

学 位 論 文

非古典的 Rac-Cofilin 伝達経路による actin 骨格制御を介した

ショウジョウバエキノコ体神経の軸索伸長調節における

Sickie 遺伝子の機能の研究

(Studies on the function of Sickie in regulation of the

F-actin-mediated axonal growth of *Drosophila* mushroom body

neurons by the non-canonical Rac-Cofilin pathway)

平成 26 年 10 月 博士（理学）申請

東京大学大学院理学系研究科

生物化学専攻

阿 部 崇 志

目次

Abstract (日本語)	6
Abstract (英語)	8
1. 序論	10
1.1 中枢神経系の発生機構解析のモデルとしてのキノコ体	11
1.2 神経軸索形成における Rac 伝達経路と Cofilin 伝達経路	16
2. 材料および方法	
2.1 ショウジョウバエ系統	20
2.2 Gal4-UAS システム	24
2.3 MARCM 法	25
2.4 免疫組織化学染色	29
2.5 <i>in situ</i> hybridization	31
2.6 Sickie の同定と変異体作成	32
2.7 Sickie の UAS 系統作成	35
2.8 Sickie の抗体作成	41
2.9 表現型の定義と分類	42
2.10 遺伝学的相互作用の統計的解析	44
2.11 Western blot によるリン酸化 Cofilin の検出	47
2.12 F-actin レベルの解析	48

3. 実験結果

3.1	<i>sickie</i> 変異体の同定	49
3.2	新生のキノコ体神経の軸索伸長における <i>Sickie</i> の細胞自律的必要性	59
3.3	<i>sickie</i> 変異体と Rac-Cofilin シグナル構成因子の変異体の表現型の類似性と遺伝学的相互作用	73
3.4	<i>sickie</i> 変異体と Rac-Cofilin 経路構成因子の変異体の神経軸索における F-actin レベルの上昇	84
3.5	<i>sickie</i> 変異体と Rac-Cofilin シグナル構成因子の変異体の神経軸索におけるリン酸化 Cofilin と F-actin レベルの変化の同時検出	95
3.6	Cofilin の強制的機能亢進による <i>sickie</i> 変異体の表現型の緩和効果	109
3.7	LIMK 強制発現による F-actin を介した軸索伸長異常に対する <i>Sickie</i> の抑制作用	114
3.8	LIMK に対する Ssh および Pak 非依存的 Rac の軸索伸長異常抑制作用における <i>Sickie</i> の必要性	122
3.9	<i>Sickie</i> の Ssh 依存的な Cofilin を介した F-actin 骨格と軸索伸長の制御	130
3.10	<i>Sickie</i> と微小管制御因子との相互作用	146
3.11	(補遺) Sevenless 経路および Robo-Sos 経路と <i>Sickie</i> の相互作用	153
3.12	(補遺) <i>abi</i> および <i>abl</i> 変異体の表現型の解析と <i>sickie</i> との相互作用	155
3.13	(補遺) <i>chic</i> および <i>cib</i> 変異体の表現型の解析と <i>sickie</i> との相互作用	170

3.14 (補遺) <i>Pak</i> および <i>dock</i> 変異体の表現型の解析と <i>sickie</i> との相互作用	176
3.15 (補遺) <i>Sickie</i> に関するその他の解析結果	183
4. 考察	
4.1 actin 細胞骨格を介したキノコ体神経軸索の伸長における非古典的 Rac-Cofilin 経路の役割	188
4.2 生体神経軸索におけるリン酸化 Cofilin と F-actin の発現変化の同時検出	191
4.3 <i>Sickie</i> の未知の分子機能	193
5. 結論	196
6. 謝辞	200
7. 引用文献	202

Abstract

Rac-Cofilin 経路は細胞骨格の再編成を制御し、神経軸索の形成に必須の役割を果たす。古典的には、RacGTPase (Rac) は下流の Pak-kinase (Pak)、LIM-Kinase (LIMK) によって伝達される Rac-Pak-LIMK 経路のスイッチとして機能し、Filamentous-actin (F-actin) の切断・脱重合を行う Cofilin に対し抑制的に機能することで、actin 骨格再構成を介した軸索伸長を抑制することが知られている。一方、ショウジョウバエにおいては、Rac は Pak 非依存的な経路を介して軸索伸長において促進的に機能することも示唆されていた。しかしながら後者の非古典的 Rac 経路が、最終的に Cofilin 依存的な actin 骨格の制御に寄与することで軸索伸長を促進しているのかどうかは明らかではなかった。また、actin 骨格や Cofilin のリン酸化状態の内在性レベルでの変化を、同一個体内の発生過程の神経軸索において同時に検出するという試みはこれまでどの生物種においても報告されていなかった。

本研究では、ヒトの Neuron-navigator-2 (NAV2) のホモログである Sickie が、ショウジョウバエキノコ体の神経軸索伸長を細胞自律的に正に制御し、その制御は非古典的 Rac-Cofilin 経路を介していることを示唆する結果を得た。Sickie は F-actin に富む新生のキノコ体神経軸索において特に顕著な発現が観察された。変異体は軸索伸長異常の表現型を示したが、キノコ体特異的に Sickie の transgene を発現させることでレスキューされた。種々の制御因子との相互作用の検証の結果、Sickie は Rac-Cofilin 経路の構成因子と密接な遺伝学的な相互作用を示すことが明らかになった。Mosaic analysis with a repressible cell marker (MARCM) 法によって変異体組織をモザイク状に誘導した結果、*sickie* や Rac-Cofilin 経路構成因子の変異体の神経軸索では、F-actin とリン酸

化（不活性型）Cofilin の発現レベルが変化していることが明らかになった。また、*sickie* 変異体の発生過程の脳では、リン酸化 Cofilin の発現レベルが上昇しており、*sickie* 変異体下で Cofilin の機能亢進を誘導すると表現型が緩和することを見出した。さらに、Cofilin 抑制因子 LIMK の強制発現の表現型が Sickie の強制発現により抑制できるが、Cofilin の脱リン酸化による活性化を担う Slingshot (Ssh) の変異体下では抑制できないことを明らかにした。加えて、Ssh または Pak 非依存性 Rac の LIMK 強制発現に対する抑制作用が *sickie* 変異体下では正常に発揮されないことを示す結果を得た。

当初、Sickie の哺乳類ホモログである NAV は、微小管集積因子として同定され解析されてきたため、微小管関連因子との関連も調べた結果、Sickie は微小管＋端集積因子 EB1 との結合モチーフをもち、EB1、 β -tubulin と遺伝学的相互作用を示すことが明らかになった。

以上の結果から、Sickie は非古典的 Rac 経路を介し、Ssh-Cofilin 経路依存的な F-actin の再編成に関わり、微小管制御因子と相互作用することで神経軸索伸長を制御するモデルを提唱する。

Abstract

The RacGTPase (Rac)-Cofilin signaling pathway is essential for cytoskeletal remodeling to control axonal development. Rac canonically signals through the downstream Pak-kinase (Pak) and LIM-Kinase (LIMK) to suppress the Cofilin-dependent axonal growth (Rac-Pak-LIMK pathway) and also signals through a Pak-independent, non-canonical pathway to promote outgrowth. However, whether this non-canonical pathway converges to promote Cofilin-dependent Filamentous-actin (F-actin) reorganization in axonal growth remains elusive. We demonstrate that Sickie, a human microtubule-associated protein (MAP) Neuron-navigator-2 (NAV2) homolog, cell-autonomously regulates the axonal growth of *Drosophila* mushroom body (MB) neurons via the non-canonical pathway. Sickie was prominently expressed in the newborn, F-actin-rich axons of MB neurons. A *sickie* mutant exhibited axonal growth defects, and its phenotypes were rescued by exogenous expression of Sickie. We observed phenotypic similarities and close genetic interactions among Sickie and Rac-Cofilin signaling components. Using the mosaic analysis with a repressible cell marker (MARCM) technique, distinct F-actin and phospho-Cofilin (P-Cofilin) patterns were detected in developing axons mutant for *sickie* and Rac-Cofilin signaling regulators. The upregulation of Cofilin function alleviated the axonal defect of the *sickie* mutant. Epistasis analyses revealed that Sickie suppresses the LIMK overexpression phenotype Slingshot (Ssh) phosphatase -dependently and is required for functions of the Pak-independent Rac1 and

Ssh to counteract LIMK. Finally, we also found the genetic interactions among Sickie and microtubule components, EB1 and β -tubulin. We propose that Sickie controls axonal growth by regulating F-actin remodeling via the non-canonical Rac-Ssh-Cofilin pathway and microtubule dynamics.

1. 序論

現象の認知や記憶学習、意思決定といった脳の高次機能が発揮されるためには、その物理的基盤として機能的な神経回路構造が構築されることが必要である。脳を構成する基本単位としての神経細胞は、軸索の伸長や分岐、樹状突起の形成や刈込み、シナプス形成など、多様な発生学的プロセスを経て、精巧な神経回路を形成する。その際、ゲノムにコードされた遺伝情報が、適切な時空間的制御をうけて機能発現することが分子レベルでの土台となっていると考えられる。これらの原則は、ヒトやマウスなどの高等脊椎動物はもちろん、神経系が比較的単純であるショウジョウバエのような無脊椎動物においても同様であると考えられ、実際、これまでに線虫やハエといった比較的神経系の単純なモデル動物を用いることで、中枢神経系の発生において重要な役割を担う遺伝子が多数同定され、分子機能の解明がなされてきた。

1.1 中枢神経系の発生機構解析のモデルとしてのキノコ体

ショウジョウバエの脳には、嗅覚連合学習記憶の形成に重要な役割を果たすキノコ体と呼ばれる神経構造体が存在する (Guven-Ozkan and Davis, 2014)。キノコ体は脳の左右に一对で存在し、嗅覚情報の入力を受け取る 3 次神経節として機能する (図 1)。成虫脳において、各脳半球には約 2,000~2,500 個のキノコ体神経細胞が存在し、それらは遺伝的に同一な 4 つの神経幹細胞から逐次的に分裂増殖して生み出される (Ito et al., 1997)。キノコ体神経細胞の細胞体は脳の背側後方に位置し、前方へ向かって樹状突起と軸索を伸長させる (図 2)。細胞体に近接した前方領域で、樹状突起は多数集まり、projection neuron などの 2 次神経からの入力を受ける場としての calyx を形成する。一方、神経軸索は前方への伸長を続ける過程で束状化し、peduncle と呼ばれる太い神経線維束を形成する。その後、軸索は脳前方領域において背側と正中線側に分岐し、脳背側末端と正中線付近まで投射伸長する。キノコ体神経においては、大別するとその発生段階によって少なくとも γ 、 α'/β' 、 α/β 神経の 3 種類のサブタイプが逐次的に生み出されることが明らかになっており、成虫脳においては α' 、 α 神経軸索が各々束状化した α' lobe、 α lobe を背側方向に形成し、 γ 、 β' 、 β 神経軸索は正中線側にそれぞれ束状化した γ lobe、 β' lobe、 β lobe 構造を形成する (図 3) (Lee et al., 1999; Zhu et al., 2003)。また、キノコ体の新生神経の軸索は peduncle や lobe といった軸索の束状構造の中心領域を通して伸長することが知られており、これらの中心領域では FasII の発現レベルが低い (図 4) (Kurusu et al., 2002)。

このように、キノコ体は解剖学的・発生学的知見が蓄積されていることから、記憶・学習といった脳高次機能の解析だけでなく、中枢神経系の発生機構の解

析のためのモデルとしても利用されてきた。とりわけ、軸索の伸長や分岐、刈込みによる再構成などに寄与する、様々な細胞骨格制御因子や軸索ガイダンス分子、シグナル伝達分子などの生体内での分子機能の解明にも大きく貢献してきたといえる (Awasaki et al., 2011; Awasaki et al., 2006; Boulanger et al., 2011; Miura et al., 2013; Shimizu et al., 2011; Yu et al., 2013; Zheng et al., 2006; Zhu et al., 2006) 。

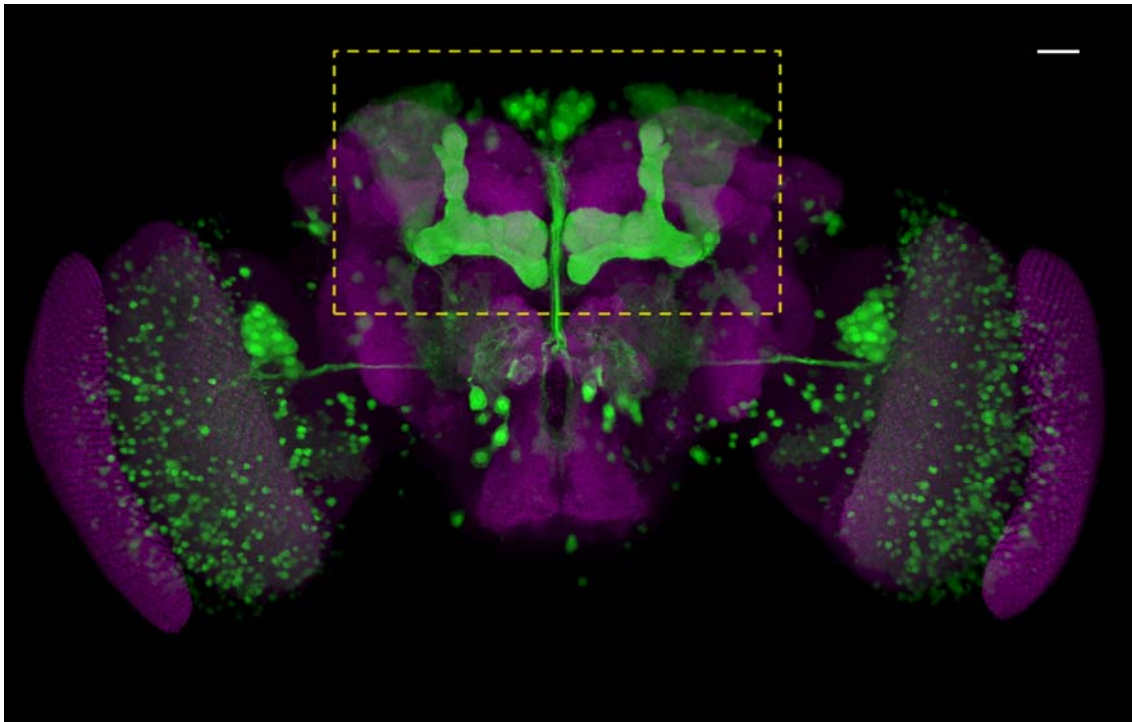


図1. ショウジョウバエ成虫脳キノコ体。キノコ体神経の全サブタイプで発現する *OK107-gal4* ドライバーで *UAS-GFP* を発現させ、蛹期後期脳におけるキノコ体をラベルした(黄点線枠内)。脳の全体構造は nc82 抗体でラベルした(マゼンタ)。Scale bar: 20 μ m

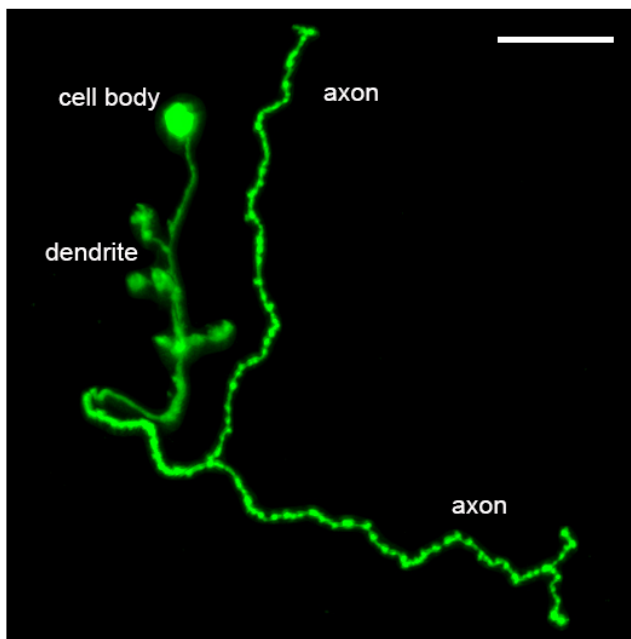


図2. MARCM 法により単一細胞レベルでラベルしたキノコ体 α / β 神経。キノコ体神経の細胞体は脳の背側後方に位置し、前方へ向かって神経線維を伸長させ、やがて樹状突起と軸索に分岐する。神経軸索は前方への伸長を続け、脳前方領域で正中線側と背軸側に更に分岐して伸長する。Scale bar: 20 μ m

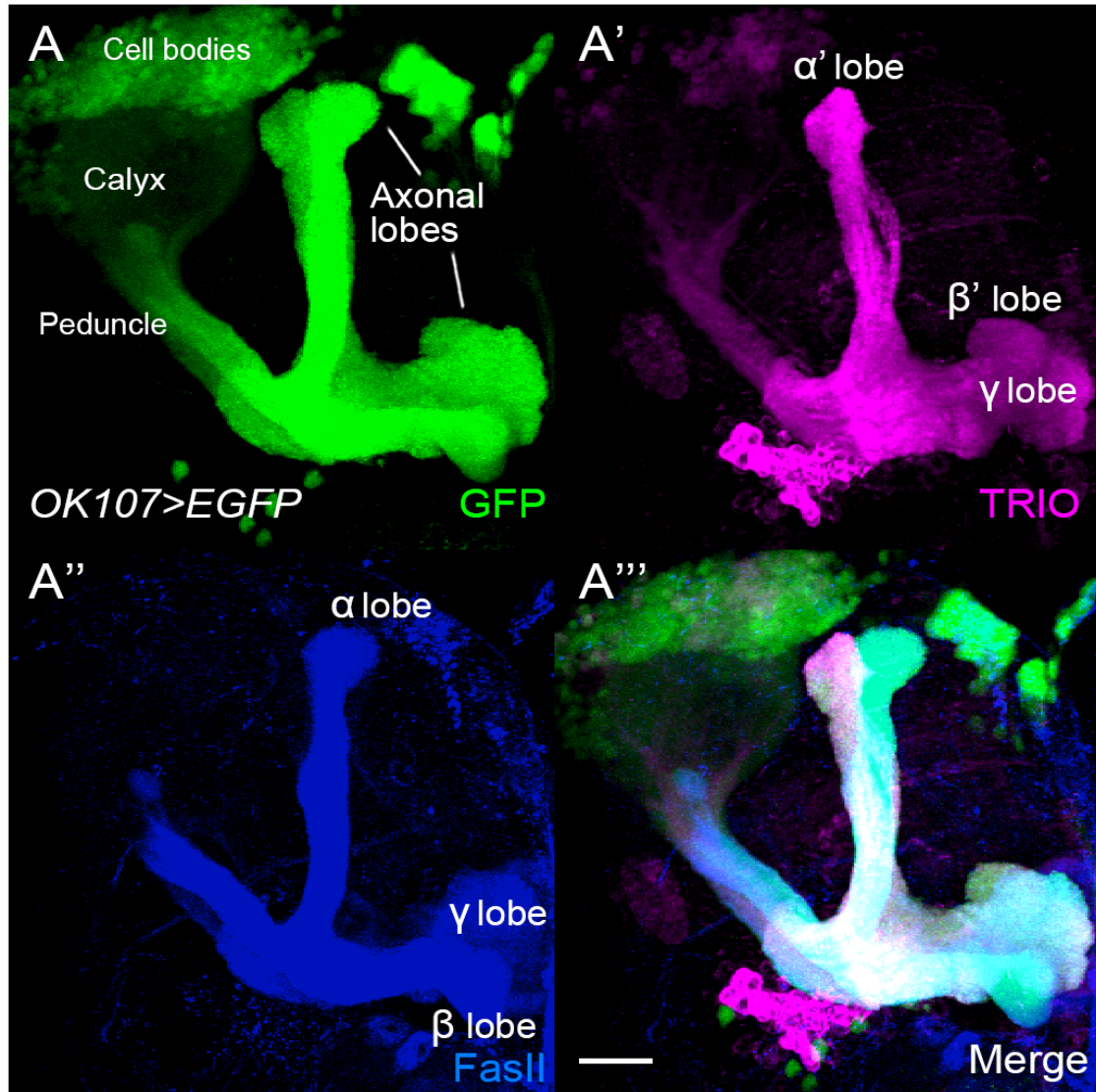


図3. (A)キノコ体神経細胞の樹状突起は、細胞体に近接した前方領域で多数集まり、projection neuron などの 2 次神経からの入力を受ける場としての calyx を形成する。神経軸索は前方への伸長を続ける過程で束状化し、peduncle と呼ばれる大線維束を形成する。(A',A'')成虫脳においては α' 、 α 神経軸索が各々束状化した α' lobe、 α lobe を背側方向に形成し、 γ 、 β' 、 β 神経軸索は正中線側にそれぞれ束状化した γ lobe、 β' lobe、 β lobe 構造を形成する。Scale bar: $20\mu\text{m}$ 。

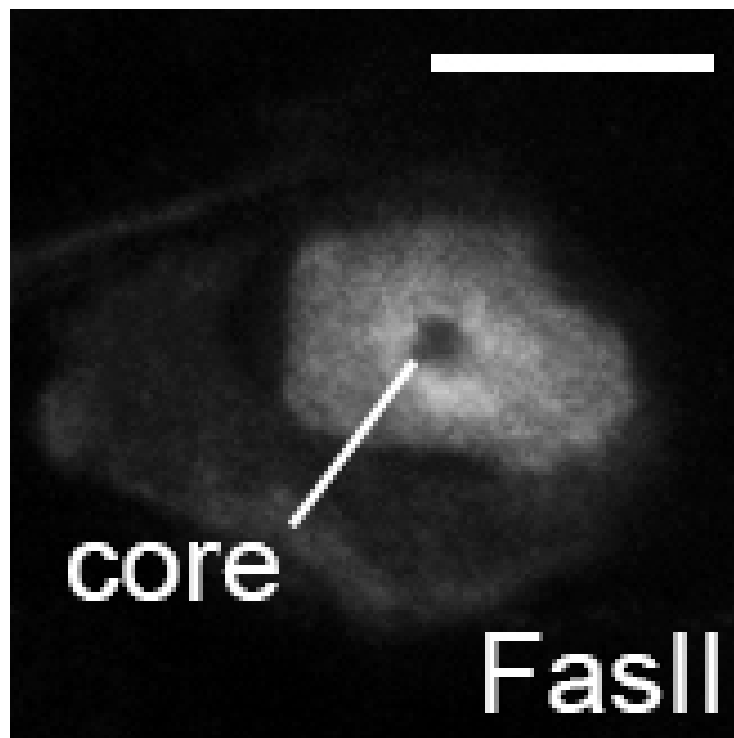


図4. キノコ体神経軸索束の peduncle 領域断面図。新生神経の軸索は peduncle や lobe の線維束構造の中心領域(core)を通して伸長するが、これらの中心領域では、FasII の発現レベルが低い。Scale bar:20 μ m

1.2 神経軸索形成における Rac 伝達経路と Cofilin 伝達経路

神経系の発生において機能する因子の中でも特に、Cofilin（ショウジョウバエでは Twinstar/Tsr の別名がある）と RhoGTPase は神経軸索の形成に伴って起こる細胞骨格制御の際に鍵となる因子である（Auer et al., 2011; Billuart et al., 2001; Hall and Lalli, 2010; Lee et al., 2000）。Cofilin は F-actin の切断と脱重合の実行因子として機能することで、軸索伸長制御において必須の役割を担う（Bernstein and Bamburg, 2010）。Cofilin は Slingshot (Ssh) フォスファターゼによる脱リン酸化によって活性化され、LIM-Kinase (LIMK) によるリン酸化によって不活性化される（Mizuno, 2013; Ono, 2007）。このため、Ssh の機能欠失変異体または LIMK 過剰発現変異体では、キノコ体神経軸索の伸長阻害の異常が起こることが知られている（Ng and Luo, 2004）。RhoGTPase ファミリーに属する低分子量 G タンパク質は、細胞骨格の再編成において重要な役割を担い、神経軸索の投射や分岐、伸長に必須であることが明らかにされてきた。なかでも Rac は、神経軸索の伸長制御の際に抑制性、促進性の両方向性のシグナル因子として機能していることが示唆されていた（Hakeda-Suzuki et al., 2002; Luo et al., 1994; Ng and Luo, 2004）（図 5）。一つ目は、Pak 依存的な、古典的な Rac-Pak-LIMK 経路のスイッチとしてであり、この経路は Cofilin 依存的な神経軸索伸長において抑制的に働く（Ng et al., 2002）（赤矢印）。Rac の下流の Pak の過剰発現変異体において軸索伸長が阻害されることや、LIMK 強制発現による伸長阻害が、Rac または Pak のヘテロ変異体下では抑制されることが報告されている（Ng and Luo, 2004）。もう一方の機能は、Pak 非依存的な、軸索伸長を促進する経路の構成因子としての役割であり、Rac 機能欠失変異体で観察される重篤な軸索伸長阻害が、Pak を活性化する能力は持たないが

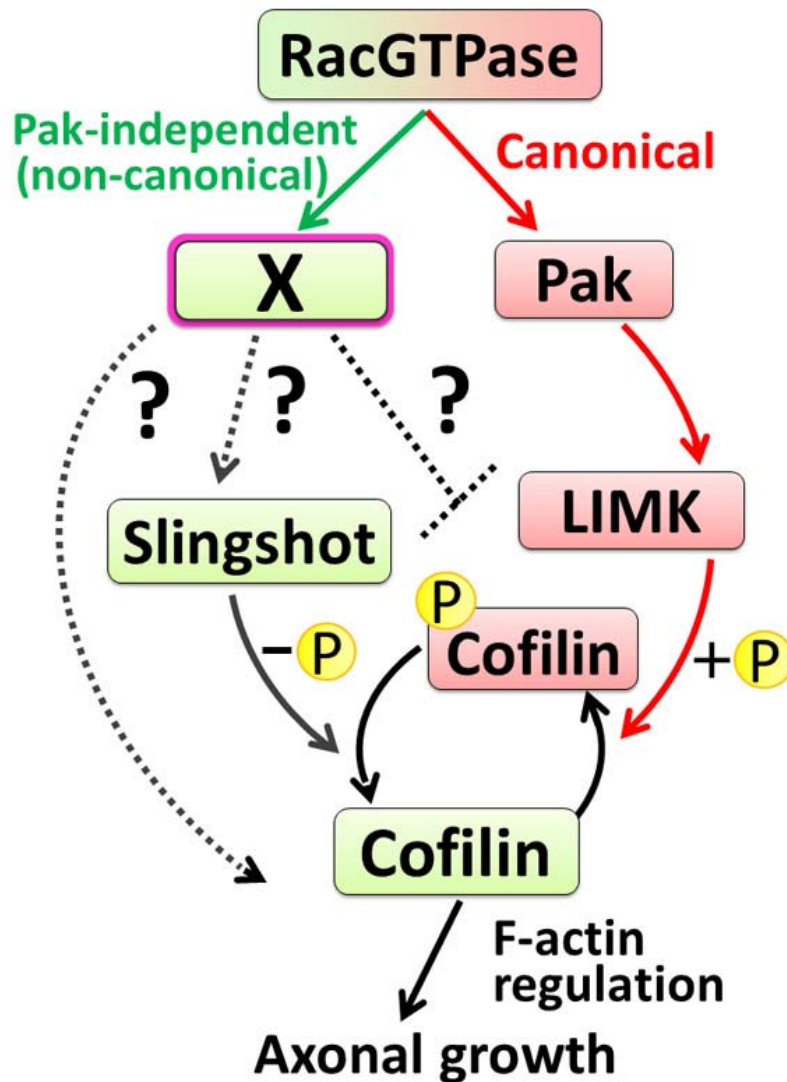


図5. これまでに提唱されている Rac-Cofilin 経路による軸索伸長制御のモデル。赤矢印は古典的 Rac-Pak-LIMK 経路で、Cofilin をリン酸化することにより軸索伸長を抑制的に制御する。緑矢印は軸索伸長において促進的にはたらく、Pak を介さない、非古典的な Rac 経路。未知の仲介因子 X の存在が示唆されていたが、Cofilin 依存的な軸索伸長を直接制御するのか、Slingshot を介するのか、あるいは古典的経路を抑制することで軸索伸長を促進するのかは一切不明であった(黒点線)。

Lamellipodia の形成には影響を与えないアミノ酸置換型 Rac (Rac1^{Y40C}) (Joneson et al., 1996; Lamarche et al., 1996) の強制発現によって緩和されることや、LIMK 強制発現による伸長阻害が Rac1^{Y40C} の共発現によって抑制されることが示されている (Ng et al., 2002) (緑矢印)。後者の知見は同時に、Pak 非依存的な Rac 経路を仲介する新規因子の存在も同時に示唆していた。

しかしながら、この非古典的 Rac 経路が最終的に Cofilin 依存的な actin 骨格 (F-actin) の制御に寄与し、軸索伸長を促進的に制御しているのかどうかは不明瞭であった (Kligys et al., 2009; Nagata-Ohashi et al., 2004) (黒点線)。また、これまでの研究の多くは生化学的手法や培養細胞の系において Cofilin や F-actin の機能や性状を解明してきたが、生体内における内在性の Cofilin の活性化状態と細胞骨格の再構成の状態を明らかにするためには、Cofilin のリン酸化状態と F-actin の発現レベルの変化を同時に観察することが重要であると考えられた。しかし、これらを同一個体内の中樞神経系で同時に観察したという報告はこれまでになされておらず、*in vivo* の中樞神経系において、Rac-Cofilin 経路を介した F-actin 依存的な神経軸索伸長の制御がどのようになされているかは不明であった。

以上の問題に取り組むために、Gal4-UAS システムをベースにしたエンハンサートラップスクリーニングと *in situ* hybridization による発現の検証、キノコ体特異的 Gal4 ドライバーを用いた RNA 干渉法 (RNAi) によるスクリーニングを行い (阿部, 2008)、キノコ体の神経軸索の伸長を制御し、Rac-Cofilin 経路と遺伝学的に相互作用する新規因子の単離、同定を試みた。スクリーニングの結果、actin 結合性のタンパク質に保存される Calponin homology ドメインを持ち (Banuelos et al., 1998)、微小管+端集積因子として知られるヒト Neuron-navigator-2 (NAV2) のホモログである Sickie を候補因子として同定

した。Sickie は当初ショウジョウバエ S2 細胞を用いたゲノムワイドな大規模 RNAi スクリーニングにより、自然免疫のシグナル伝達経路への関与のモデルが提唱されていた (Foley and O'Farrell, 2004)。しかし、キノコ体の軸索伸長において、上記報告のモデルに示された制御因子 Relish (NF- κ B 因子) や Dredd (Death related ced-3/Nedd2-like caspase) との明らかな遺伝学的相互作用は観察されなかった (未発表データ)。一方、Sickie は発生過程の脳組織の広範な領域で発現が確認されたが、特に新生のキノコ体神経軸索で顕著な発現を示し、Rac-Cofilin 経路の制御因子と密接な遺伝学的相互作用を示すことが明らかになった。本論文では、機能解析の焦点を Rac-Cofilin 経路による細胞骨格の再構成を介した軸索伸長の制御機構に絞り、遺伝学的解析と、F-actin とリン酸化 Cofilin の免疫組織化学的な解析の結果を元に、生体内における軸索伸長の制御機構の理解に資すると期待される新たな制御モデルを提示したい。

2. 材料および方法

2.1 ショウジョウバエ系統

各種系統は RNA 干渉法の実験など特別なことわりがない限り、25℃のインキュベーター内で飼育した。2 番、3 番染色体に各種変異、導入遺伝子が存在する各種系統はそれらの単独のオス個体と *yw* 変異バックグラウンドのバランサー系統のメスと掛け合わせ、再樹立したものを解析に用いた。以下の系統を解析に用いた。

yw: コントロールとなる系統。

yw; sickie^A: 本研究で作製された *sickie* コード領域特異的な欠失が存在する機能欠失変異体。

yw; sickie^{A384}: 本研究で同定された *piggyBac* 挿入型変異体 (Kyoto DGRC:114425, Bloomington Stock Center:16102)

yw; Df (2L) ED1303: *Sickie* の遺伝子座全体を含む Deficiency 系統。 (Kyoto DGRC: 150407)

yw; slingshot¹⁻⁶³: 機能欠失変異体 (Niwa et al., 2002)

yw; cofilin^{N96A}: 機能欠失変異体 (Chen et al., 2001)

yw; Rac1^{J11}, and Rac1^{J11}Rac2^ΔMt^Δ: 機能欠失変異体 (Ng and Luo, 2004)

yw; Sp/CyO; e, Pr/TM6b, Tb: バランサー系統 (多羽田研究室ストック)

yw;; TM3/TM6b, Tb: バランサー系統 (多羽田研究室ストック)

yw; Sp/CAG; e, Pr/TM6b, Tb: バランサー系統 (自作)

yw; L, Pin/CKG : バランサー系統 (自作)

yw; L, Pin/CAG : バランサー系統 (自作)

yw; abi^{KO} : 機能欠失変異体 (Lin et al., 2009)

yw; Df(3R)ED5634 : *abi* の遺伝子座を含む *Deficiency* 系統 (Ryder et al., 2007)

yw; abl² : ハイポモルフ変異体 (Hsouna et al., 2003)

yw; abl⁴ : ハイポモルフ変異体 (Liebl et al., 2003)

yw; Sos^{Ea-6} : アモルフ変異体 (Rogge et al., 1991)

yw; Sos^{Ea7} : 機能欠失変異体 (Rogge et al., 1991)

sevenless¹⁴ : 機能欠失変異体 (Kussick et al., 1993)

yw; drk^{k02401} : P 因子挿入変異体 (Roch et al., 1998)

yw; drk¹⁰⁶²⁴ : P 因子挿入変異体 (Heuer et al., 1995)

yw; chic²²¹ : アモルフ変異体 (Verheyen and Cooley, 1994)

yw; chic⁰¹³²⁰ : 機能欠失変異体 (Cooley et al., 1992)

Df (2L) GpdhA : *chic* の遺伝子座を含む *Deficiency* 系統 (Wills et al., 1999)

cib^{E10} : 機能欠失変異体 (Boquet et al., 2000)

cib^P : 機能欠失変異体 (Boquet et al., 2000)

Pak⁶ : アモルフ変異体 (Kim et al., 2003)

Pak¹¹ : アモルフ変異体 (Hing et al., 1999)

dock⁰⁴⁷²³ : アモルフ変異体 (Garritty et al., 1996)

elav-Gal4 : 全神経で発現 (DGRC Kyoto: 105921)

OK107-Gal4 : キノコ体で発現 (DGRC Kyoto: 106098)

NP7175-Gal4 : キノコ体新生 α/β 神経で発現 (DGRC Kyoto: 114120)

EB1-Gal4 : Ellipsoid Body で発現 (Wang et al., 2002)

UAS-mCD8::GFP : 細胞膜局在型 GFP (Lee and Luo, 1999)

UAS-Rac1^{V12} : 恒常活性化型 Rac1 (Luo et al., 1994)

UAS-Rac1^{N17} : ドミナントネガティブ型 Rac1 (Luo et al., 1994)

UAS-cMyc::Rac1^{Y40C} : Pak エフェクタードメイン変異型 Rac1 (Ng and Luo, 2004)

UAS-Pak^{Myr} : 膜局在型 Pak (Hing et al., 1999)

UAS-HA::slingshot^{WT} : 野生型 Slingshot (Niwa et al., 2002)

UAS-HA::slingshot^{CS} : 不活性型 Slingshot (Niwa et al., 2002)

UAS-HA::LIMK^{WTM6} : 野生型 LIMK (Ng and Luo, 2004)

UAS-LIMK^{KD} : 恒常活性化型 LIMK (Ang et al., 2006)

UAS-cofilin^{WT} : 野生型 Cofilin (Ng and Luo, 2004)

UAS-cofilin^{S3A} : 恒常活性化型 Cofilin (Ng and Luo, 2004)

UAS-cofilin^{S3E} : 不活性型 Cofilin (Ng and Luo, 2004)

UAS-GFP::abi : GFP 融合型 abi (Lin et al., 2009)

UAS-abl^{F2}, *UAS-abl^{F3}* : 野生型 Abl (Van Vactor, 2004.8. personal communication to FlyBase)

UAS-EB1::GFP : GFP 融合型 EB1 (Rolls et al., 2007)

UAS- α -tubulin::GFP: GFP 融合型 α -tubulin (Kaufman, T. 2003.8, personal communication to FlyBase)

RNA 干渉に用いた *UAS-dsRNA* 系統は VDRC stock center (Vienna) , 国立遺伝学研究所 (NIG) 、Bloomington Stock center から分譲されたものを使用した。

UAS-sickie-RNAi (VDRC transformant ID: 31318)

UAS-cofilin-RNAi (VDRC transformant ID: 110599)

UAS-EB1-RNAi (VDRC transformant ID: 24451)

UAS- β -tubulin-RNAi (VDRC transformant ID: 24144)

UAS-dicer2 (VDRC transformant ID: 60009)

UAS-abi-RNAi^{KK100714} (VDRC transformant ID: 100714)

UAS-abi-RNAi^{NIG9749R-2} (NIG ID: 9749R-2)

UAS-Robo2^{RNAi} (Bloomington ID: 9286)

UAS-LIMK-RNAi^{l.1} (Bloomington ID: 9240)

UAS-LIMK-RNAi^{2.1} (Bloomington ID: 9240)

UAS-dock-RNAi^{TRiP} (Bloomington ID: 27728)

UAS-actin-5C-RNAi (VDRC transformant ID: 7140)

2.2 Gal4-UAS システム

酵母由来の転写因子である Gal4 とその標的配列である UAS (Upstream Activating Sequence) を用いることで、Gal4 の発現パターン依存的に UAS 下流の任意の遺伝子の発現を制御することが可能となる技術である (Brand and Perrimon, 1993) (図 6)。目的の組織や発生段階で発現する遺伝子のプロモータやエンハンサーの制御下で Gal4 を発現する系統と、UAS の下流に目的遺伝子の cDNA や Inverted-Repeat 配列が組込まれた系統を掛け合わせると、次世代ではその Gal4 の時空間的発現パターン依存的に目的遺伝子を過剰発現させたり、RNA 干渉を誘導したりすることが可能である (Mohr and Perrimon, 2012)。

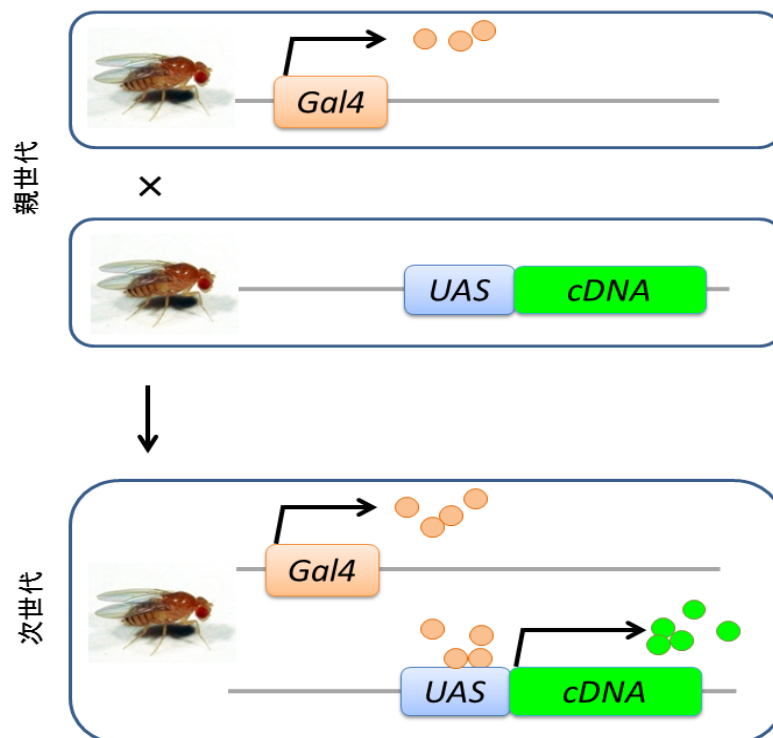


図6. Gal4-UAS システム。

2.3 MARCM 法

ある遺伝子の発生過程における機能を解析する際、当該遺伝子の機能欠失変異体を作成し、その表現型を観察することが基本となる。しかし、形態形成において重要な役割をもつ因子の機能欠失全身変異体は発生過程において致死となることが少なくない。そこで、目的の発生段階まで個体として成長させるため、解析したい一部の組織でのみホモの変異をもつ細胞群を誘導する技術として、クローン解析が開発されてきた (Xu and Rubin, 1993)。クローン解析は相同染色体の組み換えを利用した方法であり、酵母由来の DNA 組換え酵素 Flippase とその標的配列である Flippase Recognition Target (FRT) を用いる。変異をヘテロにもつ細胞において、発生過程で一過的に Flippase の発現が誘導されると、FRT が挿入されている相同染色体の間で組換えが起こり、その娘細胞のうち一方は変異をホモに持つ細胞、他方は野生型ホモの細胞となる。

特に、MARCM (Mosaic Analysis with a Repressible Cell Marker) 法は、このクローン解析の原理と上述の Gal4-UAS システム、そして Gal4 の抑制因子 Gal80 (Pfeiffer et al., 2010) を組み合わせる事により、変異体ホモのクローンの細胞群をレポーター遺伝子により特異的にラベルしたり、遺伝子発現を制御したりできる技術である (Lee and Luo, 2001) (図 7)。変異を持たない側の相同染色体に Tubulin プロモータ下で発現誘導される Gal80 を組み込んでおき、Flippase-FRT システムにより相同組み換えを生じさせる。変異をホモに持つ娘細胞とそのクローンでは Gal80 遺伝子は存在しなくなるため、やがて、Gal80 による抑制が解除され、Gal4-UAS システムが機能するようになる。このため、変異体クローンのみを Gal4 依存的に GFP などと標識したりすることで、神経線維などが入り組んだ組織の観察も容易になるほか、変異体クローン特異的に

任意の cDNA や Inverted Repeat などを用いて過剰発現させたりすることで遺伝学的な摂動を与え、それらの影響を解析することが可能となった。原因因子が細胞自律的に機能するかどうかの検討や、同一の個体内のホモ変異を起こしていない組織との表現型の比較ができるため、特に脳のような複雑な組織構造において、MARCM 法は強力な技術であるといえる。

本研究においては、単一神経細胞をラベルする (Single cell clone) 際には、蛹化後に 37℃で 15 分間、ヒートショックによる Flippase の発現を誘導した。飼育瓶をウォーターバスで温浴させることによってヒートショックをかけた。神経幹細胞とその娘細胞の集団からなるクローン (Neuroblast clone) のラベルには、一齢幼虫期に 37℃で 40 分間のヒートショックを行った。

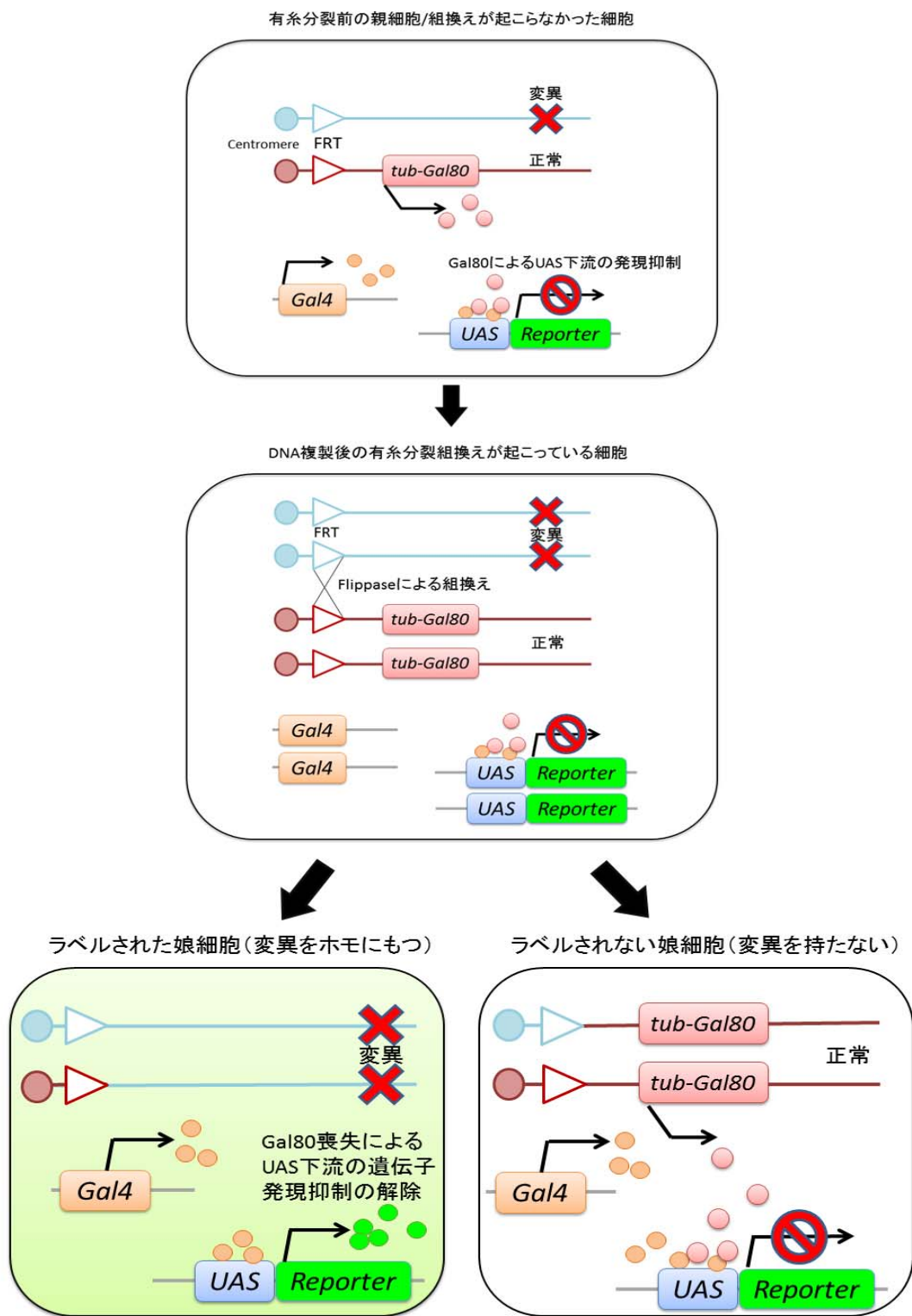


図 7. MARCM 法概略図

以下の遺伝子型の系統が解析に用いられた。

yw hs-flp UAS-mCD8::GFP; FRT40A tubP-Gal80;; OK107-Gal4

yw; FRT40A

yw; sickie^Δ FRT40A/CKG

yw; UAS-LIMK^{KD} FRT40A/CAG

yw; UAS-LIMK^{KD}, sickie^Δ FRT40A/CAG

yw; UAS-Pak^{Myr} FRT40A/Cyo

yw; FRT40A; UAS-Rac1^{V12}/TM6B

yw hs-flp UAS-mCD8::GFP;; FRT82B tubP-Gal80/TM3; OK107-Gal4

yw;; slingshot¹⁻⁶³ FRT82B/TM6B

UAS-cofilin-RNAi; y+ FRT82B/TM6B

yw; UAS-HA::LIMK^{WTM6} 40A

yw; UAS-HA::LIMK^{WTM6} 40A; UAS-sickie^{WT}/TM6B

yw; UAS-HA::LIMK^{WTM6}; slingshot¹⁻⁶³ FRT82B/TM6B

yw; UAS-sickie^{WT}, UAS-HA::LIMK^{WTM6}; slingshot¹⁻⁶³ FRT82B/TM6B

yw; UAS-sickie^{WT}; slingshot¹⁻⁶³ FRT82B/TM6B

*yw hs-flp UAS-mCD8::GFP; FRT40A tubP-Gal80/Cyo; FRT82B tubP-Gal80/
TM6B; OK107-Gal4/+*

yw; sickie^Δ FRT40A/CAG; slingshot¹⁻⁶³ FRT82B/TM6B

yw hs-flp UAS-mCD8::GFP;; FRT2A tubP-Gal80/TM3; OK107-Gal4

2.4 免疫組織化学染色

抗体染色は基本的には過去の報告に記載されている方法で行ったが、以下が改変した点である (Sato et al., 2006; Takei et al., 2004)。解剖は氷冷した PBS で満たしたプラスチックシャーレ内で行った。解剖後、サンプルは 1.5ml エッペンチューブの 4% Formaldehyde (FA) PBT (PBS + 0.3% Triton-X 100) 溶液へ移し、途中、浮遊しているものがないか注意しながら、室温で 40 分固定した。500 μ l の PBT で 2 度洗浄後 (10 分 \times 2)、PBT-N (PBT + 10% Normal Donkey Serum) で室温 40 分または 4 $^{\circ}$ C で 1 時間以上ブロッキングし、PBT で再洗浄した。その後適宜希釈した一次抗体溶液 (30 または 50 μ l スケール) で、4 $^{\circ}$ C で一晩反応させた。PBT で 3 回洗浄し、退色予防のため VECTASHIELD Mounting Media を用いて標本にした。軸索束領域を観察する際は Anterior 側を上、細胞体側領域を観察する際は Posterior 側を上にしてマウントした。以下に使用した抗体、試薬を記載する。

rabbit anti-GFP Alexa Fluor 488 conjugate (Molecular Probes, 1:1,000)

mouse anti-FasII (DSHB, 1:50)

rabbit polyclonal anti-DsRed (Takara Clone tech, 1:1,000, #632496, for detection of mCherry fusion proteins)

mouse anti-HA (Covance, 1:500)

rabbit anti-HA (Abcam, 1:1,000, ab9110)

rat anti-Slingshot (京都大、上村匡先生より贈与, 1:1,000)

mouse anti-c-Myc (Sigma-Aldrich, 1:10,000, 9E10)

rabbit anti phospho-Ser3 Cofilin (Signalway Antibody, 1:200, #11139)

rabbit anti Cofilin (Total-Cofilin, Signalway Antibody, 1:500, #21164)

