

氏名(本籍)	ふくしまりょうた (山梨県) 福島亮太		
学位の種類	博士(理学)		
学位記番号	博甲第4994号		
学位授与年月日	平成21年3月25日		
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当		
審査研究科	生命環境科学研究科		
学位論文題目	Anatomical and Functional Imaging of the Pheromone Processing System in the Male Silkworm Brain (雄カイコガの脳におけるフェロモン情報処理系の形態的および機能的なイメージング)		
主査	筑波大学准教授	医学博士	中谷敬
副査	筑波大学教授	理学博士	山岸宏
副査	筑波大学准教授	理学博士	古久保-徳永 克男
副査	筑波大学教授	理学博士	神崎亮平

論文の内容の要旨

雄カイコガ (*Bombyx mori*) は、雌の性フェロモンを受容するとフェロモン源探索行動を発現する。雄カイコガの脳内の嗅覚系一次中枢である触角葉は、フェロモン情報を特異的に処理する大糸球体と、一般臭情報を処理する常糸球体からなる。処理された匂い情報は出力神経によってそれぞれの領域から、嗅覚系上位中枢である前大脳側部やキノコ体の傘部に伝達される。フェロモン情報と一般臭情報はそれぞれ前大脳側部およびキノコ体傘部内の異なる領域に投射する。キノコ体は匂い情報処理上重要な上位中枢でありながら、それを構成する内在性神経であるケニオン細胞が微小なため、カイコガではキノコ体の構造や機能は、これまで十分な分析が行われておらず、フェロモン情報や一般臭情報の処理に至っては全く知られていない。

本研究は、カイコガの匂い情報処理の高次中枢であるキノコ体の構造と機能を明らかにするため、神経解剖学的手法によって、キノコ体の構造を単一神経細胞のレベルで、解析すること、さらに、ケニオン細胞の生理計測法を確立するため、遺伝子組換え技術によりカルシウム感受性タンパク質をカイコガの神経細胞に導入し、その有用性を検証することである。

キノコ体の全体的構造は、ショウジョウバエのプロテインキナーゼ A の触媒型サブユニットである DCO と神経ペプチドである FMRFamide に対する 2 つの抗体を用いた抗体染色によりおこなった。染色パターンから、キノコ体の出力領域である葉部が γ , α'/β' , α/β , Y 領域と呼ばれる 4 つの小領域からなることを示した。 γ , α'/β' , α/β 領域は柄部によって、Y 領域は Y トラクトによって傘部と連結していた。傘部においては、葉部の小領域と対応する明瞭な染色パターンは観察されなかった。そこで、このような染色パターンとケニオン細胞の形態がどのように関係するかを調べるために、個々のケニオン細胞の細胞内染色をおこなった。近赤外微分干渉顕微鏡システムを活用し、視認下でのケニオン細胞の細胞体に効率的に電極を刺入する手法を確立し、109 例の単一ケニオン細胞の三次元形態を解析した。その結果、ケニオン細胞は、 γ , α'/β' , α/β , Y 領域のいずれかに軸索を投射する 4 タイプに分類されることを明らかにした。各タイプのケニオン細胞の樹状突起はキノコ体の傘部において特有の形態と広がりを持ち、タイプ間で分枝領域に重なりがみられた。ケ

ニオン細胞の樹状突起は、触角葉からフェロモン情報と一般臭情報を伝達する投射神経が投射する領域にまたがって分枝していた。これは、ケニオン細胞のレベルで、フェロモン情報と一般臭情報が統合される可能性を示唆するものである。また、ケニオン細胞の各タイプの樹状突起の形態と軸索の投射パターンには一定の関係があることから、それぞれのタイプのケニオン細胞は異なる情報処理上の機能を持つと考えられる。

これらの機能的な違いを検証するためには、生理学的な解析をおこなう必要がある。しかし、これまでカイコガのケニオン細胞に対しては、その微小なサイズのため有効な生理学的手法がなかった。本研究では、遺伝子組換え技術によってカルシウム感受性の蛍光タンパク質を特定のニューロン群に導入し、カルシウムイメージングをおこなう手法をカイコガではじめて適用した。本手法の実施可能性を検証するために、フェロモン受容細胞に特異的にカルシウム感受性タンパク質である GCaMP を発現させ、その応答を計測した。GCaMP 発現細胞はフェロモン刺激に対して濃度依存的に蛍光強度を変化させ、この手法によって神経活動が十分にモニターできることを確認した。今後、ケニオン細胞に GCaMP を発現させることで、ケニオン細胞の機能解析が実施できるとともに、本手法はカイコガの脳内情報処理機構を解明する上で極めて有効な手法になると考えられる。

審査の結果の要旨

本研究は、神経解剖学的手法によって、雄カイコガの嗅覚系上位中枢であるキノコ体の構造をその構成神経細胞であるケニオン細胞のレベルから解析すること、さらにケニオン細胞の生理機能計測のための手法として、遺伝子組換え技術によりカルシウム感受性タンパク質を導入し、計測する新たな手法の開発を目的としている。ケニオン細胞はその微小なサイズのため、これまで単一細胞のレベルで分析はほとんどなされなかった。しかし、著者はケニオン細胞を微分干渉顕微鏡により可視化し、細胞体に微小電極を刺入し、網羅的にケニオン細胞の構造を分析することに成功し、はじめてカイコガでキノコ体の構造を単一神経細胞のレベルで明らかにした。

また、遺伝子工学の手法によりカイコガではじめてカルシウム感受性タンパク質 (GCaMP) を特定の神経細胞に発現させ、その神経応答をきわめて高い S/N で蛍光計測する技術を確立した。この技術の確立により、今後キノコ体ばかりではなく、カイコガの脳神経情報処理の解明に新しい方法論が提供されたものと言える。本研究は、これまでカイコガの脳内で機能的に重要と考えられながらも未知であったキノコ体の構造を細胞レベルから明らかにするとともに、その機能分析をおこなうための遺伝子操作技術を確立し、昆虫の脳内情報処理機構の解明に多大の貢献した点できわめて高く評価できる。

よって、著者は博士(理学)の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。