

平成23年1月5日  
筑波大学

## 脊索動物ホヤの変態時に、グリア細胞の一種 上衣細胞が成体の神経細胞を作り出す

発表者 筑波大学大学院 生命環境科学研究科（下田臨海実験センター）  
准教授 笹倉 靖徳  
同 日本学術振興会特別研究員(PD) 堀江 健生

このたび、筑波大学生命環境科学研究科・下田臨海実験センターの研究グループ（研究代表者：笹倉 靖徳）は、甲南大学理工学部の日下部岳広教授と沖縄科学技術研究基盤整備機構の佐藤矩行博士との共同研究により、ホヤの変態時に、グリア細胞の1種である上衣細胞が成体の神経細胞を作り出すことを発見しました。

近年、従来再生することのないとされてきたほ乳類成体の神経細胞が再生すること、つまり神経細胞を作り出す能力を持つ幹細胞\*<sup>1</sup>が成体の中枢神経系に存在することが発見されてから、神経幹細胞から神経細胞が生み出される仕組みの解明が研究の焦点となっています。しかし、ほ乳類など脊椎動物の中枢神経系には膨大な数の細胞があり解析が困難なことから、その仕組みには不明な点が多く残されています。

我々の研究グループは脊椎動物に最も近縁な無脊椎動物である脊索動物\*<sup>2</sup>・尾索動物のホヤに着目して研究を進めています。ホヤの幼生は典型的なオタマジャクシの形を取り、脊椎動物と同じ動物門に属する動物ですが、その中枢神経系は単純で約350個の細胞（神経細胞が約100個、グリア細胞\*<sup>3</sup>が約250個）しかいないため、神経細胞の形成機構を調べるのに適した研究材料です。このホヤの幼生は変態して成体へと変化する際に幼生の神経系を一度失い、成体の神経系が新たに構築されると考えられてきました。このため、成体の神経細胞がどこから生じるのかが謎とされていました。

我々は蛍光タンパク質 Kaede を使って、ホヤ成体の神経細胞がどこから生じるのかを追跡しました。その結果、幼生の中枢神経系にあるグリア細胞の1種、上衣細胞が**従来の説とは異なり**変態後も残り、その一部が成体の神経細胞に分化することが分かりました。つまり、幼生の上衣細胞がホヤの変態の際に神経幹細胞として働き、成体の神経細胞を含む中枢神経系を再構築しているのです。本発見は神経幹細胞から神経細胞が作られる仕組みの解明につながる重要な発見です。

なお、これらの研究成果は1月2日付で英国科学誌ネイチャーの電子版に掲載されました。

## [研究のポイント]

今回の発見は、以下の2点が特に評価されています。

- (1) 従来、ホヤは変態する際に幼生の中樞神経系を全て失い、成体の神経系を新しく構築する  
と考えてきたが、その説を覆し、幼生の中樞神経系が基本的にそのまま残り、成体の神経系  
を作ることを証明したこと。
- (2) グリア細胞の1種上衣細胞から神経細胞が生み出されることを示した点。

## [研究の背景]

海産の無脊椎動物の1グループであるホヤ類は脊索動物門、尾索類に属します。ホヤ(図1A-C)の成体は固着生活を送り、動物か植物かも区別するのが難しい外見をしています。その幼生は典型的な「オタマジックシ型」で、魚などの脊椎動物と類似した形態をとり活発に遊泳します。またホヤ幼生は脊索や背側に中樞神経系を持つなど(図1D)、組織学的にも脊椎動物と相同の構造を有しています。最近のゲノム解析の結果からも尾索類は脊椎動物に最も近縁のグループであることが支持されています(図2)。

上記のようにホヤは幼生と成体の形態的特徴が大きく異なります。ホヤの幼生はふ化後数日のうちに変態を行い、体のつくりを大きく変化させて成体に近い体制になり(この時期は正確には幼若体と呼ばれますが、分かりやすくするために本文では成体と特に区別しません)、固着生活を始めます。この際に、幼生の中樞神経系が大きく変化するということが報告されてきました。具体的には、電子顕微鏡による観察や細胞生物学的な解析から、幼生の中樞神経系において大規模な細胞死が生じ、中樞神経系の細胞のほとんどが消失すること、逆に変態後の成体の中樞神経系は幼生の中樞神経系のごく一部、「neurohypophysial duct」という領域から新たに形成されるということが報告されていました。その一方で、幼生の神経系の細胞はもっと残るのではないかと指摘した論文も発表されており、大きな論点となっていました。そのように議論になっている1つの原因は、幼生の中樞神経系の細胞が本当に失われるのか、について直接追跡した実験がないということでした。