Alexa Fluor 488 phalloidin (F-actin の検出, Molecular Probes, 1:200)

Alexa Fluor 568 phalloidin (F-actin の検出, Molecular Probes, 1:200)

以下は 2 次抗体。200 倍希釈して使用。

anti-mouse Cy3 (Jackson ImmunoResearch)

anti-rabbit Cy3 (Jackson ImmunoResearch)

anti-rat Cy3 (Jackson ImmunoResearch)

anti-mouse Cy5 (Jackson ImmunoResearch)

anti-mouse Dylight649 (Jackson ImmunoResearch)

anti-rat Alexa Fluor 488 (Molecular Probes)

anti-rabbit Alexa Fluor 660 (Molecular Probes)

anti-rat Alexa Fluor 647 (Molecular Probes)

サンプルの観察は Zeiss LSM 710 共焦点レーザー顕微鏡を使用し、対物レンズは Zeiss C-Apochromat 40x/1.2 W Corr M27 を使用した。画像構築には Zeiss Zen 2010、Zeiss LSM Image Browser Version 4.2 を使用し、明るさとコントラストなどのレベル補正、選択領域のトリミングには Adobe Photoshop を用いた。

2.5 *in situ* hybridization

Digoxigenin で標識された *sickie* に対するプローブは、BDGP の cDNA クローン GM23988 を鋳型にして合成され、SP6 または T7 RNA ポリメラーゼを反応に用いた。*in situ* hybridization は原則的には過去に記載されている方法を参考に行った (Nagaso et al., 2001)。サンプルは、4%フォルムアミド溶液中で 4°C、12 時間固定し、メタノールで段階希釈、置換し更に固定した。50%キシレン/エタノールに置換し-20°Cで保存した。使用時は 4%フォルムアミドに置換し室温で 30 分おき、50%フォルムアミドを含むハイブリダイゼーションバッファーでプレハイブリダイゼーションさせた。プローブを含むバッファーを加え、60°Cでオーバーナイトしハイブリダイゼーションさせた。洗浄後、アルカリフォスファターゼ標識された抗 Digoxigenin 抗体 (200 倍) を加え、4°C、オーバーナイトで反応させた。発色反応の際には、PBT で洗浄後、アルカリフォスファターゼの基質の X-Phosphatase と NBT を加えたバッファーを加え、暗所、室温で 20~40 分間反応させた。

2.6 Sickie の同定と変異体作成

スクリーニングにより得られた、*sickie* のエンハンサートラップ系統と予想された *1631pBGay-gal4* は *sickie* 遺伝子座の第 6 イントロンに挿入されていた。本系統は *sickie* の Deficiency 系統とのトランスヘテロ変異体とした際も、表現型異常が観察されず、機能欠失変異体としての使用が難しいことが明らかになり、また、ベクター内部の P 因子による Imprecise excision も成功しなかった。このため、Exelixis Collection のトランスポゾン挿入系統を用いた FLP/FRT-mediated mutagenesis により、以下の *sickie* 遺伝子領域欠失系統を新規に作製した (Parks et al., 2004) (図 8)。*sickie* のコード領域は 100kb を越す広範な領域に及び、この領域には *CG10481*, *TotF*, *Vitoria* などの他遺伝子領域も含まれていたが、*sickie*^A および *sickie*^{A-2} は *sickie* コード領域特異的な欠失系統であり、3 番目の proline-rich な領域から 1 つ目の Coiled-coil モチーフまでの 510 アミノ酸残基を欠失する。

MARCM 解析において、*sickie*^A は *FRT40A* をもつ染色体に寄せ変えたものを用いた。また、*sickie*^{A-L2} はその N 末側から CH ドメイン、2 つの Proline-rich な領域、1 つの SxIP モチーフを含む領域を欠失した機能欠失系統だが、同時に、*CG10481*, *TotF*, *Vitoria* などの他の遺伝子領域も欠失している。このため、*sickie* 以外の因子の変異による影響の可能性を排除できないことから、詳細な解析には用いなかった。*sickie*^{A-L2} の欠失領域にさらに、1 つ目の Coiled-coil モチーフの領域も欠失した *sickie*^{A-L1} および *sickie*^{A-L3} 系統も同様である。以下の Parental な系統が FLP-FRT deletion 変異体の作製に用いられた。

sickie^A : *sickie*^{d07725} と *sickie*^{d09251}

sickie^{A-2} : *sickie*^{f06833} と *sickie*^{e02238}

sickie^{A-L1} : *sickie*^{f07728} と *sickie*^{f04819}

sickie^{A-L2} : *sickie*^{f04737} と *sickie*^{f06833}

sickie^{A-L3} : *sickie*^{f04737} と *sickie*^{e02238}

上記親系統は全て Harvard Medical School の Exelixis Collection より分与された系統。

sickie 全身変異体の解析の際、セカンダリ変異の影響の可能性を避けるため、*sickie*^A 系統は *sickie*^{A384} *piggybac* トランスポゾン挿入変異体とのヘテロ変異体として用いた。*A384 piggybac* 因子は *sickie* の第 6 イントロンに挿入されている系統であり (Ring, 2001)、*sickie*^A とのヘテロ変異体下で表現型を確認し、その浸透率は *sickie*^{A/Df (2L) ED1303} や *sickie*^{AL1/Df (2L) ED1303} 変異体の浸透率と同程度であった。また、*piggybac* transposase による Precise excision により、リバータントが得られ (*sickie*^{A384Revertant})、表現型が回復したことから、*sickie* の変異体であることを確認した。

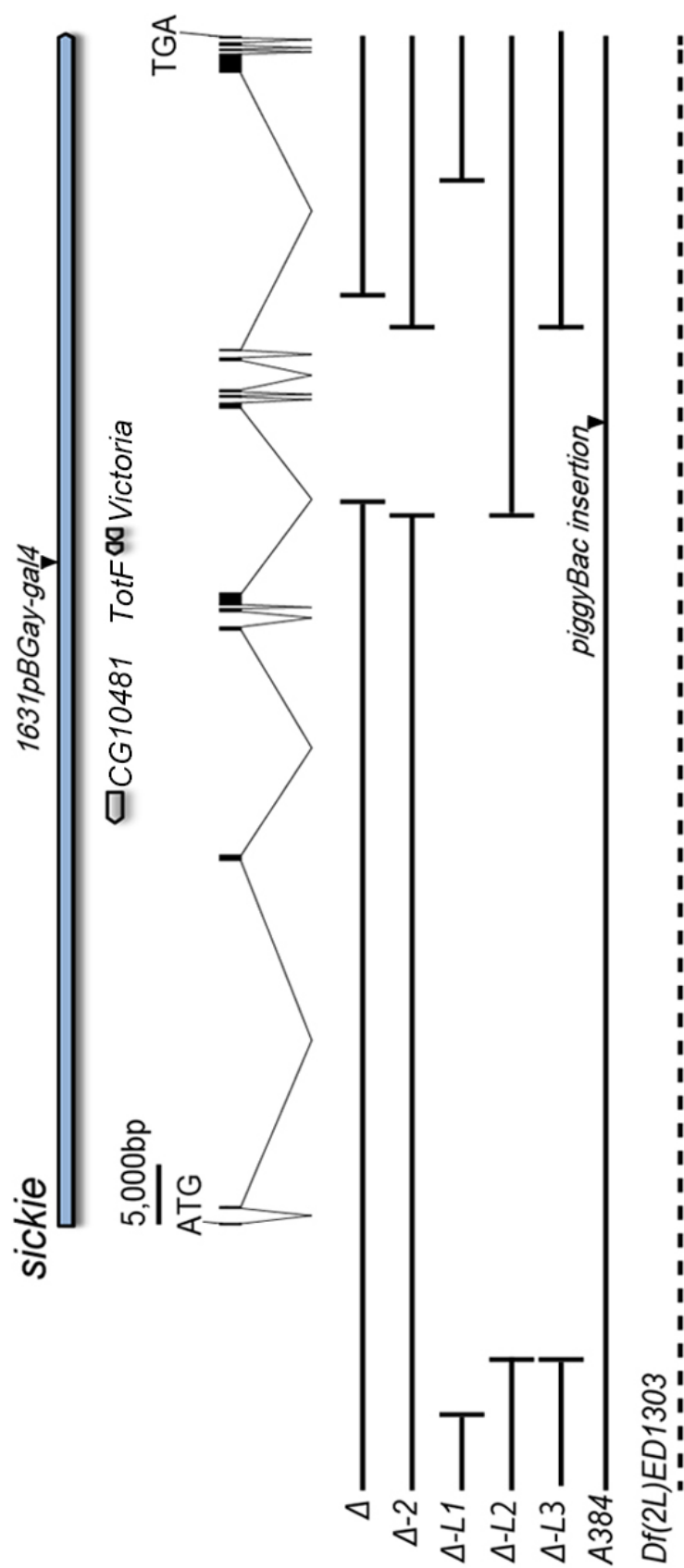


図 8. *sickie* 変異体の作製

2.7 *sickie* の UAS 系統作成

sickie の UAS 系統作成にあたり、解剖により摘出した脳から RNeasy purification kit (Qiagen) を用い Total mRNA を抽出した。これを鋳型に、PrimeScript II High Fidelity RT-PCR Kit (Takara Bio) を用いて逆転写を行い Total cDNA を得た。この cDNA を鋳型に PrimeSTAR HS DNA polymerase (Takara Bio) を用い *sickie* cDNA を増幅した。シーケンシングは Operon sequencing services (Operon Co.) に外注した (図 9)。相同配列のアライメントは GENETYX (GENETYX Co.) を用いた。mCherry (clone tech) の塩基配列は *UAS-sickie^{WT}*、*UAS-sickie^{K1881A}* いずれにおいても N 末端側の *EcoRI/SpeI* サイトへ挿入した。AAA ドメインの機能解析において、PCR によって 1881 番目のリジン残基にアラニン変異を導入した。これらのコンストラクトは *EcoRI/XhoI* サイトを用いて pUAST ベクターに組み込まれた (Brand and Perrimon, 1993)。これらの組み換えベクターは BestGene Inc 社のインジェクションサービスに外注し、*yw* 系統の embryo に導入された。

以降はシーケンシングにより得られた *sickie* の cDNA 全長とアミノ酸配列 (図 9)。

图 9

```

10      20      30      40      50      60      70      80      90      100
GAATTCGGTCTCCCTGGAAGTGCAAAACAAAATGTGTAAAAAGTGAAATAAAAACGGAATCAACTCCATCAATCAGTGAACCTTTTGTAGTTCGGGAAA

110     120     130     140     150     160     170     180     190     200
AAATGTTGGCTCGTGTGTGAGCTACCAAGGGTCCTGTGATAATATCAACGGCATCCTGACGCGTGACTATGCCGAGATCTACACCGACTGGGCCAACTA
M L A R C V S Y Q G S C D N I N G I L T R D Y A E I Y T D W A N Y

210     220     230     240     250     260     270     280     290     300
TTACTTGAACGTGCCAAATCGAAAAGAAAGGTCACAGACCTCTCCGCCGACTGTCGAGATGGTCTGCTCCTCGCCGAGGTATCGAGGCGGTTACCAGC
Y L E R A K S K R K V T D L S A D C R D G L L L A E V I E A V T S

310     320     330     340     350     360     370     380     390     400
TTCAAGGTGCCGATTGGTCAAGAAGCCAAAGAATCAACAGCAATGTTTGACAACGTCAACTCGTGTCTGCATGTGCTGCGAAGCCAGTCGGTCGGCG
F K V P D L V K K P K N Q Q M F D N V N S C L H V L R S Q S V G

410     420     430     440     450     460     470     480     490     500
GCTTGGAGAACATCACCAATGACATCTCGCCGGCCGCTGAAAGCCGTGCTCGCCCTCTTCTTCGCCCTTGAGTCGCTTCAAGCAGCAGGCCAAGCA
G L E N I T T N D I C A G R L K A V L A L F F A L S R F K Q Q A K Q

510     520     530     540     550     560     570     580     590     600
GACCAATCCATCGGCGTTGGCTCGCGCGCGGAGTGGCGGCTCCTCGTCGACTCTCACCGGCAGCGGCTCGGTCCTGGGAATCGGAATCGGCGGACTG
T K S I G V G C G G G V G G S S S T L T G S G S V L G I G I G L

610     620     630     640     650     660     670     680     690     700
AGGACTCCGGGATCCAGTCTGAACCAAGATAAGAATCAGCAGGAGCAGCAGCAGCAGCAGCAACAACAACGCCACAGCAGTTGGCCCAATCGCTGG
R T P G S S L N Q D K N Q Q E Q Q Q Q Q Q Q T P Q Q L A Q S L

710     720     730     740     750     760     770     780     790     800
AAAACGGCAATGAGATGGTGAATCGACAAATGCCCGCGCTACGCAAAAGGTCAATGGCGGAATGCCATTCCACTGCCCGCCACCGTGATGGTTCAACG
E N G N E M V N R Q I A P A Y A K V N G G T A I P L P A T V M V Q R

810     820     830     840     850     860     870     880     890     900
TCGCTGTCCGCCGATAAAGTGCGTCCACTGCCACCCACCCGAATCACACGCCATCAATACCGGGACTTGGAAAGAGCGGAAGTGATTTCAATACCAGC
R C P P D K V R P L P P T P N H T P S I P G L G K S G S D F N T S

910     920     930     940     950     960     970     980     990     1000
CGTCCAAACAGTCCGCCACCAACACGATTGAGAGCCTCAAGAGCGGTAAACAACAACAGCCTCCGACCCCGCAGATTAGAGCGGCGATTCCCT
R P N S P P T S N H T I Q S L K S G N N N S L R P P S I K S G I P

1010    1020    1030    1040    1050    1060    1070    1080    1090    1100
CGCCGAGCAGTCCGCAGACCGCTCCCGAGAAGCACTCGATGCTGGACAAGTGAAGCTCTTCAACAAGGAGAAGCAACAAGATCGCGTAAACGCCCGCTC
S P S S P Q T A P Q K H S M L D K L K L F N K E K Q Q N A V N A A S

1110    1120    1130    1140    1150    1160    1170    1180    1190    1200
GGTGGCCAGCAAAACGCAGATTGAGTCCAAAAGGACATCCTCCTCATCGGGCTTCAGTTCCGCACGCTCGGAGCGCTCTGATTCCAGCCTGAGTTTGAAT
V A S K T Q I Q S K R T S S S S G F S S A R S E R S D S S L S L N

1210    1220    1230    1240    1250    1260    1270    1280    1290    1300
GACGGTCATGGCTCCGCTGAAACCAACCGATTATGCGTGAGTTCCCAAGAGCCCGCCAGCCCAAGCAATCCAAGTCTGCTGGCTGCCAGCAGT
D G H G S Q L K P P S I S V S S Q K P Q P K T K Q S K L L A A Q Q

1310    1320    1330    1340    1350    1360    1370    1380    1390    1400
AGAAGGAACAGGCCAACAAGGCGACCAAGCTGGACAAGAAGGAGAAGAGTCCGCGGAGGTCTTGAACAAGGAGGAATCGGGCAATGAGTCCCGCAGCTC
K K E Q A N K A T K L D K K E K S P A R S L N K E E S G N E S R S S

1410    1420    1430    1440    1450    1460    1470    1480    1490    1500
CACAAATGGGAGGACTGGCAAGTCTTGGTTGGTCCGTGCAAGTGGTGGTGGAGAAGAATACACCAAGACGTCCTCGAAGTCTCGCTGCACTCGAAG
T M G R T G K S S L V R A V G G V E K N T P K T S S K S S L H S K

1510    1520    1530    1540    1550    1560    1570    1580    1590    1600
TCGGACTCGAAGAGCTCTTGAAGGCGCCCAACTCTCCAGAGTCCAGTGGCGGGGATTGCCCAAGCCATTCCCGCATCAAGGGCAGCAGCAAGT
S D S K S S L K A P Q L L Q S P S G G G L P K P I A A I K G T S K

1610    1620    1630    1640    1650    1660    1670    1680    1690    1700
TGCCCTCCTTGGGTGGTGGTACTGGCCACCTCCGGCTGCAGAATCCAGCAGAAATCAGCAGTGTCTAAACGCGAAACAGCGACATATCCTCGAACAT
L P S L G G G T G H L P A A E S Q Q N Q Q L L K R E T S D I S S N I

1710    1720    1730    1740    1750    1760    1770    1780    1790    1800
ATCCAGGCCACCGCGGCTGAGCCACCCATAAGCACACATGCACATATCCATCAGAATCAGACGCCACCACTCCCTACTATGCGAATAGTCAGCCAAAG
S Q P P P A E P P I S T H A H I H Q N Q T P P P P Y Y A N S Q P T

1810    1820    1830    1840    1850    1860    1870    1880    1890    1900
AGCCACATATCATCGCATGGGTTCTTGAGTGAGCCAGTACTCCGACAGCAGCTCGGGTATTTACGGCAGCAGTCGGCTTCCACCAAGGAGTCCGCGC
S H I S S H G F L S E P S T P Q H S S G I Y G S S R L P P P K S A

1910    1920    1930    1940    1950    1960    1970    1980    1990    2000
TGAGTGGCCCTAGAAAGTTGGAGTACAACGCCGACCTCATATCTGTCTCGCCACCGCACCACCAACGGCAAGGACTGCCGAGACCGCTGGTCAACTC
L S A P R K L E Y N A G P H I L S S P P H H Q R Q G L P R P L V N S

```

2010 2020 2030 2040 2050 2060 2070 2080 2090 2100
 GGCTCCCAACACACCCACCGCCTCGCCAAACAAGTTCCACACGATACCTCTAAGATTGTGGGCACGATCTACGAGTCCAAGGAGGAGCAGTTGCCCCCA
 A P N T P T A S P N K F H T I P S K I V G T I Y E S K E E Q L P P

2110 2120 2130 2140 2150 2160 2170 2180 2190 2200
 GCACCACCACAGCCAGTGGGGGCTCCTCCATCCTGCCCATGAGACCTCTGCTTCGGGGCTACAACCTCACACGTGACCTCGCCAGCAGGGGGGCTCGCG
 A P P P A S G G S S I L P M R P L L R G Y N S H V T L P T R G A R

2210 2220 2230 2240 2250 2260 2270 2280 2290 2300
 GTGGCCACCCACATCAATCTACCTGGACTTTTGTGAGTCGGACATTGGCCAGGGCTACTGCAGCGATGGTGATGCTCTGCGAGTGGGCAGCTCCCC
 G G H H P H Q S Y L D F C E S D I G Q G Y C S D G D A L R V G S S P

2310 2320 2330 2340 2350 2360 2370 2380 2390 2400
 GGGGGGATCGCGATTCCACGACATTGACAACGGTTACCTTTTCGGAGGGCAGCAGCGGTCTAAATGGGCCAGCTCGTCGCGAGGAGGATCTCACCTGGA
 G G S R F H D I D N G Y L S E G S S G L N G P S S S A G G I S P G

2410 2420 2430 2440 2450 2460 2470 2480 2490 2500
 AAGCACTTCTCAGCATGATCGGGCAGCAACCAATTGCCACCACCATCGAAGAGCGTATTGCAACAGTCGCGGCTCCTTGACAGCATTGGAACCG
 K H F L S M M R A R T Q L P T T I E E R I R N S R G S L D S I G T

2510 2520 2530 2540 2550 2560 2570 2580 2590 2600
 CCGCAACGGCAGCTCAGCGGCCAGCCAGGCCAGCTCCAGCGGGCGGTCCACCACCTACCCACGCCCAAAACAACAACATAACAACAACATAACTCGGG
 A A N G S S A A S Q A S S S G G S T T T H A Q N N N N N N N N S G

2610 2620 2630 2640 2650 2660 2670 2680 2690 2700
 AGGCGGCGCTAAATGGATGGCAGTCCCAACCTCGGCCAGGATCTCGAAATGGGCGCGATAACTGGAGCAAAATGCCGGAACCGCTCAACGGGCCAGG
 G G A K M D G S P H H R P G S R N G R D N W S K M P E P L N G Q K

2710 2720 2730 2740 2750 2760 2770 2780 2790 2800
 GTGGAAAGTCGGACAAGTCGTCGCCATCCCGTCGCAGCATGGGCGGCGTGGGAGTGGCAGTTCCTCAAGCAGGGATCGCCCTCCTCCTCGCGCA
 V E K S D K S S P S R R S M G G G G S G S S S K Q G S P S S S S R

2810 2820 2830 2840 2850 2860 2870 2880 2890 2900
 CCAAGGGCGTTCGCGCAGTTTGGATACGTAAAGCGGGGCCAACGGCAGCATCGCCTCCACCGCCGAGCAGCAGAACATCGCCATGATGATGGCGCGCG
 T K G V P P S F G Y V K R A N G S I A S T A E Q Q N I A M M M A A G

2910 2920 2930 2940 2950 2960 2970 2980 2990 3000
 TGGAGCGGGACCAATGGTGTGCCCTGCGGTGCTACCGCTCATGTATCGCGGGTTCGCGGACAGCCAGCGGTCCGAAAGTTCCGCGCGGCACGCAACCC
 G A G A N G L P C G R T A H V S A V P R T A S G R K V A G G T Q T

3010 3020 3030 3040 3050 3060 3070 3080 3090 3100
 CTGCCAATGACATGAACAAGCTGCCCGGAATACTCAGCATCGCAGCTTTTCTTGACCGGACCCACAGCCACTCAACTGAGTCAGTCGATTAGGGAGC
 L P N D M N K L P P N T Q H R S F S L T G P T A T Q L S Q S I R E

3110 3120 3130 3140 3150 3160 3170 3180 3190 3200
 GACTGGCCACCGGATCACACAGCTACCAAGCCGGGCGAGCAGTTTGACAGTATTTGAGCATAGAATATCCAATCGTGGAGGAACCTCGTCACGACGGATC
 R L A T G S H S L P K P G S D L H V F Q H R I S N R G G T R H D G S

3210 3220 3230 3240 3250 3260 3270 3280 3290 3300
 CCTGTCCGATACGCAAACTTACGCCGAGGTCAAGCCAGAATATAGCTCATACGCCATGTGGCTTAAGCACAGCAATACGGCTGGCAGTCGCGTGTCCGAC
 L S D T Q T Y A E V K P E Y S S Y A M W L K H S N T A G S R L S D

3310 3320 3330 3340 3350 3360 3370 3380 3390 3400
 GCGAGTCCGTGGAGCAGCTGCAAAATTGGATCCCCGGCGATGACCCGACATGGTCACAAGATGATACAAATCGGTCCGAGGACCTGGTCAGATGGCGG
 G E S V E Q L Q I G S P A M T R H G H K M I H N R S G G P G Q M A

3410 3420 3430 3440 3450 3460 3470 3480 3490 3500
 GTCAAAATGTCGGGCAATGAGTCGCCCTACGTGCAAAAGTCGGCGCATGAACCGCAGCAATAGCATAAGATCGACGAAATCCGAGAAGATGTATCCCTCGAT
 G Q M S G N E S P Y V Q S P R M N R S N S I R S T K S E K M Y P S M

3510 3520 3530 3540 3550 3560 3570 3580 3590 3600
 GATGAGTCGTGCTGGGGAGGTGAAAATCGAGCCCTACTACTGCCTGCCGTGGGCACCAACGGTGTGCTAACGGGCCAAATGGCAGGTGCCATGGCTGCT
 M S R A G E V E I E P Y Y C L P V G T N G V L T A Q M A A A M A A

3610 3620 3630 3640 3650 3660 3670 3680 3690 3700
 CAATCGCAGGCGGCCAGGGGAATCCCGCGTGGCGTTAACGTGGGAGGCGTGGCCTGGAGCCAGCCAACCTCGCTACCCCTCACCCTGGCGGCGCAT
 Q S Q A A Q G N P G V G V N V G G V A W S Q P T S P T P L T R G P

3710 3720 3730 3740 3750 3760 3770 3780 3790 3800
 TCAACACAGCGCAGGTGCATCGGTGCTATCGCCCAACCATGGAACACATCGGCGCGAGGACTCGTTGGTCTGGCGGGGAGCAGGTGGTGGTGAAT
 F N T A A G A S V L S P T H G T T S A A G L V G P G G G A G G G A M

3810 3820 3830 3840 3850 3860 3870 3880 3890 3900
 GGTGCGGCATCGGCTGACATATCCCAAGAGAATGACGAAGTTACGGCAGTGGCGCTCCTTGTGTGTCGGAGGAGTTCCTATACGGAACCGCGGAG
 V G H R L T Y P K K N D E V H G S A A S L L S G G S S L Y G N A E

3910 3920 3930 3940 3950 3960 3970 3980 3990 4000
 GAGCGGCAGGCGACGAAATCCGAGGCTGAAGCGCGAGCTGCAGGATGCCCGGATCAGGTGCTCAGCTGAGCAGCCAGCTGTCAACCAATGCCATG
 E R Q A H E I R R L K R E L Q D A R D Q V L S L S S Q L S T N A H

4010 4020 4030 4040 4050 4060 4070 4080 4090 4100
 TGGTACCGCCTTCGAGCAGTCGTTGTCCAACATGACCAACCGACTGCATCAGTTGACGGCGACGGCGGAGCGAAAGGACGGCGAGCTGACGGACATGCG
 V V T A F E Q S L S N M T N R L H Q L T A T A E R K D G E L T D M R

4110 4120 4130 4140 4150 4160 4170 4180 4190 4200
 GCAGACCATTGAGCTGCTGAGGAAGCAGTCCATCCAGGCGGGACTGACCAGGGCGCACATGCAGAGCATGGGCGTCCAGACCCAGGGTCAAGGTCAGGTT
 Q T I E L L R K Q S I Q A G L T T A H M Q S M G V Q T Q G Q G Q V

4210 4220 4230 4240 4250 4260 4270 4280 4290 4300
 CAGGGTCAGGCGCTGGGTGAGCCGGGTTCCGATCAGAAGCCACCGAAGCTCGGGTCCCAACGGCCCATCAATGCCAACCAATGGATCCATGCCACTGGGAA
 Q G Q A L G Q P G S D Q K P P N S G S Q R A I N A N N G S M P L G

4310 4320 4330 4340 4350 4360 4370 4380 4390 4400
 TGCAGCGCCAGCACAGCAGCAGTCCATGTGCTCGCTGAAGTCCATCAGCTCGGGCTGCTCGGCGGCCAGGACAGAACAGGCCAACAGAGAGAGGG
 M Q R Q H S T D S M C S L N S I S S G C S A A Q D K N K A N K K K G

4410 4420 4430 4440 4450 4460 4470 4480 4490 4500
 CTGGCTGCGGAGCAGCTTACCAAGGCCTTTCCCGCAATGCCAAGATCTCCAAGACGAGTCGTATGTGGGTCAACCATCATCATCACAACCACTCGCAG
 W L R S S F T K A F S R N A K I S K T S R H V G H H H H N H S Q

4510 4520 4530 4540 4550 4560 4570 4580 4590 4600
 CAAGAGTTGGCCTCTGGGAACTTCCCTGCAATGGTCACGGTGAACCTTGGGATTGGCCTCGTTGGCCACCAACCTGCTCCTCCCTGCGGAATA
 Q E L A S G K L P L H N G H G E P L G L A S L A T Q P A P P L P N

4610 4620 4630 4640 4650 4660 4670 4680 4690 4700
 GCAAGCAGAGCAGTCCGCGCAAGACCGTCACCCCTCATAGACAATGCCAAGCCCATCGATGCCATTGACCAGGAGGATCAGCATGTGGTCGAGGACCTCAA
 S K Q S S P A K T V T L I D N A K P I D A I D Q E D Q H V V E D L K

4710 4720 4730 4740 4750 4760 4770 4780 4790 4800
 GAAGCAGCTGCGGAAAAGGATCTCGTCTGACCGATATTCGCTGGAGGGCCTTGAGCTCGGCCTCCAGTTGGAGAGCCTCAAGGAGATGATGAACAAG
 K Q L R E K D L V L T D I R L E A L S S A S Q L E S L K E M M N K

4810 4820 4830 4840 4850 4860 4870 4880 4890 4900
 ATGCGGGCGGAGATGATGTCCCTGAAGCACAACAATGAGCGTCTCCAGAAGCTGGTGACCAACGCGATCCTTGGCTGGTTCGGAGGCCAGCTTGGGCGAGG
 M R A E M M S L K H N N E R L Q K L V T T R S L A G S E A S L G Q

4910 4920 4930 4940 4950 4960 4970 4980 4990 5000
 CCATCAGTCCCATGGATCAGTGGCTGGAAGCTCTGAGGTGTGAGGCGCTACTCCCTCGCCGACAGCAACAATCGCCACCCATGGAACTACCACTGCGTCTG
 A I S P N G S V A G S S E V S R R Y S L A D S N N R P P M E L P A R

5010 5020 5030 5040 5050 5060 5070 5080 5090 5100
 ACTCAGTGAAGAACTTGAAGTGGAGGAGGACTGTTGCCACCTGCCCGGGCCCGGACCAACCAACCAACCGGCTCCTAATGGCGTCAGTGTGGCACCC
 L S E E L E L E E D C L P P A P A P E Q P P P P A P N G V S V A P

5110 5120 5130 5140 5150 5160 5170 5180 5190 5200
 CTTAGTCCAGTACCCACGTAGACCTAACGCCACCGCCTCCTGCCTTGGAGGGGGCTCCTATGGCCAGTCCGGTGCACATGGCCAGTGCCACGGAGGAGT
 L S P S T H V D L T P P P P A L E A A P M A S P V H M A S A T E E

5210 5220 5230 5240 5250 5260 5270 5280 5290 5300
 TGGCGATGTGTGCGATTGGCAAGAAGATAGCCATTGCCTGTTATCTGGGTGAGGAGGCGTTTGGCAAGTACTGTGAGGAGTGCAGGAGCTGCGATGG
 L A D V C D G K K I A I A C Y L G Q P E A F A K Y C E E L Q E L D G

5310 5320 5330 5340 5350 5360 5370 5380 5390 5400
 CTTCTATGCCAATGGCCAGGAGGCGGATAGCCAAATCCCAAGCGAGAGGAAGTCTAACTATACAGCGCCAGCTGCAACGAGTTGCTCATAGCCTGCACC
 F Y A N G H E A D S Q S Q S E R K S N Y T S A S C N E F V I A C T

5410 5420 5430 5440 5450 5460 5470 5480 5490 5500
 TATATATCCGGCAAGACGAGCTGGCAGAACTCTGGAAGTCTGAGTCTGCGCAAGACCTTCAAGGACTAGTGGCGCGATTGATCCGGGCACCAATCTGGGTG
 Y I S G K T T W Q N L D Y V V R K T F K D Y V A R I D P G T N L G

5510 5520 5530 5540 5550 5560 5570 5580 5590 5600
 TCAACACGGACTCCATTACCTCGTACCACCTAGGAGAGGCGAAACGGGGTCCGAGATGGGATTCCCGGAACCTCGCCCTGTGGTTACATAGTGGGCGAG
 L N T D S I T S Y H L G E A K R G P E M G F P E L L P C G Y I V G S

5610 5620 5630 5640 5650 5660 5670 5680 5690 5700
 CGTGAGGACCTATACATTTGCCTCCAGGAGTGGGAAGTTTGGCTTTCGACAGCCTTATTCGCGCAGCATTGTCCATCGATACATCAGCCTGCTCAGG
 V R T L Y I C L Q G V G S L A F D S L I P R S I V H R Y I S L L T

5710 5720 5730 5740 5750 5760 5770 5780 5790 5800
 GAGCACCAGCTCTGATTCTGTGCGGACCCAGCGGCACTGGAAAGTCTATCTGGCCCGTCTGACTAGCCGAGTTCTGCTGATGCCCGCTCTGCCAGGGGCA
 E H R R L I L C G P S G T G K S Y L A R R L A E F L V A R S A R G

5810 5820 5830 5840 5850 5860 5870 5880 5890 5900
 ATCCTTCGGAGGCCATTGCCAGATTCAATGTTGACACAAAGTCTCGAAGGATCTGCGTCAGTATCTGGGCCACATTGCCGAGCAGGCTGCCATTGCCAA
 N P S E A I A T F N V D H K S S K D L R Q Y L G H I A E Q A A I A N

5910 5920 5930 5940 5950 5960 5970 5980 5990 6000
 TGGAGTCTCCGAGCTTCCCTCTGTGATTATTTGGACAACCTGCACCACGCTCCGCTTGGCGAGCTCTTCTCCTGTCTCCTGAGCGCTGGGCCGCT
 G V S E L P S V I I L D N L H H A S A L G D V F S C L L S A G P A

6010 6020 6030 6040 6050 6060 6070 6080 6090 6100
 AACAAAGCTGCCCTGCATCATTGGAACCATGTCACAGGCCACTTGCAACACCACCAACCTGCAGCTGCACCACAATTTCCGATGGGTGCTCAGGTAATC
 N K L P C I I G T M S Q A T C N T T N L Q L H H N F R W V L T A N

6110 6120 6130 6140 6150 6160 6170 6180 6190 6200
 ACATGGAGCCCGTGAAGGCTTTCTGGGTCGCTTCCTGAGGCGTGGACTCTTCCAGCTGGAACTGCAGACGCAACATCCTCAGCCGGAGCTGGCGGCACT
 H M E P V K G F L G R F L R R R L F Q L E L Q T Q H P Q P E L A A V

6210 6220 6230 6240 6250 6260 6270 6280 6290 6300
 GCTGGCCTGGTTGCCCTCCGTTTGGCAGCACATCAACCGATTCTGGAGGTGCACAGCTCCAGTGATGTAACCATTGGGCCGAGGCTGTTCTCGCCTGC
 L A W L P S V W Q H I N R F L E V H S S S D V T I G P R L F L A C

6310 6320 6330 6340 6350 6360 6370 6380 6390 6400
 CCAATGGACCTGAAGGACTCGCAGGTGTGGTTACCGACATCTGGAACCTACCACCTCTCGCCATACTTGGTGGAGCGGTGCGCGAGGGAGTTCAGCTCT
 P M D L K D S Q V W F T D I W N Y H L S P Y L V E A V R E G V Q L

6410 6420 6430 6440 6450 6460 6470 6480 6490 6500
 ATGGACGACGAGGAGGTGCCTGGAACGACCCCTCCGCCTTCATTAGGAACCTATCCGTGGCCATACGGTCCGGACTCAGTGCCTCCACTACGGCAAAT
 Y G R R G G A W N D P S A F I R N S Y P W P Y G P D S V P P L R Q I

6510 6520 6530 6540 6550 6560 6570 6580 6590 6600
 CAATGCCGAGGATGTGGGACTCGAAGGCGTGGCCCTAACCAACGGTGACCAACAGGATCCCTTGCTCAACATGCTGATGCGCCTGCAGGAGGCGGCCAAC
 N A E D V G L E G V A L T N G D Q Q D P L L N M L M R L Q E A A N

6610 6620 6630 6640 6650 6660 6670 6680 6690
 TACTCGGAGGCCAGGATCAGGAGTCCGATTGTGCCAGCCTGGACTCGAATGTTACGCCCGAAAAGTTCCGCTGGAGCCGAGTGAACAGCT
 Y S E A Q D Q E S D C A S L D S N V T P E S S A G A E * T A

sickie の cDNA が導入された pUAST ベクター (図 10)。PlasMapper Version 2.0 を使用した (Dong et al., 2004)。

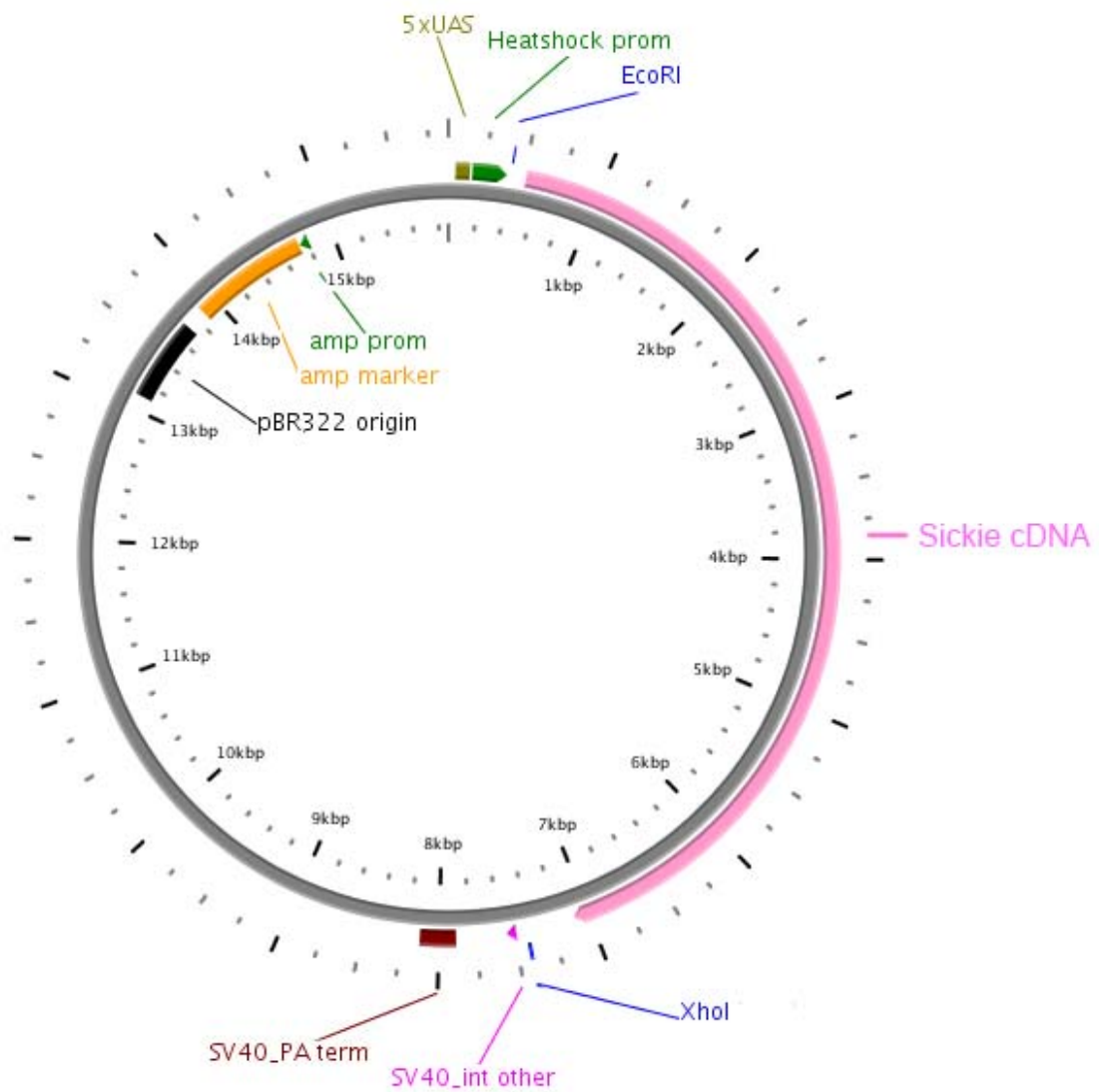


図 10. *sickie* の cDNA が挿入されたpUAST ベクターコンストラクト。

2.8 Sickie の抗体作成

ラットポリクローナル抗 Sickie 抗体 (1:1,000) は Takara Bio Inc に外注し作成した。Sickie の 1,734 番から 2,197 番までの 464 アミノ酸残基に相当する DNA 領域を増幅しベクターに組み込んだものを大腸菌に導入し、合成した組み換えタンパクを抗原として抗体は得られた。*OK107-gal4* 依存的に *UAS-sickie* を強制発現した個体において本抗体で免疫染色を行ったところ、キノコ体神経軸索束で強いシグナルが観察された。このため、本抗体を用いて内在性の *sickie* の発現の検出が可能かどうか検討したところ、野生型個体のキノコ体軸索束中心領域で顕著なシグナルを確認したが、機能欠失変異体の軸索束中心領域ではこの発現パターンが消失したことから、内在性の Sickie の発現を組織染色レベルで検出できることがわかった (図 11)。

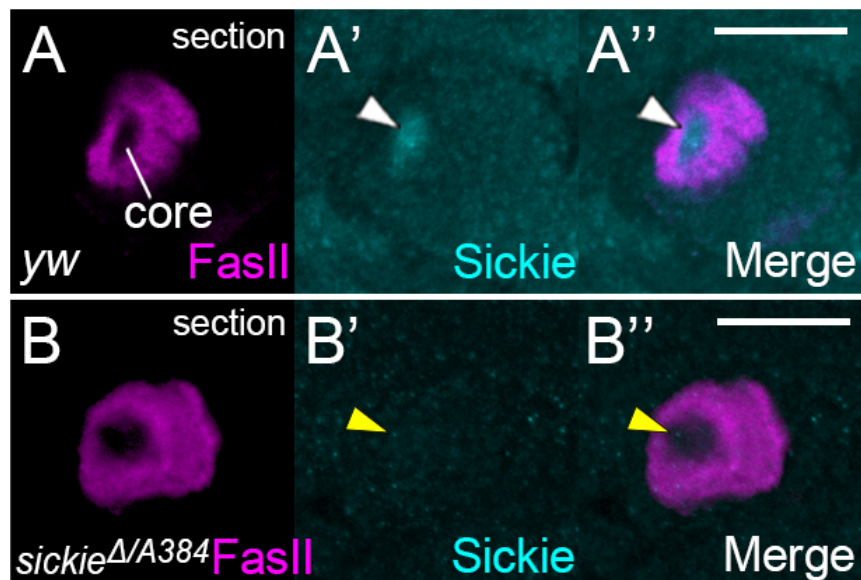


図11. 蛹化後 72 時間前後のキノコ体神経の peduncle 領域の軸索束断面図。(A-A'') 軸索束中心領域は FasII の発現が弱い一方、Sickie の発現は強い。(B-B'') *sickie* 変異体においては、全体的な Sickie のシグナルが低下し、黄矢頭で示すように中心領域での強いシグナルは検出されない。Scale bars: 20 μ m

2.9 表現型の定義と分類

sickie 全身変異体の表現型について、独自に定義した基準に基づき、2つのクラス分けを行った。キノコ体 α 神経軸索束または β 軸索束のいずれかが、軸索束の分岐点からそれぞれの投射末端までの中間地点よりも遠位側へ伸長できなかった場合、Class-I とした (図 12 右上パネル左部)。 α 神経軸索束が中間点をこえるが、 β 軸索束はその中間地点を超えない場合や、その逆の場合があてはまる。一方、 α 、 β 軸索束の両方が分岐点からそれぞれの通常の投射末端までの中間地点に達しない場合を Class-II と定義した (右上パネル右部)。

Rac や *Pak* の恒常活性化型変異体、*cofilin-RNAi* 変異体、*LIMK* 強制発現 *ssh* 機能欠失 2 重変異体、*sickie Rac cofilin* 3 重ヘテロ変異体などでは、著しく細い peduncle が形成され、FasII でラベルされる軸索束による塊状の構造体が、脳後方の細胞体領域付近に異所的に形成される、より重篤な伸長異常と考えられる表現型が観察され、この表現型を Posterior arrest と定義した (図 12 下パネル)。この表現型は *sickie* や *ssh*、*LIMK* 強制発現のような単独の変異体では観察されなかった。

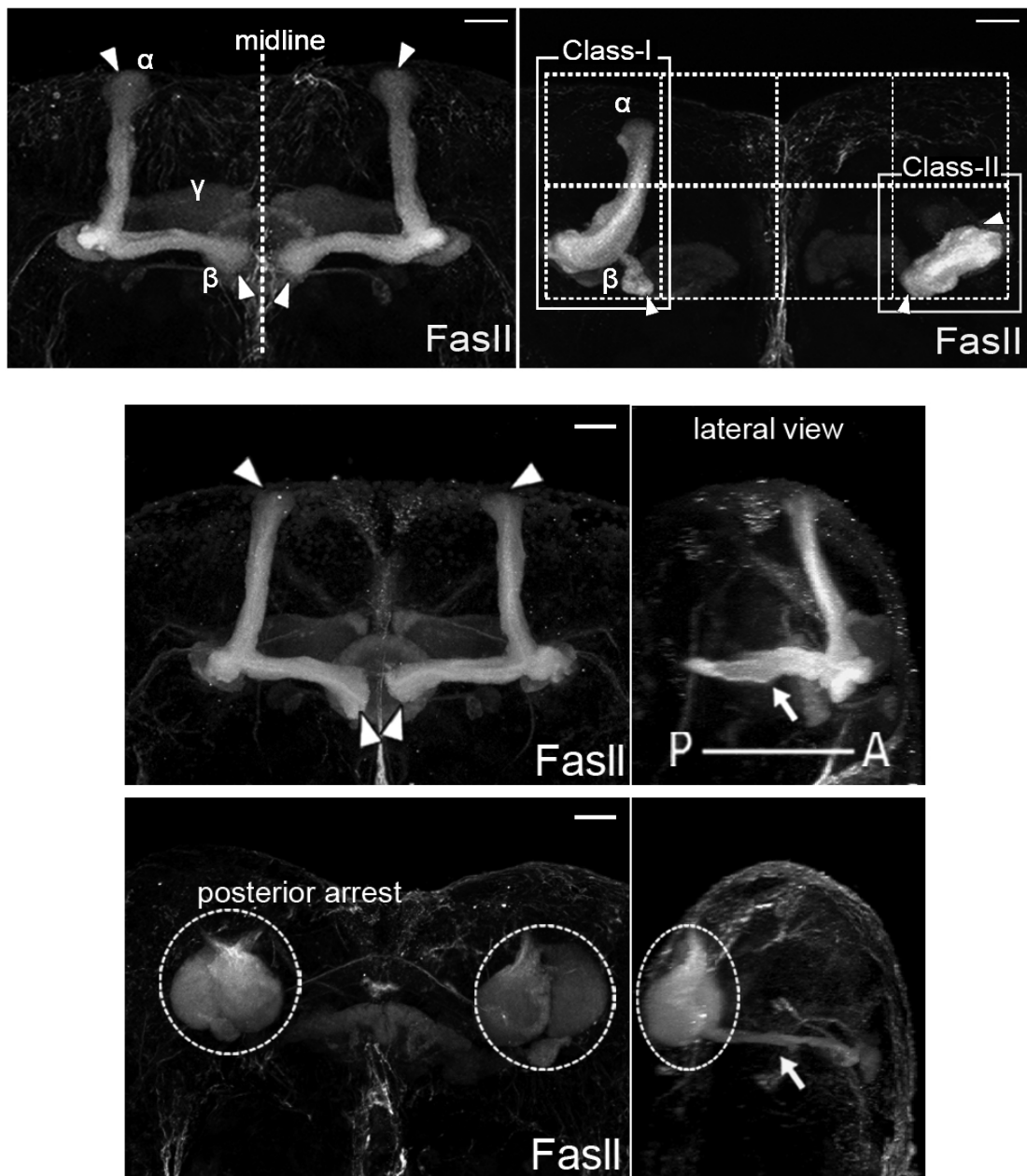


図12. 軸索束伸長異常の表現型の定義と分類。Scale bars:20 μ m

2.10 遺伝学的相互作用の統計的解析

有意差の検定には Fisher の正確確率検定を採用した。以下に述べる本方法の説明は、群馬大学社会情報学部の青木繁伸博士による文献‘正確確率検定の解説’ (<http://aoki2.si.gunma-u.ac.jp/LaTeX/ExactTest.pdf/>)、Cyrus 博士らによる論文‘A Network Algorithm for Performing Fisher's Exact Test in $r \times c$ Contingency Tables, 427-434, Vol. 78, No. 382, Jun., 1983, DOI: 10.2307/2288652’を参考にして記述した。

Fisher の正確確率検定は、注目する 2 変数（要因 A、要因 B）が各々 2 つのカテゴリーを持つとき、 2×2 表に分類して集計し、要因 A、B 間の独立性の検定（2 群の比率の差の検定）を行う場合に適用できる、ノンパラメトリックな検定方法である。集計表の周辺度数を観測値のときのもので固定したときに、全てのとりうる分布パターンの場合の数を数えあげることにより、統計量の分布を定める。本研究では 2 変数 A, B についての分割表を以下の表のように定義する。要因 A：解析対象の遺伝子型の区別による分類。例として、A1：野生型または対照区となる系統と A2：変異型または試験区となる系統として分類した。要因 B：解析対象の表現型の区別による分類。明らかな表現型が見られないものをカテゴリー B1 とし、Class-I, Class-II, posterior arrest の表現型異常を、伸長異常という表現型として併合したものをカテゴリー B2 として、2 群に分類し、 2×2 表を作成した。

