Sang, J.H.: J. Embryol. Exp. Morphol., 33: 159-175, 1975
- 6) Rubin, G.M. & Spradling, A.C.: Science, 218: 348-353, 1982
- 7) Salkoff, L., Butler, A., et al.: Science, 237: 744-749, 1987
- 8) Okamoto, H., Sakai, K., et al.: Proc. Jpn. Acad., 63: 284-288, 1987
- 9) Wu, C.-F., Suzuki, N. & Poo, M.-M.: J. Neurosci., 3: 1888-1899, 1983
- 10) Suzuki, N. & Wu, C.-F.: J. Neurogenet., 1: 225-238, 1984
- 11) Poulson, D. F.: Biology of *Drosophila*: 168-274, 1950
- 12) Campos-Ortega, J. A. & Hartenstein, V.: Embryonic Development of *Drosophila melanogaster*, 1985
- 13) Seecof, R. L., Donady, J. J. & Teplitz, R. L.: Cell Differ., 2: 143-149, 1973
- 14) Furst, A. & Mahowald, A. P.: Dev. Biol., 109: 184-192, 1985
- 15) 堀田凱樹, 岡田益吉編: ショウジョウバエの発生遺伝学, 丸善, 1989

〈著者プロフィール〉

酒井邦嘉 東京大学理学系大学院学生。物理学を学んで生命現象に興味を持ち、DNA、染色体、培養細胞という順で実験を行ってきた。特に脳と記憶の問題に対して深い関心がある。

堀田凱樹 東京大学理学部物理学教室教授。医学部出身だが基礎生物学に興味をもち、ショウジョウバエの遺伝子疾患のお医者さんをしている。