そこで本研究では、幼生の中樞神経系の細胞を生きたままラベルし、変態後に残るのかどうかを調べました。生きた細胞を光でラベルする手法として、「Kaede(カエデ)」という特殊な蛍光タンパク質を利用しました。Kaedeは理化学研究所脳センターの宮脇敦史博士の研究グループがサングから発見した蛍光タンパク質で、通常は緑の蛍光を発していますが、紫外光を照射することにより赤の蛍光を発するようになります。この変化は不可逆的であるため、Kaedeを細胞に発現させ、その色を赤に変化させることによりその細胞がどのように変わっていくのかを追跡することが可能になります(図3)。この技術を用いて、ホヤ幼生の中樞神経系の細胞の変態過程での変化を追跡しました。

## [研究の内容]

(本内容はわかりやすさを考え、本論文とは一部実験の順序を変えています)

材料には遺伝子解析の様々な技術が利用できるホヤの1種カタユレイボヤを利用しました。Kaede を幼生の中樞神経系の細胞で発現させる遺伝子組換え系統を作製し (図 1D)、その幼生に紫外光を照射することにより Kaede を赤に変えて、幼生の中樞神経系の細胞をラベルします。そのホヤ幼生を変態させ、変態後に中樞神経系を観察して赤の蛍光を有する細胞=幼生の中樞神経系由来の細胞があるかどうかを確認しました。もし、幼生の神経系の細胞が無くなるのであれば赤の蛍光をもつ細胞は変態後のホヤでは消失しているはずですが、結果として、幼生の中樞神経系由来の細胞が変態後も中樞神経系全体に残っていることが分かりました (図 4)。

続いて、成体の神経系を構築すると言われてきた neurohypophysial duct の細胞を追跡しました。その結果、neurohypophysial duct の細胞は変態後の中樞神経系の前側の一部に残っていますが、成体の中樞神経系の全体を構築することはないことが分かりました (図 5)。

さて、ホヤ幼生の中樞神経系には大きく分けて神経細胞とグリア細胞の2種類がありますが、どちらが変態後に残っているのかを追跡しました。まず、幼生の神経細胞を追跡しますと、一部の例外はあるものの、神経細胞のほとんどが変態後に消失することが分かりました。次にグリア細胞を調べました。グリア細胞とは神経系に存在する神経細胞以外の細胞の総称です。脊椎動物の神経系には複数の種類のグリア細胞が存在しますが、ホヤ幼生の神経系にはグリア細胞の1種である上衣細胞のみが存在することが分かっています。その上衣細胞を追跡したところ、変態後も多くの幼生由来の上衣細胞が残っており、変態後の中樞神経系を構築していることが分かりました。さらに、上衣細胞の一部は変態後に成体の神経細胞に変わっていることも同時に明らかにしました (図 6)。つまり、上衣細胞が神経幹細胞のように振る舞い、ホヤの変態の過程で神経細胞を生み出すことができることが示されたのです。

上記にもありますように、我々ヒトを含めたほ乳類の成体の中樞神経系にも神経幹細胞があり、神経細胞を生み出しています。ほ乳類の中樞神経系にも上衣細胞を含めたグリア細胞は数多く存在しています。特に上衣細胞はその神経幹細胞の正体であるという論文が出されたこともあり、神経幹細胞と近い特徴を持っていることが分かっています。今回、ほ乳類に近い無脊椎動物・ホヤの上衣細胞が神経細胞になるという発見から、「神経幹細胞とは何か」という問題に新たな知見を与えたと考えています。