		要因 B（表現型）		
		B1 (ほぼ正常)	B2(Class-I + II + Posterior arrest)	合計
要因 A (遺伝子型)	A1(野生型 or 対照区)	a	b	e
	A2(変異型 or 試験区)	c	d	f
	合計(個体数)	g	h	n

表において、周辺度数 e, f, g, h が固定されている場合、様々な a, b, c, d の値の組み合わせの分割表が仮定できる。4 つのマスの数値が特定の値であるような分割表が得られる確率 p は以下の式のように定義される。

$$p = eCa \times fCc / nCg$$

実際に観察された度数分布よりも極端に偏った分布パターンを仮定し、それらの分布表が得られる確率を本式を用いて求める。観察した分布と同方向により偏った分布の生起確率 p を合計したものは片側検定用の P 値とされ、この値にさらに逆方向で偏った分布表の生起確率 p の合計も加えたものは両側検定用の P 値とされる。

検定の前提となる帰無仮説 (H_0) と対立仮説は以下のように定義される。 H_0 : 遺伝子型と表現型という 2 要因は独立であり、関連がない（表現型の比率に差がない）。 H_1 : 遺伝子型と表現型という 2 要因は独立ではなく、関連がある（表現型の比率に差がある）。 H_0 が正しい（比率に差がない）という仮定の下に、

比率の差が極端な a, b, c, d の値の分布の起こりうる場合の数を全て数え上げ（逆方向に偏った場合も含め）、それぞれの生起確率を上式を用いて計算し、合算したものを有意確率 P とする。合算して得られた P が有意水準より小さいとき、仮説 H_0 は棄却され、その有意水準において 2 系統間の表現型の比率に統計学的な差があることが示唆される。

これら 2 要因 A, B の独立性の検定（2 群の比率の差の検定）を、統計解析ソフト R の関数 ‘fisher. test’ を用いて両側検定で行った。また、多重比較の際には、有意水準を比較する要因 A のカテゴリー（遺伝子型）数で割って補正をかける Bonferroni correction を適用した。

2.11 Western blot によるリン酸化 Cofilin の検出

ウェスタンブロットに供するサンプルは、各種系統の蛹化後72時間前後の個体の脳を用いた。氷冷したTBS-T 溶液の中で解剖して摘出し、リシスバッファー内に保存し、液体窒素で凍結させて保存、収集した。電気泳動とブロッティングはECL Prime Western Blotting Detection System (GE Healthcare) のプロトコルにしたがって行った。ゲルはMulti Gel II mini 15/25 (コスモバイオ, 414916) を使い、スタッキングに80Vで20分、バンドの分離に250Vで60分間泳動した。マーカーはNexus Pointer Wide Range Multi Color ladder (BIONEXUS, BNPM52) 、AccuRuler Prestained Protein Ladder (Lambda Biotech, G02101) を用いた。PVDF膜 (GE Healthcare, Hybond-P PVDF) への転写は氷冷したBio-Radのタンク型泳動槽を用い、500mAで60分間ブロッティングした。リン酸化タンパク質の検出のため、ブロッキングにはカゼインを含むスキムミルクではなく、人工合成ポリマーを主成分とするブロッキング剤であるPVDF Blocking Reagent for Can Get Signal (TOYOBO, NYPBR01) を用いた。抗原抗体反応には、以下の1次抗体、2次抗体を用いた。

rabbit anti-p-Cofilin (Signalway antibody, #11139, 1:100)

rabbit anti-Cofilin (rabbit polyclonal antisera to Tsr, 京都大, 上村匡先生より分与, 1:2,000)

mouse anti α -tubulin (SIGMA, #T9026, 1:500,000)

rat anti-Slingshot (京都大, 上村匡先生より分与, 1:5,000)

anti-Rabbit Immunoglobulins/HRP (Dako, P0448, 1:10,000)

anti-Mouse Immunoglobulins/HRP (Dako, P0447, 1:10,000)

anti-Rat IgG HRP-linked Whole Antibody (GE Healthcare, NA 935, 1:10,000)。シグナルの検出にはECL Prime Western Blotting Detection System (GE Healthcare) を用い、自動現像機FPM 800A (FUJIFILM) と Hyperfilm ECL (GE Healthcare) を使用して現像した。

2.12 F-actin の発現レベルの解析

キノコ体 α/β lobe 内における F-actin シグナルの定量には、立体画像構築・編集ソフトの Imaris (Bitplane 社) を用いた。MARCM 法により脳片半球側のキノコ体に Neuroblast クローンを誘導した蛹後期のキノコ体を、GFP、Phalloidin、FasII で三重染色したものを、共焦点顕微鏡 LSM710 で撮影し、Imaris 上で立体構築した。立体像の中で、 α/β lobe 内部の領域を、FasII でラベルされる領域として定義し、体積を測定した。このとき、MARCM クローンが誘導されていないほうの lobe 領域を対照区とし、クローンが誘導されている側の lobe 領域を観察区としたが、後者の領域は FasII 陽性で囲われる領域かつ GFP のシグナルでも囲われる領域と定義した。それらを構成する各 Voxel の Phalloidin のシグナル強度 (0-255) を合計する処理を、両脳半球のキノコ体 lobe それぞれにおいて行った。それぞれの lobe 内の F-actin シグナルの合計値を各々の α/β lobe の体積 ($\mu^3\text{m}$) で割った値をグラフの縦軸にとった。これを各 lobe における F-actin シグナルの平均値と定義し、同一遺伝子型の複数個体 (各遺伝子型につき $n=6$) を観察しデータを得た。この F-actin シグナルの平均値の、6 個体における平均値が、対照区とする lobe と変異体クローンを含み観察区とした lobe の間で差があるかを、Paired t-test により検定した。検定とグラフの描画には Graphpad Prism (GraphPad Software, Inc) を用いた。

3. 実験結果

3.1 *sickie* 変異体の同定

キノコ体神経軸索束の形態形成を制御する新規因子を同定するため、*piggybac* 転移因子と *P* 転移因子が入れ子になり、マーカーに *yellow* 遺伝子が挿入された *Gal4* ベクターである、*pBGay-Gal4* ベクター (New York University, Claude Desplan 博士と共同開発) を用いたエンハンサートラップスクリーニングを行った。本ベクターがゲノム内にランダムに挿入された 1,909 系統を *UAS-GFP* 系統と掛け合わせ次世代個体を観察したところ、169 系統においてキノコ体でレポーターGFP の発現が確認された (阿部崇志, 2008)。

これらの中から、*1631-pBGay-Gal4* 系統を得た。本系統に *UAS-CD8::GFP* を持たせた個体の蛹化後 36 時間のキノコ体神経において、レポーターGFP の発現を確認した (図 13)。本系統において *pBGay-Gal4* ベクターは *sickie* 遺伝子の第 6 イントロンに挿入されていた (図 8)。*sickie* が実際に発現しているかどうか検証するため、*in situ hybridization* を行ったところ、3 令幼虫期、蛹化後 72 時間前後の *yw* 系統の脳後方部のキノコ体神経の細胞体領域を含む領域で発現が確認された (図 14)。蛹期後期脳キノコ体細胞体を含む領域では、脳片半球あたり 4 つのクラスター上の発現が観察され、キノコ体の神経幹細胞を中心とするクローナルユニットに対応すると推察された。*Sickie* の内在性の発現パターンを確認するためにラットポリクローナル抗体を作製し免疫染色を行った結果、*Sickie* はキノコ体の神経軸索束を含む発生過程の脳において広範に発現していた (図 13 左下パネル)。

ショウジョウバエのゲノムデータベースである Flybase の情報をもとに

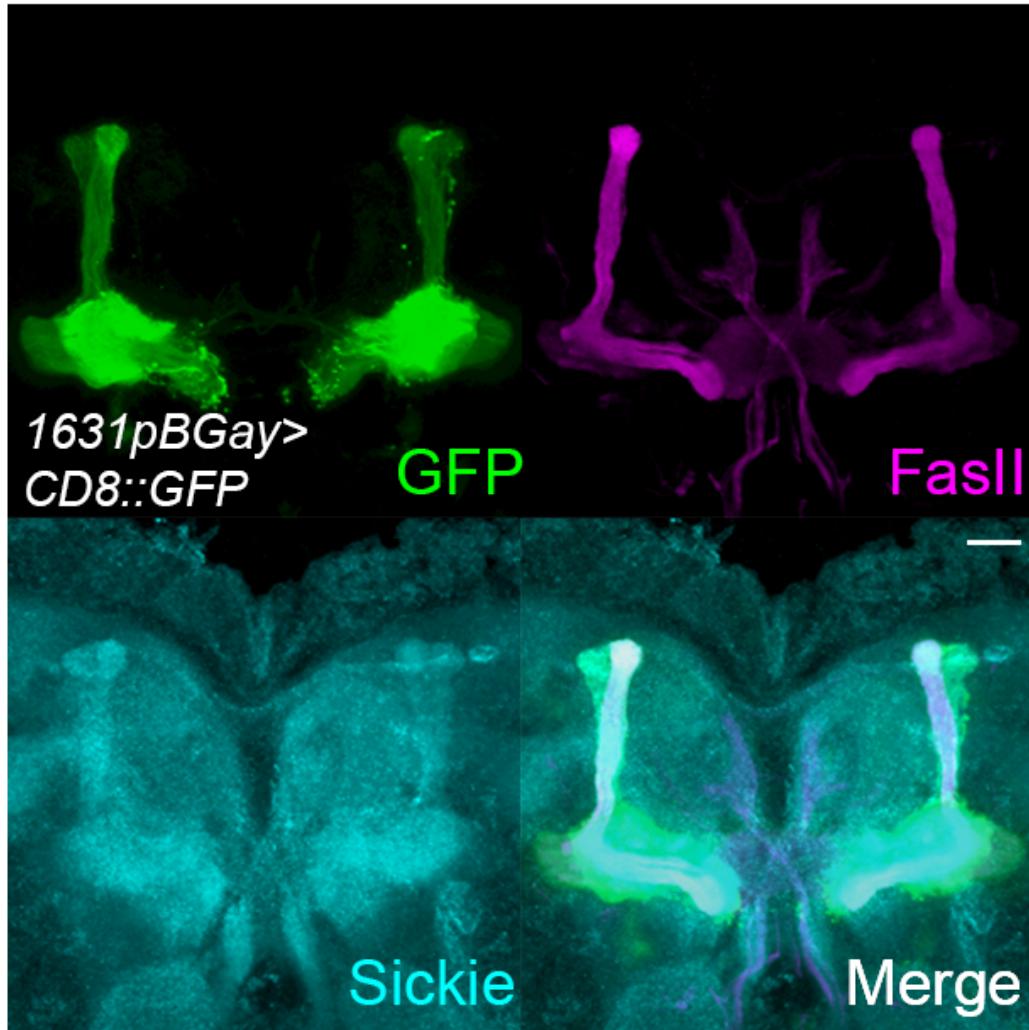


図13. 蛹化後 36 時間前後の *1631pBGay-gal4* 系統におけるレポーターGFPと内在性 Sickie の発現パターン。FasII でラベルされるキノコ体の α / β 神経軸束において GFP の発現が重なっている。Sickie はキノコ体神経軸索を含む脳全体で発現が検出された。

Scale bar: 20 μ m

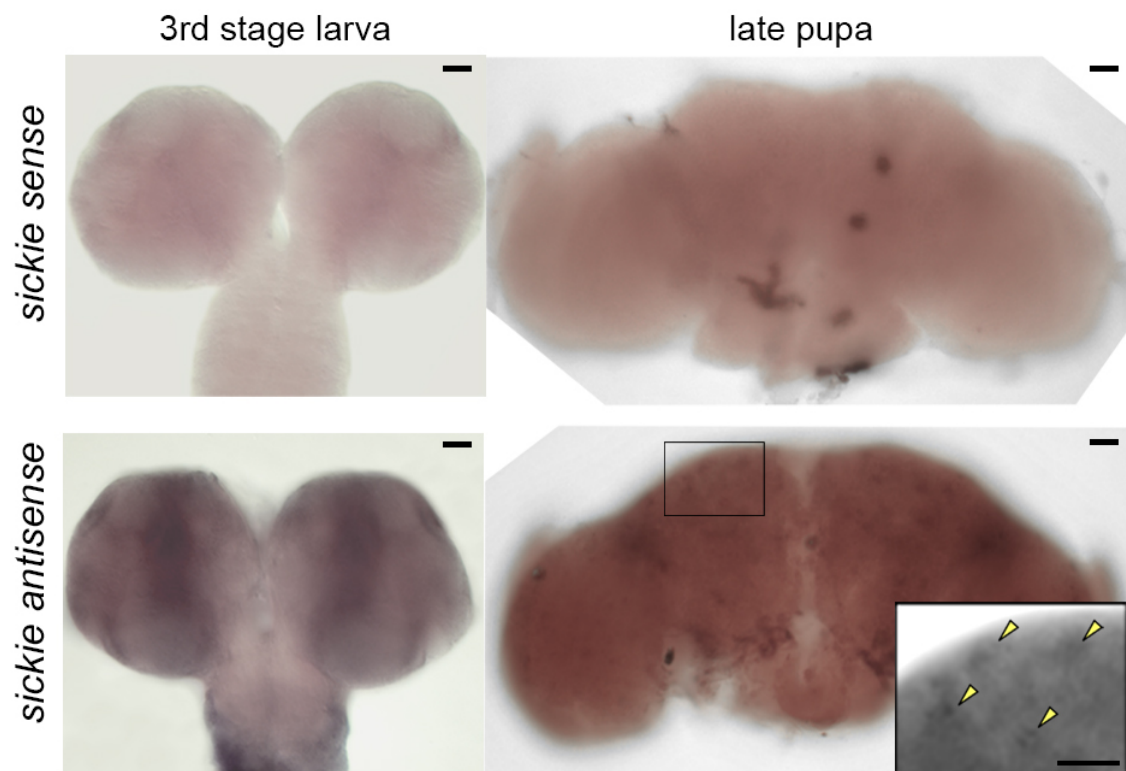
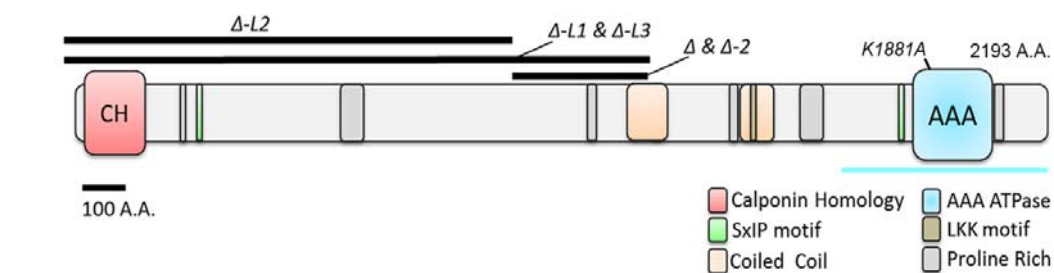


図14. *in situ* hybridization による *sickie* の発現パターンの検出。3 令幼虫期、蛹化後 72 時間前後の *yw* 系統の脳後方部のキノコ体神経の細胞体領域を含む領域で発現が確認された。脳片半球あたり 4 つのクラスター上の発現が観察された(黄矢頭)。Scale bars: 20 μ m

Total-cDNA の中から *sickie* の cDNA を単離し、BLAST 解析を行った結果、*Sickie* はヒトの微小管＋端集積因子である Neuron-navigator-2 (NAV2) のホモログであり、actin 結合性タンパク質に保存されている Calponin homology (CH) ドメイン (Banuelos et al., 1998)、Coiled Coil モチーフ、AAA ATPase ドメイン (Erzberger and Berger, 2006) が種を超えて保存されていることを確認した (図 15) (Klein et al., 2011; Maes et al., 2002; Martinez-Lopez et al., 2005; McNeill et al., 2011; McNeill et al., 2010; Stringham et al., 2002; Stringham and Schmidt, 2009)。配列解析ソフトウェア GENETYX を用いた結果、微小管＋端結合因子 EB1 との結合に必要な SxIP モチーフ (Akhmanova and Steinmetz, 2010) が 2 箇所、ヒト NAV、ゼブラ NAV、*Sickie* の間で保存されていることが明らかになった (図 15)。

キノコ体軸索束形成における *Sickie* の必要性を検討するため、FLP-FRT 法により *sickie* の遺伝子領域欠失系統を複数作成した (Parks et al., 2004)。*sickie* 遺伝子座特異的な欠失系統として、三番目の Pro-rich な領域から一つ目の Coiled-Coil モチーフに対応する 510 アミノ酸残基を欠失する *sickie^Δ* を得た。また既存の *piggybac* 挿入系統の中から、*sickie* の遺伝子座全体を含む Deficiency 系統である *Df (2L) ED1303* や、*sickie^Δ* との相補性試験により *sickie^{A384}* 変異体を同定した (図 8)。野生型個体のキノコ体と比較した際、*sickie^{Δ/A384}* 変異体では、peduncle の領域においては明らかな形態異常は観察されなかったが、lobe 領域において短い軸索束の形成が観察された (図 16)。この表現型は FasII 抗体によりラベルされる α/β lobe 神経軸索においてもっとも明瞭に観察できたため、その表現型について、Class-I、Class-II の 2 つのカテゴリーを定義した (図 17)。 α 神経軸索束または β 神経軸索束のいずれかが、軸索束分岐点から投射末端までの中間点よりも伸長できなかった場合、



Calponin homology domain

Homo sapiens IYTDWANHLLAKSGHKRLIKDLQQDVTDGVLAAQITGVANERIEDINGCPKNSRS---QMIENIDACNFLAAGKINIQ-G
Danio rerio IYTDWANHLLAKSGHKRLIKDLQQDVTDGVLAAQITGVANERIEDINGCPKNSRS---QMIENIDACNFLAAGKINIQ-G
D. melanogaster IYTDWANHLLAKSGHKRLIKDLQQDVTDGVLAAQITGVANERIEDINGCPKNSRS---QMIENIDACNFLAAGKINIQ-G
C. elegans IYTDWANHLLAKSGHKRLIKDLQQDVTDGVLAAQITGVANERIEDINGCPKNSRS---QMIENIDACNFLAAGKINIQ-G
 LSAAEETRNGLKAILGLFFSLSRYSKQ
 LSAAEETRNGLKAILGLFFSLSRYSKQ
 ITTNDICAGLKAVALALFFALSRYKQ
 TKTDIDS-GNLGAVLQLLELLSTYKQK

SxIP motif

Homo sapiens IPKGGKLLNSAKKEPMAPSHSGIPKPGMKSIS-LDSLVFESLIPKPILORYVSL-LIEHRRILSGPSGTGKIYLANRLSE
Danio rerio IPKGGKLLNSAKKEPMAPSHSGIPKPGMKSIS-LDSLVFETLIPKPILORYVSL-LIEHRRILSGPSGTGKIYLANRLSE
D. melanogaster IPKGGKLLNSAKKEPMAPSHSGIPKPGMKSIS-LDSLVFETLIPKPILORYVSL-LIEHRRILSGPSGTGKIYLANRLSE
C. elegans IPKGGKLLNSAKKEPMAPSHSGIPKPGMKSIS-LDSLVFETLIPKPILORYVSL-LIEHRRILSGPSGTGKIYLANRLSE

Coiled Coil

Homo sapiens YSTPEEKQSSEIRKLRLRELDAEQKVSALTITQANAHVAAFEQSLGNTIRLQS--LTMTAEQKDS-ELNELRKTIELLKKQNA
Danio rerio YSTPEEKQSSEIRKLRLRELDAEQKVSALTITQANAHVAAFEQSLGNTIRLQS--LTMTAEQKDS-ELNELRKTIELLKKQNA
D. melanogaster YSTPEEKQSSEIRKLRLRELDAEQKVSALTITQANAHVAAFEQSLGNTIRLQS--LTMTAEQKDS-ELNELRKTIELLKKQNA
C. elegans YSTPEEKQSSEIRKLRLRELDAEQKVSALTITQANAHVAAFEQSLGNTIRLQS--LTMTAEQKDS-ELNELRKTIELLKKQNA
 HDSAEETVMQ-LRN--ELREKEMKLTDIRLEALSSAHQDLQREANNRQSEIEKLEKENDRLKSE
 LDGEAETVMQ-LRN--ELREKEMKLTDIRLEALSSAHQDLQREANNRQSEIEKLEKENDRLKSE
 LDGEAETVMQ-LRN--ELREKEMKLTDIRLEALSSAHQDLQREANNRQSEIEKLEKENDRLKSE
 LDGEAETVMQ-LRN--ELREKEMKLTDIRLEALSSAHQDLQREANNRQSEIEKLEKENDRLKSE

AAA ATPase domain

Walker-A
★(K1881)

Homo sapiens EHRRILSGPSGTGKIYLANRLSEYIVLRGRELTDGVTATFNVDHKSSKELRQYLSNLAQCCNSENNVDMP
Danio rerio EHRRILSGPSGTGKIYLANRLSEYIVLRGRELTDGVTATFNVDHKSSKELRQYLSNLAQCCNSENNVDMP
D. melanogaster EHRRILSGPSGTGKIYLANRLSEYIVLRGRELTDGVTATFNVDHKSSKELRQYLSNLAQCCNSENNVDMP
C. elegans EHRRILSGPSGTGKIYLANRLSEYIVLRGRELTDGVTATFNVDHKSSKELRQYLSNLAQCCNSENNVDMP
 MILDNLHHVSSLGELFNGLLNCKYHK--PYIIGTMSQATSSAPNLQHHNFRWVLCANHEPVKGFGLGRFLRRKMEIEIS-
 VILDLNLHHVSSLGELFNGLLNCKYHK--PYIIGTMSQATSSAPNLQHHNFRWVLCANHEPVKGFGLGRFLRRKMEIEIS-
 MILDNLHHVSSLGELFNGLLNCKYHK--PYIIGTMSQATSSAPNLQHHNFRWVLCANHEPVKGFGLGRFLRRKMEIEIS-
 MILDNLHHVSSLGELFNGLLNCKYHK--PYIIGTMSQATSSAPNLQHHNFRWVLCANHEPVKGFGLGRFLRRKMEIEIS-

図15. 種間で保存されたドメイン、モチーフのアライメント図。actin 結合性のCHドメイン、Coiled Coil 領域、AAA ATPaseドメインはヒト NAV、ゼブラフィッシュ NAV、Sickie、線虫の UNC-53 で全て保存されていた。SxIP モチーフの明らかな保存は線虫では確認できなかった。AAAドメインにはコンセンサス ATP/GTP-binding motif であると考えられている Walker-A モチーフ(GxxxxGKS/T)が存在する。

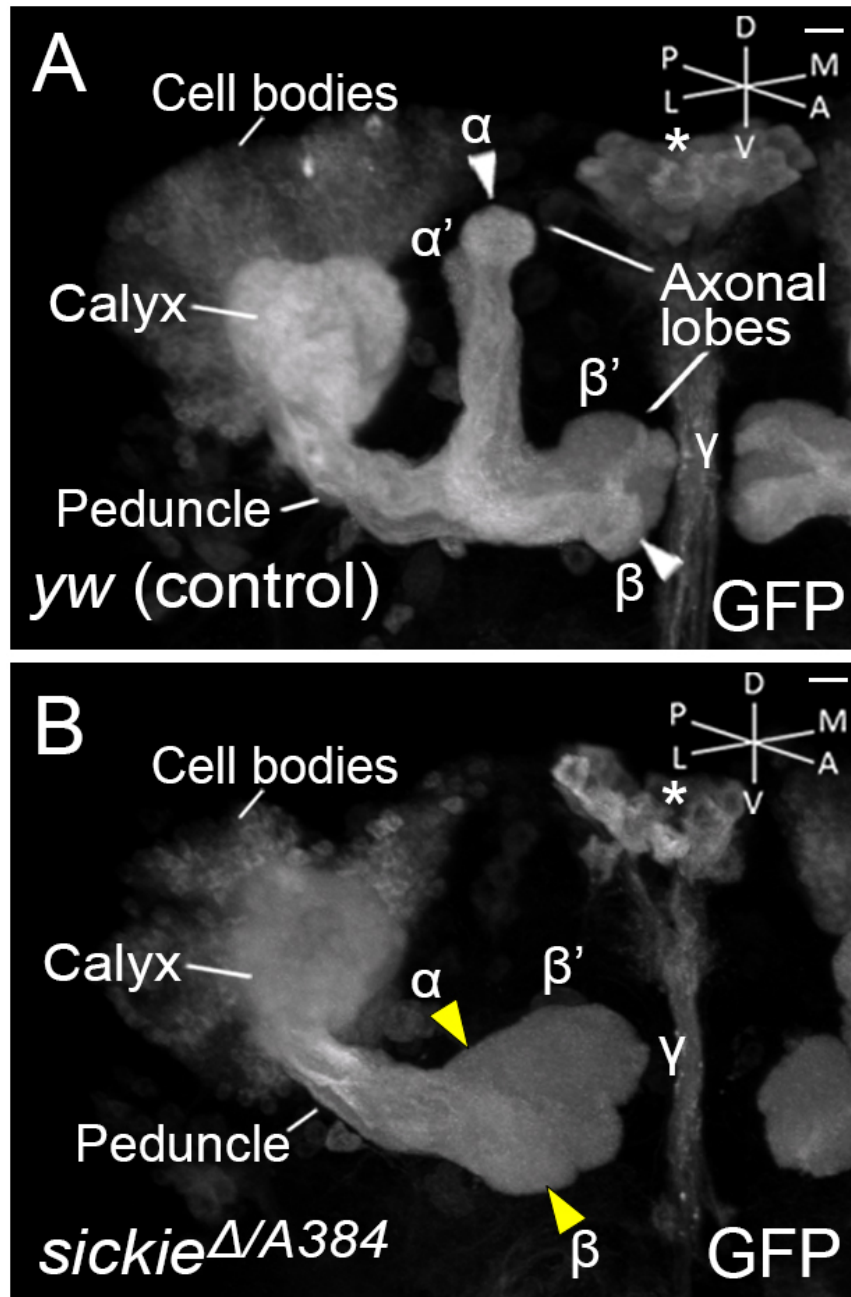


図16. (A) *OK107-Gal4* で発現誘導した GFP レポーターによりラベルした、成体の右脳のキノコ体の切出し図。白矢頭は正常に投射伸長した *yw* 個体のキノコ体 α / β lobe 末端を示す。(B) 黄矢頭は peduncle 形成後の軸索伸長が阻害され、正常な lobe 構造が形成されていない *sickie* 変異体の α / β lobe 末端を示す。星印は脳間部組織。Antero-lateral view, Scale bars: $20 \mu m$

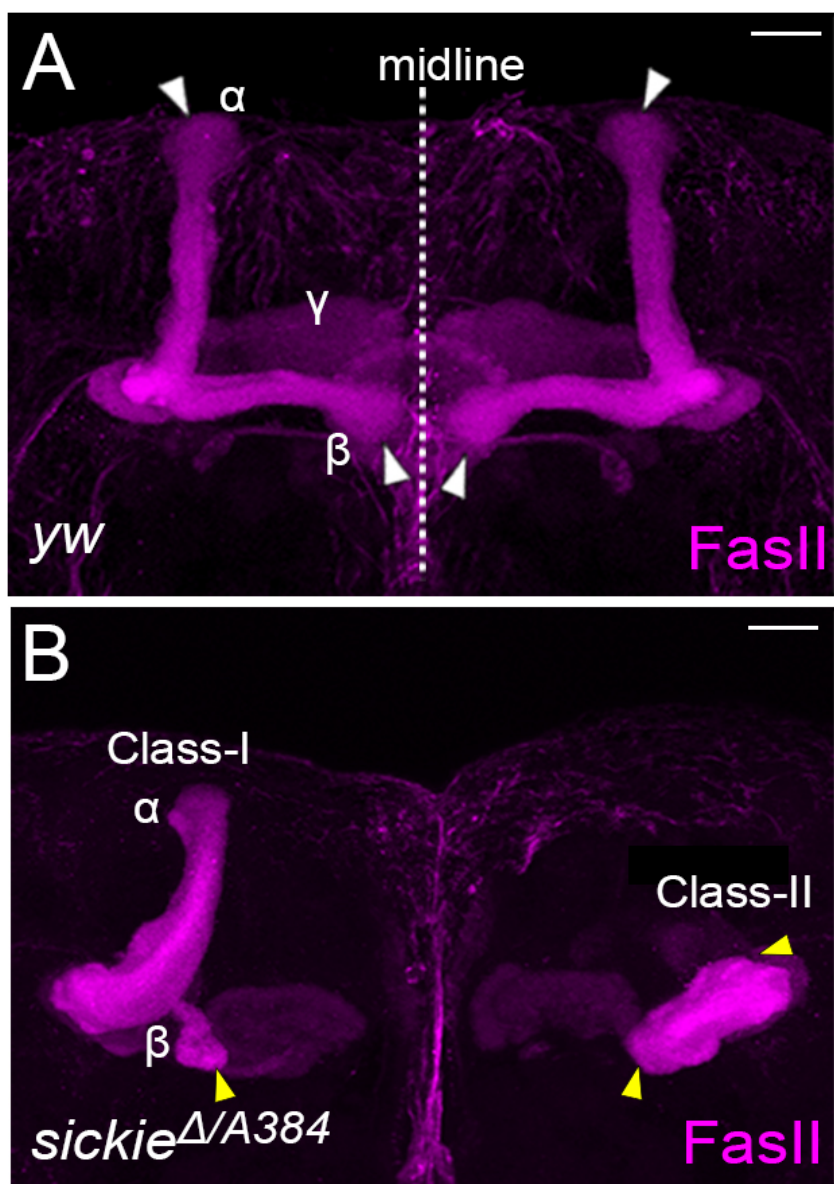


図17. (A)成虫脳の α/β lobe を FasII 抗体でラベルしたもの。白矢頭は正常に投射した末端領域を示す。(B)黄矢頭は伸長異常が起こっている軸索束末端を示す。右脳半球側のキノコ体は Class-I 型に、左脳半球側のものは Class-II 型に分類される。Scale bars:20 μ m

Class-I と定義した。一方、 α 、 β 神経軸索束の両者がそれぞれの通常投射末端までの中間地点に達しない場合を Class-II と定義した。作出した複数の *sickie* 変異体の表現型の強さを、種々のヘテロ変異体の組み合わせにすることによって各アレル間で比較した (図 18)。その結果、*sickie*^{A/A384} 変異体の表現型の浸透率は、Sickie の開始コドンと以降のコード領域を大きく欠失したアレルの組み合わせである *sickie*^{A-L1/Df (2L)} *ED1303* 変異体とほぼ同等であることが明らかになった。また、野生型個体の ellipsoid body (EB) に比べ *sickie*^{A/A384} 変異体の EB では、正中線上に形成される環状構造が乱れ、脳の各半球に分断して形成される異常が観察された (図 19)。この表現型は全ての組み合わせの *sickie* ヘテロ変異体で同程度かつ高頻度に観察された。さらに、FasII の発現が弱い peduncle の中心領域には新生神経の軸索が存在しており、正常型個体の中心領域において顕著な Sickie の発現が観察されたが、*sickie*^{A/A384} 変異体においてはその発現が観察されなかった (図 11)。これらの結果は、*sickie*^A および *sickie*^{A384} 系統は *sickie* の機能欠失型アレルであることを示唆していると考えられる。以上を総合すると、Sickie は新生のキノコ体神経軸索で強い発現を示し、その変異体は軸索束伸長異常の表現型を示したことから、正常なキノコ体神経束の形態形成に必要であると結論した。以降の解析では MARCM 法においては *sickie*^A、全身変異体としては *sickie*^{A/A384} を *sickie* の機能欠失型変異体として用いて解析を行った。

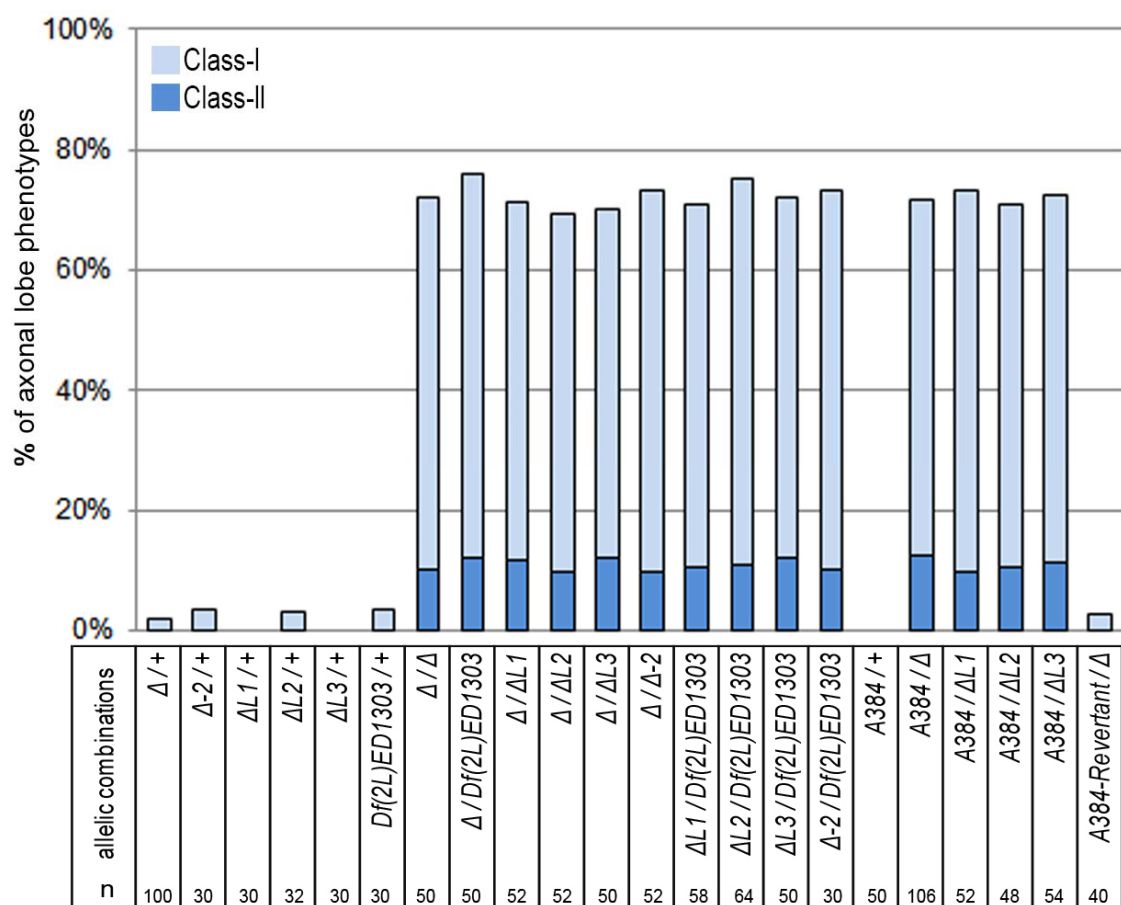


図18. 本研究で作成した複数の *sickie* アリルの組み合わせの変異体における表現型の浸透率の比較。*sickie* アリルは正常型染色体(+)とのヘテロ変異体下では、Class-II 型の表現型の浸透率は観察した全ての場合において 0%であり、Class-I 型も 5%以下であった。*sickie* 変異体のアリル同士のヘテロ変異体では、Class-II 型が 10%~15%、Class-I 型が 55~65%の範囲で観察された。

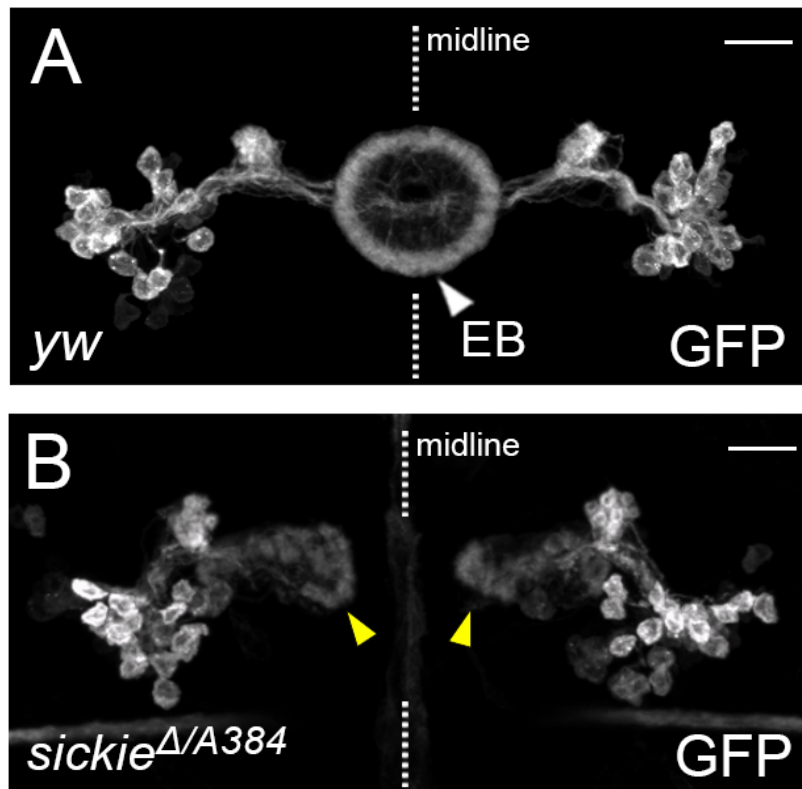


図19. (A) *EB1-Gal4*で発現誘導した GFP レポーターによりラベルした、成体の Ellipsoid Body (EB)。白矢頭は正中線領域に正常に伸長し形成された環状構造を示す。(B) 黄矢頭は軸索伸長が阻害され、各脳半球に分断され環状構造が形成されていない *sickie* 変異体の EB を示す(B)。Scale bars: 20 μ m

3.2 新生のキノコ体神経の軸索伸長における Sickie の細胞自律的必要性

Sickie が神経軸索の形成を細胞自律的に制御するかどうかを明らかにするため、ホモ変異体のキノコ体神経を単一細胞レベルでラベルすることができる MARCM 解析を行った (Wu and Luo, 2006)。正常型の α/β 神経の神経軸索に比べ、*sickie*^Δ ホモ変異体では、神経軸索が lobe の末端まで到達しない伸長異常が観察された (図 20)。また、*OK107-gal4* ドライバーを用いた RNA 干渉法により、キノコ体において *sickie* をノックダウンする実験を行った。25°C の誘導条件下では、目立った軸索束形成異常は観察されなかった (図 21A-A')。このため、育成温度を 29 度にまで上げ、*Dicer2* を共発現させると、一定数の *sickie-RNAi* 個体において軸索束の形成異常が観察された (図 21B-B'、21C)。これらの結果は、キノコ体神経の軸索伸長において *sickie* が細胞自律的に必要であることを示唆している。

次に、神経軸索伸長における Sickie の十分性を検討するためのレスキュー実験を行った。第 1 に、Pan-neuronal な発現を誘導する *elav-gal4* 系統と、野生型 Sickie を発現する系統 (*UAS-sickie*^{WT}) の組み合わせで実験を行った。*elav-gal4* のみを持たせた変異体では軸索伸長異常が回復しなかったが (図 22A-A'')、同時に野生型 *UAS-sickie* を持たせた系統では、Sickie は神経系の組織で広範な発現が検出され (図 22B'')、軸索伸長阻害の表現型は、左右の β lobe が正中線上で融合してしまう現象 (図 22B') を除き、ほぼ完全に回復した。野生型の遺伝学的背景で同様に *elav-gal4* 依存的に Sickie を強制発現させた場合も過剰伸長による融合が観察されたことから、Gain-of-function 様の効果が現れている可能性があると考えられた。

第 2 に、キノコ体での顕著な発現を誘導する *OK107-gal4* 系統 (図 22C) を

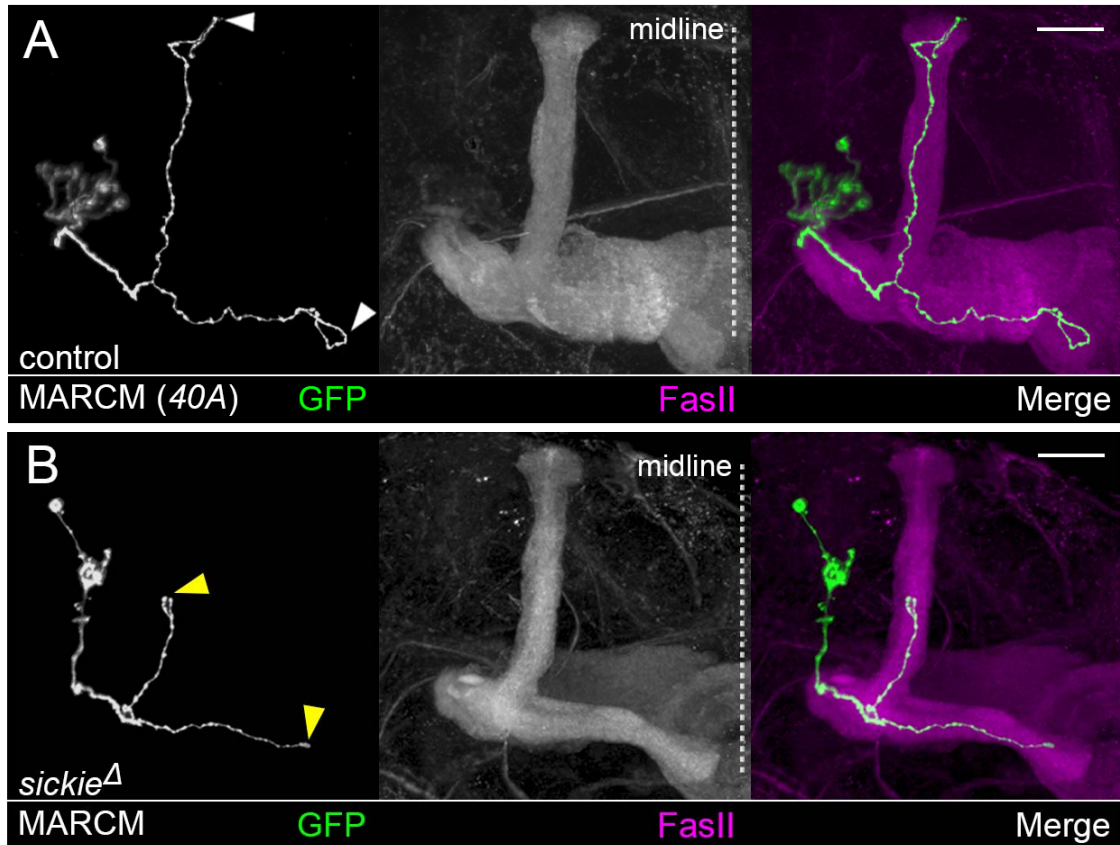


図20. (A)キノコ体神経軸索の伸長における Sickie の細胞自律的必要性。MARCM 法により単一のキノコ体神経細胞を GFP でラベルした。白矢頭は、正常に投射した α/β lobe 末端まで伸長したコントロールの *FRT40A* クローン軸索を示す。n=102, 2.94%。(B)黄矢頭は、 α/β lobe 末端まで伸長できない異常を示す *sickie Δ* 変異体の軸索末端。n=104, 13.5%。Scale bars:20 μ m

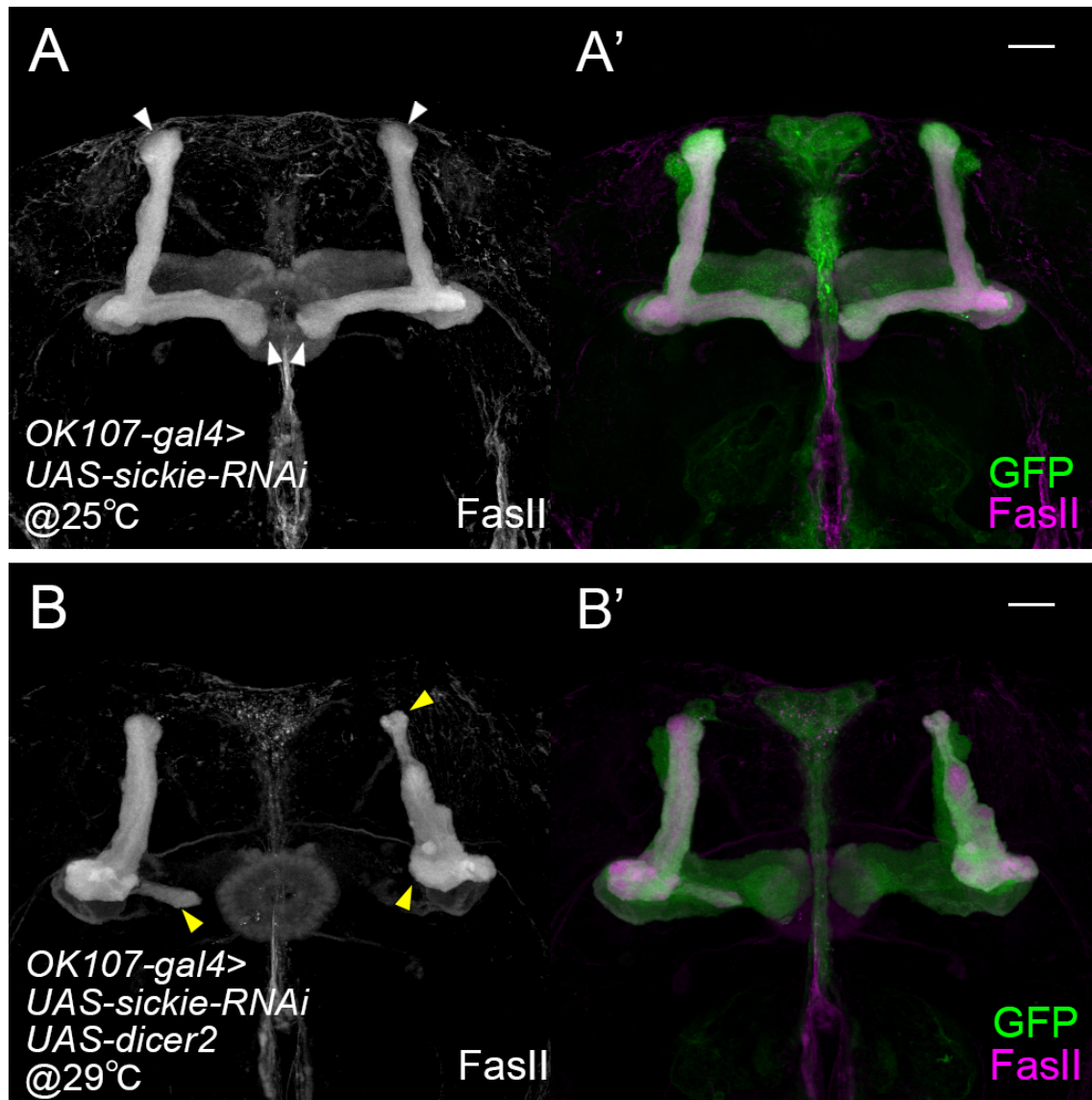


図21. (A) 25°Cの誘導条件下では明らかな軸索束形成異常は観察されない。(B) 育成温度を 29 度にまで上げ、Dicer2 を共発現させると、軸索束の形成異常が観察された。
Scale bars: 20 μ m

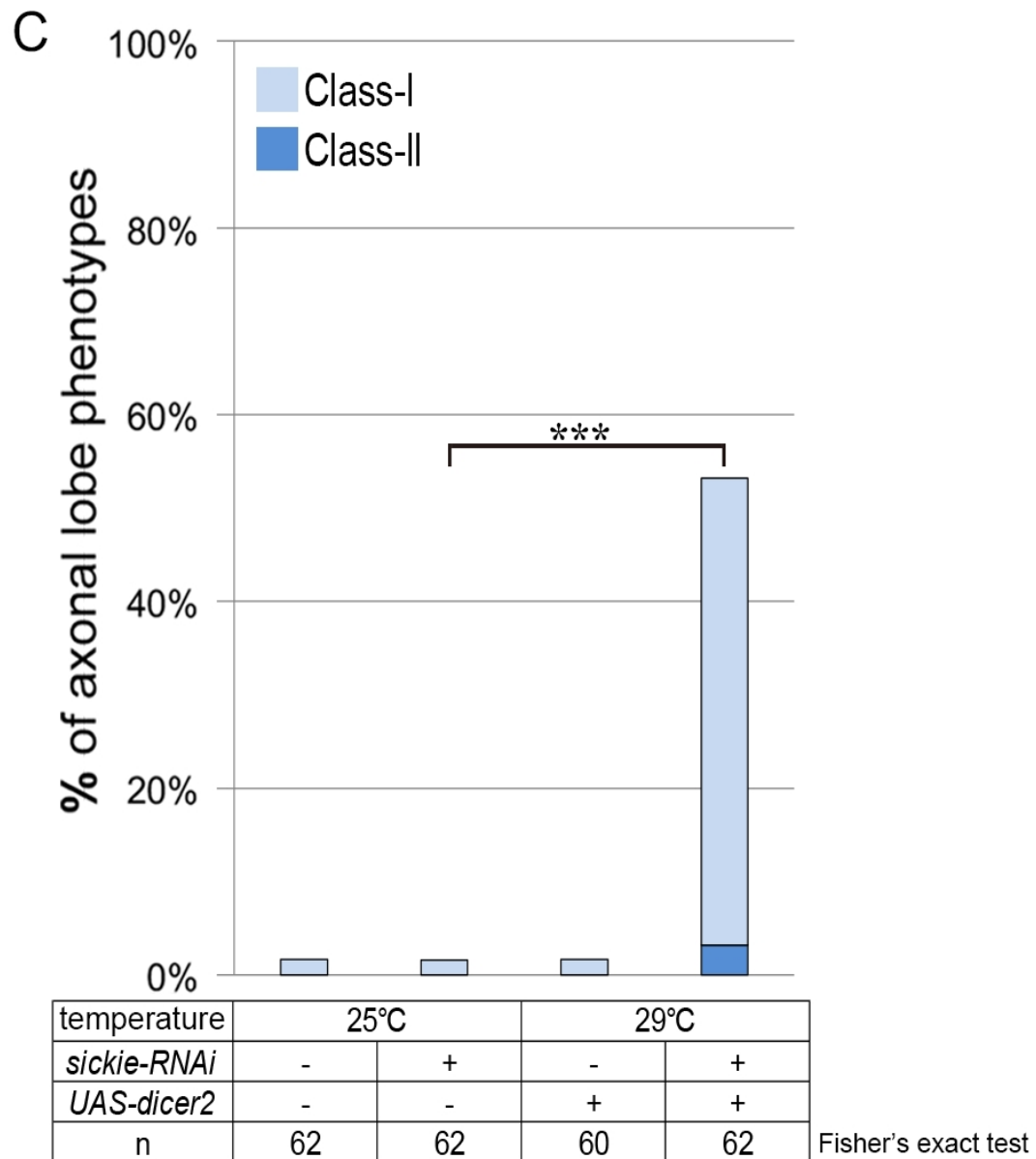


図21. (C)軸索束形成異常の表現型に関し統計的解析を行ったところ、29°C 育成条件で Dicer2 を共発現した群は 25°C 育成条件で *sickie* の RNA 干渉単独発現群に比べ有意に異常個体の比率が増加していた。*** $p=1.50 \times 10^{-11}$ 。Fisher の正確確率検定、Bonferroni 補正を適用。

用いて同様の実験を行ったところ、キノコ体軸索束の形成異常はレスキューされた (図 22C')。第 3 に、Sickie の時空間的必要性を調べるために、成虫脳において α/β 神経束の中心領域での発現を誘導することが既知のドライバーである *NP7175-gal4* 系統の使用を検討した (Aso et al., 2009; Tanaka et al., 2008)。 α/β 神経は蛹化後に産生され続けることが知られていたため (Lee et al., 1999)、蛹形成後のキノコ体領域でのレポーターGFP の発現を検証した (図 23)。FasII の発現が弱い α/β 神経束の中心領域付近で、発生過程を通して GFP の発現が観察され続けたため、本ドライバーは蛹期の新生のキノコ体 α/β 神経で一過的に遺伝子発現を誘導できることが示唆された。Sickie の発現でラベルされる、中心領域のなかでも特にコアと考えられる領域 (白矢頭) で GFP の発現が弱いのは、Gal4-UAS システムの遅延による影響が一つの可能性として考えられる (Phelps and Brand, 1998)。本ドライバーを用いた結果、*elav-gal4*, *OK107-gal4* のときと同様に軸索束の形成異常が回復し、これらのレスキュー効果はフィッシャーの正確確率検定を行った結果、有意であることが明らかになった (図 24A)。同様の結果は *UAS-sickie^{WT}* の代わりに *UAS-mCherry::sickie^{WT}* を用いた場合にも確認できた (図 24B)。次に Sickie の AAA ドメインの軸索伸長における必要性を確かめるため、AAA ドメイン内の Walker-A モチーフのアラニン置換体 Sickie (*UAS-mCherry::sickie^{K188IA}*) を用いたレスキュー実験を行った (Hanson and Whiteheart, 2005; Ramakrishnan et al., 2002; Saraste et al., 1990)。*OK107-gal4*, *NP7175-gal4* いずれを用いた場合でも、有意なレスキュー効果は観察されなかった (図 25, 26)。

以上の結果は、Sickie が発生過程の新生キノコ体神経において、細胞自律的に軸索伸長を正に制御し、その際 AAA ドメインの機能を必要とすることを示唆している。

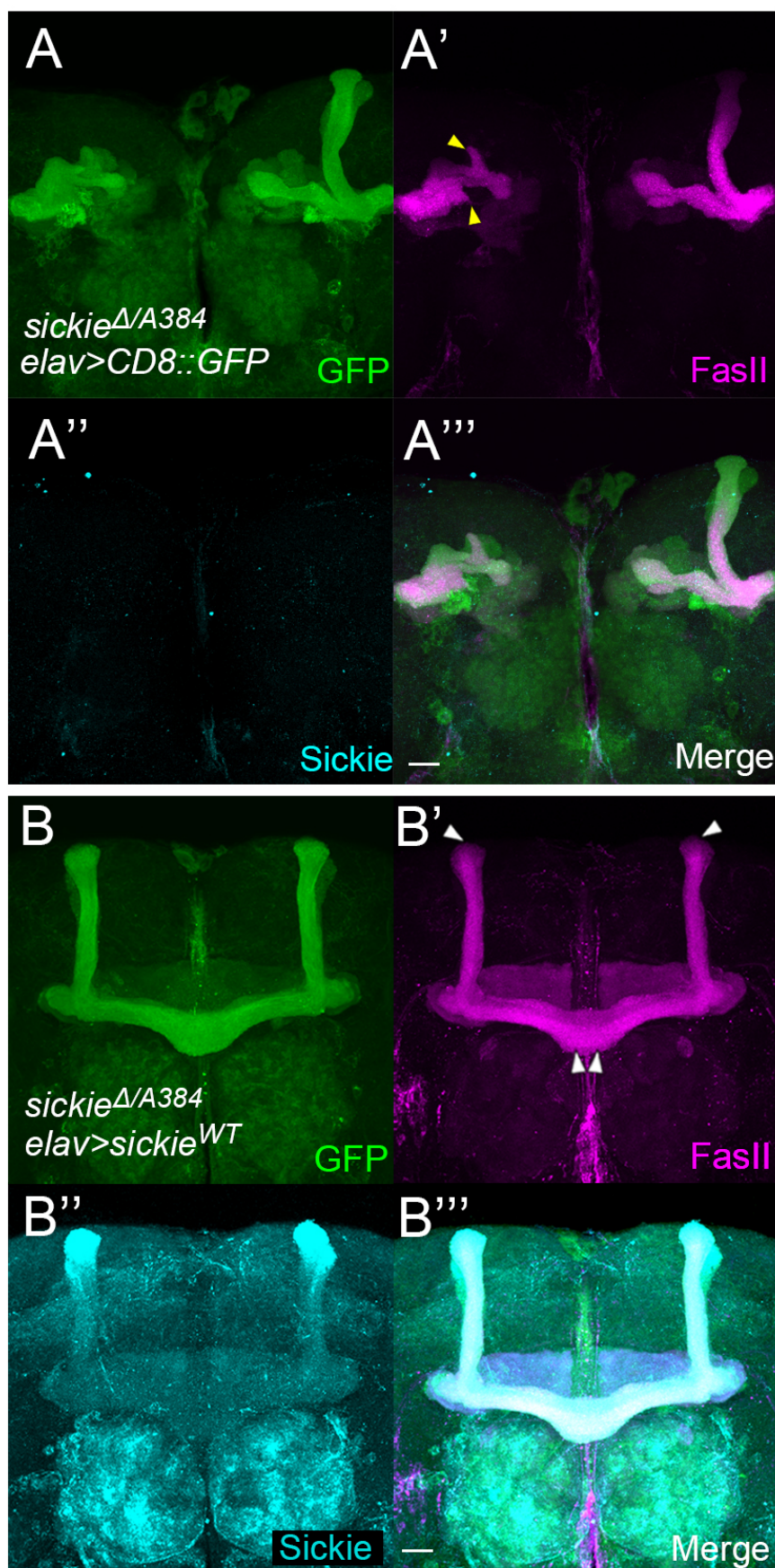


图 22

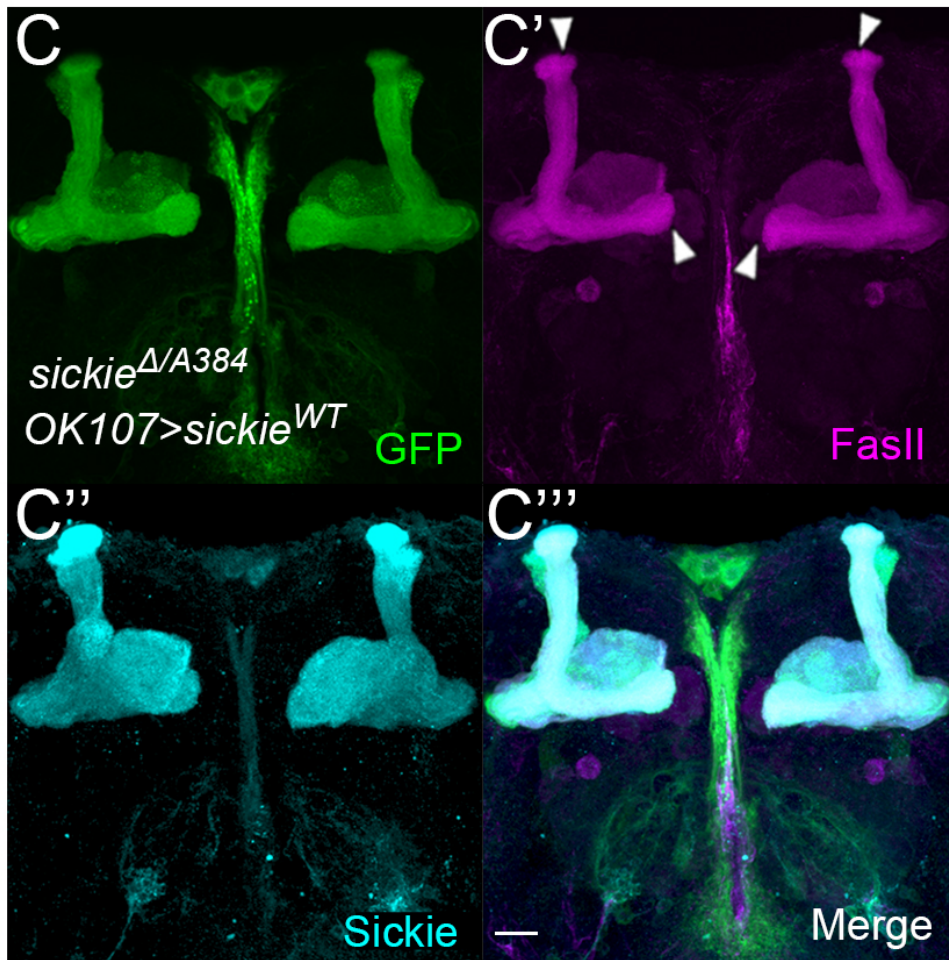
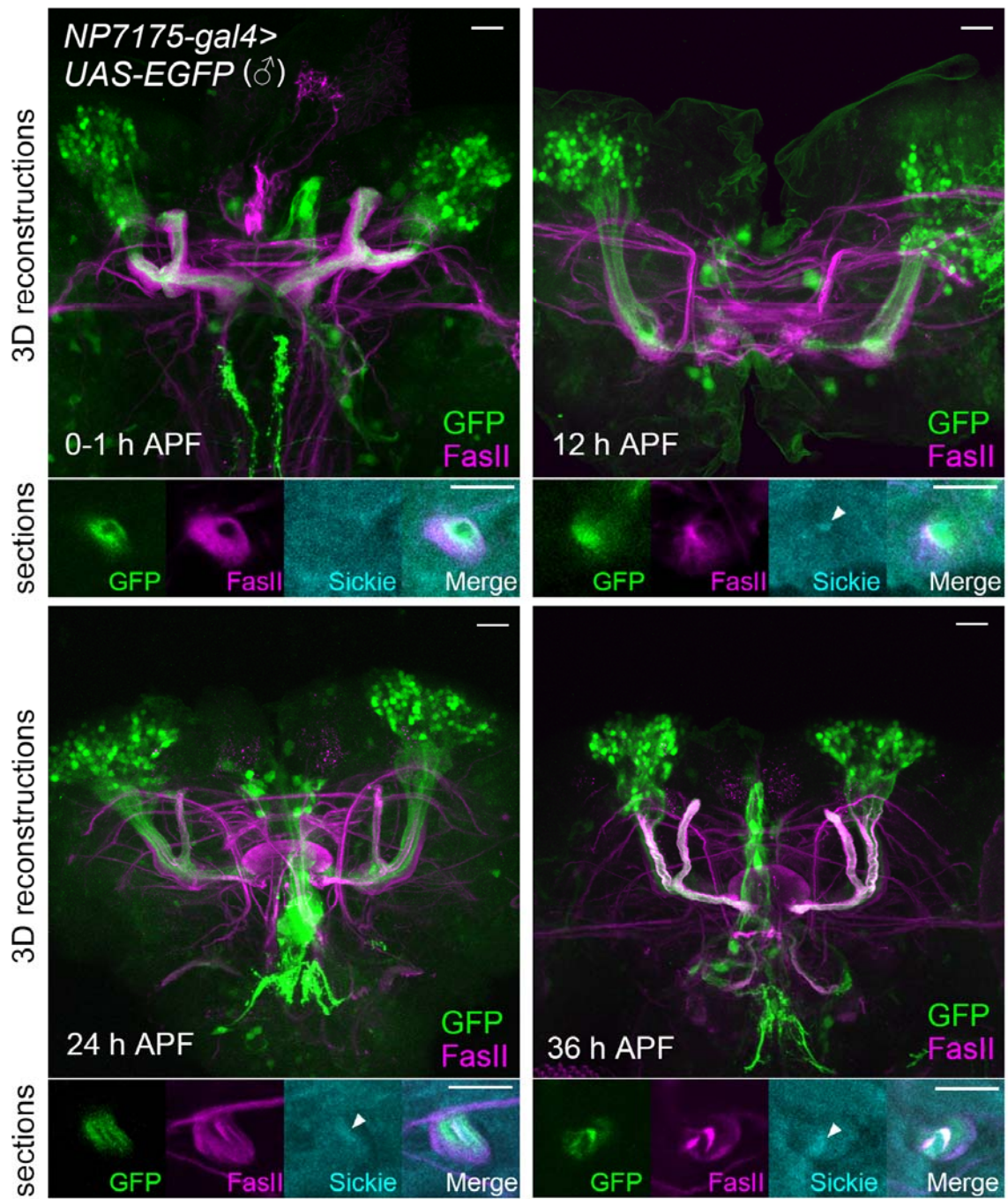
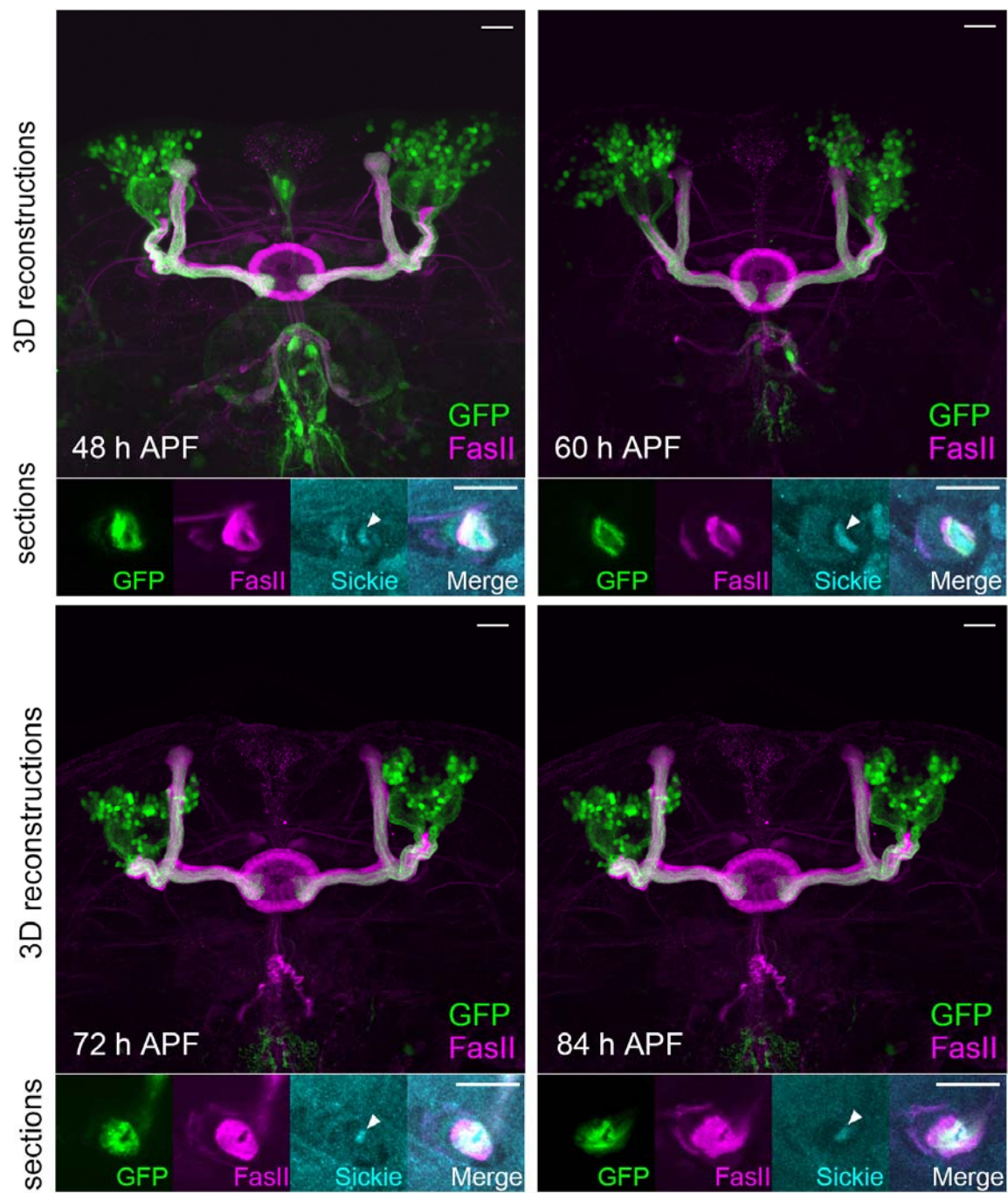


図22. (A-A'', B-B'') *sickie*^{Δ/A384} 変異体の軸索束形成異常のレスキュー実験。全神経性の *elav-gal4* 依存的な野生型 Sickle の発現(B'')は変異体の表現型を高効率に回復させる。(B')の白矢頭は lobe 端を示し、正中線側に投射する β lobe は過剰伸長し融合してしまう効果を示した。野生型下で同様に *elav-gal4* 依存的に Sickle を強制発現させた場合も過剰伸長による融合が観察されたことから、Gain-of-function 様の効果が現れている可能性がある。(B'')強制発現された Sickle は脳の広範な領域で検出された。(C-C'')キノコ体で強い発現を示す *OK107-gal4* 依存的な野生型 Sickle の発現は *sickie*^{Δ/A384} 変異体の表現型を回復させる。(C')の白矢頭は正常に形成された α / β lobe 末端を示す。(C'')キノコ体で顕著な Sickle の発現が検出された。Scale bar:20 μm



23-1



23-2

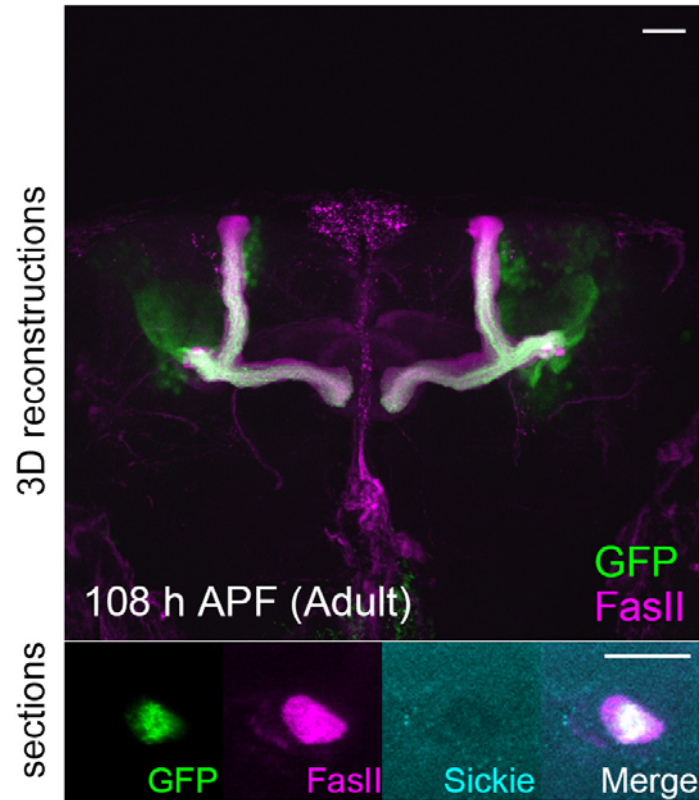


図 23-3

図23. 発生過程を通して、レポーターGFP の発現が FasII でラベルされる α / β 神経軸索束の内側の領域で観察された(各ステージ Section パネル)。蛹形成後 12～84 時間にかけて、Sickie の強い発現が軸索内側でも更に中心の、FasII の発現が弱い領域で観察された(Section パネル白矢頭)。この中心領域における GFP の発現は弱く観察された。

Scale bars:20 μ m

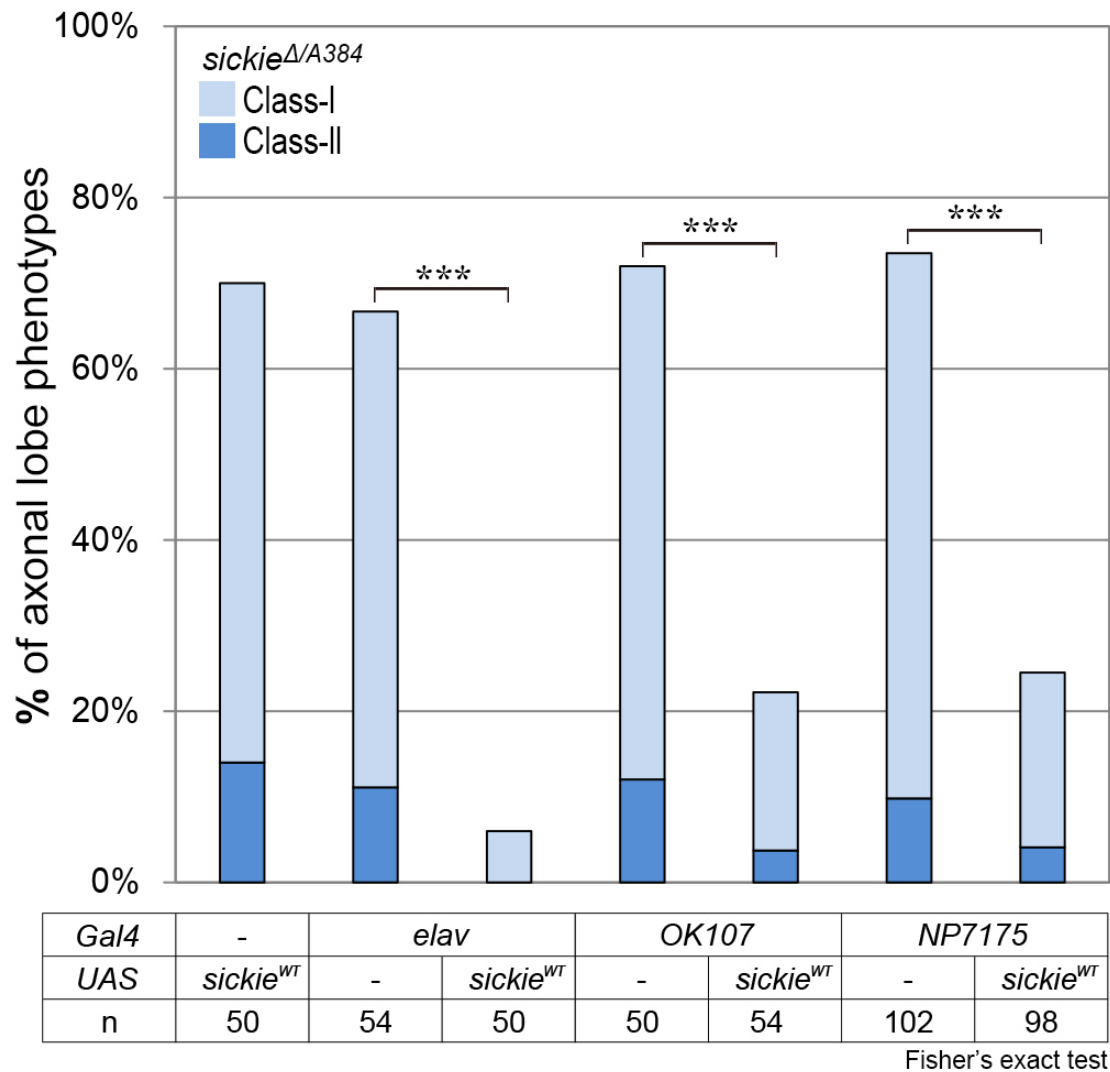


図24. (A)野生型 Sickie の強制発現によるレスキュー実験の定量と検定結果。全神経性の *elav-gal4*, キノコ体特異的 *OK107-gal4*, 新生のキノコ体神経特異的 *NP7175-gal4* のいずれを用いた場合でも、*sickie*^{Δ/A384} 変異体の表現型は有意にレスキューされた。Fisher の正確確率検定を両側検定で行った。*elav-gal4*: *** $p=4.40 \times 10^{-11}$, *OK107-gal4*: *** $p=5.13 \times 10^{-7}$, *NP7175-gal4*: *** $p=2.30 \times 10^{-12}$ 。

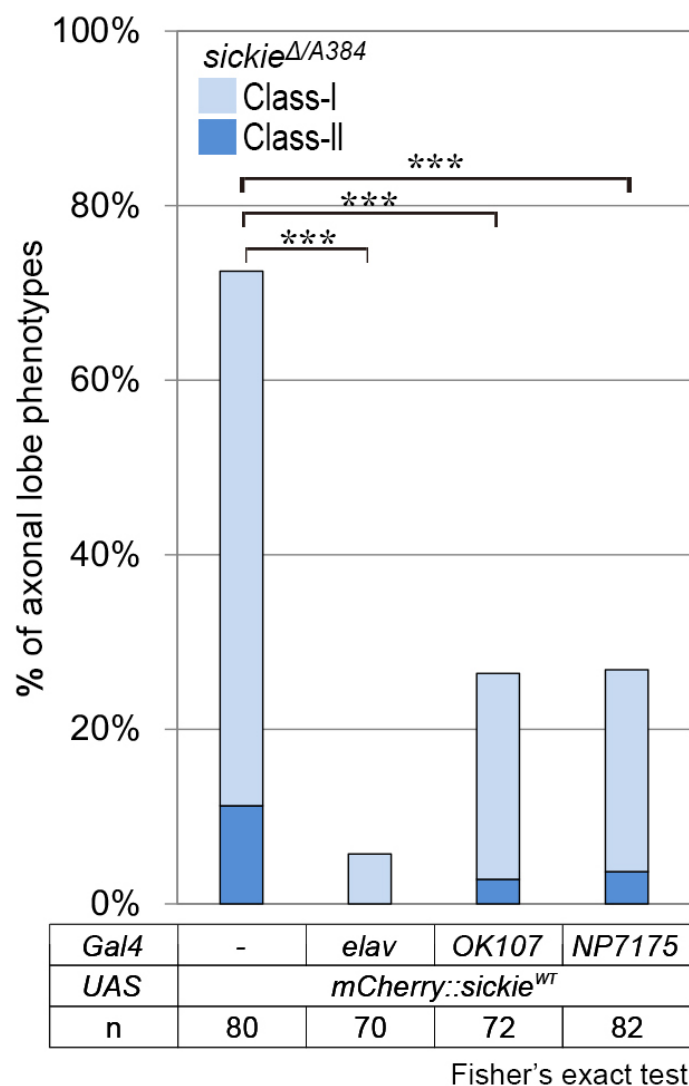


図24. (B)mCherry 融合型 Sickie の強制発現によるレスキュー実験の定量結果。野生型 Sickie と同様のレスキュー結果が得られた。Fisher の正確確率検定を両側検定で行った。多重比較を行ったため、Bonferroni の補正を行った有意水準のもとに検定を行った。*elav-gal4*: *** $p=2.84 \times 10^{-18}$ 、*OK107-gal4*: *** $p=1.90 \times 10^{-8}$ 、*NP7175-gal4*: *** $p=8.66 \times 10^{-9}$ 。*OK107-gal4*によるレスキューと *NP7175-gal4*によるレスキュー結果には有意な差は認められなかった。 $p=0.951$

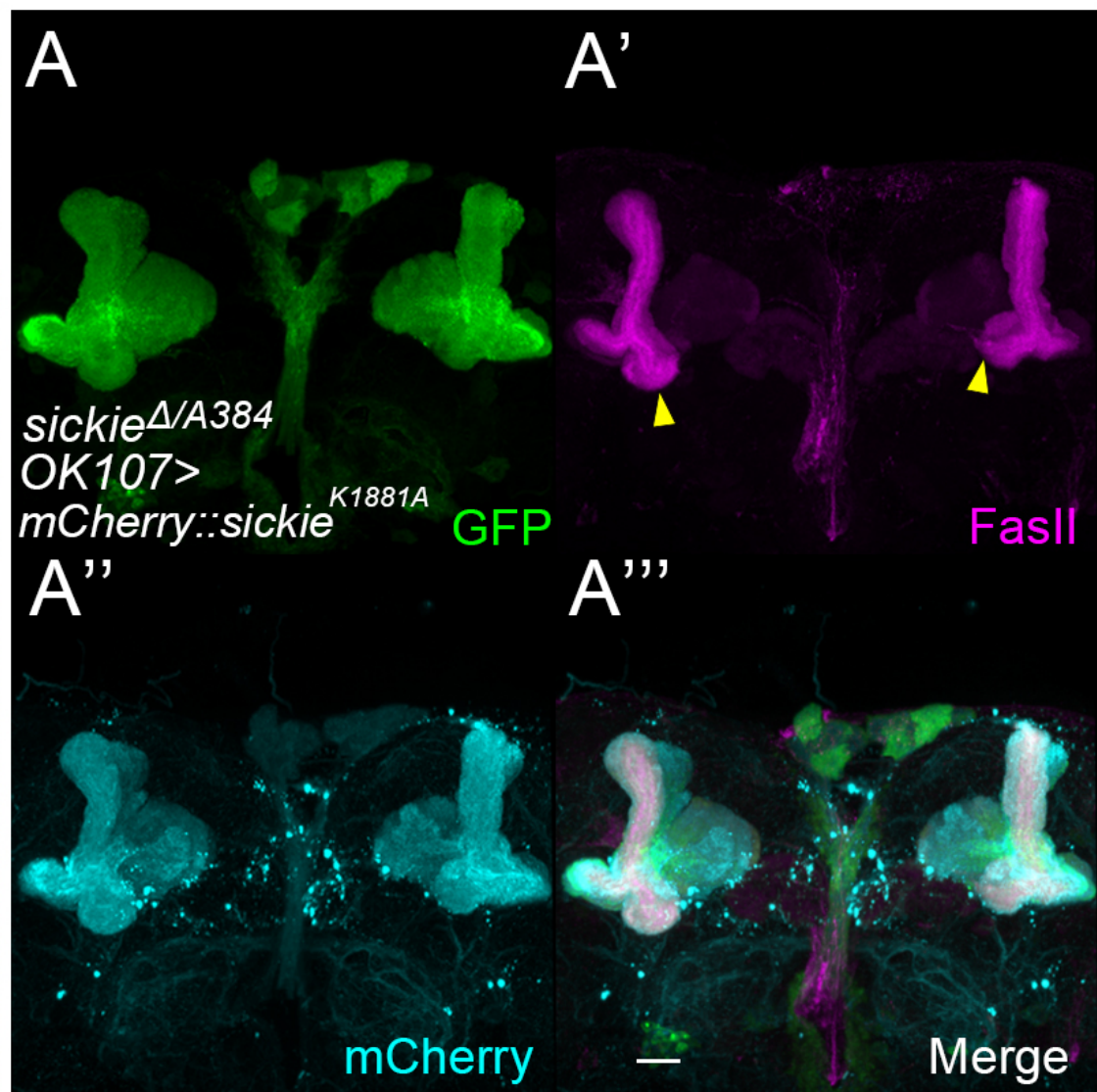


図25. (A)mCherry 融合型 Sickie の AAAドメインのアラニン置換変異体コンストラクトによるレスキュー実験。(A'') *OK107-gal4* 依存的に発現を誘導した結果、軸索において Sickie は検出されているものの、(A')黄矢頭に示すように軸索伸長異常はレスキューされなかった。Scale bars, 20 μ m.

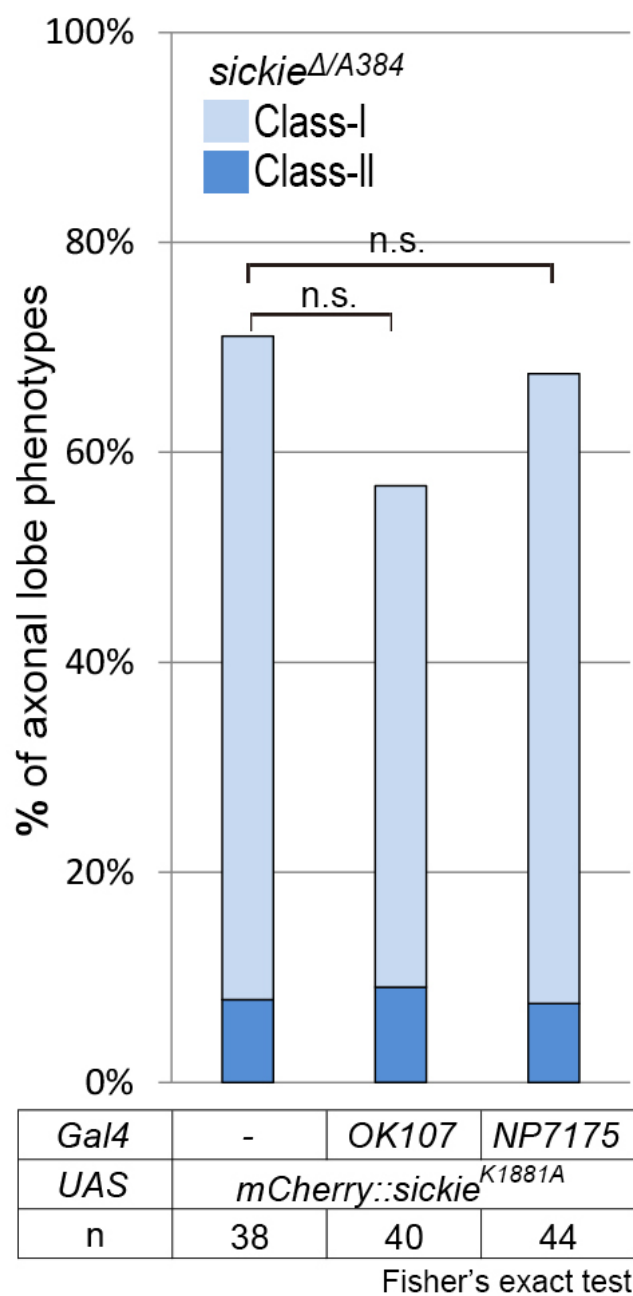


図26. アラニン置換 Sickie 変異体によるレスキュー実験の定量と検定。OK107-*gal4*、NP7175-*gal4* いずれを用いた場合でも有意なレスキュー効果は観察されなかった。OK107-*gal4*: p=0.250、NP7175-*gal4*: p=0.808。

3.3 *sickie* および *Rac-Cofilin* シグナル構成因子の変異体の表現型の類似性と遺伝学的相互作用

元来、Sickie はショウジョウバエの S2 細胞を用いた大規模 RNAi スクリーニングの系で同定され、自然免疫のシグナル伝達経路への関与のモデルが提唱されていた (Foley and O'Farrell, 2004)。Sickie という遺伝子名もこの報告の結果に依拠するものとなっている。しかし、今回新規に作成した *sickie* 機能欠失変異体を用いたキノコ体の軸索伸長の表現型の解析においては、上記報告のモデルに示された相互作用因子 Relish (NF- κ B 因子) や Dredd (Death related ced-3/Nedd2-like caspase) との明らかな遺伝学的相互作用は観察されなかった。また、Sickie のホモログである NAV1, NAV2, NAV3 は微小管結合因子であることが示唆されていた。このため、NAV1 の微小管結合領域とされる配列 (Martinez-Lopez et al., 2005) を用いて Sickie において相同性の比較を行ったが、明らかに保存された配列を見出すことはできなかった。(以上、未発表データ)。また、当時は微小管+端集積因子である EB1 との結合に SxIP モチーフが重要であることも未解明であったため (Honnappa et al., 2009)、Sickie と微小管制御因子との相互作用の可能性を示す分子レベルでの知見が不足していた。

一方、Sickie、NAV2 は actin 結合性の CH ドメインを N 末端側に持つことが明らかになっていた。また、発生過程の新生のキノコ体神経の軸索は、peduncle や lobe において、FasII の発現は弱い (図 27A')、F-actin の発現が顕著である (図 27A) 軸索束の中心領域を伸長することが知られている (Kurusu et al., 2002)。これに関連して、 α/β 神経軸索束の中心領域において、Sickie の発現も同様に顕著であり (図 27A'')、F-actin の発現と重なることが明らかになった (図 27A''')。このため、*sickie* 変異体の表現型は actin 骨格の制御に異常が

起こっていることで引き起こされている可能性を検討することとした。キノコ体で *actin* の RNA 干渉を *Dicer2* を共発現させて誘導したところ、25°Cの誘導条件下では Class-I 型や II 型の軸索伸長異常が観察された (図 28A-A')。一方、より *actin* の発現量が低下していることが予想される 29°C誘導条件下では、lobe、peduncle ともに正常に形成されない、軸索伸長が著しく阻害された表現型である Posterior arrest 型の異常が観察され、EB 下部領域にも切れ込みが入る形態異常が観察された。(図 28B-B'')。また、*Dicer2* の共発現無しで、25°Cでの *actin* の RNA 干渉と *sickie* の欠失を同時にもたせた変異体では、これらの単独の変異体よりも Class-II 型や Posterior arrest 型の出現頻度が増加した (図 28C)。以上の結果は、伸長中のキノコ体神経軸索における *actin* 骨格の制御に *Sickie* が関与している可能性を示唆した。

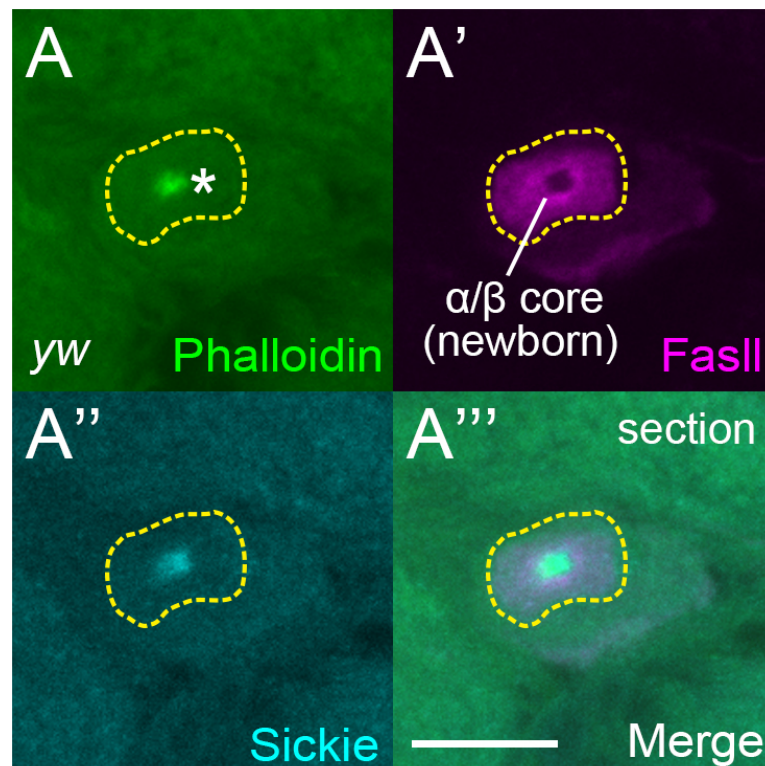
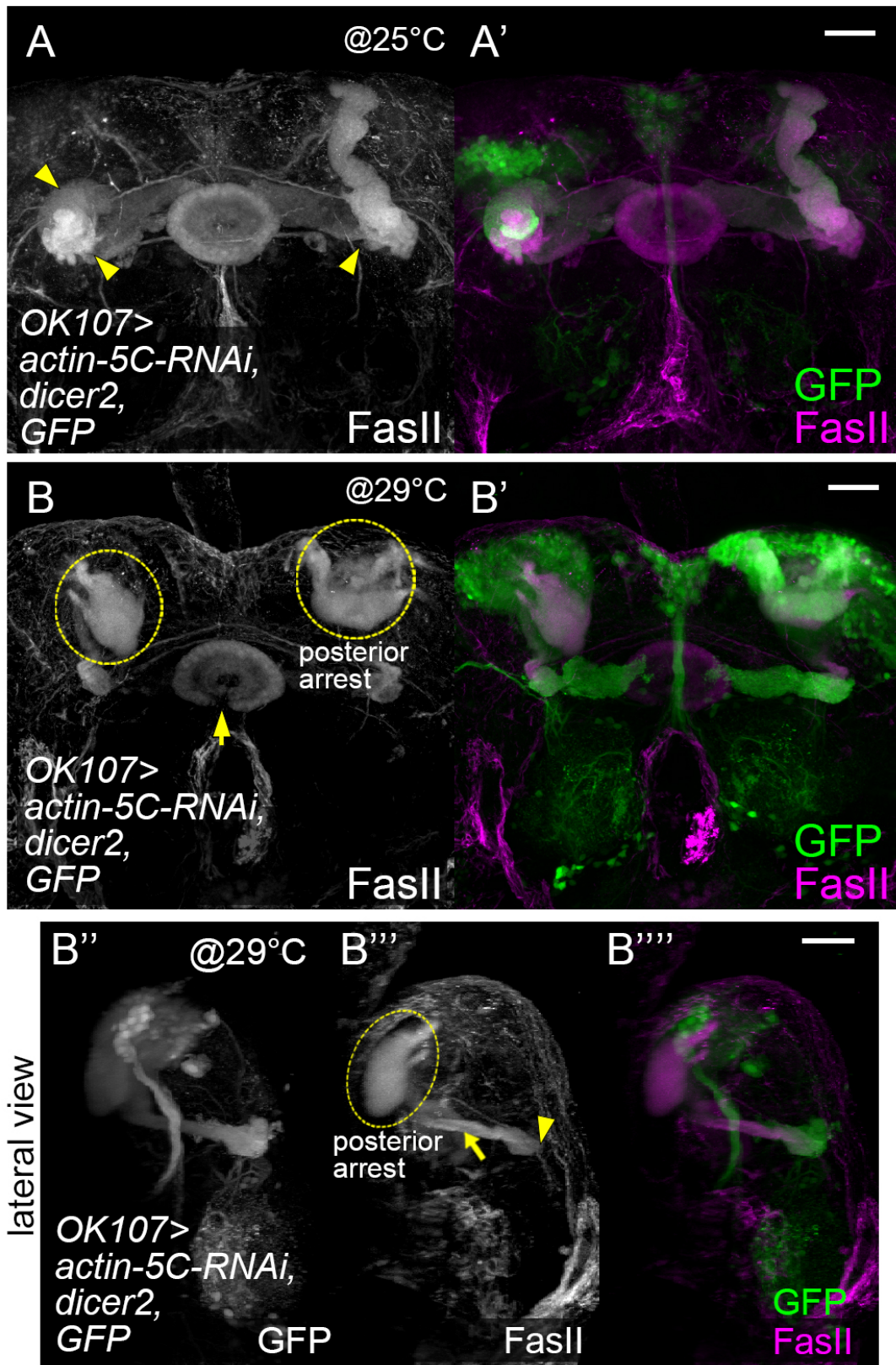


図27. (A)蛹化後 72 時間経過したキノコ体の peduncle 領域における断面図。星印に示す、F-actin の発現レベルが高い新生のキノコ体神経の軸索に占められ、(A')FasII の発現が弱い軸索束中心領域において、(A'')Sickie の顕著な発現が観察された。Scale bar, 20 μ m。



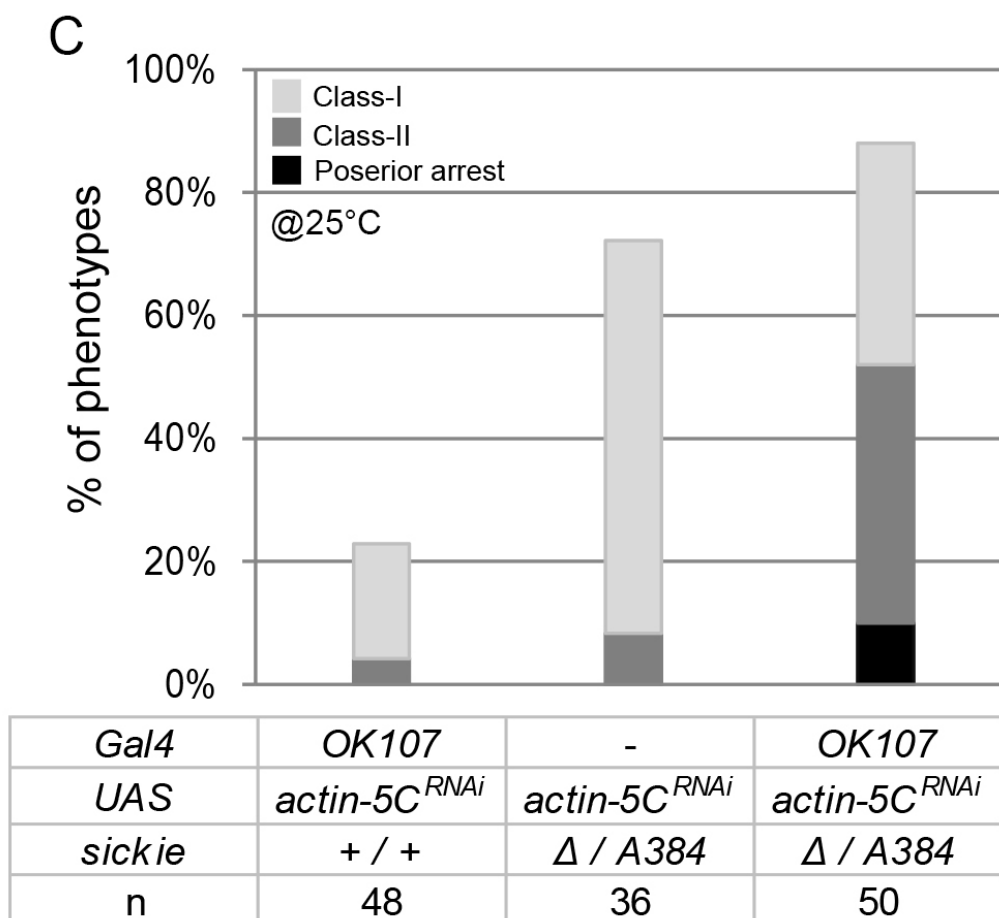


図28.