## [今後の展望]

神経幹細胞の研究は生物学的興味に留まらず、損傷を受けた神経系の再生を始めとする医療的な応用が期待されている重要な研究テーマとなっており、多くの研究が進められています。その一方でほ乳類を含む脊椎動物の中樞神経系には非常に多くの細胞が存在するため、神経幹細胞からどのように多様な神経細胞が生み出されるのかを研究することは容易ではありません。前述のように、ホヤの幼生は数えられる程度の細胞から成る単純な中樞神経系を持っています。このため、神経細胞がどのように生み出されるのかを詳しく解析することが可能になります。今回の研究を基にして、ホヤの上皮細胞が神経細胞に変化する仕組みを細胞・遺伝子レベルで解明していくことを狙います。またその研究から得られた知見を脊椎動物・ほ乳類に照らし合わせることで、神経幹細胞からの神経細胞の分化の仕組みをより一般的に明らかにすること、さらには医療面への応用を狙いたいと考えています。

## [謝辞]

本研究は、文部科学省・日本学術振興会の科学研究費補助金、ナショナルバイオリソースプロジェクト、マリンバイオ共同推進機構、国立遺伝学研究所共同研究、の支援によって行われました。本研究で利用されたカタユウレイボヤ系統はナショナルバイオリソースプロジェクトに寄託されています。

## [用語解説]

- \* 1 幹細胞：多細胞生物の体を構成する細胞のうち、自己増殖能力と多分化能力を有する細胞。組織の形成などで中心的な役割を果たしている。
- \* 2 脊索動物：一生のいずれかの段階に、脊索という特徴的な組織を有する生物の一群。頭索動物（ナメクジウオなど）、尾索動物（ホヤなど）、脊椎動物が含まれる。
- \* 3 グリア細胞：神経系にある細胞のうち、神経細胞（ニューロン）以外の細胞の総称。