(A-A')キノコ体で *OK107-gal4* 依存的に *actin* の RNA 干渉を誘導した。25°C の誘導条件下では Class-I 型や II 型の軸索伸長異常が観察された (A-A')。Scale bar: 20 μm

(B-B'') 25°C 条件下に比べ *actin* の発現量がより低下していることが予想される 29°C 育成条件下では、Posterior arrest 型の異常が観察され (B,B'')、EB 下部領域にも切れ込みが入る形態異常 (B) が観察された。Scale bars: 20 μm

(C) 25°C での *actin* の RNA 干渉と *sickie* の機能欠失を同時にもたらされた変異体では、これらの単独の変異体よりも Class-II 型や Posterior arrest 型の出現頻度が増加した。

そこで、神経軸索の形成に伴って起こる actin 細胞骨格の制御において重要な役割を果たす Rac-Cofilin 経路との関係に着目した (Auer et al., 2011; Bernstein and Bamburg, 2010)。次項に、現在提唱されている Rac-Cofilin 経路に、Sickie が関わる際に考えられるシグナルモデルを示す (図 29)。古典的には、Rac は下流のエフェクター分子である Pak を活性化し、活性化された Pak はさらに下流の LIMK を活性化する。活性化された LIMK は Cofilin をリン酸化し不活性化することで、Cofilin 依存的な軸索伸長を抑制的に制御すると考えられている (赤矢印) (Ng and Luo, 2004)。一方、Pak を介さずに軸索伸長を促進する非古典的経路の因子として Rac が機能する可能性も提唱されていた (Ng and Luo, 2004) (緑矢印)、下流の制御因子とその伝達経路は未知なままであった (黒点線)。本研究ではこの非古典的な Rac の機能を仲介する因子として Sickie が機能しているという仮説を立て、より詳細な解析を行うこととした。

前者の古典的 Rac 経路をさらに支持する結果として、恒常活性化型の *Rac1* (*UAS-Rac1^{V12}*) や Pak (*UAS-Pak^{Myr}*)、LIMK (*UAS-LIMK^{KD}*) のキノコ体における強制発現は、キノコ体神経の軸索束伸長阻害の表現型を示すことが明らかになった。コントロールと比較して (図 30A)、*Rac1^{V12}* (図 30B) または *Pak^{Myr}* (図 30C) の強制発現変異体では軸索伸長が著しく阻害された posterior arrest 型の表現型が観察された。本表現型は、細胞増殖の不全も同時に示す *cofilin-RNAi* ノックダウン変異体においても同様に観察されており (図 30E)、Cofilin の大幅な機能低下によって惹起されることが示唆された。また Rac の完全機能欠失変異体でも本表現型に分類される表現型が一定頻度で観察されることが報告されている (Ng et al., 2002)。一方、*LIMK^{KD}* 恒常活性化型変異体においては軸索束の伸長異常が peduncle 領域ではなく lobe 領域において頻繁に

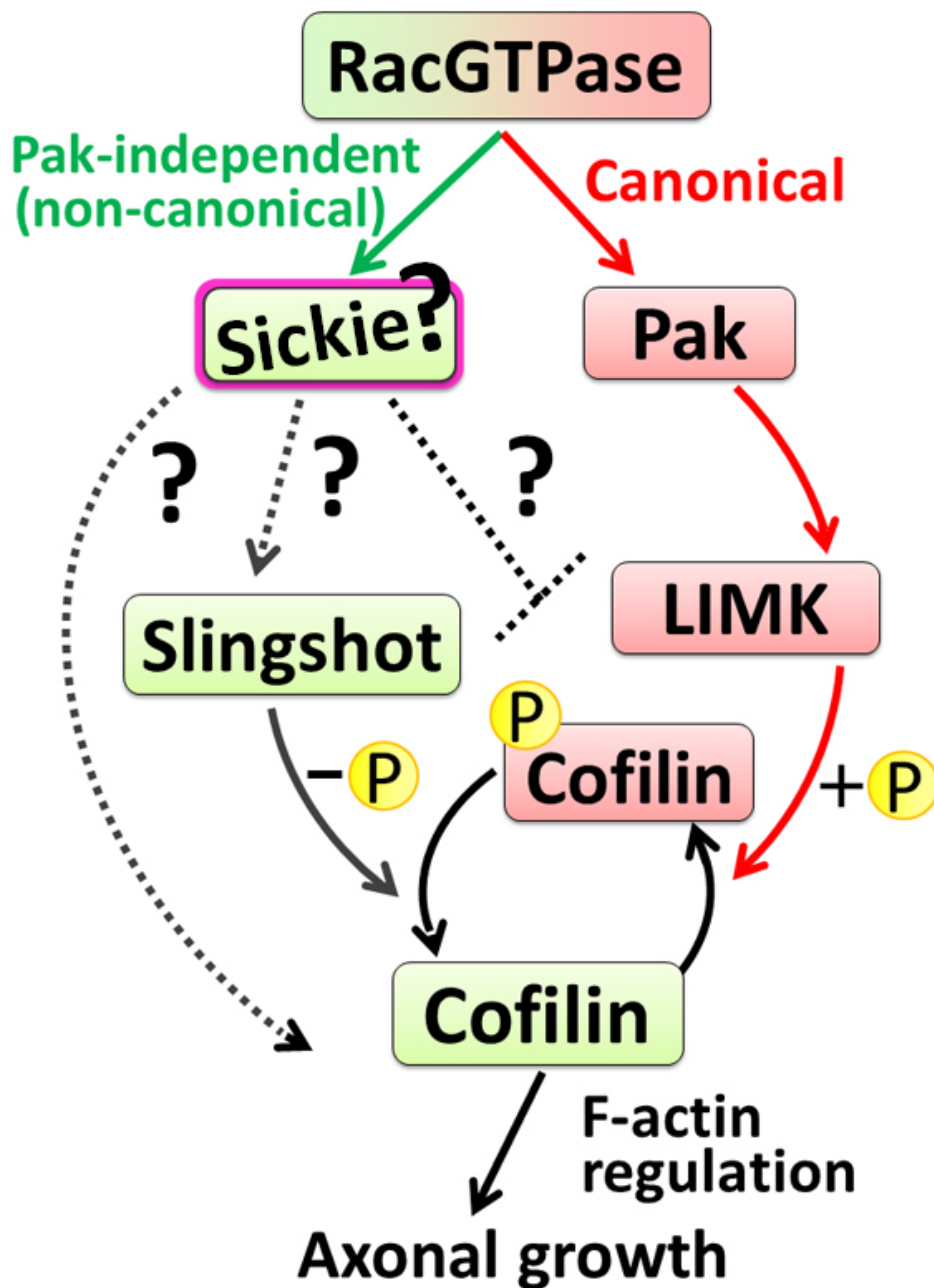


図29. 既存の Rac-Cofilin 経路による軸索伸長制御のモデルと Sickie の予想されうる遺伝学的相互関係。赤矢印は古典的 Rac-Pak-LIMK 経路で、Cofilin をリン酸化することにより軸索伸長を抑制的に制御する。緑矢印は軸索伸長において促進的にはたらく、Pak を介さない、非古典的な Rac 経路。下流に未知の仲介因子の存在が示唆されており、Sickie をその候補因子のひとつと仮定した場合、非古典的 Rac 経路は Cofilin 依存的な軸索伸長を直接制御するのか、Slingshot を介するのか、あるいは古典的経路を抑制することで間接的に軸索伸長を促進するのかは不明である(黒点線)。

観察され（図 30D）、この表現型は *ssh¹⁻⁶³* 変異体（図 30F）や *sickie^{ΔΔ}* 全身変異体（図 30G）と類似していた。また、ドミナントネガティブ変異型 *Rac1*（*UAS-Rac1^{N17}*）の強制発現も、Posterior arrest の表現型は示さずに lobe 領域付近での軸索束の伸長異常の表現型を示した（図 30H）。Sickie が Rac-Cofilin 経路に関与しているかどうか遺伝学的に検討するため、各制御因子に関して野生型アリルとのヘテロ変異体となっている多重変異体を作成し、表現型とその浸透率を検証した。*sickie cofilin* ヘテロ 2 重変異体は目立った軸索伸長異常を示さず（図 31A-A'）、*Rac* ヘテロ変異体は Class-I 型の表現型を顕著に示した（図 31B-B'）。また、EB の環状構造は上記のヘテロ変異体のいずれにおいても形成されていた。これらとは対照的に、*Rac sickie cofilin* 3 重ヘテロ変異体では Posterior arrest 型の重篤な軸索伸長異常が（図 31C-C'）高頻度で観察され（図 32A,B）、EB の形成異常も頻繁に観察された。これらの結果は、Sickie が軸索伸長において Rac-Cofilin 経路と遺伝学的に相互作用することを示しており、Cofilin 依存的な F-actin の制御に Sickie が関わっている可能性を示唆するものである。

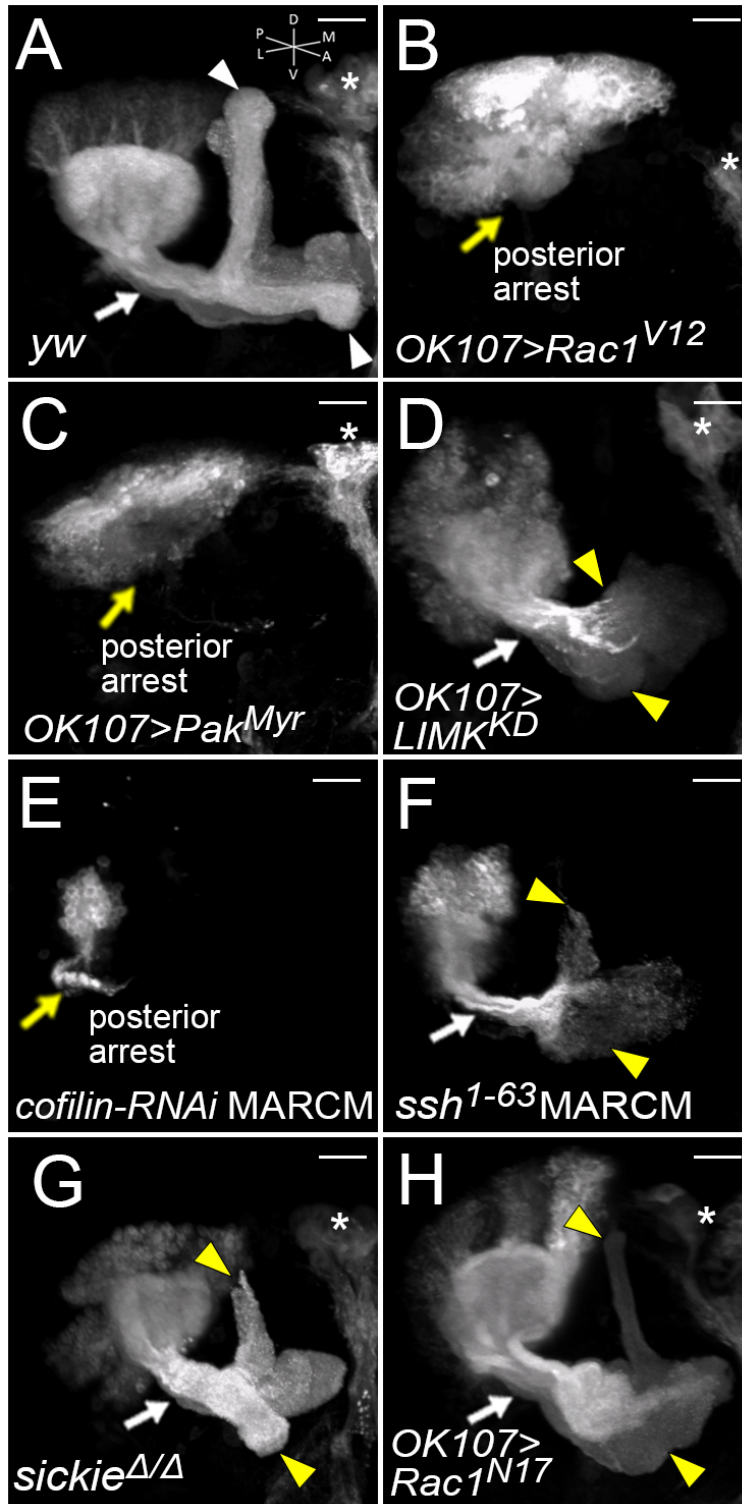


図30. Rac-Cofilin 経路を構成する種々の因子の変異体の典型的な表現型。*OK107-Gal4* で発現誘導した GFP レポーターによりラベルした成体の右脳のキノコ体。白矢頭は正常に投射伸長した lobe 末端を示す。黄矢頭は peduncle 形成後の軸索伸長が阻害され、正常な lobe 構造が形成されていない lobe 末端を示す。白矢印は正常に形成された peduncle を示し、黄矢印は著しく細い peduncle が形成され、Posterior 側の calyx 近傍に異所的に軸索が留まっている状態を示す。アスタリスクは *OK107-gal4* で同時にラベルされる脳間部 (pars intercerebralis)。 (A) *yw*、(B) *Rac* 恒常活性化型変異体、(C) *Pak* 恒常活性化型変異体、(D) *LIMK* 恒常活性化型変異体、(E) *cofilin-RNAi* ニューロブラストクローン、(F)

ssh 機能欠失変異体ニューロブラストクローン、(G) *sickie* 機能欠失全身変異体、(H) *Rac* ドミナントネガティブ強制発現変異体。Antero-lateral view, Scale bars: 20 μ m。

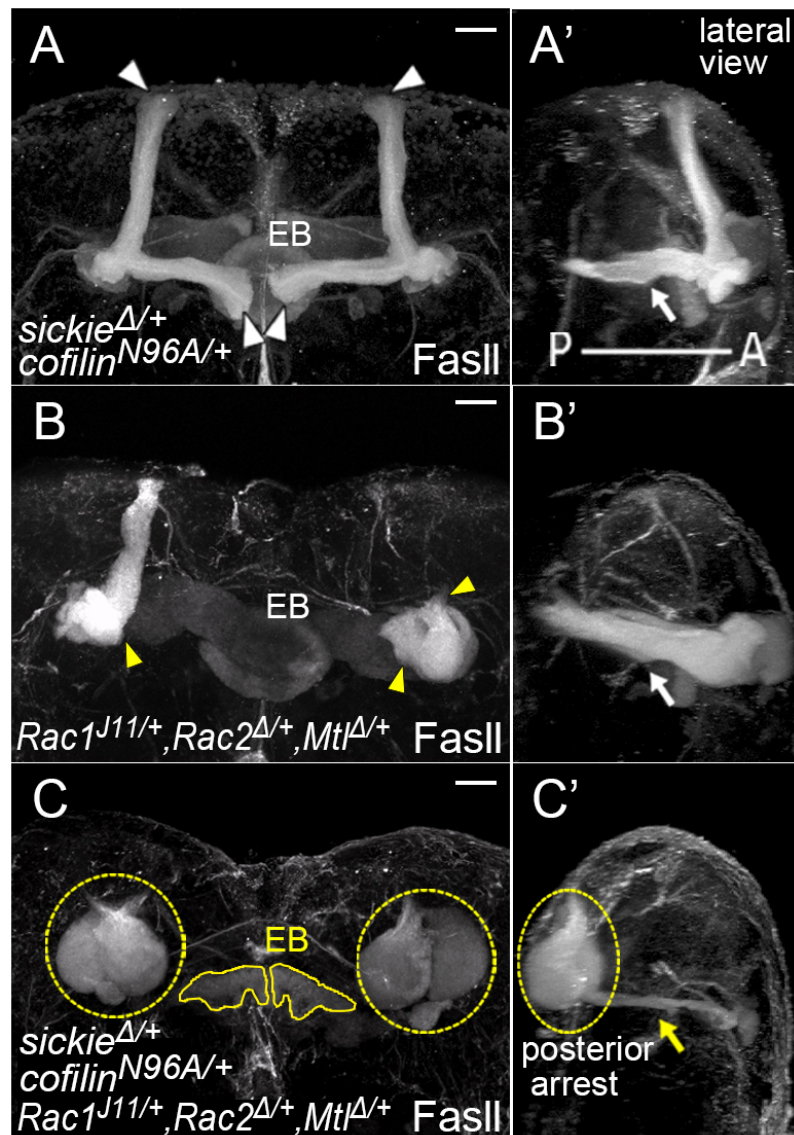


図31. *sickie*、*cofilin*、*Rac*の遺伝学的相互作用。(A-A') *sickie cofilin*ヘテロ2重変異体は目立った軸索束形成異常の表現型を示さない。白矢頭に示すようにlobeは通常の投射先末端まで伸長する。白矢印に示すように、peduncleにおける異常も観察されない。EBの環状構造も形成される。(B-B') *Rac*ヘテロ変異体は、黄矢頭に示すようにClass-I型またはII型に分類されるlobe形成異常を一定の頻度で示すが、白矢印で示すようにpeduncleは形成される。EBの環状構造も形成される。(C-C') *sickie cofilin Rac*ヘテロ3重変異体においては、黄点線円で示すような脳後方に軸索束が留まっている表現型が高頻度で観察される。黄矢印で示すように細いpeduncleが形成され、黄枠線で示すように、*sickie*機能欠失変異体と同様な、脳両半球に分断され環状構造が乱れたEBが観察される。Scale bars:20 μ m

A

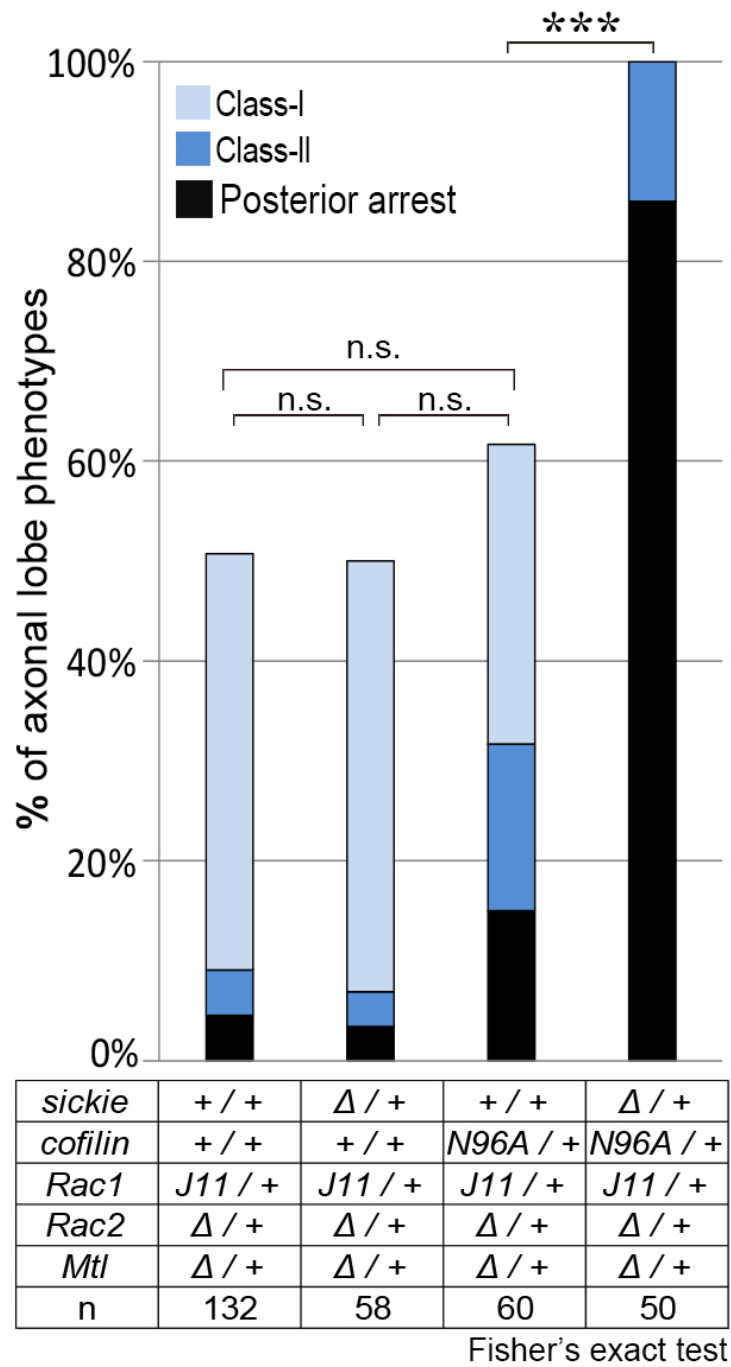


図32. (A)遺伝学的相互作用の浸透率の比較。*sickie cofilin Rac*ヘテロ3重変異体はこれらの2重変異体に比べ有意に軸索束形成異常の浸透率が増加した。Posterior arrestに分類される表現型が劇的に増加した。Bonferroniの補正を行った、Fisherの正確確率検定。 $***p=8.64 \times 10^{-8}$ 。Scale bars, $20 \mu m$ 。

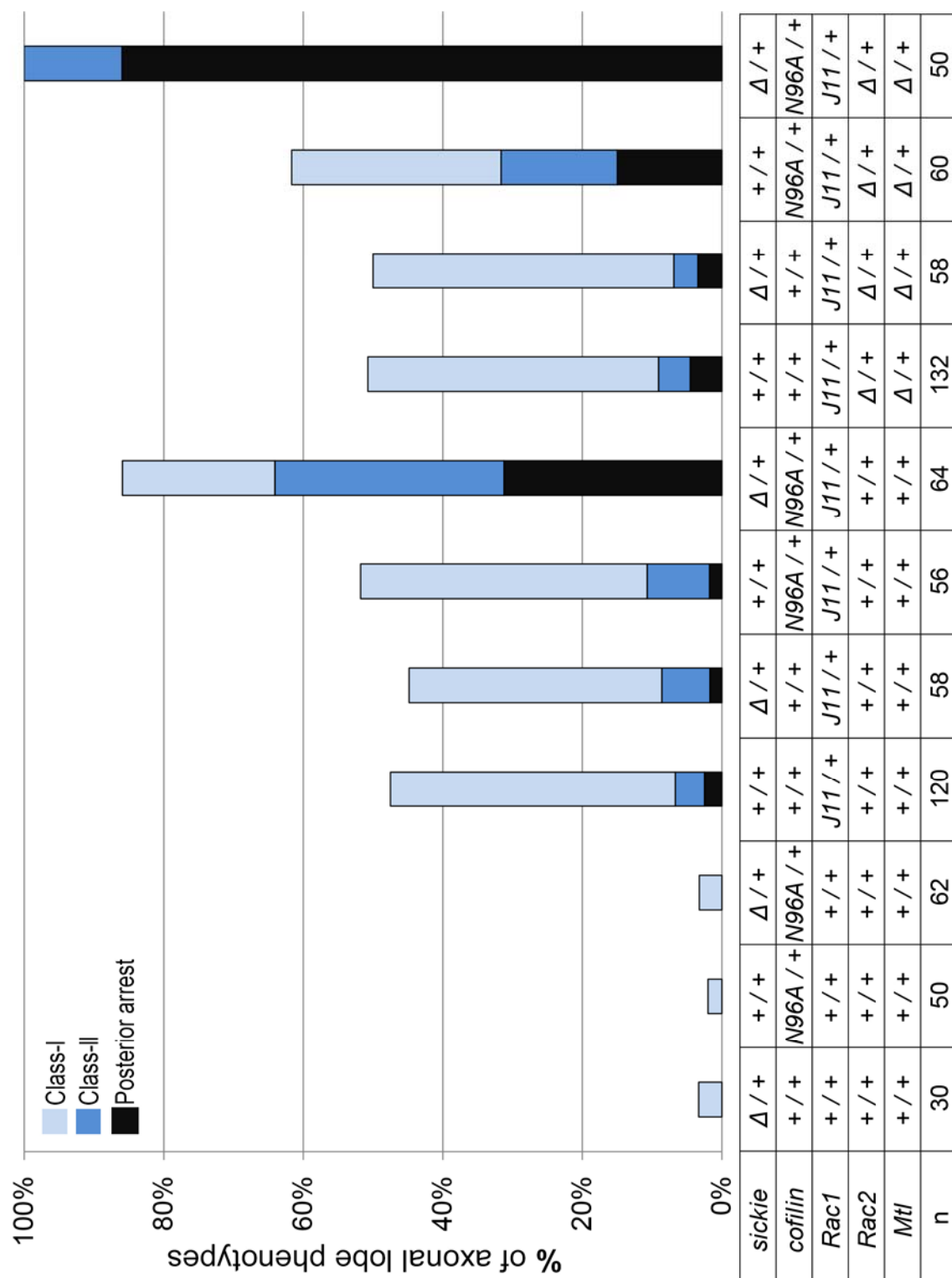


図32. (A') *sickie*, *cofilin*, *Rac* の遺伝学的相互作用の浸透率の比較の詳細版。

3.4 *sickie* 変異体と *Rac-Cofilin* 経路構成因子の変異体の神経軸索における F-actin レベルの上昇

ショウジョウバエの複眼原基や翅原基、卵室の follicle 細胞等の上皮系組織における過去の報告で、Cofilin の活性化因子である Ssh の変異体クローンでは F-actin シグナルの顕著な上昇が観察されることが明らかにされていた (Corrigall et al., 2007; Nagel et al., 2010; Niwa et al., 2002)。Cofilin 依存的な F-actin 再構成の過程で、Sickie が Ssh と同様に軸索伸長において促進的に機能する場合、F-actin の発現レベルは *sickie* 変異体の神経軸索においても変化することが予想された。蛹化後 72 時間経過後の脳において、正常型 (図 33A', 白星印) と比較した際、*sickie*^{VA384} 変異体の α/β 神経軸索束 (図 33B'') の中心領域において、F-actin シグナル強度の顕著な上昇 (図 33B', 黄星印) が観察された。

次に、F-actin レベルの上昇を MARCM 法を用いて更に検証した。キノコ体は左右 1 対の対称的な構造として存在するため、MARCM 法により F-actin レベルの変化を同一個体内のコントロールのキノコ体神経軸索束領域 (図 34A',) と比較することにより、個体間における染色のばらつきの影響を排除し、定量的に検証することが可能となるためである。単一のニューロブラストクローンが誘導された *sickie*^A 変異体では、*sickie*^{VA384} 全身変異体と比べると上昇の程度は弱いものの、変異体神経軸索が伸長している α/β lobe の中心領域において、F-actin シグナルの上昇が観察された (図 34A', 黄星印)。また、同一個体内の対側のコントロールの α/β 神経の軸索束と比較した際、*sickie*^A 変異体クローンを含んだ側の α/β 神経軸索束内の F-actin のシグナル強度の平均値が上昇していることが明らかになった (図 35A)。これらの結果は、Sickie がキノコ体神経の

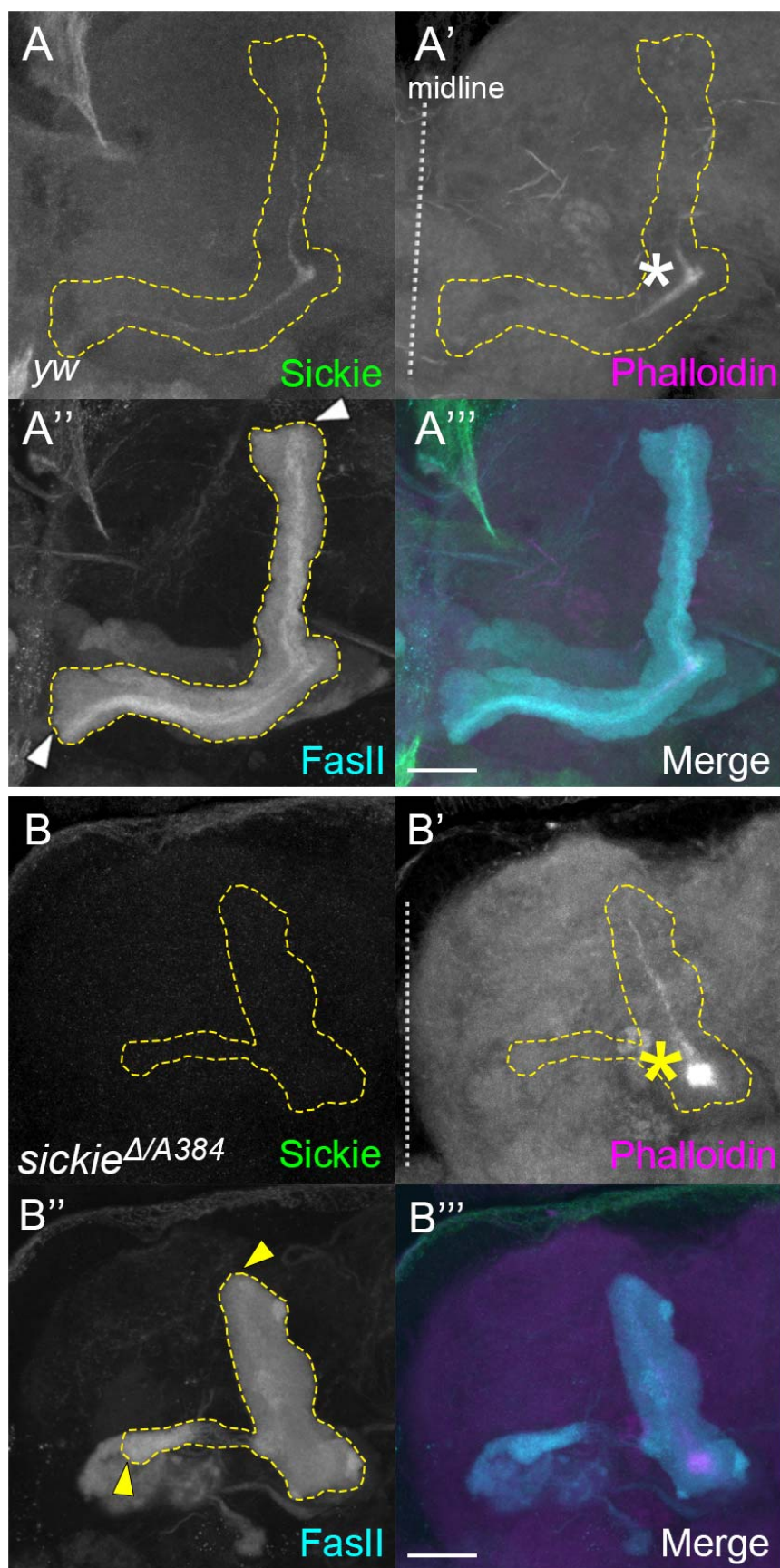


図33.

(A-A'', B-B'')
yw 個体と *sickie*
 変異体の神経軸
 索 における
 F-actin シグナル
 レベルの上昇パタ
 ーン。(A') *yw* 個
 体の黄点線で囲
 われた α / β lobe
 の中心領域では、
 白星印で示よう
 に内在性の筋状
 の F-actin シグナ
 ルが観察される。
 (B') *sickie* 変異体
 の α / β lobe の中
 心領域では、黄星
 印で示すように強
 い筋状の F-actin
 シグナルが観察され
 る。蛹化後 72 時間
 前後。Scale bars,
 20 μ m.

F-actin を介した軸索伸長に必要であることを示唆している。次に、この MARCM 法に基づいた解析を Ssh と LIMK に対して同様に行った。*ssh¹⁻⁶³* 変異体クローンは *sickie^A* クローンよりも強い F-actin シグナルの上昇を α/β lobe の中心とその周辺の領域で示し (図 34B')、F-actin レベルの平均値も同一個体内のコントロールの軸索束と比較して上昇していた (図 35B)。一方で、*LIMK^{KD}* 恒常活性化型変異体クローンでは異なった F-actin レベルの上昇パターンが観察された。*ssh* 変異体と同様に顕著な F-actin レベルの上昇が α/β lobe 分岐点の中心とその周辺領域で観察されたことに加え (図 34C', 黄星印)、正中線側に形成された lobe の遠位側にかけても非常に高い F-actin シグナルの上昇が観察された (図 34C', 2 重星印)。同様に、F-actin シグナル強度の平均値も *LIMK^{KD}* 変異体のクローンを含む α/β lobe で有意に上昇していた (図 35C)。

さらに、Pak または Rac1 の恒常活性化型変異体クローンを誘導したところ、*sickie^A* や *ssh¹⁻⁶³*、*LIMK^{KD}* 変異体の場合とは異なり、より重篤な表現型である Posterior arrest 型の神経軸索伸長異常を示し (図 36A'', B'')、F-actin シグナルの上昇も同時に観察された (図 36A', B')。*cofilin* の RNA 干渉によるノックダウンを誘導したクローンにおいても、同様に Posterior arrest 型の伸長異常が (図 36C'')、高い発現レベルの F-actin シグナルを伴って観察された (図 36C')。なお補遺の項で述べている、Sickie の相互作用因子の候補として解析した Abi と Chic に関しても MARCM クローンを誘導したが、軸索伸長には異常が見られたものの、F-actin レベルの明らかな上昇は観察されなかった (図 37A-A'', B-B'')。

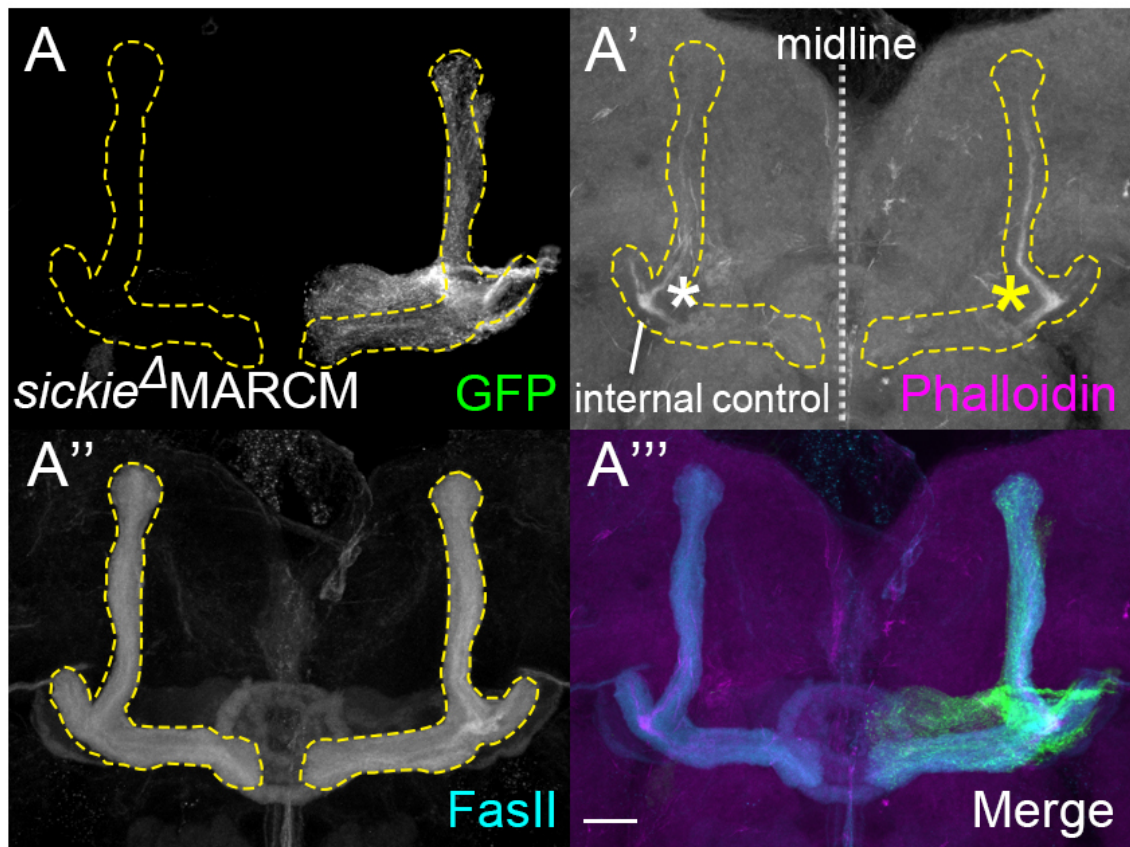


図34. (A)GFP でラベルされる *sickie*^Δ MARCM クローンを含む側の、(A')黄星印で示す α / β lobe 中心領域では、白星印で示すクローンを含まない側の内在性のコントロール領域に比べ、F-actin シグナルの上昇が観察される。Scale bar, 20 μ m。

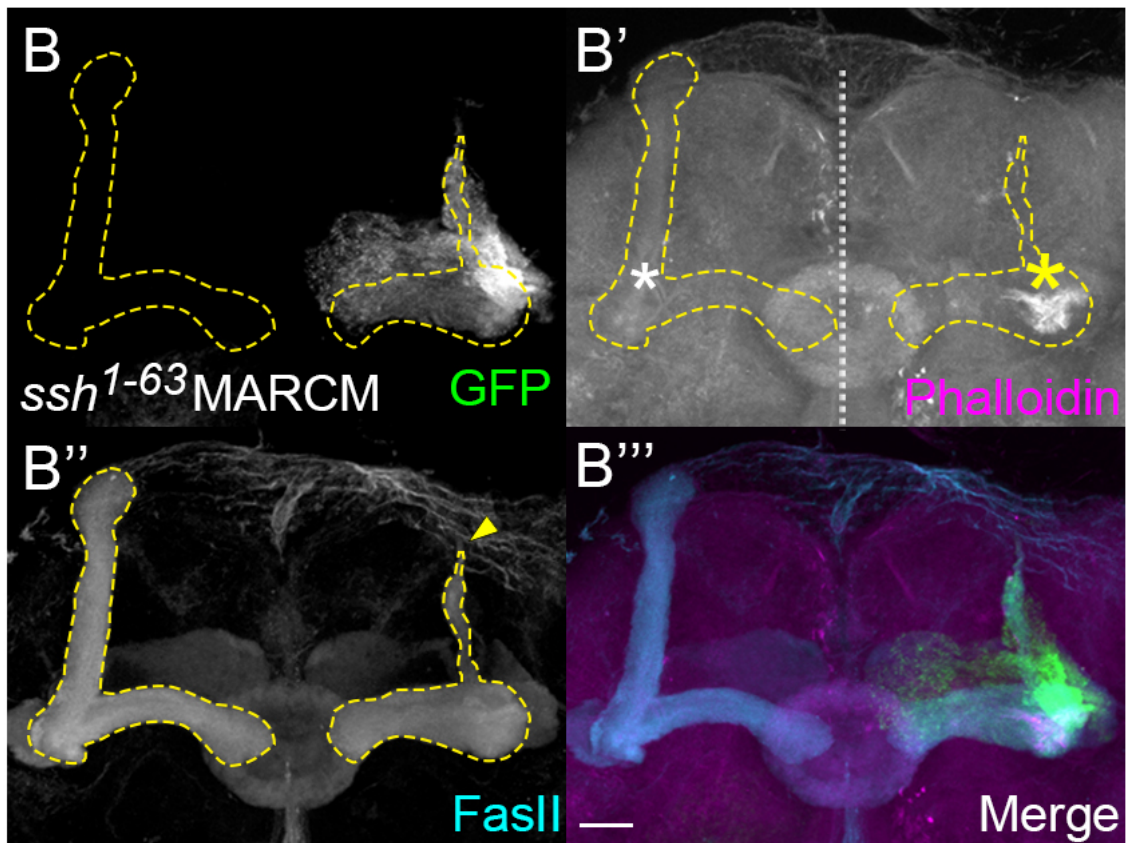


図34. (B)GFP でラベルされる *ssh*¹⁻⁶³ MARCM クローンを含む側の、(B')黄星印で示す α / β lobe 中心領域では、白星印で示すコントロール領域に比べ、F-actin シグナルの上昇が観察される。Scale bar, 20 μ m.

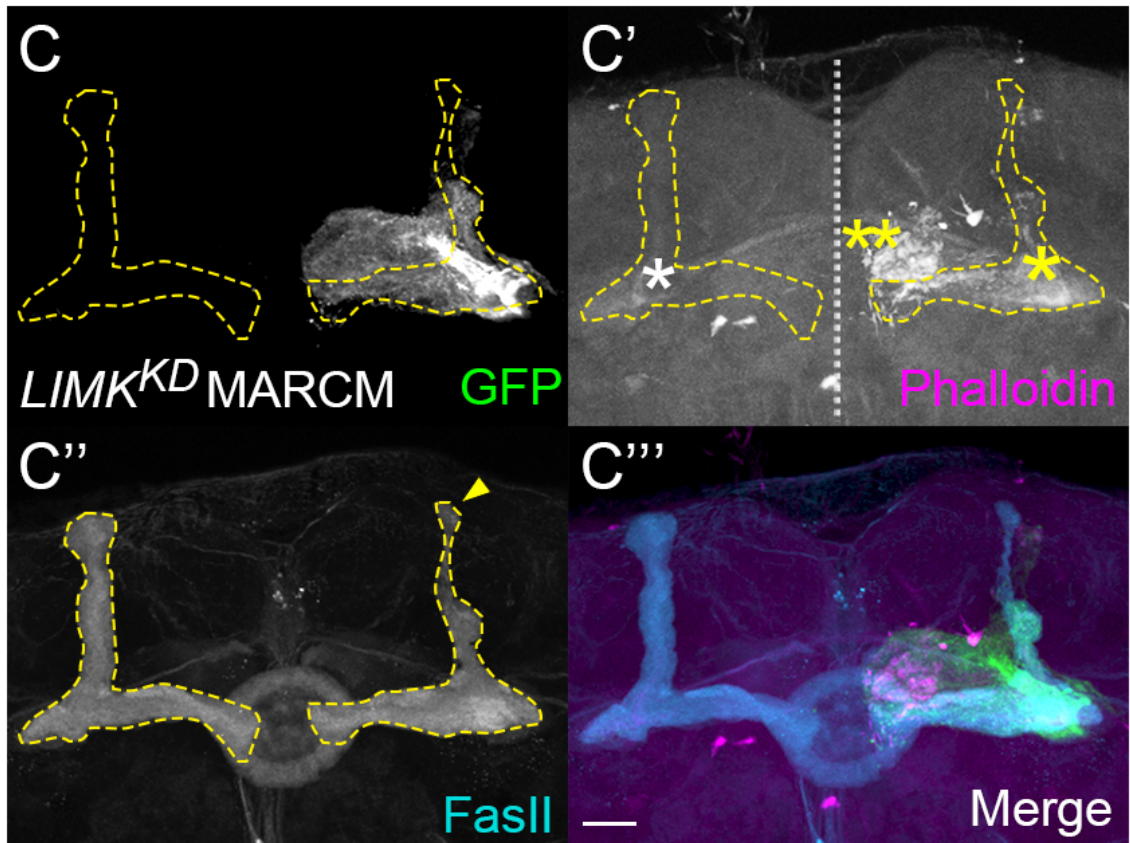


図34. (C)GFP でラベルされる *LIMK^{KD}* 恒常活性化型クローンを含む側の、(C')黄星印で示す α / β lobe 中心領域では、白星印で示すコントロール領域に比べ、F-actin シグナルの上昇が観察される。2 重の黄星印で示す lobe 末端領域にかけても強い F-actin シグナルの上昇が観察される。Scale bar, 20 μ m。

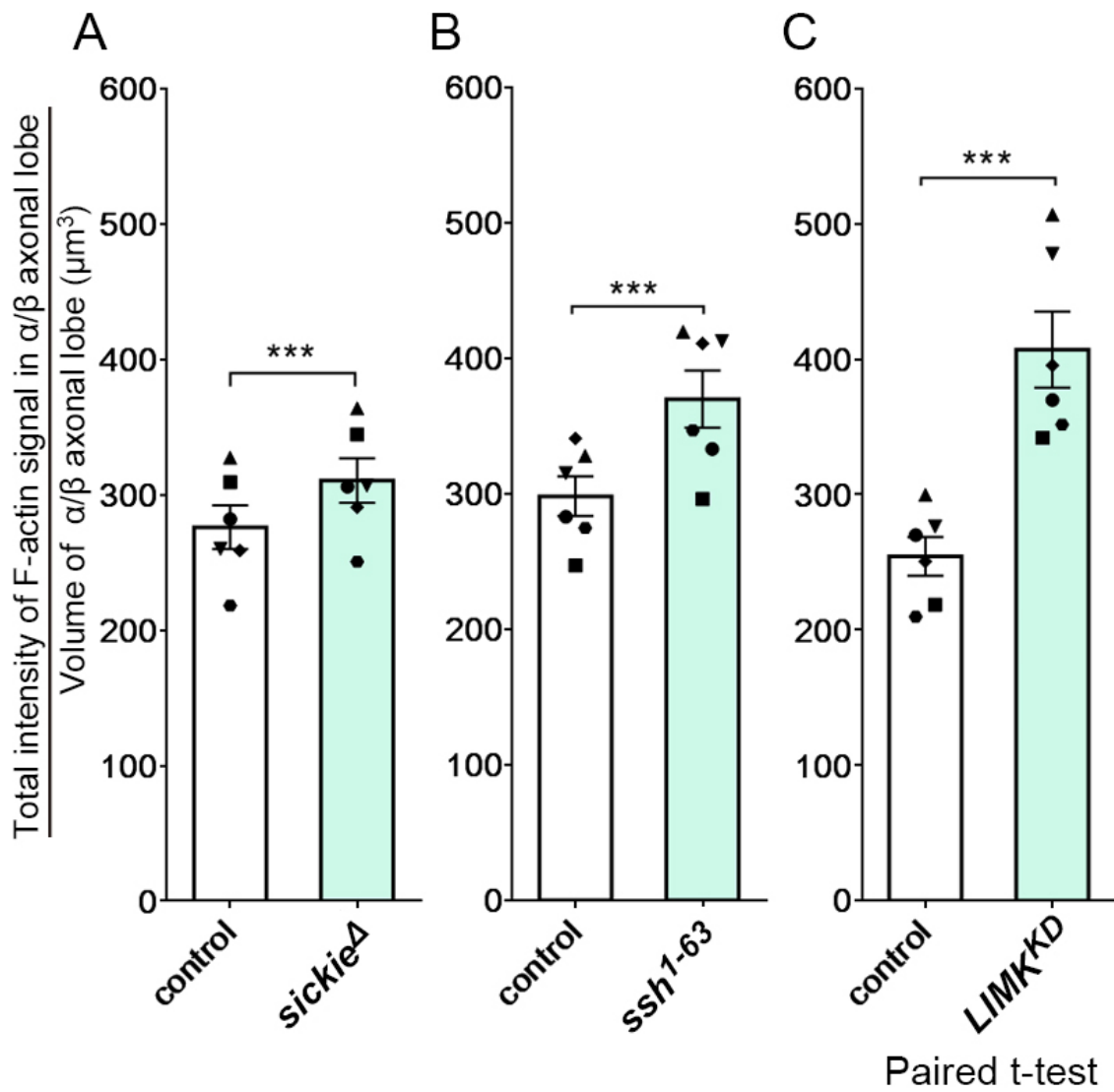


図35. (A-C)F-actinレベルの定量。*sickie* Δ 、*ssh1-63*、*LIMK*^{KD}変異体いずれにおいても、変異体クローンの軸索を含む側の α/β lobe内部のF-actinレベルの体積あたりの平均値がコントロールの内部領域と比較して有意に上昇していた。*sickie*: *** $p=8.10 \times 10^{-5}$ 、*ssh*: *** $p=3.26 \times 10^{-4}$ 、*LIMK*: *** $p=3.29 \times 10^{-4}$ 、Paired t test。

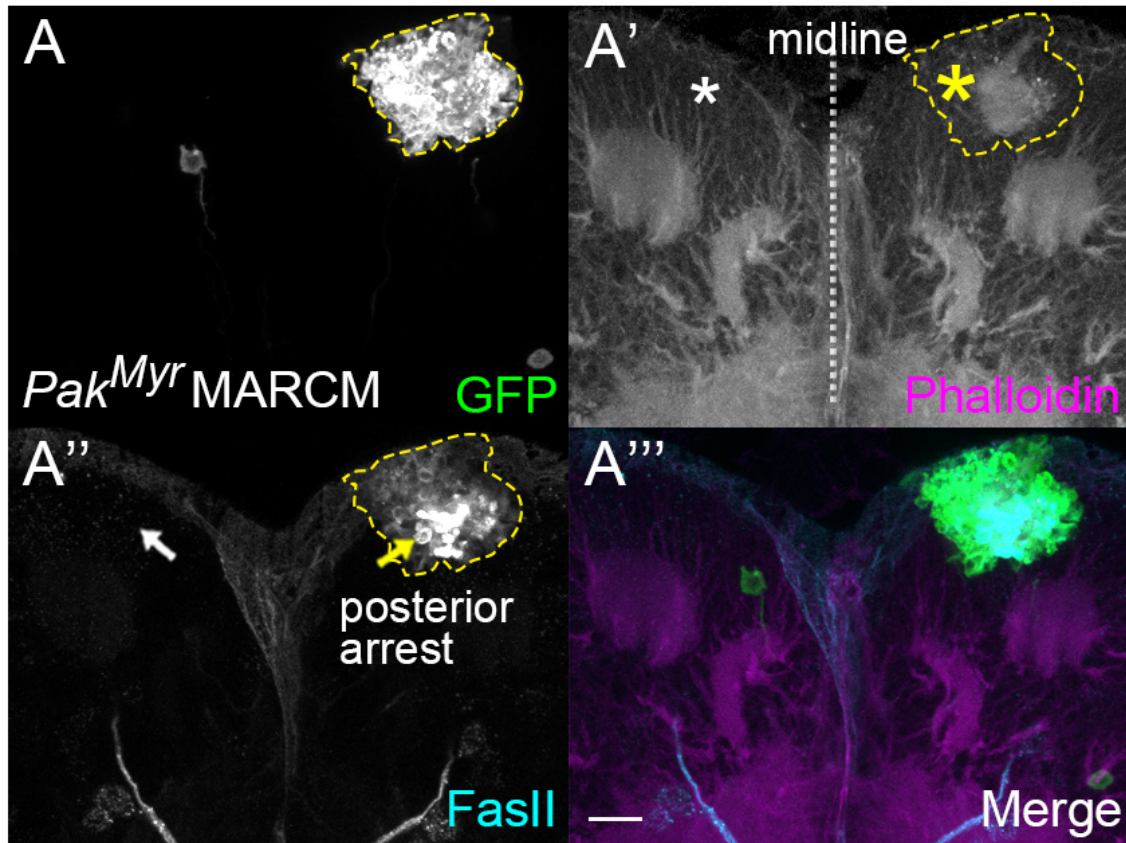


図36. (A)脳後方部において GFP でラベルされ、Posterior arrest の表現型を示す *Pak* 恒常活性化型クローンの、(A'')黄矢印で示す異所的な FasII のシグナルが検出される領域では、(A')黄星印で示すようなF-actinシグナルの上昇が観察される。コントロールとなる脳片半球の線対称な領域には、白矢印で示すように FasII のシグナルは観察されず、白星印で示すように F-actin の強いシグナルも見られない。Scale bar, 20 μ m。

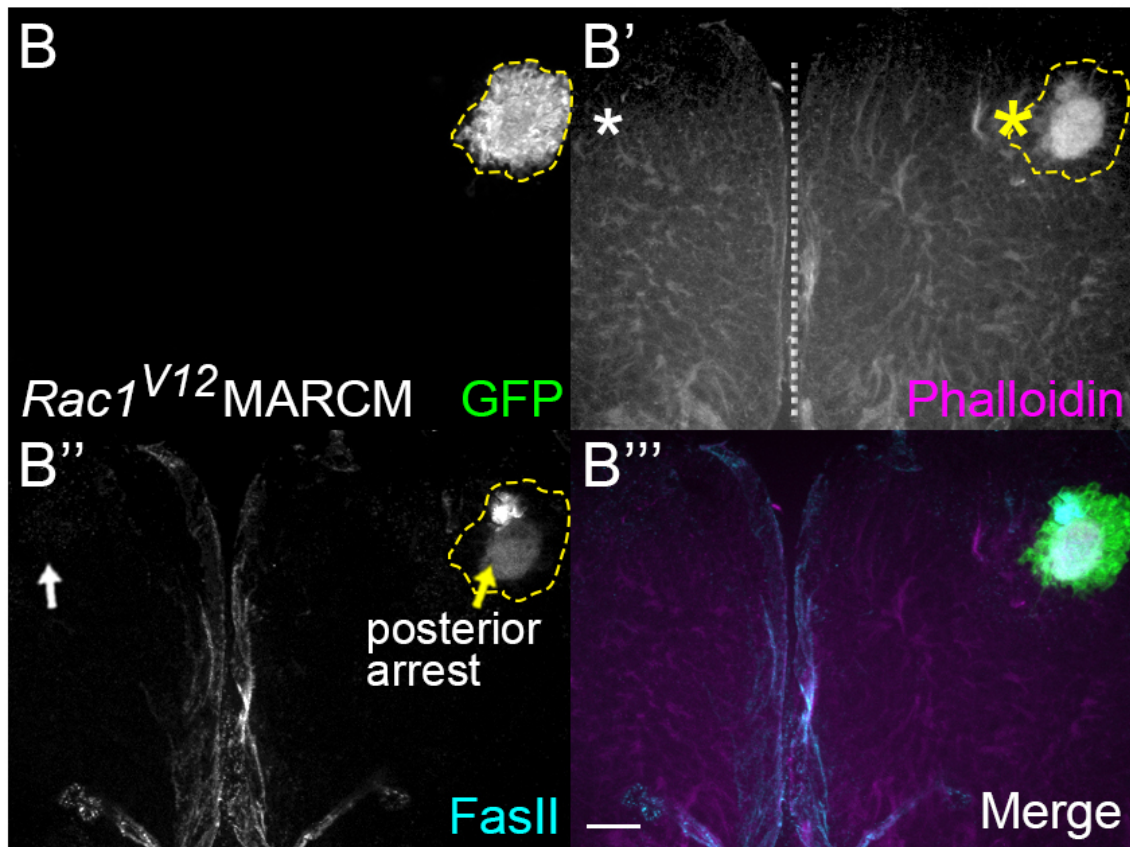


図36. (B)脳後方部において GFP でラベルされ、Posterior arrest の表現型を示す *Rac* 恒常活性化型クローンの、(B'')黄矢印で示す異所的な FasII のシグナルが検出される領域では、(B')黄星印で示すような F-actin シグナルの上昇が観察される。コントロールとなる脳片半球の線対称な領域には、白矢印で示すように FasII のシグナルは観察されず、F-actin の強いシグナルも見られない。Scale bar, 20 μ m。

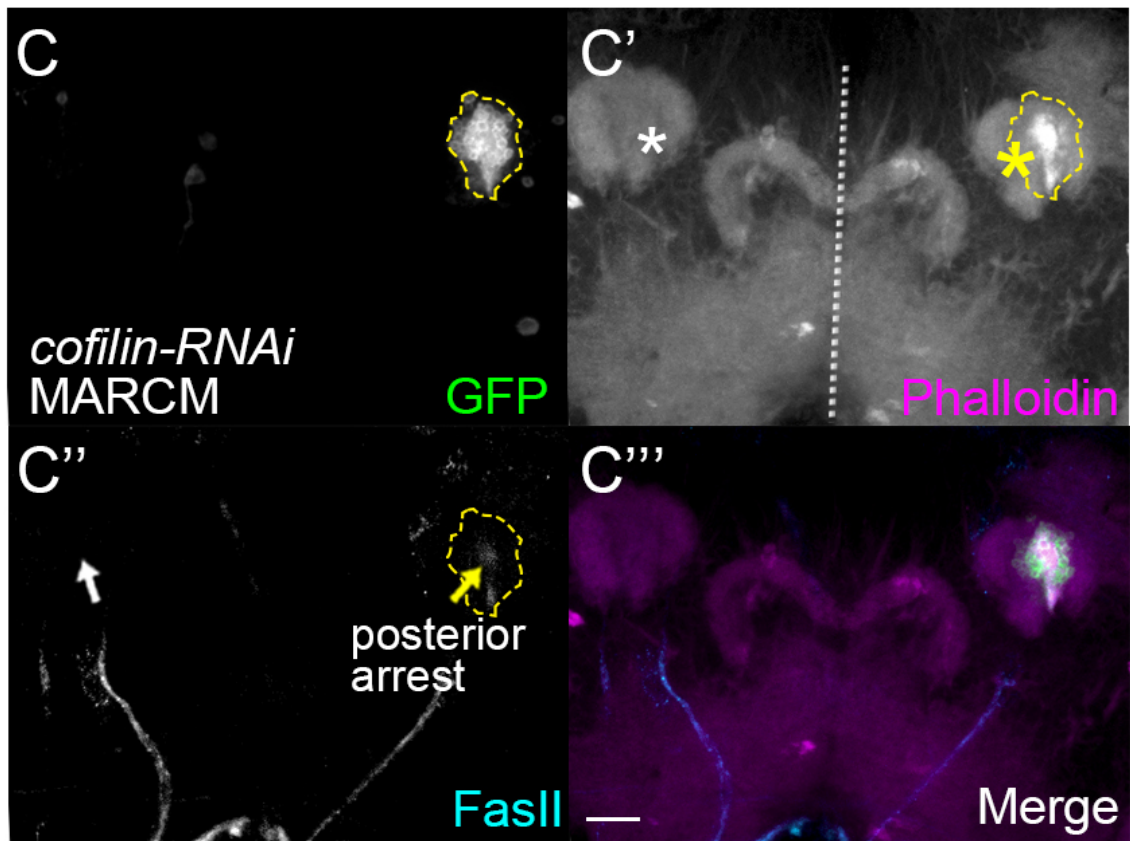


図36. (C)脳後方部において GFP でラベルされ、Posterior arrest の表現型を示す *cofilin-RNAi* クローン、(C'')黄矢印で示す異所的な FasII のシグナルが検出される領域では、(C')黄星印で示すような F-actin シグナルの上昇が観察される。コントロールとなる脳片半球の線対称な領域には、FasII のシグナルは観察されず、F-actin の強いシグナルも見られない。*cofilin* の RNAi クローンは細胞の増殖も阻害されていることが予想され、*Pak* や *Rac* の恒常活性化型クローンに比べ、細胞体領域におけるクローンのサイズが小さい個体が観察された。Scale bar, 20 μ m。

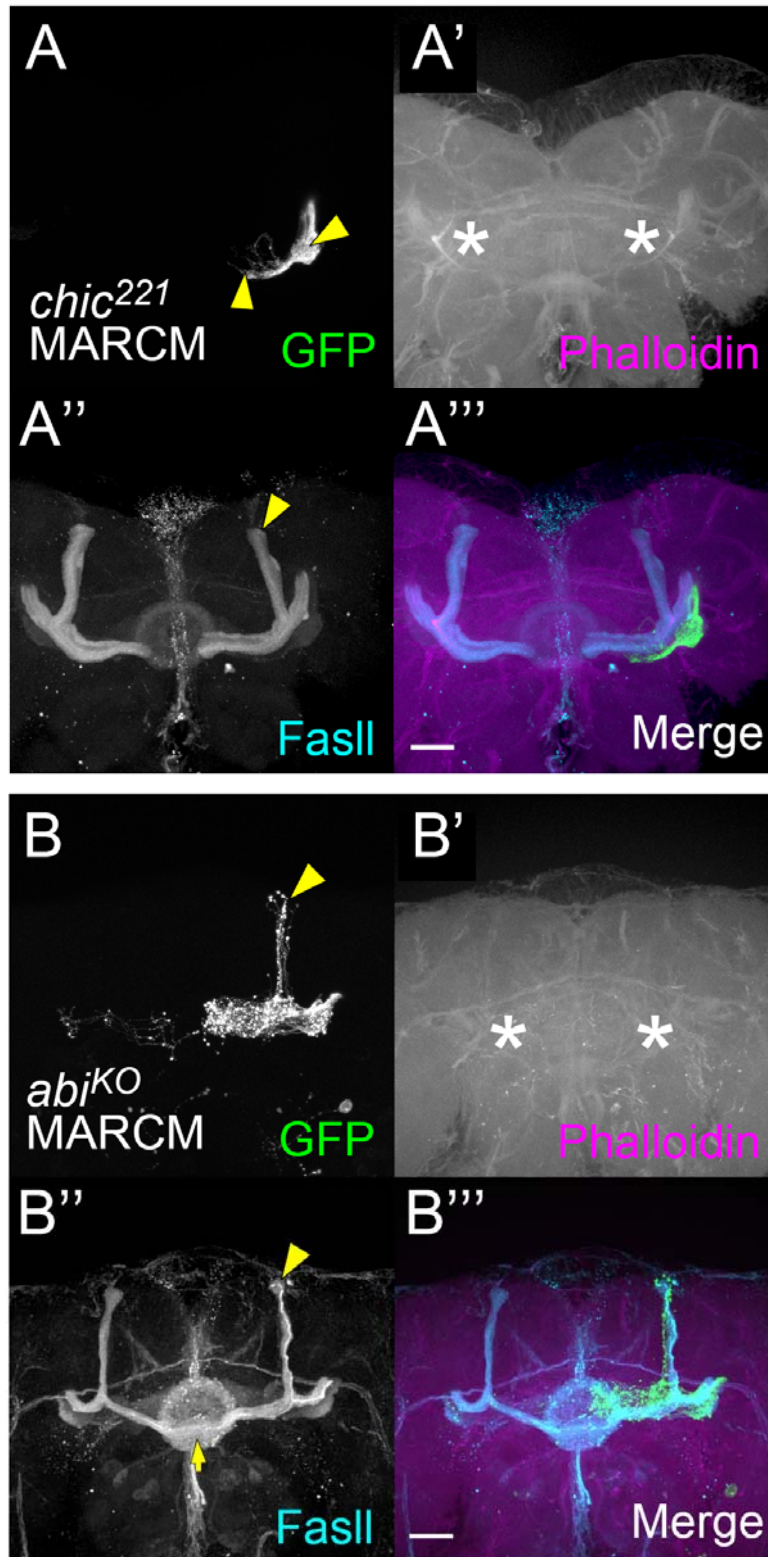


図37. (A-A''') *chic²²¹* FRT40A、(B-B''') *abi^{KO}* FRT82BのMARCMクローンの軸索束中心領域においては、明らかな F-actin レベルの上昇は観察されなかった。

Scale bars, 20 μ m.

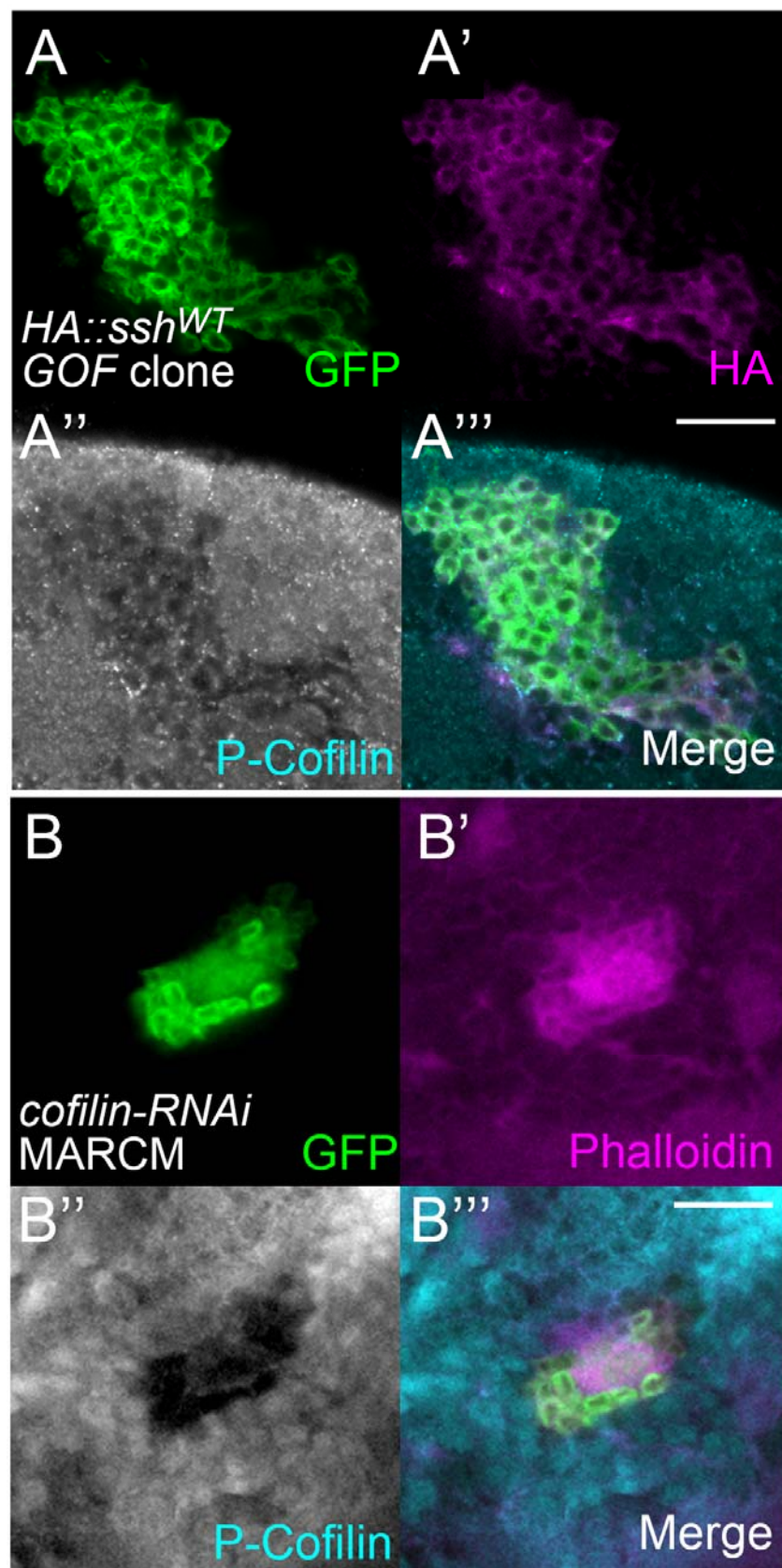
3.5 *sickie* 変異体と Rac-Cofilin 経路構成因子の変異体におけるリン酸化

Cofilin と F-actin レベルの変化の同時検出

ここまでの結果から、*sickie* および Rac-Cofilin 経路構成因子の変異体のキノコ体神経軸索では、Cofilin がリン酸化され不活性化されることで F-actin の再編成を介した軸索伸長阻害が起こっていることが予想された。そこで、神経軸索での Cofilin の活性化状態を推定するため、結果 3.4 時と同様に MARCM 法を用い、Cofilin のリン酸化状態と F-actin の発現レベルの変化を同時検出することを試みた。内在性のリン酸化 Cofilin の発現レベルの変化が、免疫組織染色化学レベルで神経軸索において検出できる現象かどうか検討するため、Cofilin の脱リン酸化の実行因子である Ssh の過剰発現クローン、*cofilin-RNAi* クローンを誘導したところ、クローンの細胞体領域においてリン酸化 Cofilin シグナルの減少を確認できた（図 38A-A'',B-B''）。また、*cofilin-RNAi* クローンを誘導し Total-Cofilin による組織染色を行ったところ、同様にクローンの細胞体領域においてシグナルの低下を確認できた（図 38C-C''）。

ssh の機能欠失変異体クローンを誘導し蛹形成後 90 時間前後に観察したところ、同一個体の対側のキノコ体神経軸索束領域（図 39A'', 白点線）に比べ、変異体神経軸索束の広範な領域で、リン酸化 Cofilin のシグナルの上昇（図 39A'', 赤点線）が観察された。また、72 時間経過時と比べ、穏やかな F-actin シグナルの上昇（図 39A', 黄星印）が検出された。本 *ssh¹⁻⁶³* 変異体クローンにおいて Total-Cofilin による組織染色を行った結果、クローンを含む側のキノコ体軸索束領域において、Total-Cofilin の発現レベルの明らかな上昇は観察されないことを確認した（図 40A-A''）。

次に、*sickie^Δ* 変異体の神経軸索におけるリン酸化 Cofilin の状態を検証した。



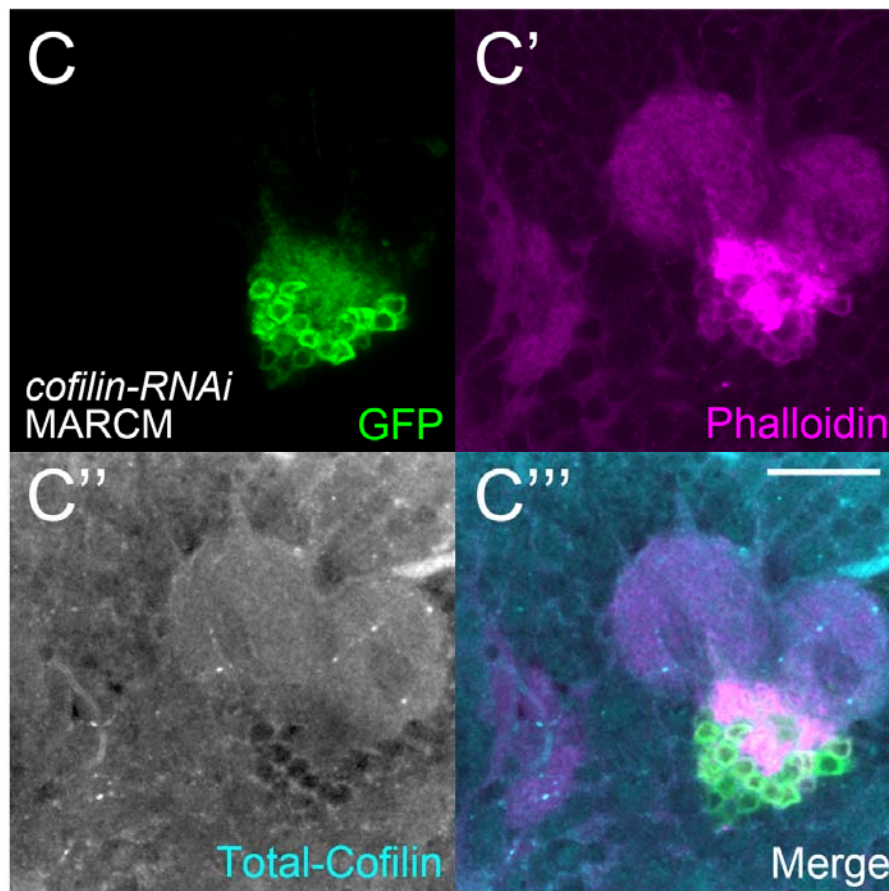


図38.

(A-A'') Ssh^{WT} 過剰発現クローンにおける内在性のリン酸化 Cofilin レベルの低下の検出。

(B-B'') *cofilin-RNAi* クローンにおける内在性のリン酸化 Cofilin レベルの低下の検出。

(C-C'') *cofilin-RNAi* クローンにおける内在性の Total-Cofilin レベルの低下の検出。

Scale bars, 20 μ m.

仮に Sickie が Ssh と同様に Cofilin の脱リン酸化による活性化に必須の因子であるならば、*sickie*^A変異体クローンの神経軸索ではリン酸化 Cofilin のシグナルの上昇が検出されることが期待された。しかし、*ssh*¹⁻⁶³ 変異体クローンのときに観察されたような、明瞭なリン酸化 Cofilin の発現レベルの上昇は検出することができなかった（図 39B”）。*sickie*^A 変異体クローンでは *ssh*¹⁻⁶³変異体に比べ穏やかな F-actin レベルの上昇（図 34A’）や形態学的異常（図 34A）が検出されていることを考慮すると、Cofilin の活性が免疫染色レベルでのシグナルの上昇として検出可能なほど大きくは低下していない可能性が考えられた。このため、Western blot による生化学レベルでの検出を試みた。コントロールとして、*yw* 系統のほかに *ssh* 機能欠失変異体や *elav-gal4* 依存性 *LIMK*^{KD} 強制発現変異体を用いることを計画したが、何れも致死となりサンプルを収集できなかったため、*elav-gal4* 依存性 *ssh*^{WT} 強制発現系統を用いた。蛹期脳全体を試料として検出を行ったところ、*sickie* 変異体の脳では相対的なリン酸化 Cofilin のレベルが *yw* 系統に比べ約 1.8 倍上昇していることが明らかになった（n=3）（図 39C）。これらの結果は、発生過程の中樞神経系において Ssh ほど直接的ではないが、Sickie が Cofilin の脱リン酸化に寄与していることを示唆している。

続いて、*LIMK*^{KD} 恒常活性化型変異体クローンを誘導した。これまでの生化学的な研究において、LIMK は Cofilin をリン酸化することにより不活性化することが知られており（Aizawa et al., 2001; Bernard, 2007; Endo et al., 2007; Endo et al., 2003; Scott and Olson, 2007; Soosairajah et al., 2005; Yang et al., 1998）、また、本研究においても *LIMK*^{KD} クローンは高い F-actin シグナルの上昇を示していたため（図 34C’）、Cofilin の活性は低下し、リン酸化のレベルが顕著に上昇していることを予測した。ところが、予想に反し、*ssh*¹⁻⁶³ 変異体と同様な明瞭なリン酸化 Cofilin の発現レベルの上昇は *LIMK*^{KD} 恒常活性化型ク

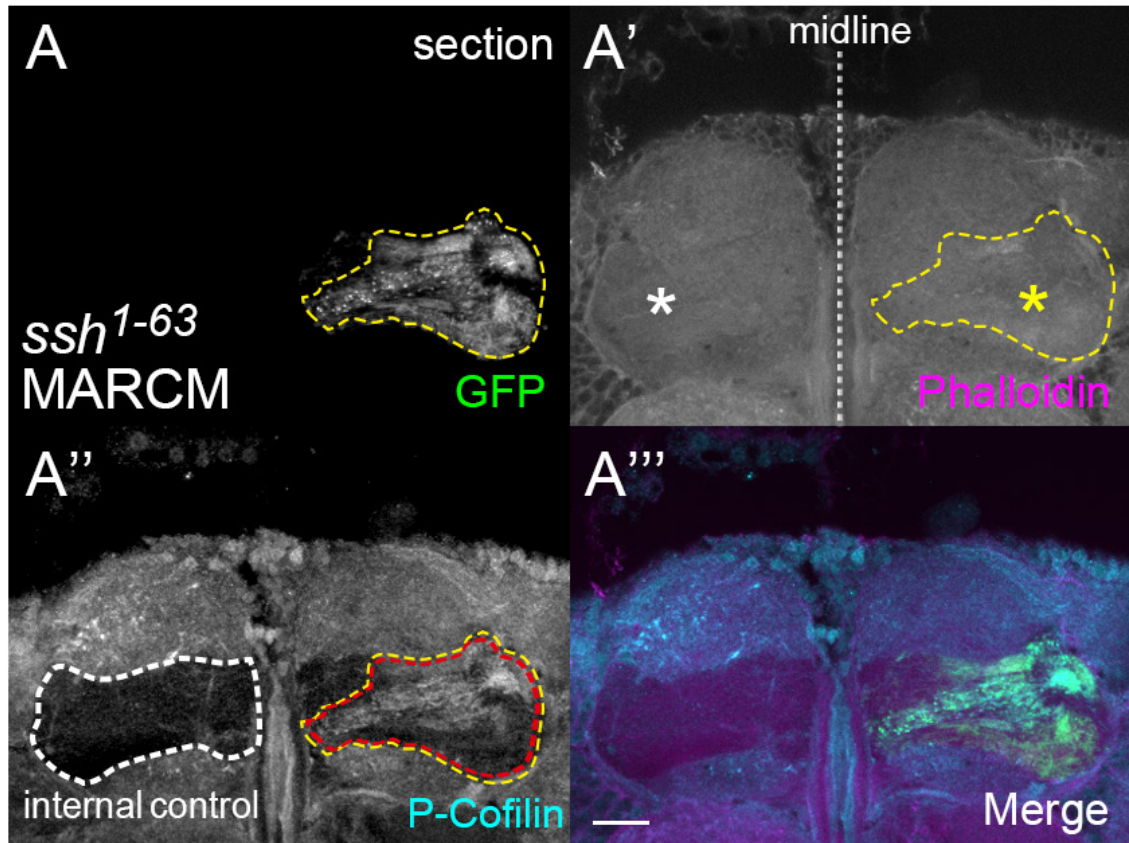


図39. (A-A''') *ssh*¹⁻⁶³変異体の神経軸索におけるリン酸化 Cofilin と F-actin シグナルの固有の検出パターン。(A) 蛹化後 72 時間前後に比べ、蛹化後 90 時間前後の GFP でラベルされる *ssh*¹⁻⁶³ クローンを含む側の lobe 領域では、(A') 黄星印に示す穏やかな F-actin レベルの上昇が観察される。(A'') 白点線で囲むコントロールの lobe 領域に比べ、クローンを含む側の lobe 領域では、赤点線内部領域でリン酸化 Cofilin のシグナルの上昇が観察される。Scale bar, 20 μ m。

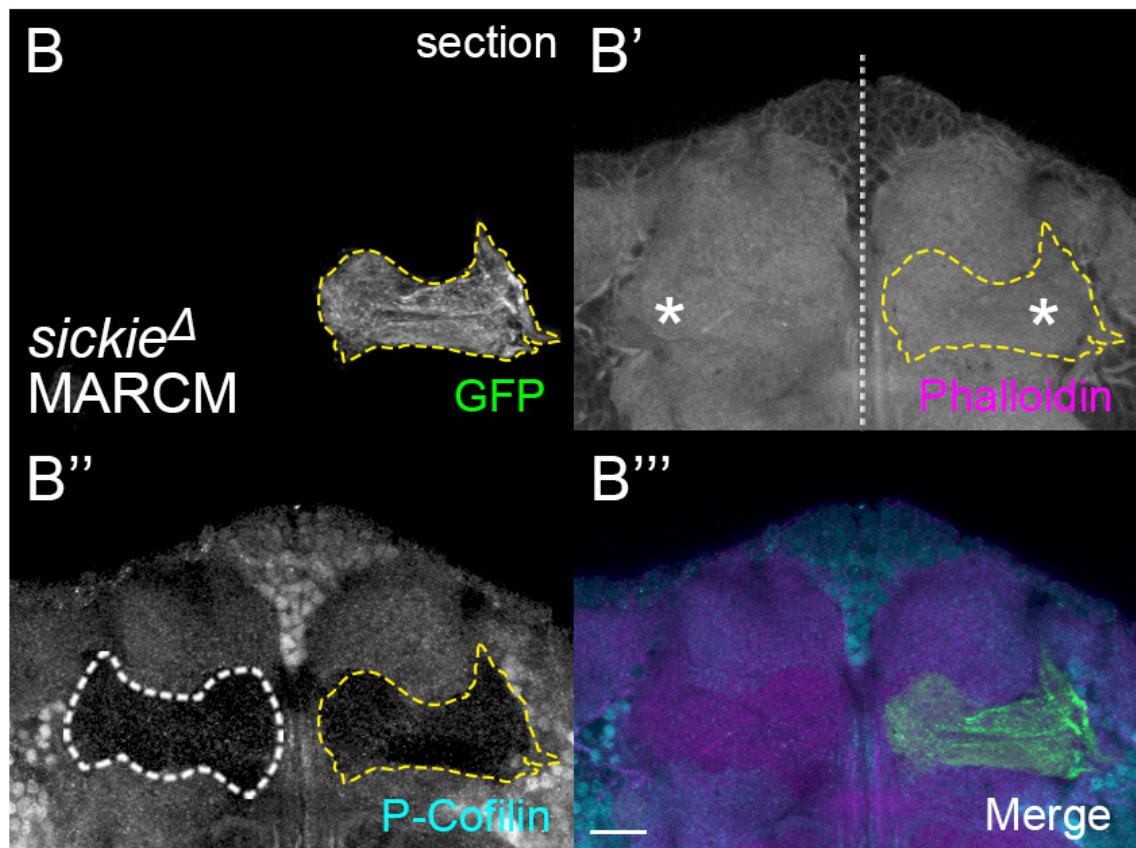


図39. (B-B''') 蛹化後 90 時間前後の(B) *sickie*^Δクローンを含む lobe 領域では、(B') 明らかな F-actin レベルの上昇や、(B'') リン酸化 Cofilin のシグナルの上昇は観察されない。Scale bar, 20 μ m。

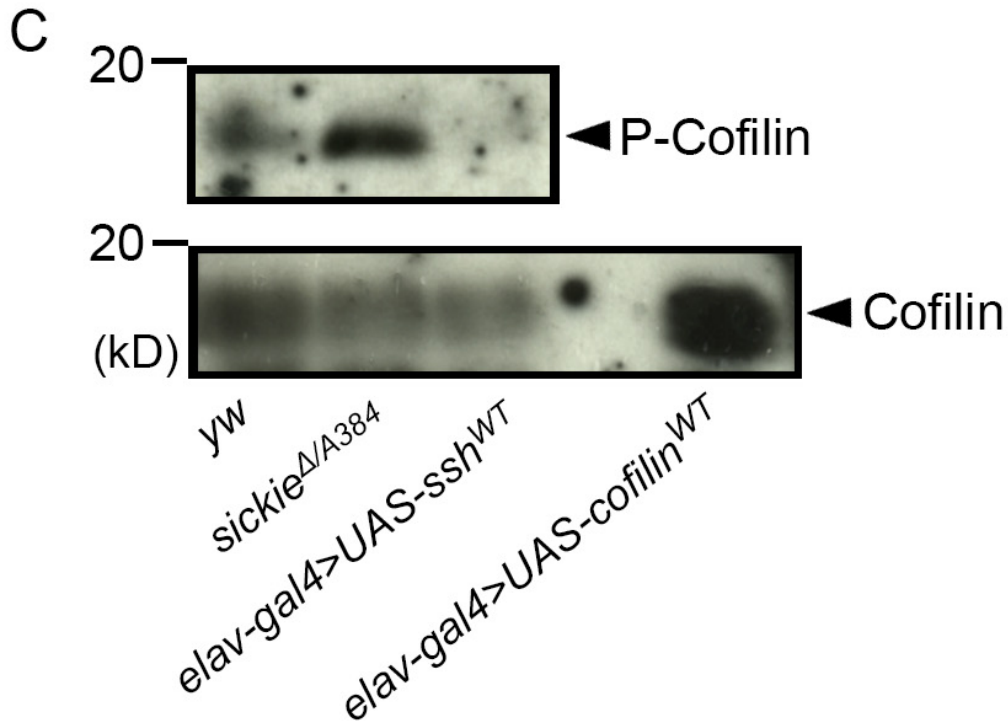


図39. (C) 蛹形成後 72 時間前後の全脳抽出試料を用いた Western blotting により、リン酸化 Cofilin、Total-Cofilin を検出した。各群の平均したリン酸化 Cofilin の発現レベルは各々の値に対応する平均した Total-Cofilin の発現レベルによってノーマライズして比較した。対照群の *yw* の相対的リン酸化 Cofilin の発現量に対して、比較群の *sickie Δ A384* 変異体のリン酸化 Cofilin のレベルはおよそ 1.8 倍に上昇していた ($n=3$)。リン酸化 Cofilin のレベルは *ssh^{WT}* 強制発現群において *yw* 群に比して減少していた。強制発現には Pan-neuronal な Gal4 系統である *elav-gal4* を用いた。Total-Cofilin レーン右端は野生型背景下で Cofilin を全神経で強制発現した群。

ローンにおいて観察されなかった (図 39D’’)。後期蛹期の *ssh¹⁻⁶³* 変異体では相対的に穏やかな F-actin レベルの上昇が観察されながらも (図 39A’) 明らかなリン酸化 Cofilin の上昇が観察された (図 39A’’) のに対し、*LIMK^{KD}* 変異体では高いレベルの F-actin シグナルの上昇が継続的に観察されていたにも関わらずである (図 39D’)

さらに、*LIMK^{KD}* 強制発現 *sickie^A* (*LIMK^{KD}sickie^A*) 2 重変異体クローンを誘導したところ、*LIMK^{KD}* 単独強制発現変異体と同様に高い F-actin レベルの上昇を示したが (図 39E’)、*ssh¹⁻⁶³* 変異体クローンに比べて上昇度合いは低いものの、クローン内の一部の神経軸索においてリン酸化 Cofilin のレベルの上昇が検出された (図 39E’’, 赤点線)。なお、本 2 重変異体クローンの軸索束領域においても、Total-Cofilin の発現レベルの明らかな上昇は観察されないことを確認した (図 40B-B’’’)。これらの結果は、*LIMK^{KD}* または *sickie^A* の単独変異体に比べ、*LIMK^{KD}sickie^A* 2 重変異体の神経軸索において Cofilin の活性が低下していることと、Sickie が LIMK と逆方向に作用する性質を持つことを示唆している。加えて、F-actin レベルとリン酸化 Cofilin のレベルの上昇の度合いを考えたとき、少なくとも *in vivo* の系においては、F-actin の発現レベルが常に Cofilin のリン酸化レベルの程度を反映するものではないことを示している。

一方、古典的 Rac-Cofilin 経路における LIMK の上流の制御因子 Pak、Rac1 の恒常活性化型変異体クローンは異なる結果を与えた。*Pak^{Myr}* または *Rac1^{V12}* クローンのいずれにおいても、リン酸化 Cofilin (図 39F’’, G’’, 赤点線) と F-actin (図 39F’, G’) シグナルの上昇が、Posterior arrest 型の強い伸長異常の表現型を示すキノコ体神経 (図 39F, G) において検出され、これらの変異体の神経軸索において Cofilin の活性が大きく低下していることが示唆された。

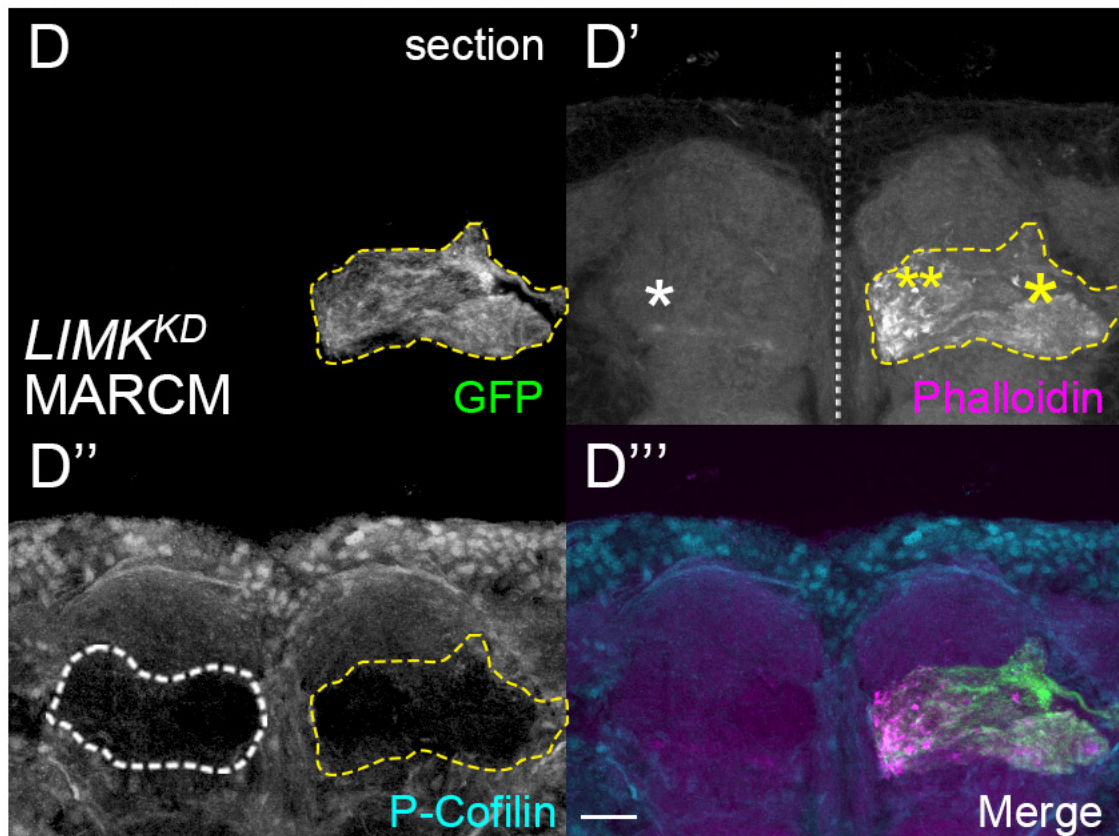


図39. (D) *LIMK^{KD}* 恒常活性化型クローンを含む lobe 領域では、蛹化後 90 時間前後においても、(D') 黄星印に示すような高い F-actin レベルの上昇が継続して観察されるが、(D'') 明らかなリン酸化 Cofilin のシグナルの上昇は観察されない。Scale bar, 20 μ m.

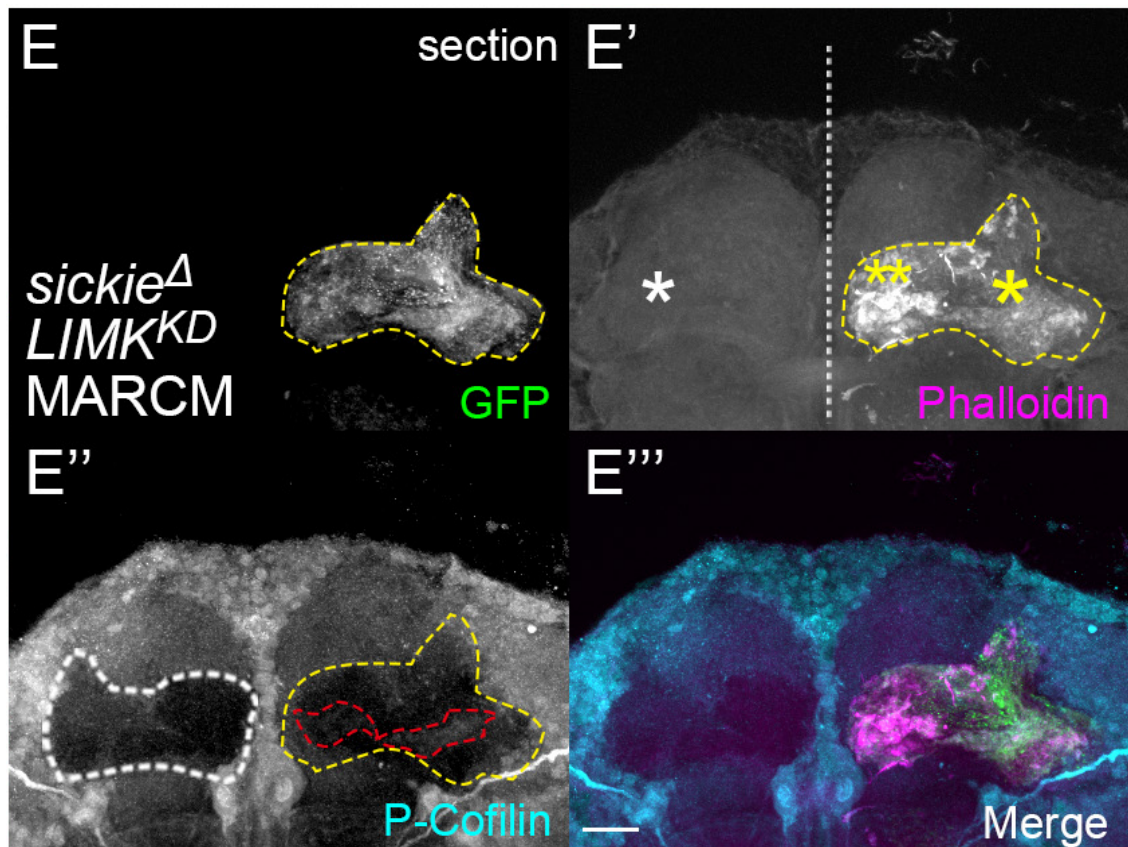


図39. (E) *LIMK*^{KD} *sickie*^Δ 2 重変異体クローン含む lobe 領域では、(E')黄星印に示す F-actin レベルの上昇が継続して観察され、(E'')クローンの一部の神経軸索において、赤点線枠で示すようなリン酸化 Cofilin のシグナルの上昇が観察される。Scale bar, 20 μ m。

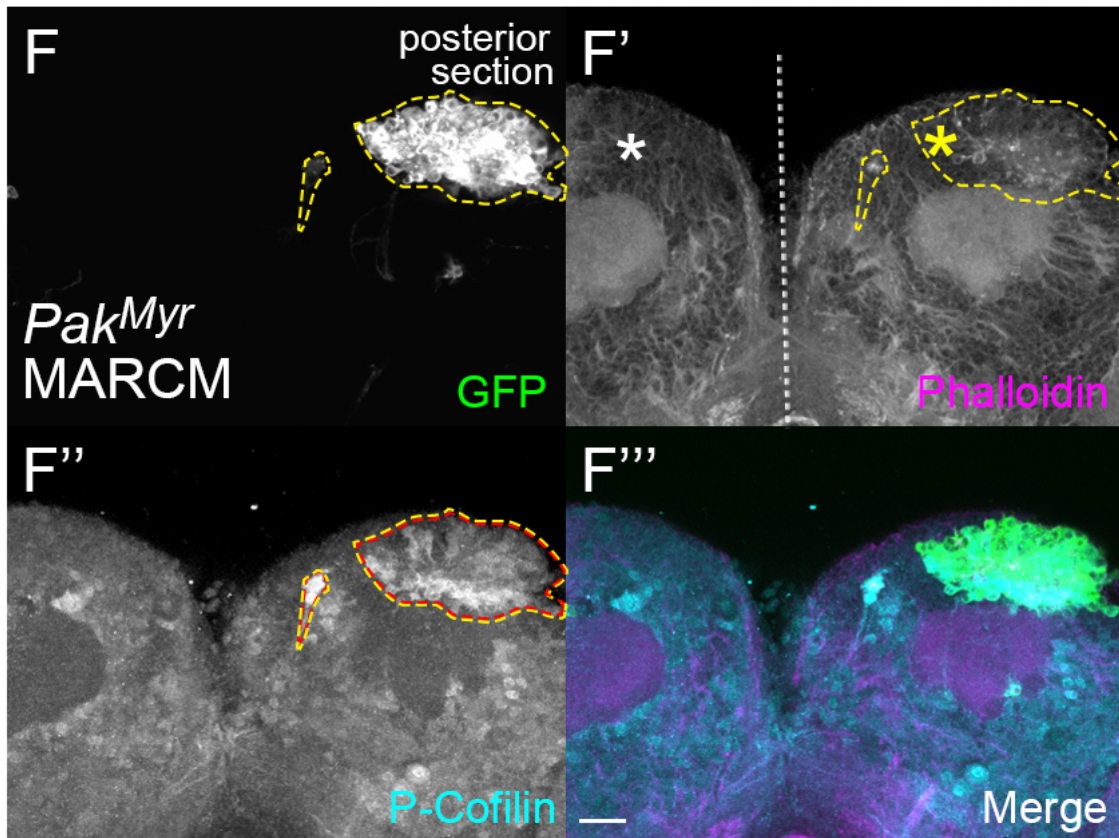


図39. (F)脳後方部において GFP でラベルされ、Posterior arrest の表現型を示す *Pak* 恒常活性化型クローンでは、(F')黄星印で示す異所的な F-actin シグナルが検出され、(F'')赤点線枠に示すリン酸化 Cofilin のシグナルの上昇が観察される。Scale bar, 20 μ m。

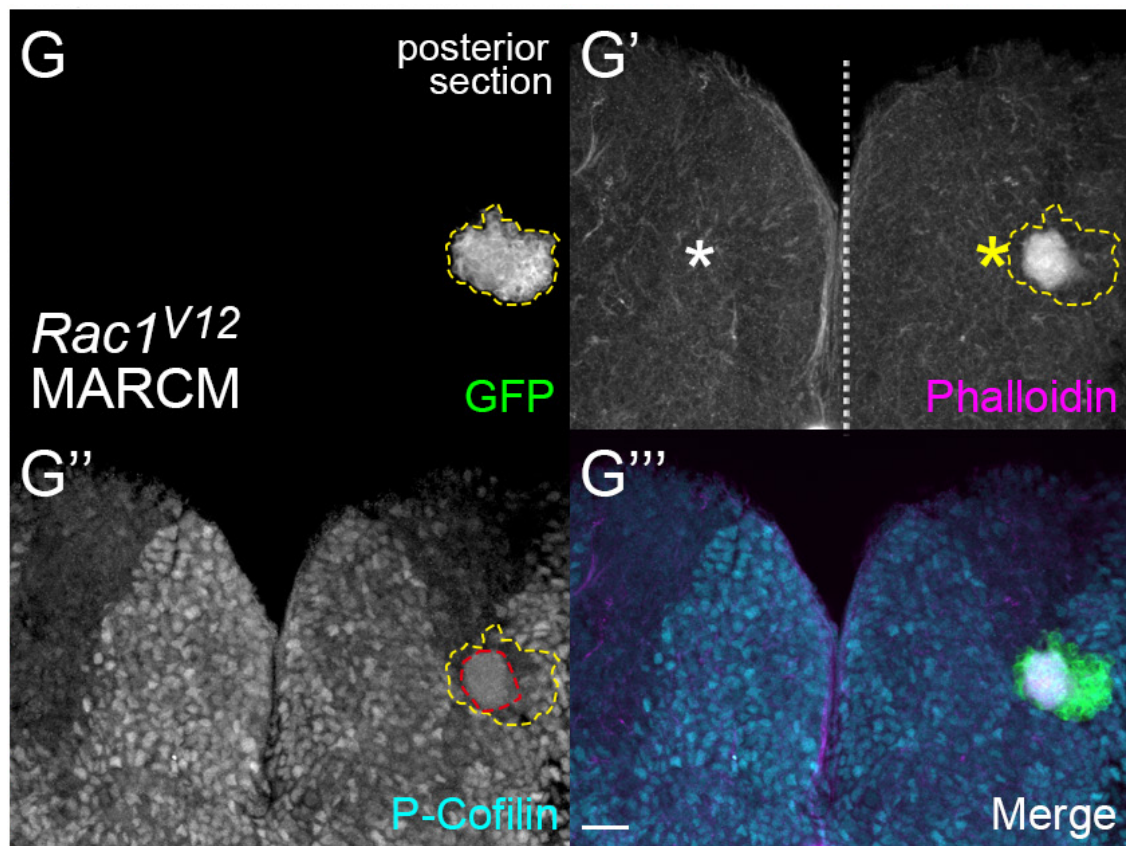


図39. (G)脳後方部においてGFPでラベルされ、Posterior arrestの表現型を示す *Rac* 恒常活性化型クローンでは、(G')異所的な F-actin シグナルが検出され、(G'')赤点線枠で示すリン酸化 Cofilin のシグナルの上昇が観察される。Scale bar, 20 μ m。

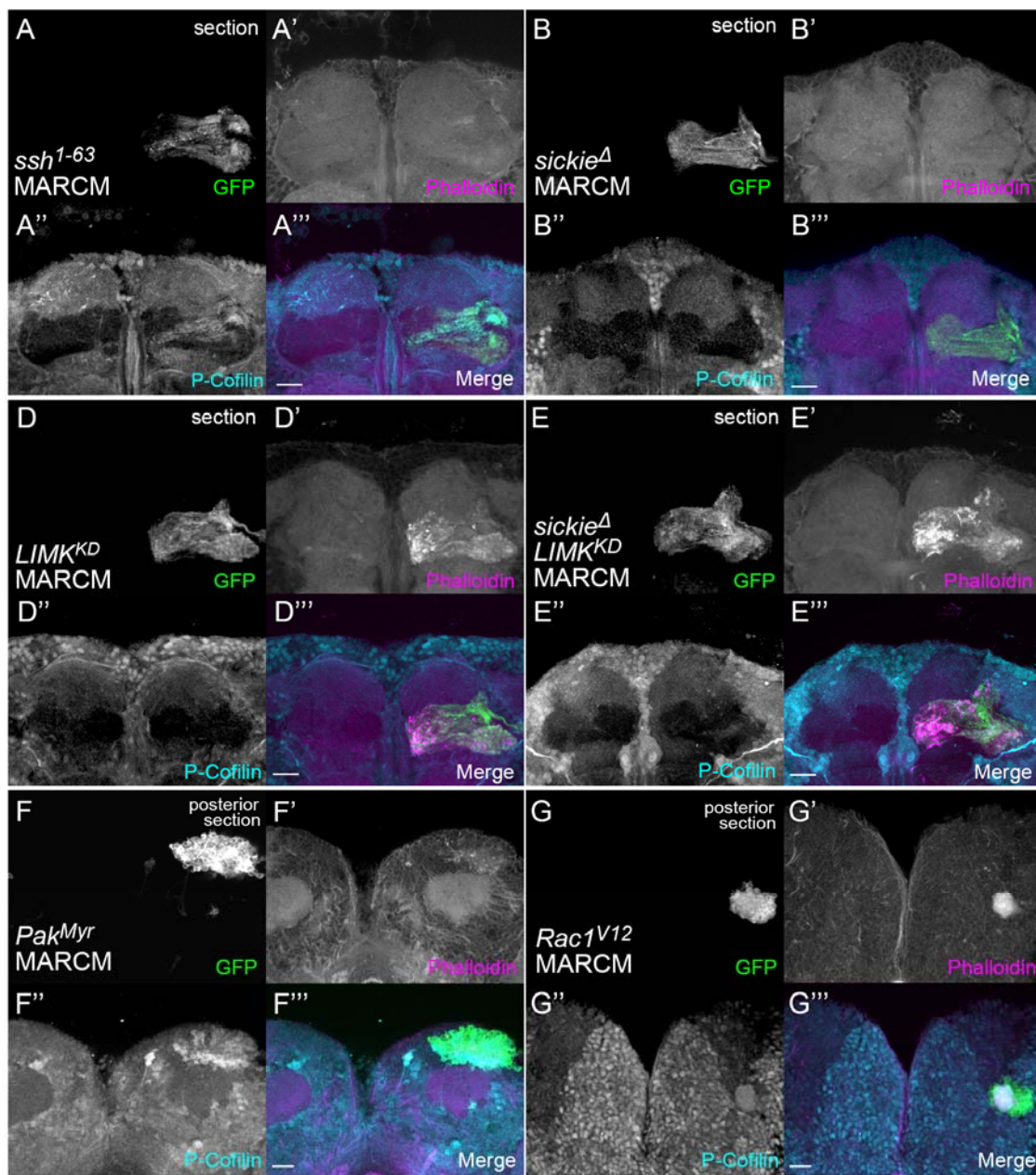


図39. A-G 画像のクローンへのラベリング追加前の画像。Scale bars, 20 μ m.