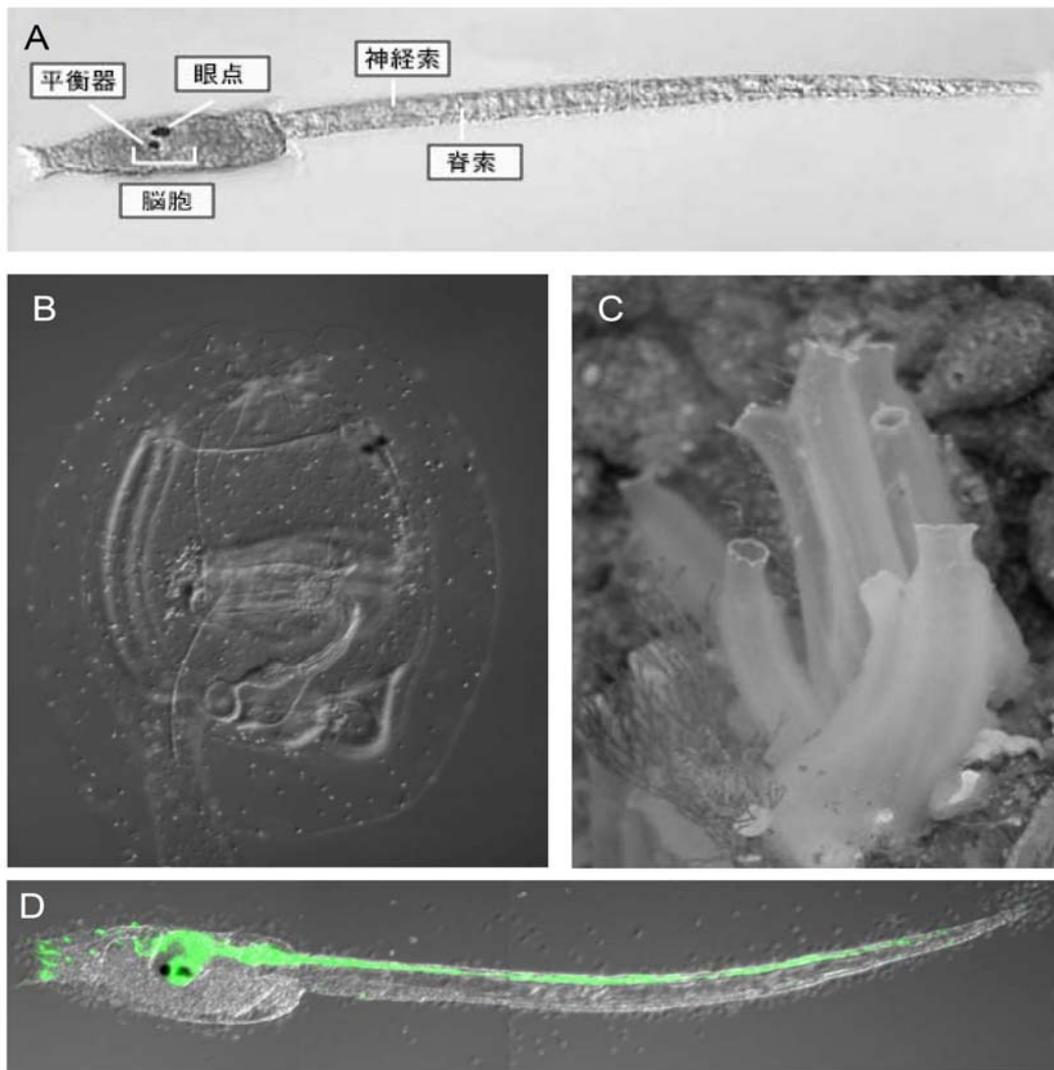


図1 ホヤの一種カタユウレイボヤ

- A. カタユウレイボヤの幼生。ホヤの幼生は一般的にオタマジクシ型の形態をしており、活発に遊泳する。背側（写真では上側）に中枢神経系（図では脳胞と神経索）を有すること、脊索を持つことなど、脊椎動物と共通の体制を備えている。
- B. 変態後数日が経過したカタユウレイボヤ。ホヤ幼生は変態により体制を劇的に変化させ、固着生活を始める。
- C. カタユウレイボヤの成体。自然界ではホヤの多くはこのように岩などに付着して生活している。
- D (ネイチャー提供) . カタユウレイボヤ幼生の中枢神経系で Kaede 蛍光タンパク質を発現させ、可視化した写真。ホヤの中枢神経系は脊椎動物と同様に背側（写真の上側）に存在する。

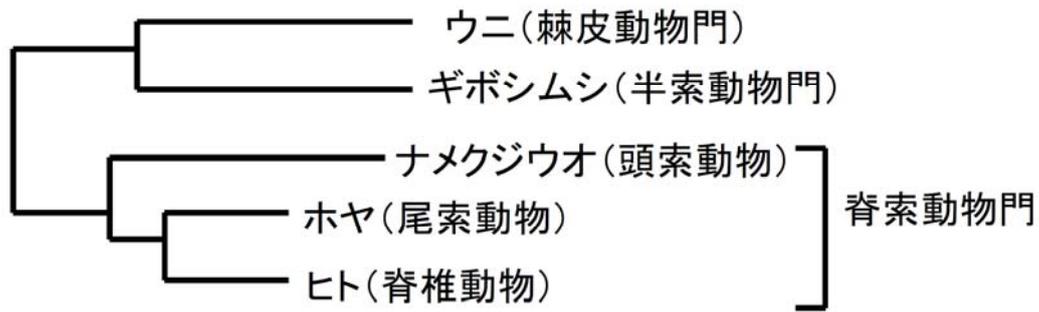


図2 ホヤ、脊椎動物とその近縁の動物の系統関係を表した系統樹。それぞれの動物グループの代表的なものをカタカナで示している。ホヤは尾索動物の一群である。尾索動物は脊椎動物と同じ脊索動物門に属しており、両者は極めて近縁な動物である。

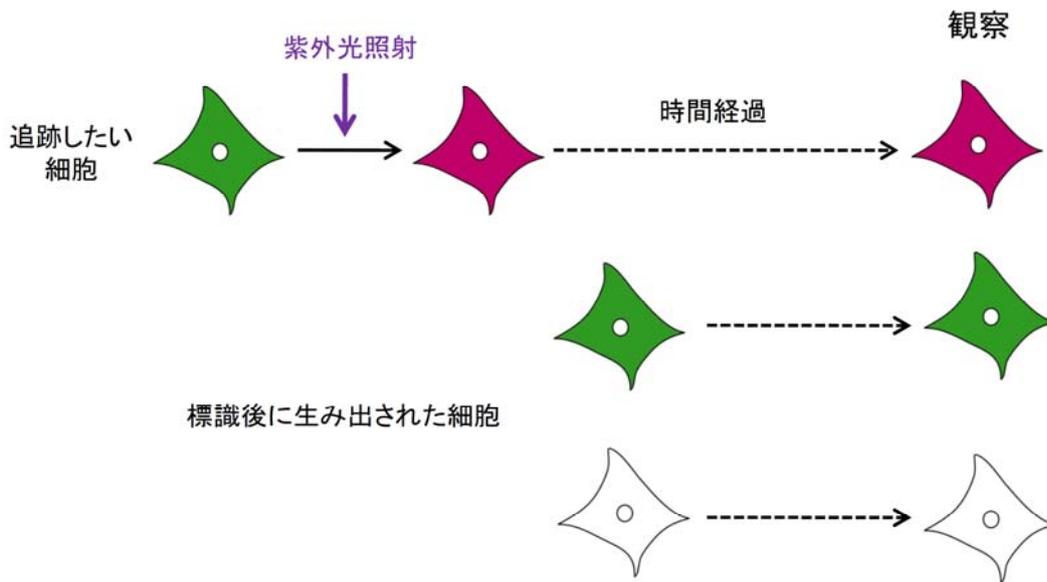


図3 Kaede 蛍光タンパク質を使った細胞追跡実験。まず、Kaede を追跡したい細胞で発現させる。Kaede は通常は緑色の蛍光を発しているが、紫外線の照射により赤の蛍光を発するようになる。この赤の蛍光で目的の細胞を標識することができる。標識後（つまり紫外線照射後）、観察したい時期まで生物を飼育して観察する。今回の実験の場合にはホヤの変態が完了するまで飼育し、変態完了後に観察する。標識の後に新たに生み出された細胞は Kaede を発現していないか、発現していても緑の蛍光のみを発する。このため、赤で標識された細胞が残っていれば、追跡していた細胞が残っていることを表している。（色を変えることが本実験の重要ポイントで、色が変わらない GFP などの蛍光タンパク質だと、幼生から残っている細胞か、新たに作られた細胞かを区別できない）

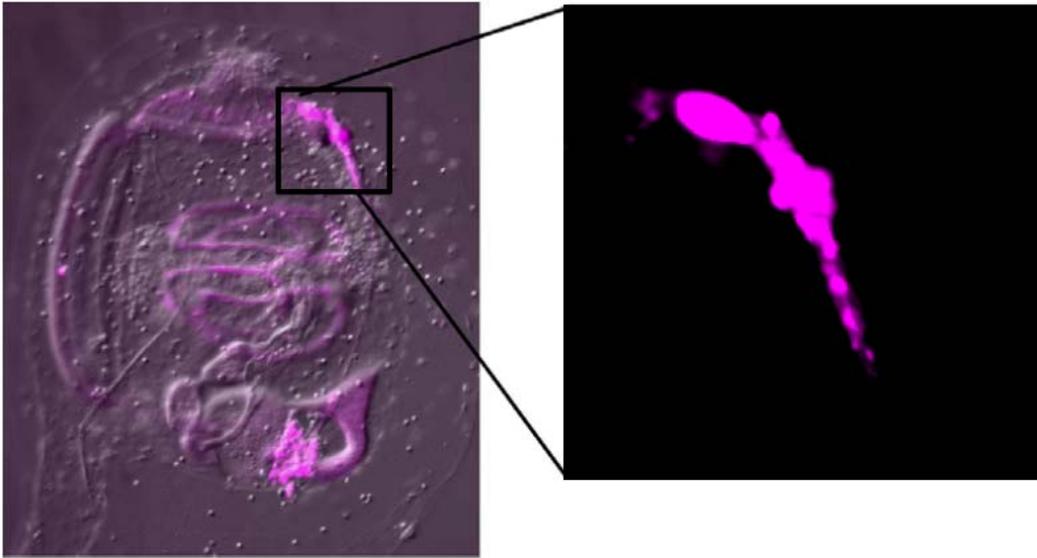


図4 幼生の中樞神経系の細胞が残っていることを示した写真。左は、変態後のホヤの全体像。四角で囲った領域に成体の中樞神経系が存在する。右はその領域で赤色蛍光を発する細胞が存在することを示した拡大図。このように、赤色 Kaede で標識された幼生の神経系由来の細胞が変態後に残っており、成体の中樞神経系を構成している。写真はネイチャー提供。