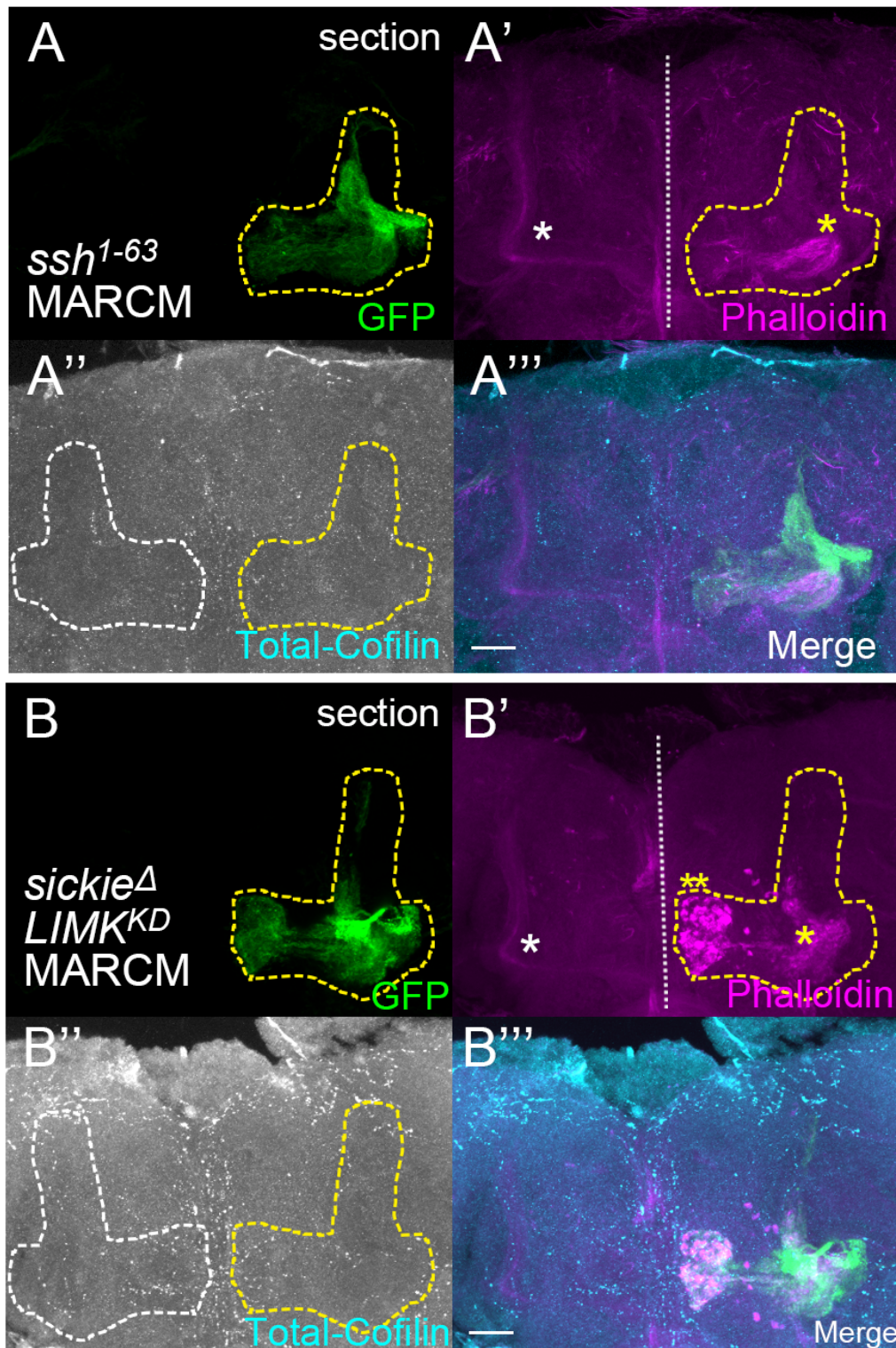


図40. (A) *ssh1-63* 変異体クローン、(B) *LIMK^{KD} sickie^Δ* 重変異体クローンを誘導した個体の Total-Cofilin 抗体による染色 (A'', B''). いずれも、クローンを含む側のキノコ体軸索束領域において、Total-Cofilin のシグナルレベルの明らかな上昇は観察されない。

Scale bars: 20 μ m

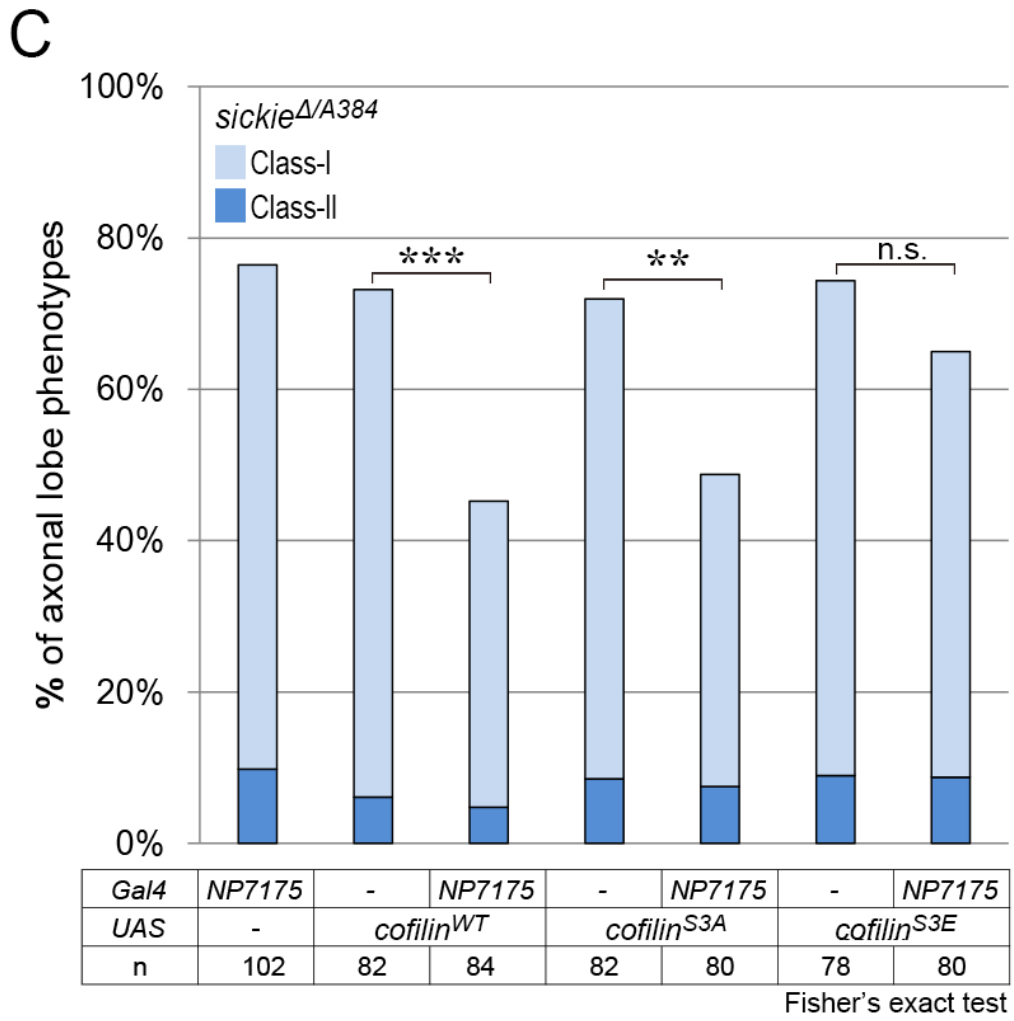
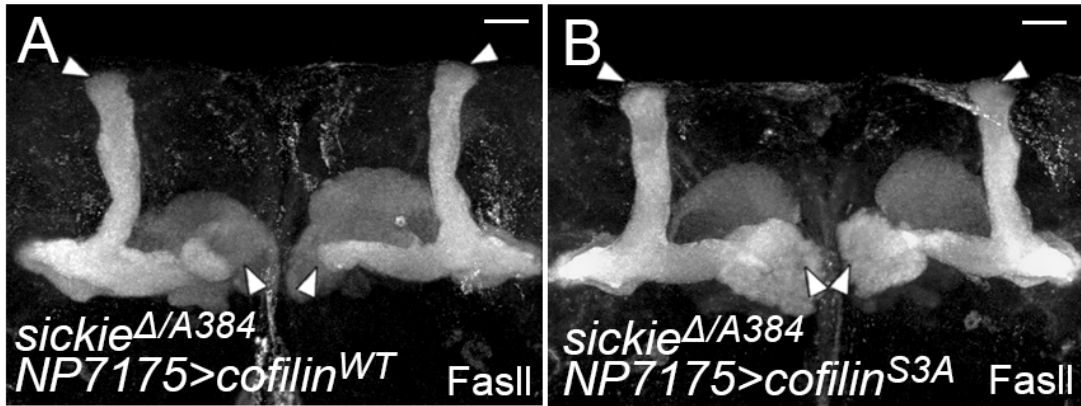
3.6 Cofilin の強制的機能亢進による *sickie* 変異体の表現型の緩和効果

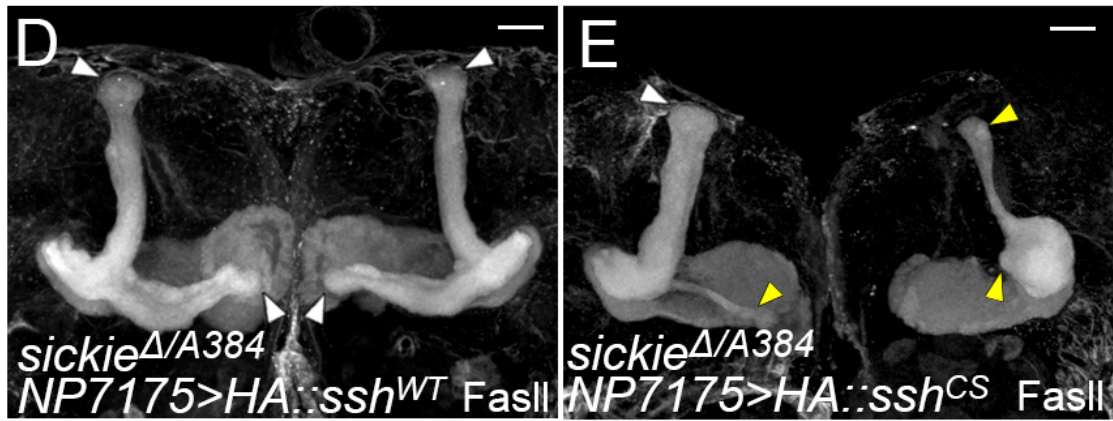
sickie および *LIMK^{KD}* 恒常活性化型の単独の変異体の神経軸索においては明らかなリン酸化 Cofilin の上昇は観察されなかったものの、*LIMK^{KD} sickie 2* 重変異体においては上昇が観察された。この結果は、*sickie* 変異体のキノコ体神経軸索では Cofilin の機能が低下しているという仮説と矛盾せず、Sickie が古典的 Rac-Pak-LIMK 経路と逆方向に働いていることを示唆する。これらの可能性をさらに検討するため、*sickie* 変異体下で Cofilin の機能を強制的に亢進させる実験を行った。発生過程の新生の α/β 神経での発現の誘導が可能であることが明らかになった *NP7175-gal4* ドライバー系統によって種々の *UAS-cofilin* を *sickie^{VA384}* 変異体下で発現させることで、軸索伸長異常がレスキューされるかどうかを調べた。

sickie 変異体の表現型は、野生型 Cofilin (*UAS-cofilin^{WT}*)、活性化型擬態型 Cofilin (*UAS-cofilin^{S3A}*) いずれの強制発現によっても、部分的にレスキューされることが明らかになった (図 41A,B)。ただし、軸索束先端が野生型のように肥大し丸みを帯びた構造をとることが稀であったため、完全な表現型回復ではないと考えた。なお浸透率の回復の度合いも、野生型 Sickie の強制発現によるレスキュー実験時 (図 24) よりも低かった (図 41C)。さらに、Cofilin の活性は Ssh によって時空間的に制御される事に鑑み、同様のレスキュー実験を Ssh の強制発現によって行った (Nishita et al., 2005) (図 41D,E)。野生型 Ssh (*UAS-HA::ssh^{WT}*) は Cofilin の強制発現時と同等のレスキュー効果を示す一方、不活性型 Ssh (*UAS-HA::ssh^{CS}*) の強制発現では有意なレスキュー効果は観察されなかった (図 41F)。

これらの結果は Cofilin の機能の強制的亢進が *sickie* 変異体の軸索伸長異常

を緩和する効果があることを示しており、*sickie* 変異体の神経軸索において内在性の Cofilin の活性が低下しているという仮説と矛盾しない。また、Sickie は遺伝学的には Ssh-Cofilin 経路の下流には位置せず、その上流または独立の経路で機能する可能性が考えられた。





F

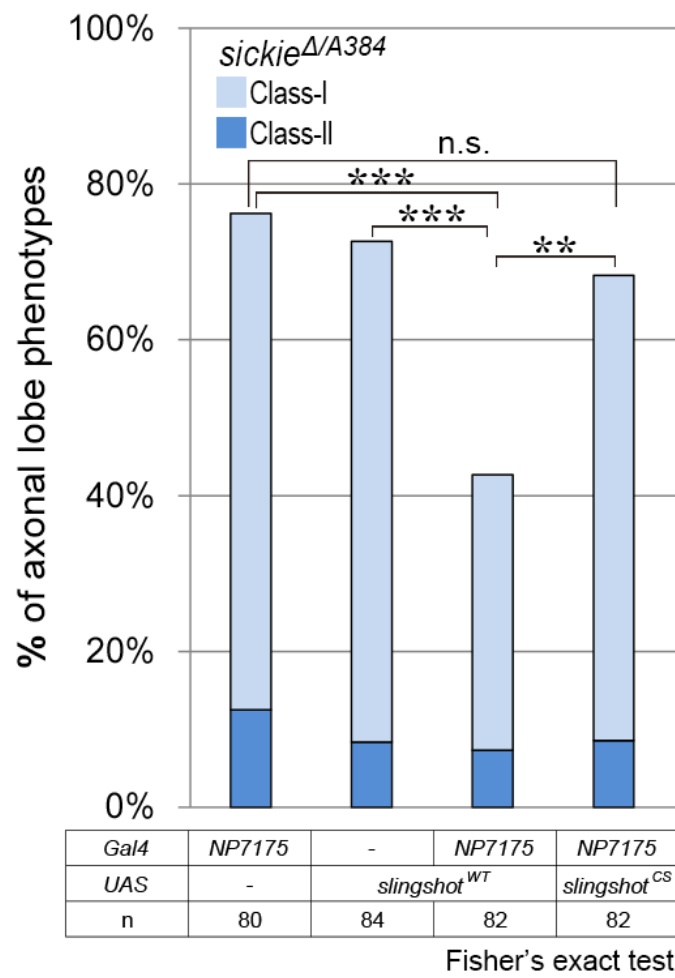


図41. 新生のキノコ体神経における Cofilin の強制的機能亢進により *sickie* 変異体の軸索形成異常の表現型の緩和効果。

(A-B) *sickie* 変異体下で、野生型 Cofilin (WT) または活性型 Cofilin (S3A) を *NP7175-gal4* 依存的に強制発現することで lobe 形成異常の表現型が緩和する。野生型個体のキノコ体のような、末端の膨らんだ α / β lobe の構造は完全にはレスキューされないが、白矢頭に示すように、両 lobe が末端まで投射伸長する個体が観察された。Scale bars, 20 μ m。

(C) Cofilin の強制発現による緩和効果の比較。野生型 Cofilin (WT) または活性型 Cofilin (S3A) を強制発現する系統では有意に軸索束形成異常の浸透率が低下するが、不活性化型 (S3E) Cofilin を強制発現しても有意な低下は確認されなかった。WT: $***p=2.87 \times 10^{-4}$ 、S3A: $**p=2.22 \times 10^{-3}$ 、S3E: $p=0.228$ 、Fisher の正確確率検定。

(D-E) *sickie* 変異体下で、野生型 Ssh (WT) または不活性型 Ssh (CS) を *NP7175-gal4* 依存的に強制発現することで lobe 形成異常の表現型が緩和する。白矢頭に示すように、両 lobe が末端まで投射伸長する個体が観察された。Scale bars, 20 μ m。

(F) Ssh の強制発現による緩和効果の比較。野生型 Ssh^{WT} を強制発現する系統では軸索束形成異常の浸透率が低下するが、不活性型 Ssh^{CS} を強制発現しても有意な低下は確認されなかった。WT: $***p=1.50 \times 10^{-5}$ 、CS: $p=0.295$ 。Bonferroni の補正を行った多重比較において WT と CS を比較した際も差が見られた。 $**p=1.59 \times 10^{-4}$ 。

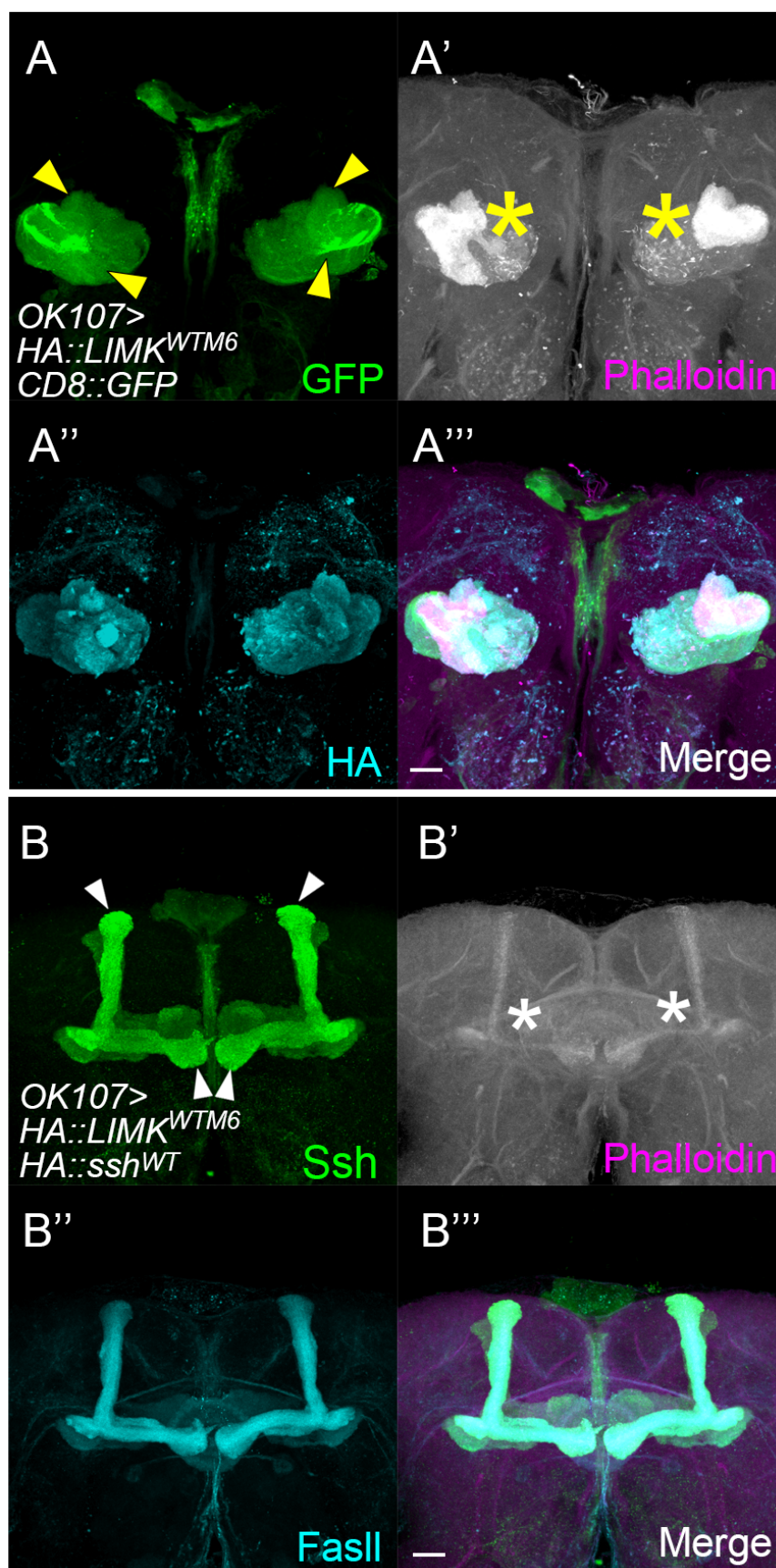
3.7 LIMK 強制発現による F-actin を介した軸索伸長異常に対する Sickie の抑制作用

非古典的 Rac-Cofilin 経路の存在を示唆する結果としては、これまでショウジョウバエキノコ体をモデルとして、Rac 機能欠失変異体の軸索伸長阻害が、Pak を活性化する能力を持たないアミノ酸置換型 Rac (Rac1^{Y40C}) の強制発現によって緩和されることや、LIMK 過剰発現による軸索伸長阻害が Rac1^{Y40C} の共発現により緩和されることが報告されていた (Ng and Luo, 2004; Ng et al., 2002)。すなわち、非古典的経路は古典的 Rac-Cofilin 経路に対し拮抗的に働くことが予想されていたため、Sickie と LIMK 間の相互作用について調べることにした。

先行研究において、高い発現レベルの野生型 LIMK (*UAS-HA::LIMK^{WTM6}*) を用いて過剰発現した個体では、背側と正中線側の両方の軸索束の伸長が阻害されている Class-II 型の表現型が、F-actin の強い発現をとめない高い浸透率で観察されることが報告されており (Ng and Luo, 2004)、本研究でも同様にこれらの結果を確認することができたため (図 42A-A’’)、比較の際の対照群として定義した。興味深いことに、Ssh^{WT} の共発現は、この高い発現レベルの *LIMK^{WTM6}* 過剰発現系統の表現型も完全に回復させることができた (図 42B-B’’)。Rac1^{Y40C} の共発現は、完全ではないものの *LIMK^{WTM6}* 過剰発現の表現型を緩和することができることが明らかになった (図 42C-C’’)。このため、Sickie が Ssh や非古典的 Rac (Rac1^{Y40C}) と同一の経路で機能すると仮定した場合、*LIMK^{WTM6}* 過剰発現に見られる伸長異常と高いレベルの F-actin の上昇が抑制されることを期待した。野生型 Sickie (Sickie^{WT}) を共発現した結果、Rac1^{Y40C} と同様に、軸索伸長異常と F-actin レベルの上昇を緩和できることが明らかになった (図 42D)。ただし、軸索伸長異常の緩和効果は Ssh^{WT} と比較すると不完全であり、

正中線側に投射する軸索束の伸長異常はレスキューされるものの、背側方向に伸びる軸索束の完全な回復は観察されなかった（図 42D-D'''）。さらに、AAA ドメインのアミノ酸置換変異体 Sickie^{K1881A} を用いて同様の実験を行った結果、軸索伸長阻害（図 42E）と F-actin レベルの上昇（図 42E'）の何れもレスキューされなかった。これらの事実は、Sickie が軸索伸長制御の過程で LIMK に対して拮抗的に作用することを示しており、その際、AAA ドメインの機能が重要であることを示唆している。

次に内在レベルでの LIMK と Sickie の相互作用を調べるため、*OK107-gal4* 依存的な RNA 干渉法により *LIMK* をキノコ体でノックダウンする系統を用いた。*LIMK* を単独でノックダウンした系統では、Class-I 型の lobe 形成異常が低頻度で観察され、過剰発現のときのような Class-II 型の表現型が観察されることはなかった（図 43）。本 RNA 干渉を *sickie* 機能欠失変異体下で同様に誘導したところ、*sickie* 機能欠失変異体単独の系統に比べ Class-I 型の lobe 形成異常の浸透率は増加したが、Class-II 型の浸透率は減少した。Class-I,II の浸透率を合計した、lobe 形成異常の総和としての浸透率を考えた場合、*LIMK* ノックダウン *sickie* 機能欠失 2 重変異体では、相加的に表現型が亢進したと考えられたが、Class-II 型の浸透率の低下に着目した場合、軸索伸長において Sickie と LIMK は逆向きに作用するという仮説と矛盾しない結果であるとも考えられた。



☒42.

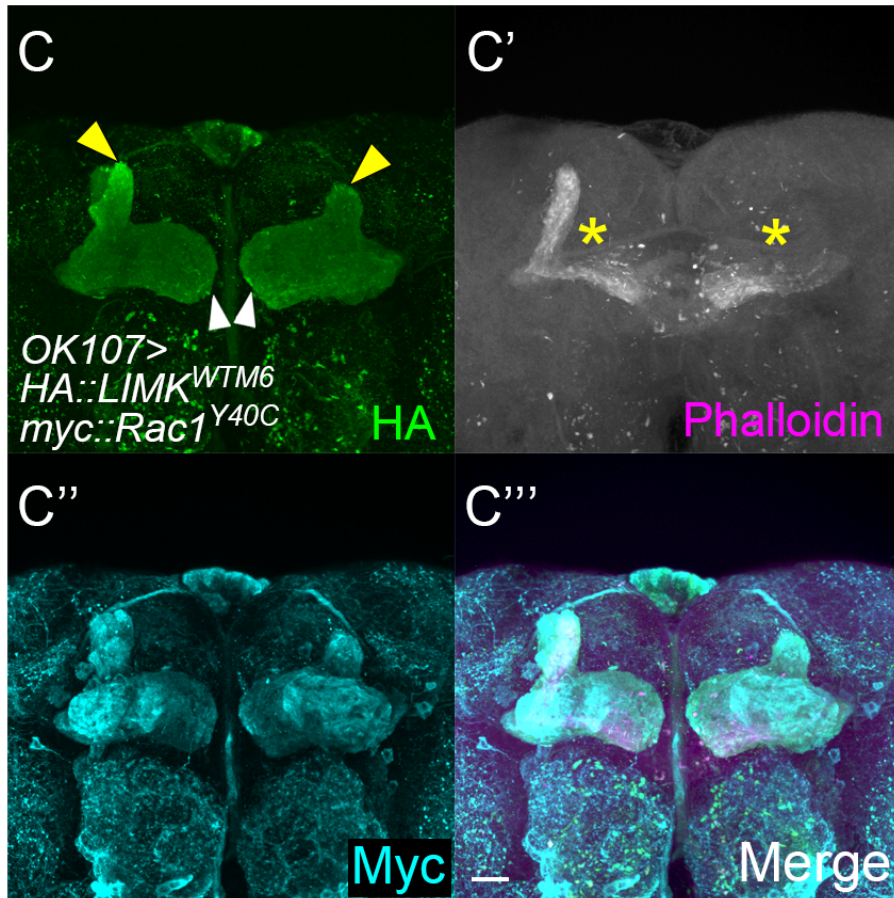


図42.

(A-A'') (A'') *OK107-gal4* 依存的な HA::LIMK^{WTM6} の発現は、(A)黄矢頭に示す Class-II 型の軸索伸長異常を惹き起こし、(A')黄星印に示す F-actin シグナルの強い上昇を伴う。

(B-B'') (B) HA::LIMK^{WTM6} に HA::Ssh^{WT} を共発現させると、(A-A'')に見られた軸索伸長異常と F-actin レベルの上昇が、それぞれ(B)白矢頭と(B')白星印に示すように明瞭に抑制される。

(C-C'') HA::LIMK^{WTM6} に(C'') Pak 結合能を持たない myc::Rac1^{Y40C} を共発現させると、(C)背側方向に投射する lobe 形成異常は完全には抑制されないが、正中線側に投射する lobe の形成異常は抑制され、(C')黄星印で示すように F-actin シグナルの上昇の緩和も観察される。

Scale bars, 20 μ m.

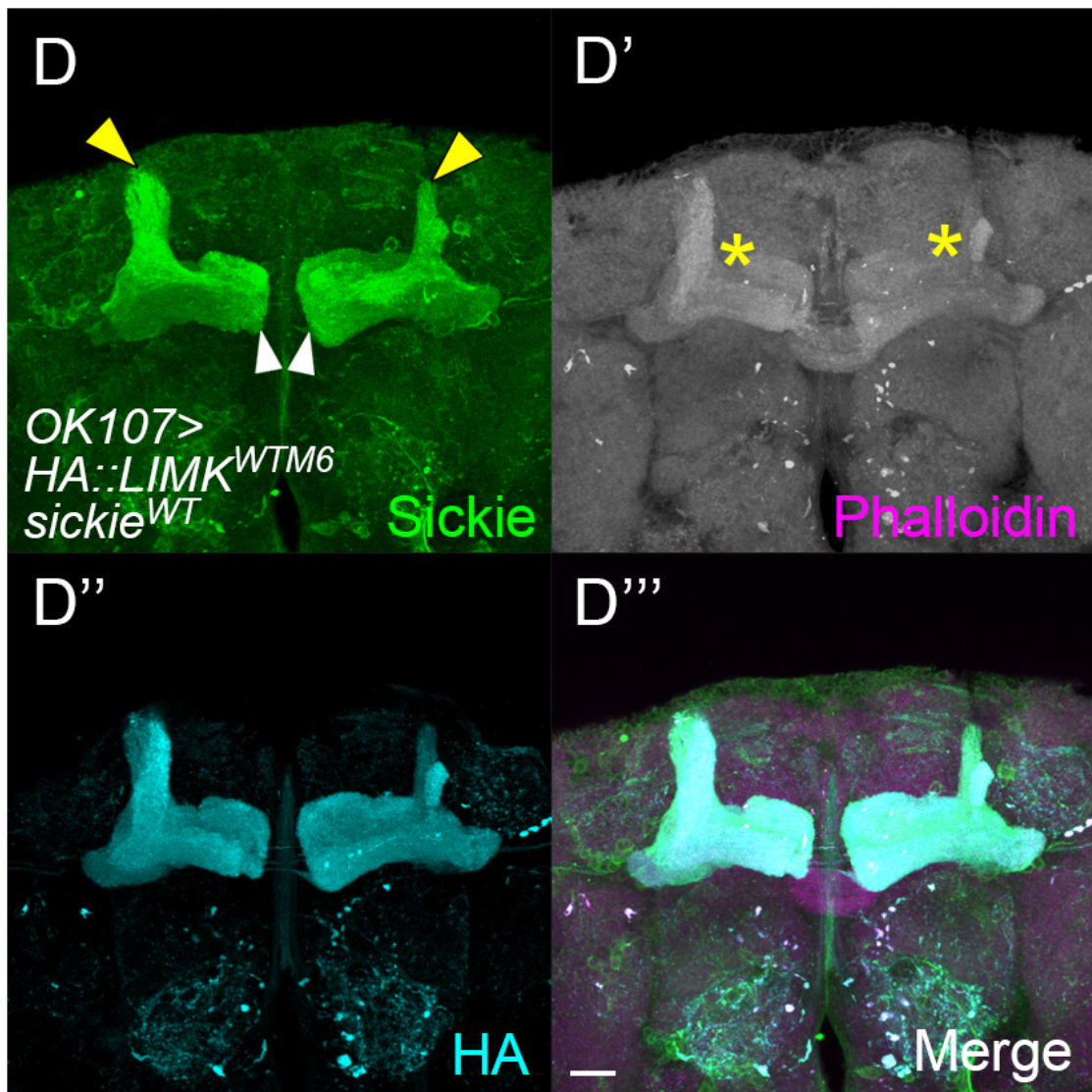


図42. (D-D''') (D'') HA::LIMK^{WTM6} の発現に (D) 野生型 Sickie を共発現させても、(C-C'') Rac1^{Y40C} と同様に (D) 背側方向に投射する lobe 形成異常は完全には抑制されないが、正中線側に伸びる lobe 形成異常は明瞭に抑制される。(D') 黄星印で示すように F-actin シグナルの上昇は緩和される。
Scale bar, 20 μ m.

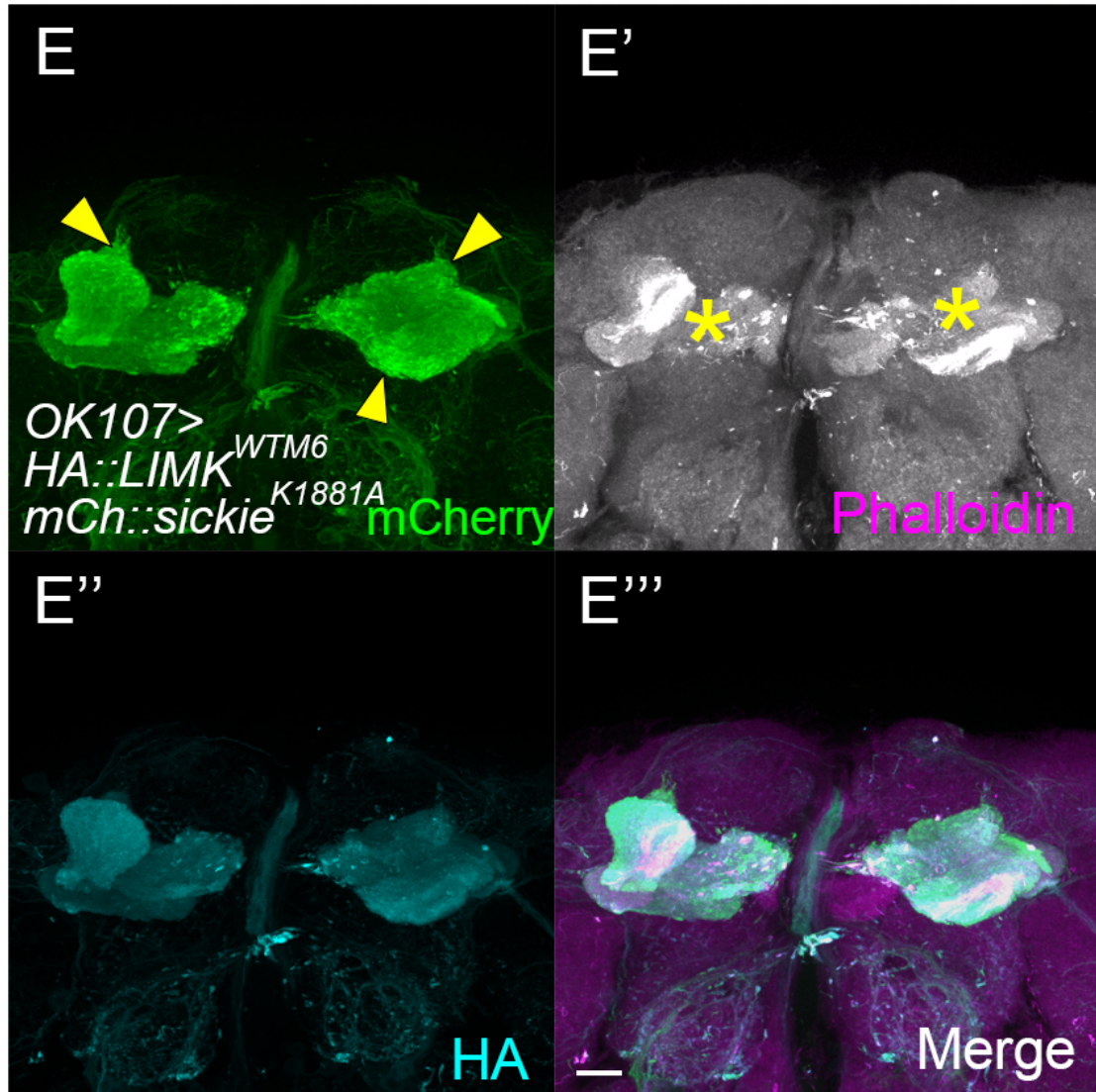


図42. (E-E''')アラニン置換変異型 Sickle を共発現させると、(E'')LIMK 強制発現の異常の緩和効果は観察されなくなり、(E)黄矢頭と(E')黄星印で示す Class-II 型の lobe 形成異常と高いレベルの F-actin シグナルが観察される。Scale bar, 20 μ m.

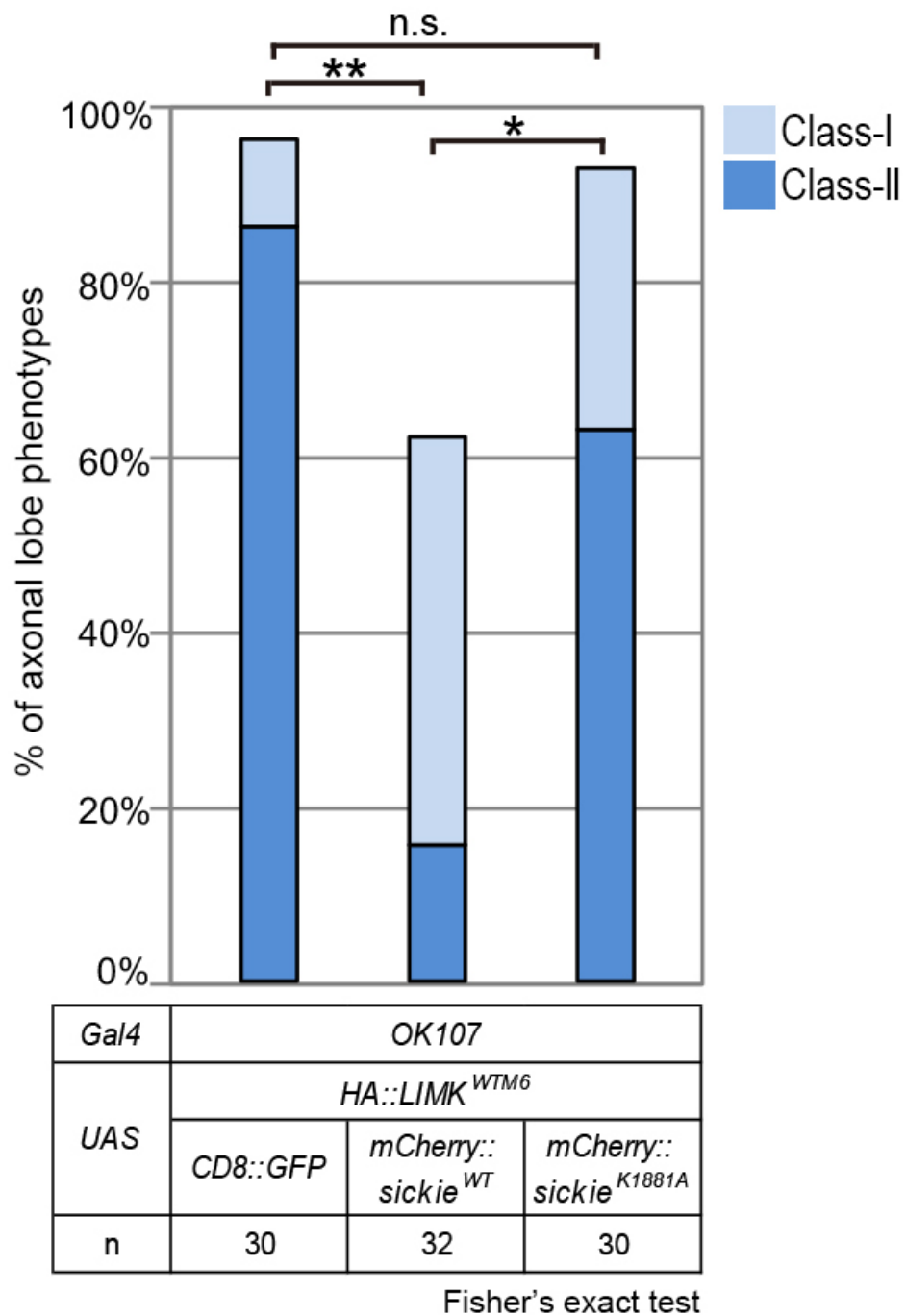


図43. OK107-gal4 依存的 *LIMK^{WTM6}* 強制発現による軸索伸長異常は、*mCherry::Sickie^{WT}* の共発現によって有意に抑制された。

GFP/sickie^{WT}: ** $p=1.20 \times 10^{-3}$ 、*sickie^{WT}/sickie^{K1881A}*: * $p=5.36 \times 10^{-3}$ 。

変異型 *mCherry::sickie^{K1881A}* の共発現の場合では、有意な抑制は観察されなかった。

GFP/sickie^{K1881A}: $p=1.00$ 。

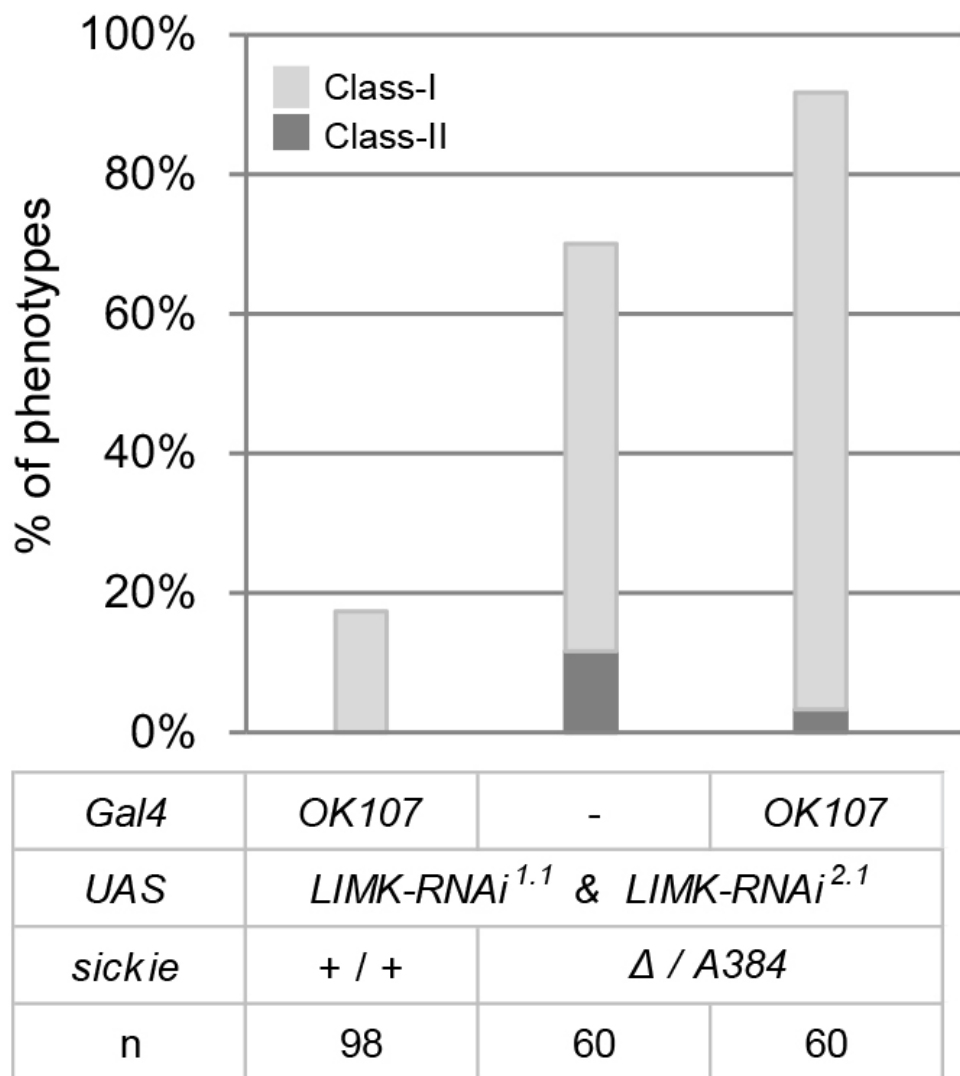


図44. RNA 干渉法による *LIMK* ノックダウンと *sickie* 機能欠失変異体を用いた遺伝学的相互作用の検証。*sickie* 単独の変異体に比べ、*LIMK-RNAi sickie* 機能欠失 2 重変異体では Class-I 型の lobe 形成異常の浸透率は増加したが、Class-II 型の浸透率は若干減少した。

3.8 LIMK に対する Ssh および Pak 非依存的 Rac の軸索伸長異常抑制作用における Sickie の必要性

ここまでの結果を踏まえ、Sickie は Cofilin 依存的な軸索伸長制御において促進的に機能し、その際、非古典的 Rac 経路を Ssh に仲介しているという仮説を立て、Rac1^{Y40C} と Ssh^{WT} の LIMK への拮抗的作用に Sickie の機能欠失が影響を与えるかどうかを検証した。*sickie*^{A/A384} 変異体下では、Rac1^{Y40C} を強制発現しても、LIMK 過剰発現によって惹起された Class-II 型の軸索伸長異常(図 45A、B) と強い F-actin レベルの上昇(図 45A') が観察された。次に、Rac1^{Y40C} のかわりに Ssh^{WT} を強制発現したところ、LIMK 単独の強制発現のときに比べると F-actin レベルの上昇度合いが相対的には低下しているものの、依然として明らかな上昇が観察された(図 45C')。また、Class-II 型の表現型に限って着目するとその浸透率は 50%程低下していたが、Class-I、II を合わせた伸長異常の表現型の抑制に関して統計学的に検定した際に優位な差は検出されなかった(図 45D)。

また、これらの遺伝学的解析において *sickie*^{A/A384} 変異体の代替に 25°C の誘導条件下で *OK107-gal4* 依存的に *sickie* の RNA 干渉を誘導した。図 21A,C に示すように、25°C 条件下での *sickie* の単独の RNA 干渉は軸索束形成に明らかな異常を示さないにも関わらず、*sickie*^{A/A384} 変異体背景下のときと同様に、Rac1^{Y40C} や Ssh^{WT} の共発現による LIMK 強制発現依存的な F-actin レベルの上昇と軸索伸長異常の抑制効果は低下していた(図 46A-A'', B-B'')。

これらの結果は、キノコ体神経軸索の伸長制御において Pak 非依存的 Rac が LIMK に対して抑制的に機能するために Sickie が必須であること、Ssh の機能発現自体に Sickie は必須ではないが、LIMK に対し Ssh がその機能を正常に発