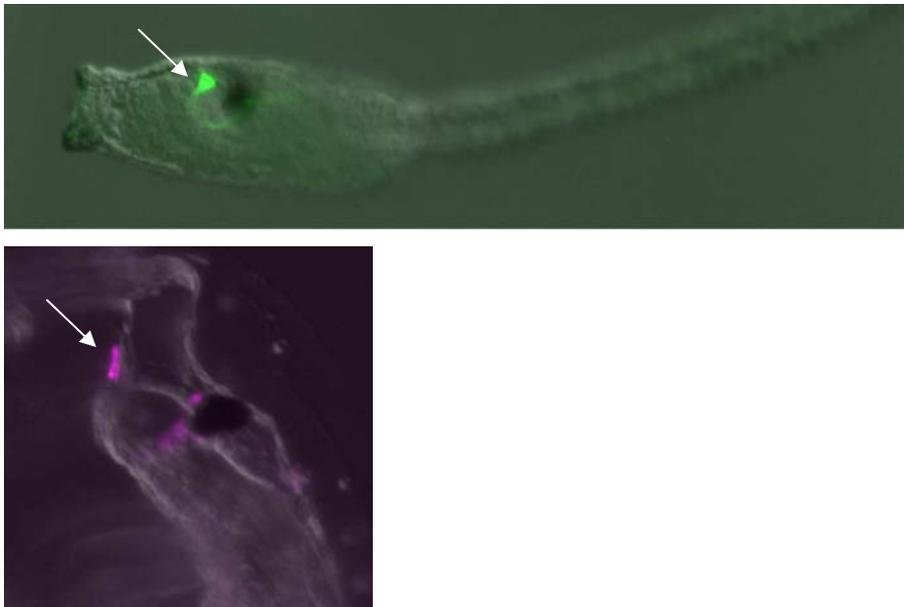
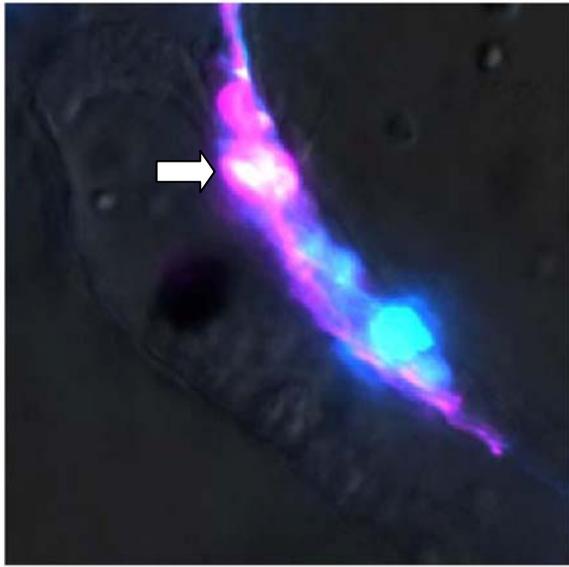


図5 neurohypophysial duct の細胞を追跡した実験。上は幼生の neurohypophysial duct (矢印) で Kaede (緑色) を発現させた個体。neurohypophysial duct は中枢神経系の前方にあり、将来の口になる領域とつながっている。下は neurohypophysial duct の細胞を追跡した実験結果。変態後、neurohypophysial duct の細胞は矢印の領域のみに認められ、中枢神経系全体を構築していないことが分かる。写真はネイチャー提供。



**図6** 幼生の上皮細胞から成体の神経細胞が形成されたことを示した写真。赤色蛍光で幼生の上衣細胞由来の細胞をラベルし、さらに神経細胞では青色の蛍光を発するように工夫している。図の真ん中より少し上、矢印で示した細胞は、赤と青の両方の蛍光を発現しており、図では白く見えている。写真はネイチャー提供。