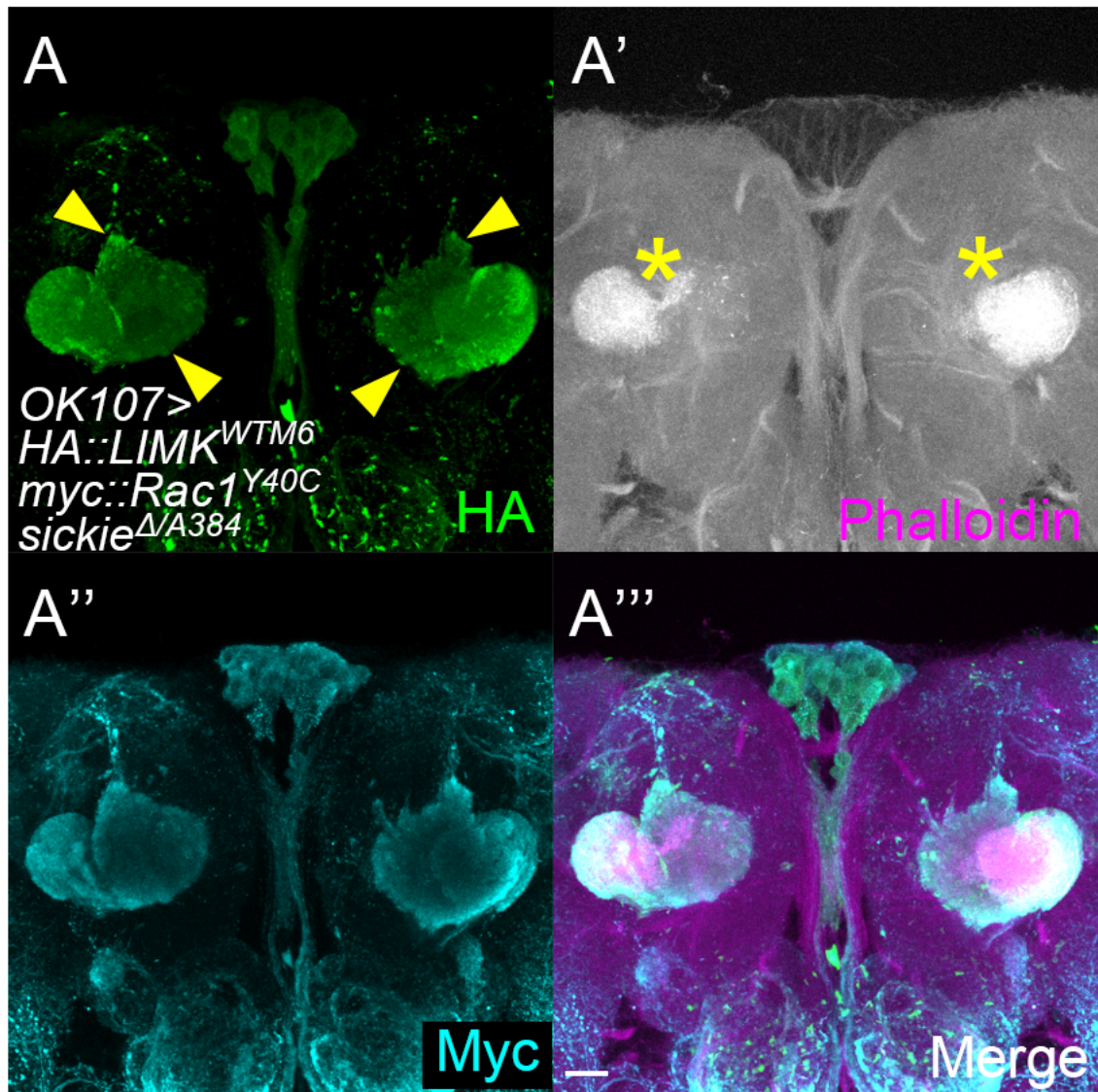


図45. (A-A''')図 42C-C'''に示した HA::LIMK^{WTM6} 強制発現の表現型の Rac1^{Y40C} 共発現によるレスキュー効果が、*sickie* 変異体下でも発揮されるかを検証した。(A)黄矢頭と (A')黄星印に示すように、軸索束伸長異常と F-actin レベルの上昇のいずれも抑制されない。Scale bar, 20 μm。

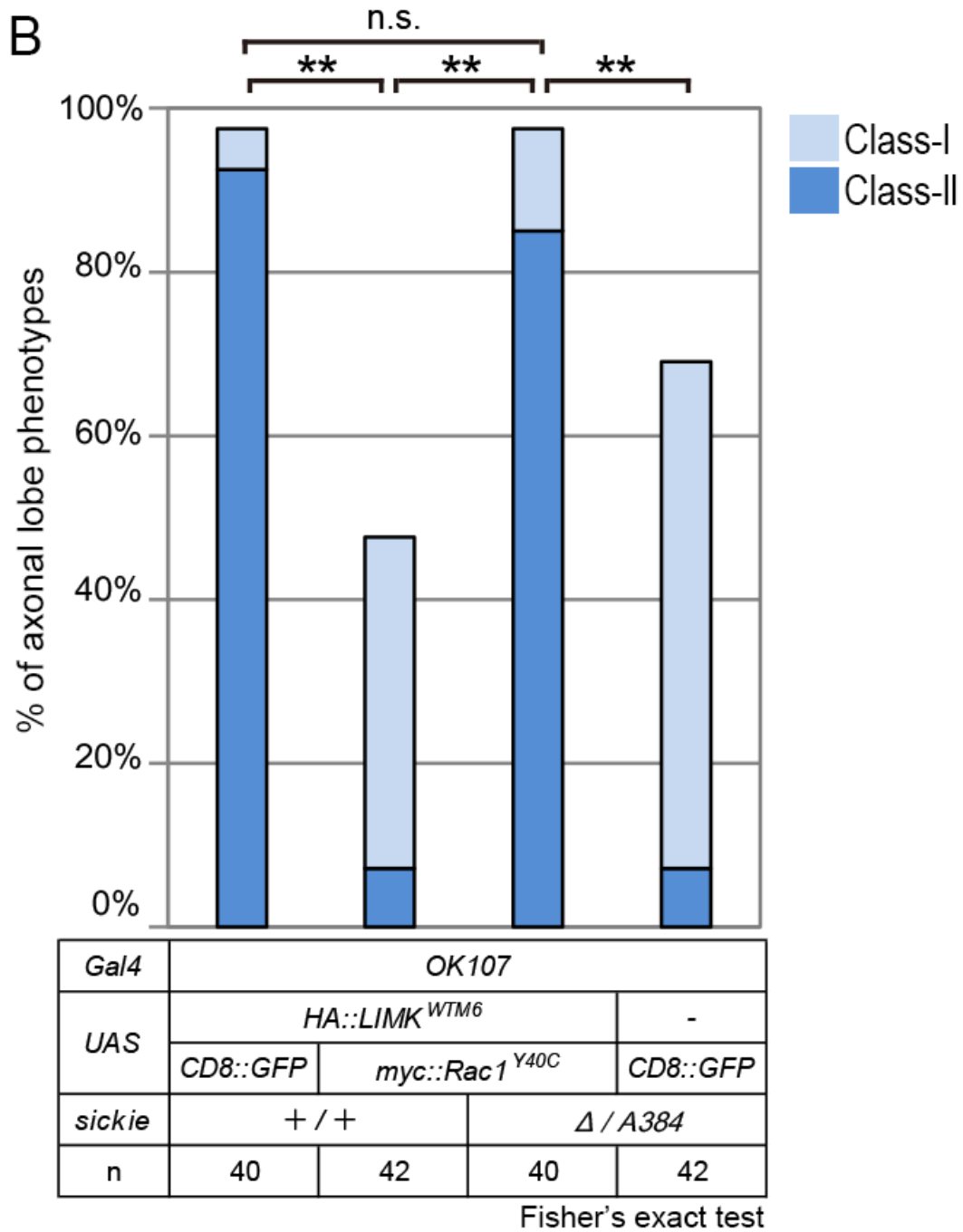


図45. (B) LIMK 強制発現による軸索異常の $Rac1^{Y40C}$ による抑制効果は有意差が確認されたが、*sickie* 変異体下では確認されなかった。

$GFP/Rac1^{Y40C}$: $**p=1.77 \times 10^{-3}$, $GFP/Rac1^{Y40C} sickie^{\Delta/A384}$: $p=1.00$,

$Rac1^{Y40C}/Rac1^{Y40C} sickie^{\Delta/A384}$: $**p=1.77 \times 10^{-3}$,

$Rac1^{Y40C} sickie^{\Delta/A384}/sickie^{\Delta/A384}$: $**p=7.28 \times 10^{-4}$ 。

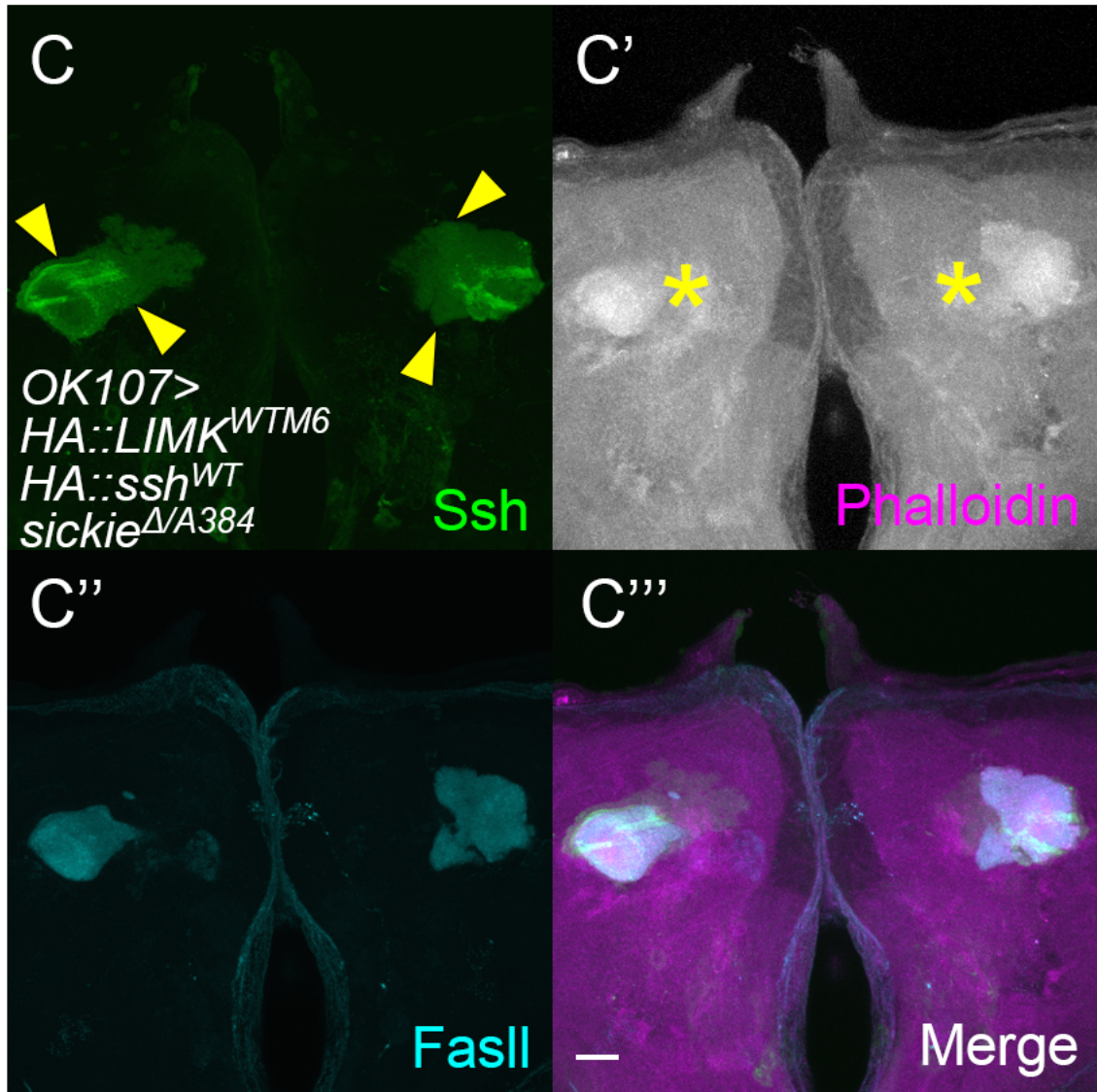


図45. (C-C''')図 42B-B'''に示す LIMK 強制発現の Ssh^{WT} 共発現によるレスキュー効果は、*sickie* 変異体下では正常に発揮されない。(C)黄矢頭と(C')黄星印に示す、伸長異常と強い F-actin の発現が観察される。Scale bar, 20 μ m。

D

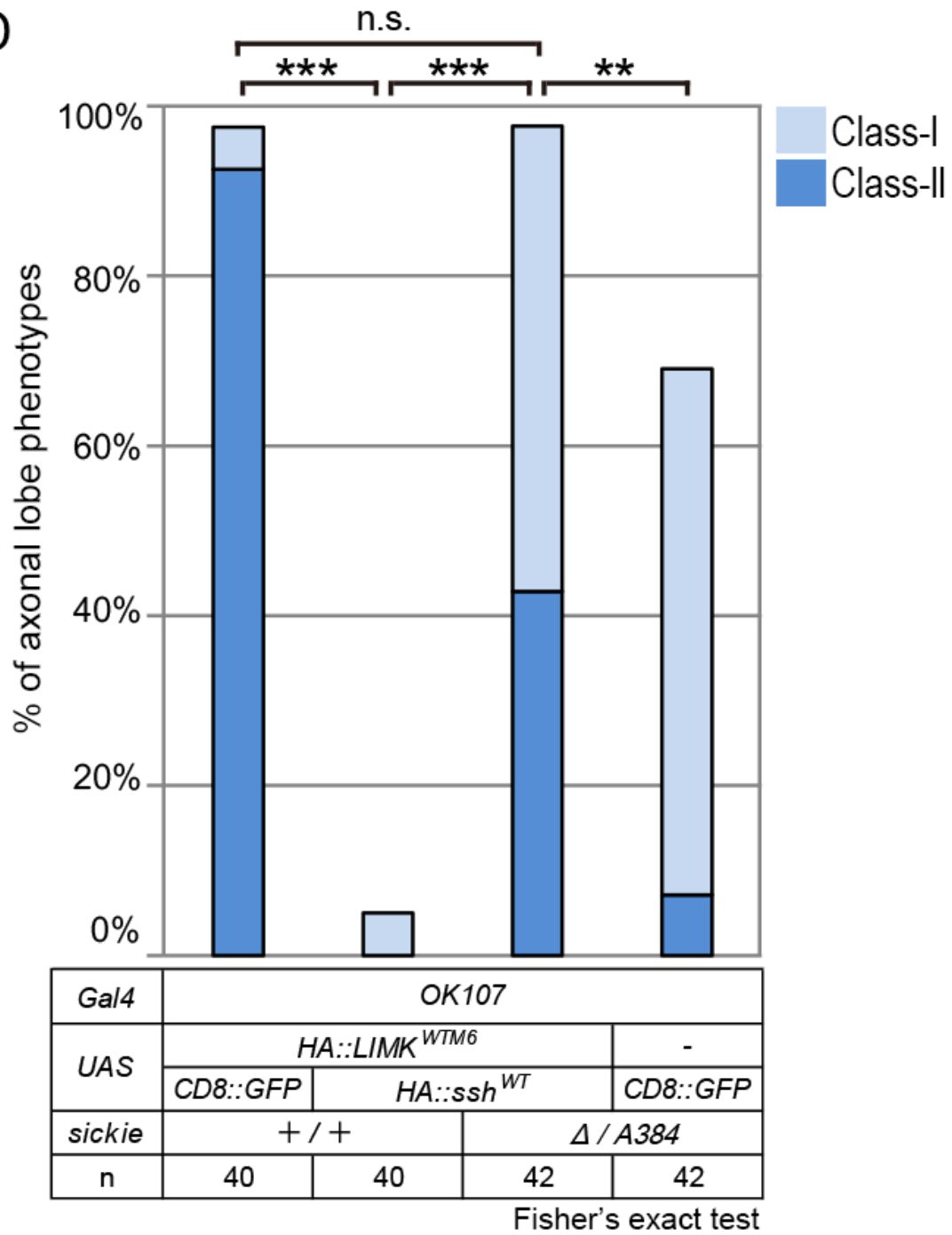


図45. LIMK 強制発現による軸索異常の Ssh^{WT} による抑制効果は統計的な有意差が確認されたが、*sickie* 変異体下では確認されなかった。

GFP/ssh^{WT} : *** $p=3.33 \times 10^{-8}$, $GFP/ssh^{WT} sickie^{\Delta/A384}$: $p=1.00$,

$ssh^{WT}/ssh^{WT} sickie^{\Delta/A384}$: *** $p=6.43 \times 10^{-9}$,

$ssh^{WT} sickie^{\Delta/A384}/sickie^{\Delta/A384}$: ** $p=7.08 \times 10^{-4}$ 。

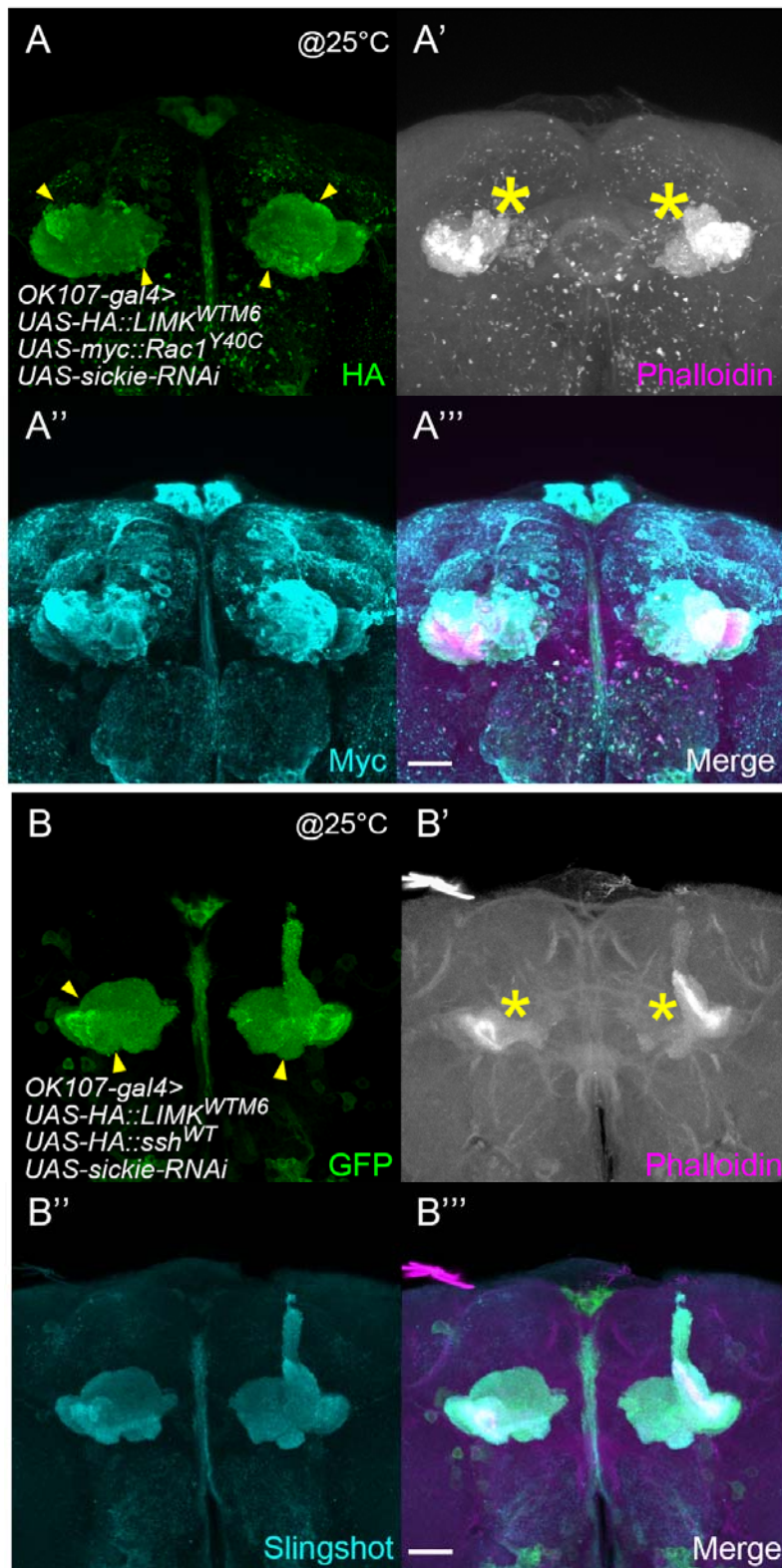


図46. (A-A'', B-B'') 25°C条件下の *sickie* の RNA 干渉の共誘導は、LIMK^{WTM6} 過剰発現の表現型に対する Ssh^{WT}、Rac1^{Y40C} の抑制効果を低下させる。Scale bars, 20 μ m。

揮して抑制的に作用するためには Sickie が必要であることを示唆している。

さらに、図 45 と同様の実験系で、キノコ体軸索束における Cofilin の活性化状態を推定するため、peduncle 領域におけるリン酸化 Cofilin の発現レベルを調べた (図 47)。OK107-gal4 依存的な LIMK^{WTM6} の強制発現では、peduncle 領域において周辺組織より低いレベルのリン酸化 Cofilin の発現が観察された (図 47A", 白円内部)。一方、LIMK^{WTM6} 強制発現 sickie 機能欠失 2 重変異体では、周辺組織よりも高いレベルのリン酸化 Cofilin のシグナルが検出された (図 47B", 赤円内部)。この結果は、結果 3.5 (図 39D,E) で示した LIMK^{KD} 単独の強制発現クローンでは明らかなリン酸化 Cofilin のレベルの上昇が観察されず、LIMK^{KD}sickie 機能欠失の 2 重変異体においては上昇が観察された結果と矛盾しなかった。さらに、同条件下で Rac1^{Y40C} を強制発現した個体では軸索束形成異常が抑制されず (図 47C"""), リン酸化 Cofilin の上昇が観察された (図 47C"). また、同条件下で Rac1^{Y40C} の代替に Ssh^{WT} を強制発現した個体でも、周辺組織に比べ高いレベルのリン酸化 Cofilin のシグナルが観察された (図 47D"). すなわち、LIMK に対し Ssh が拮抗的に作用する際や、Sickie や Pak 非依存的 Rac が LIMK に対し抑制的に機能する際、Cofilin の活性制御の段階において相互作用していることが示唆された。

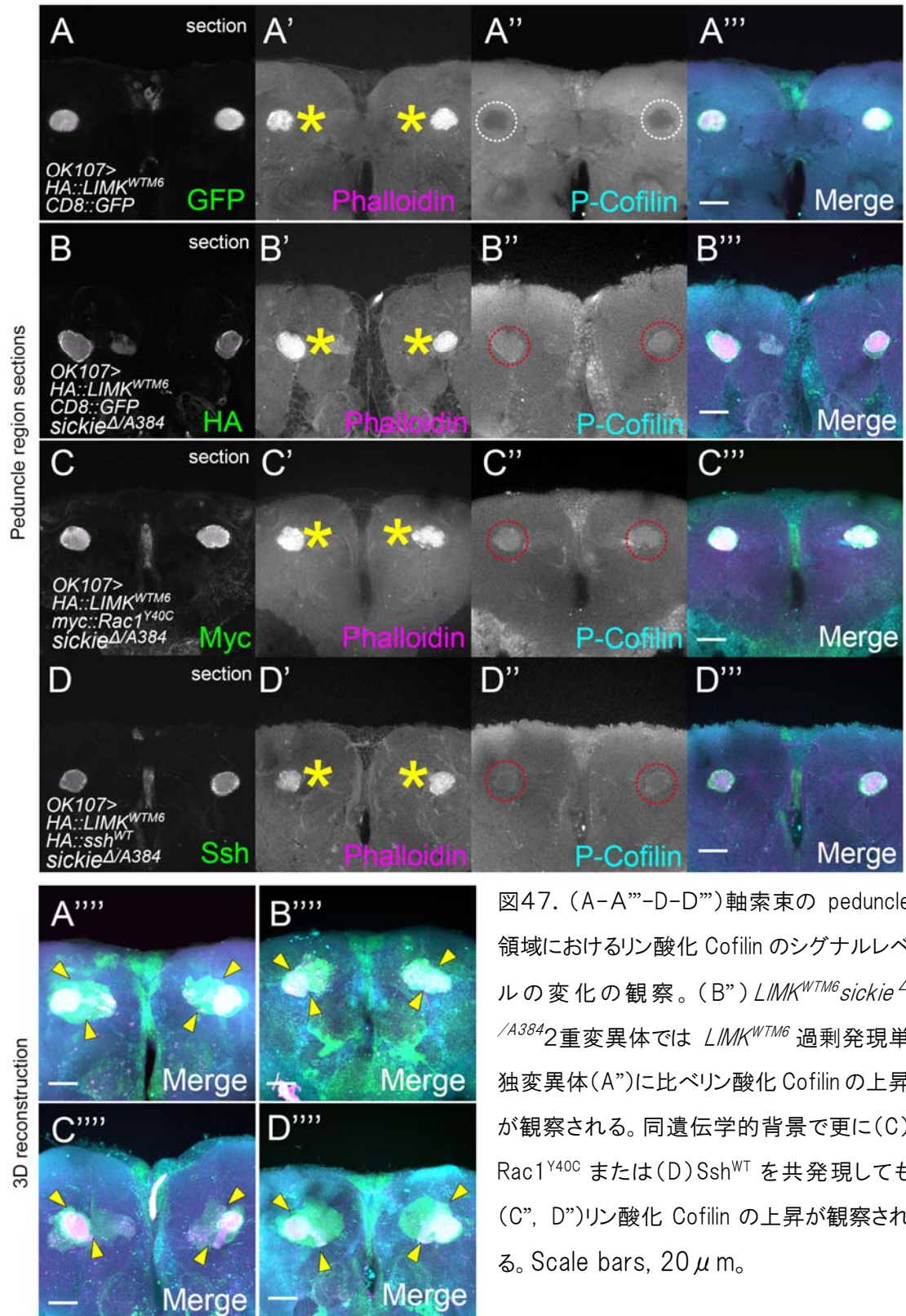


図47. (A-A'''-D-D''')軸索束の peduncle 領域におけるリン酸化 Cofilin のシグナルレベルの変化の観察。(B'') *LIMK^{WTM6}sickie^Δ/A384* 2重変異体では *LIMK^{WTM6}* 過剰発現単独変異体(A'')に比べリン酸化 Cofilin の上昇が観察される。同遺伝学的背景で更に(C) *Rac1^{Y40C}* または(D) *Ssh^{WT}* を共発現しても(C'', D'')リン酸化 Cofilin の上昇が観察される。Scale bars, 20 μ m。

3.9 Sickie の Ssh 依存的な Cofilin を介した F-actin 骨格と軸索伸長の制御

Sickie の Cofilin 依存的な軸索伸長促進作用が、Ssh とは独立の Sickie 固有の能力であるのか、Ssh 依存的なものであるのかどうかを検討するため、MARCM システムの系で、結果 3.7 のときと同様に LIMK 強制発現に対する Sickie の抑制効果を調べる実験を行った。LIMK 強制発現変異体クローン (図 48A-A'') の Sickie の共発現は、軸索伸長異常と F-actin の上昇を緩和することを確認したため (図 48B-B'')、この緩和効果が *ssh¹⁻⁶³* 変異体下で発揮されるかどうかを検証した。

これを検証するために作製した *LIMK^{WTM6}sickie^{WT}ssh¹⁻⁶³* 3 重変異体では、興味深いことに、Posterior arrest に分類される重篤な伸長異常が観察され (図 48C''), F-actin (図 48C') とリン酸化 Cofilin (図 48D'') のシグナルも非常に高いレベルで検出された。これらの表現型は、*LIMK^{WTM6}ssh¹⁻⁶³* 2 重変異体においても観察されることが明らかになり (図 48E'', E', E''), これらの 2 重変異体と 3 重変異体の間では、形態学的表現型、F-actin とリン酸化 Cofilin のシグナルレベルの上昇度に関して明確な差異を検出することは難しかった。以上の結果は、Sickie は Ssh 依存的に LIMK に対して抑制的に作用するという可能性を示唆した。

また、*LIMK^{WTM6}ssh¹⁻⁶³* 2 重変異体においても観察された Posterior arrest 型の軸索伸長異常 (図 48E'', F'') は、Class-I 型または II 型の表現型を示す *ssh¹⁻⁶³* (図 34B'') や *LIMK^{WTM6}* (図 42A) の単独の変異体では観察されず、*cofilin-RNAi* 変異体クローンの表現型 (図 30E) や *Rac sickie cofilin* ヘテロ 3 重変異体 (図 31C-C') と類似であった。これらの結果は、Cofilin の機能が *LIMK^{WTM6}ssh¹⁻⁶³* 2 重変異体、*LIMK^{WTM6}sickie^{WT}ssh¹⁻⁶³* 3 重変異体、*Rac sickie cofilin* ヘテロ 3 重

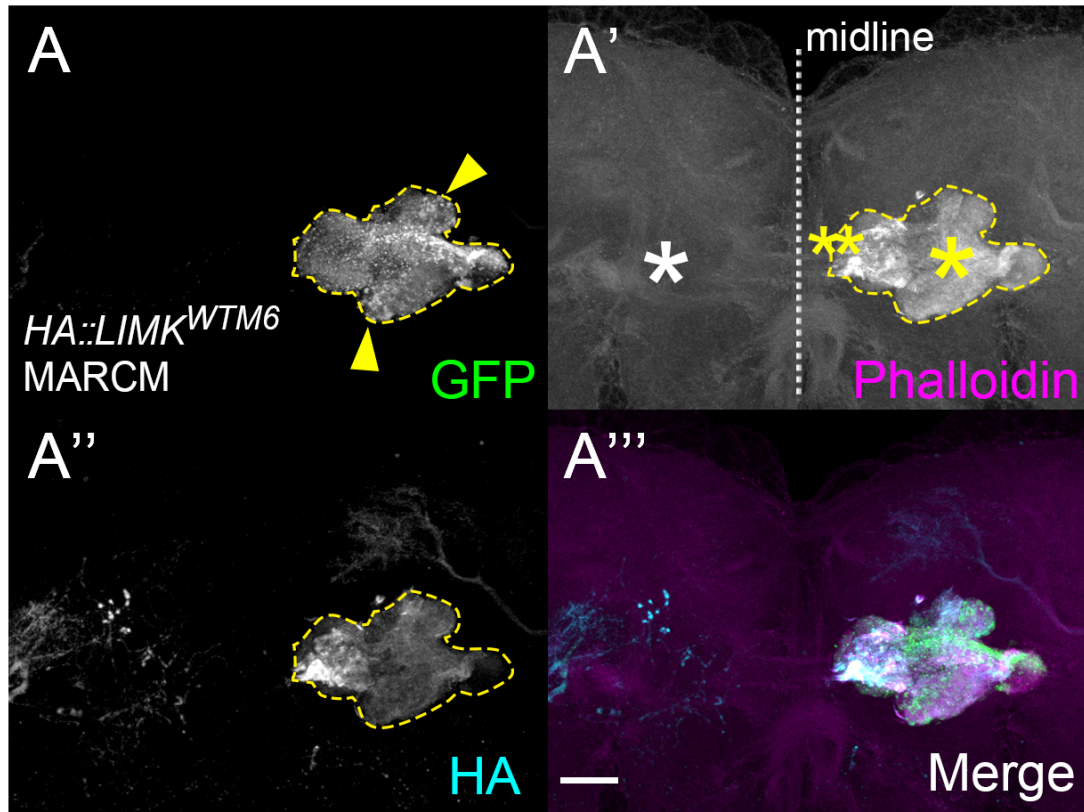


図48. (A-A''')図 42A-A'''と同様に、MARCM の系においても、クローンでの(A'')
OK107-gal4 依存的な $LIMK^{WTM6}$ の発現は、(A)黄矢頭に示す Class-II 型の軸索伸長
 異常を惹き起こし、(A')黄星印に示す F-actin シグナルの上昇を伴う。Scale bar, 20 μ
 m。

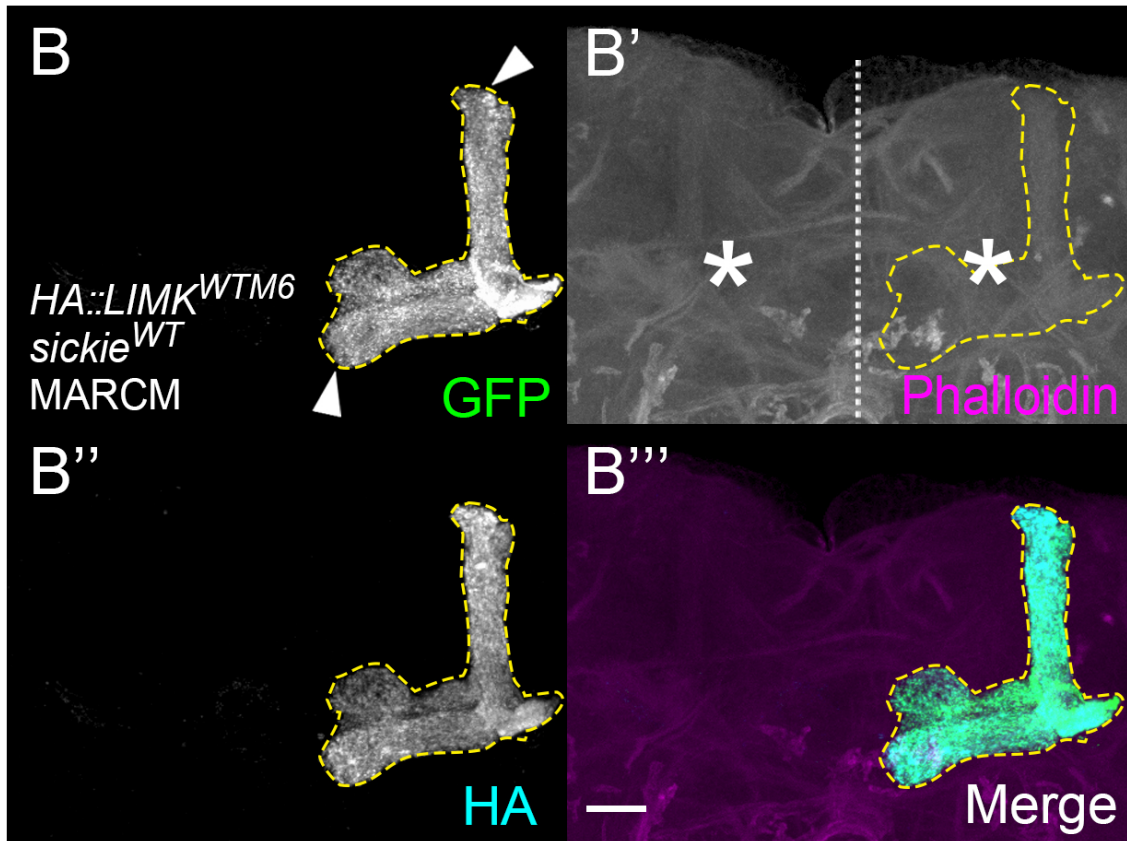


図48. (B-B''')(A-A''')に示される軸索伸長とF-actinレベルの異常は、野生型 Sickie をクローンで共発現させることでレスキューされる。(B)白矢頭で示すように背側、正中線側両方の lobe 形成異常が抑制され、(B')白星印に示すようにF-actinレベルの上昇も緩和する。Scale bar, 20 μ m。

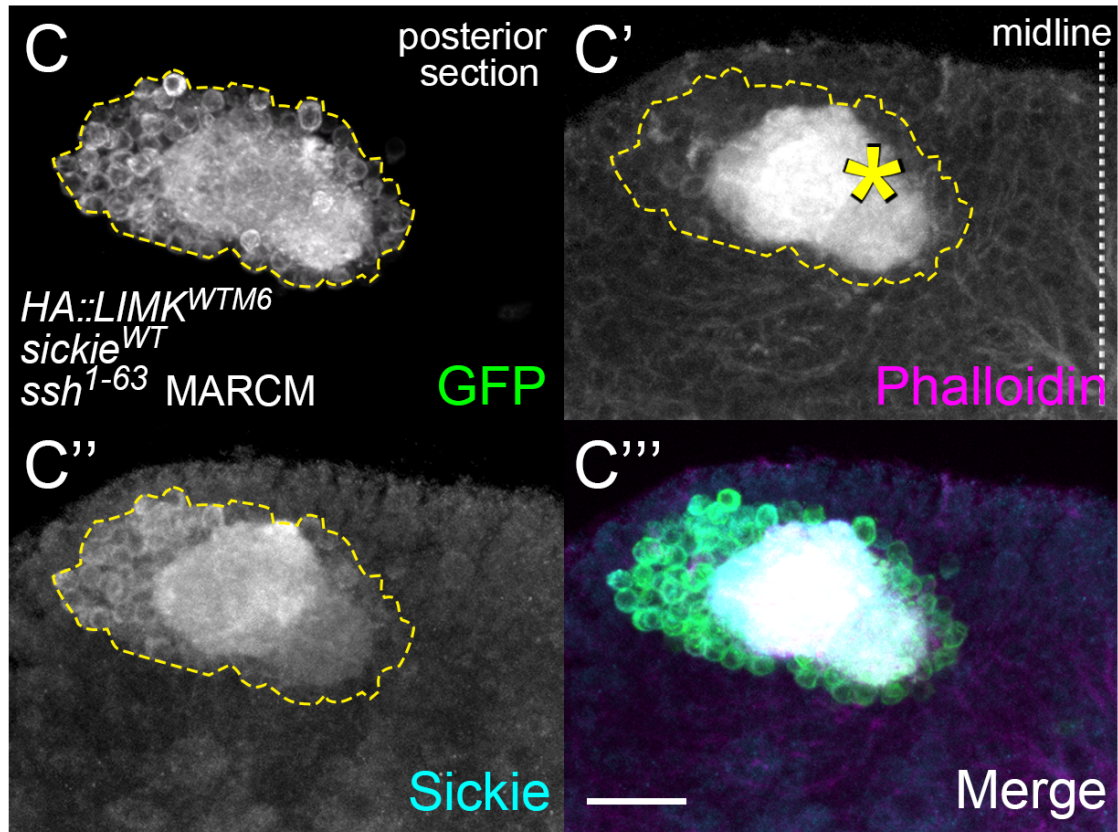


図48. (C-C''') (B-B''')に示す、野生型 *Sickie* の共発現による *LIMK* 強制発現の表現型のレスキュー効果が、*ssh* 変異体下でも発揮されるかどうかを検証した。(C'') *OK107-Gal4* 依存的な *Sickie^{WT}* の発現が観察される *LIMK^{WTM6}sickie^{WT}ssh¹⁻⁶³* 3 重変異体 MARCM クローンは、posterior arrest 型の重篤な軸索伸長異常を示し、(C)細胞体に近接した領域に異所的に形成された(C')軸索相当領域で高いレベルの F-actin シグナルが観察された。Scale bar, 20 μ m。

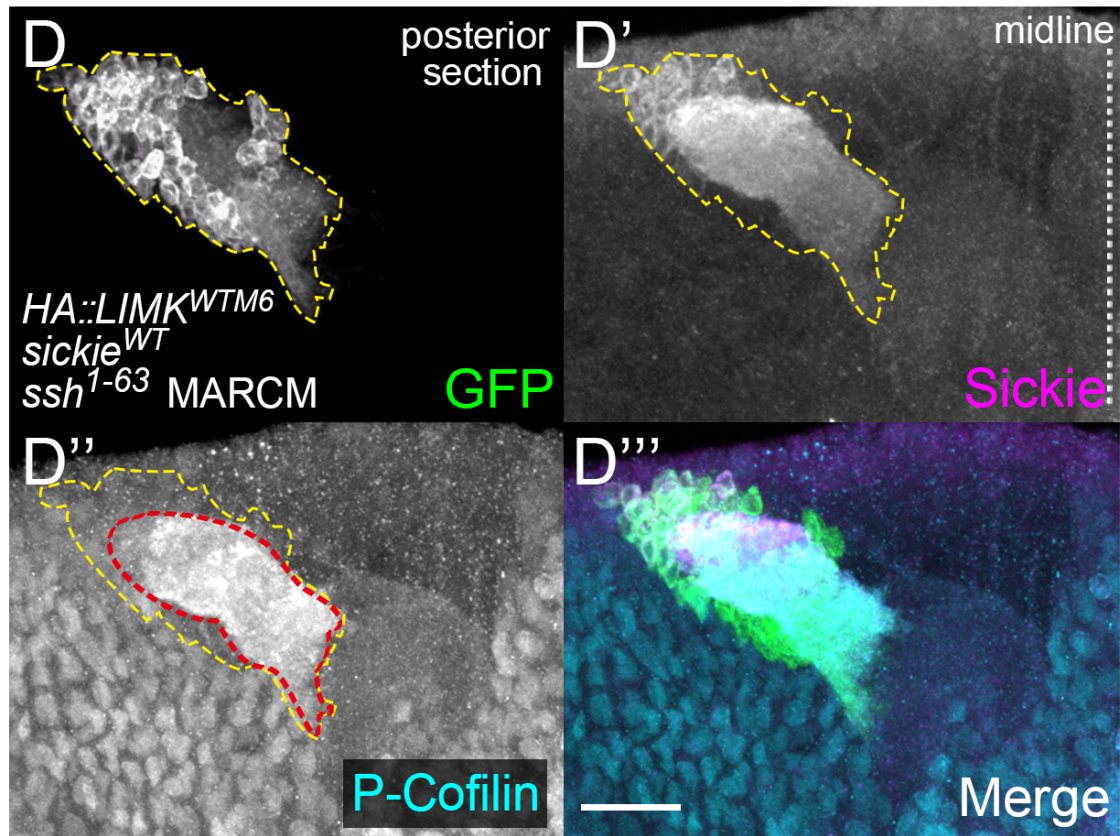


図48. (D-D''') (C-C''')と同様の実験系で、F-actin の代わりにリン酸化 Cofilin のシグナルを観察した。(D')強制発現された Sickie が検出されている Posterior arrest 型の軸索相当領域に、(D'')赤点線に示すように高いレベルのリン酸化 Cofilin のシグナルが観察された。Scale bar, 20 μ m。

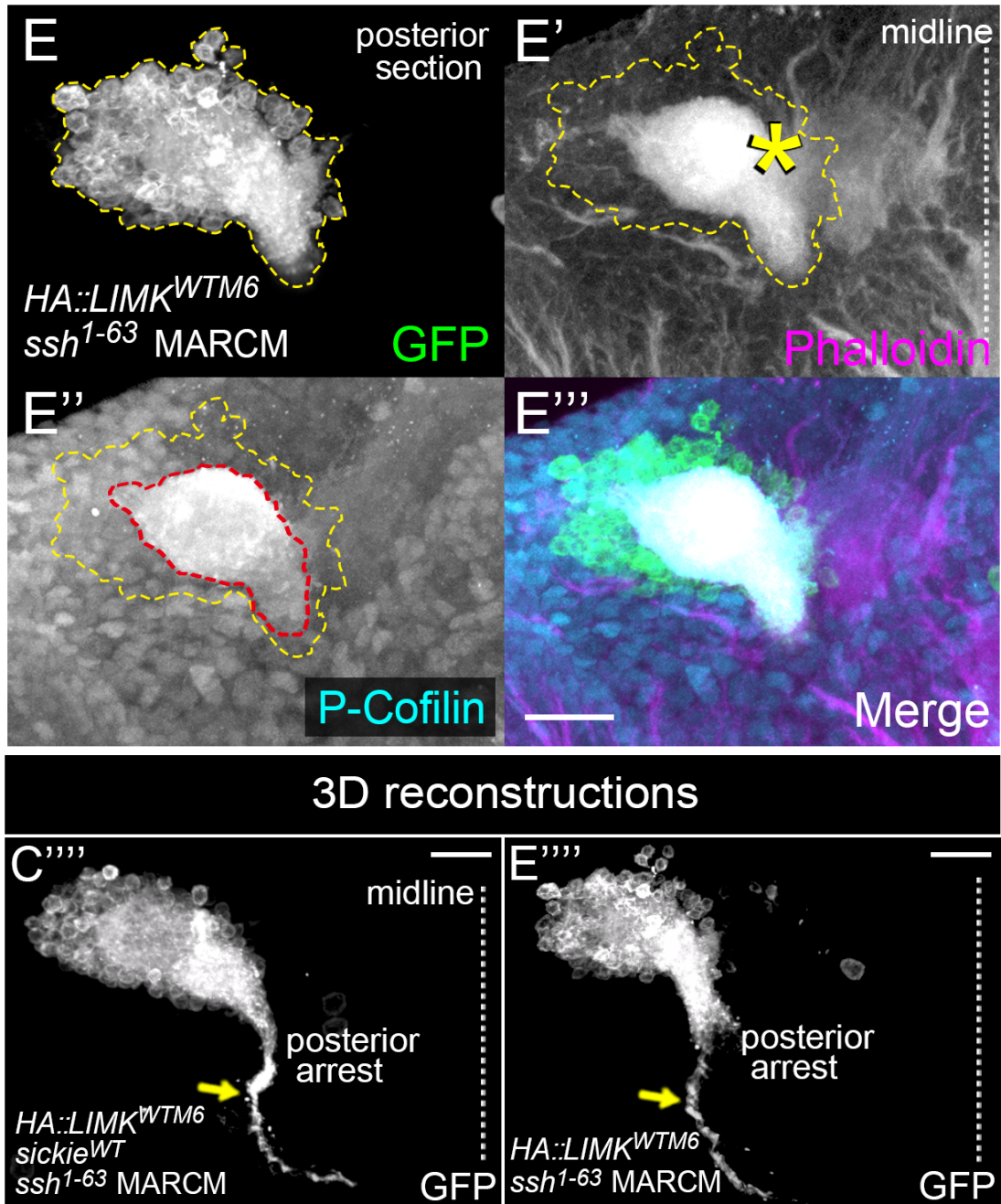


図48. (E-E''') *LIMK*^{WTM6} *ssh*¹⁻⁶³ 2 重変異体 MARCM クローンは、(C,D) *LIMK*^{WTM6} *sickie*^{WT} *ssh*¹⁻⁶³ 3 重変異体クローンと同様に、(E') 黄星印に示す F-actin レベルと (E'') 赤点線枠に示すリン酸化 Cofilin レベルの高い上昇を示した。

(C''', E''') *LIMK*^{WTM6} *sickie*^{WT} *ssh*¹⁻⁶³ クローン、*LIMK*^{WTM6} *ssh*¹⁻⁶³ クローンを 3 次元立体構築した図。何れも Posterior arrest 型の軸索伸長異常を示し、黄矢印に示す著しく細い軸索束を peduncle 相当領域に形成し、lobe 領域まで伸長しない。Scale bars, 20 μm。

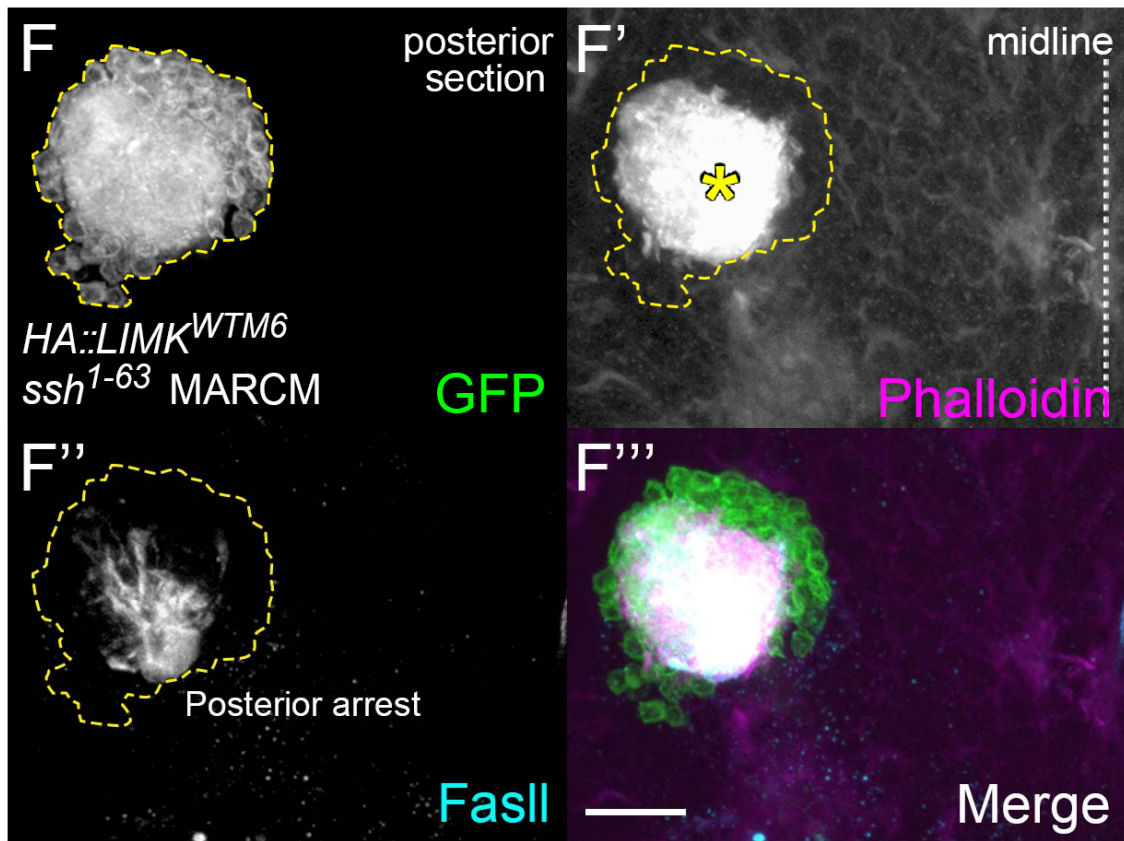


図48. (F-F''') *LIMK^{WTM6} ssh¹⁻⁶³* 2重変異体クローンが、Posterior arrest型の軸索伸長異常を α/β 神経で起こしていることを、(F'') FasII抗体による染色によって確認した。Scale bar, 20 μ m。

変異体において著しく低下していることを示唆していると考えられる。

次に、内在性レベルでの *sickie*、*ssh* の遺伝学的な上下関係を推定するための実験を行った。 *sickie^A* と *ssh¹⁻⁶³* の2重変異体MARCMクローンを誘導するため、40A が載る染色体のアームと 82Bがのるアームの両方に *Gal80*をもつ親系統を作製し、 *sickie^Assh¹⁻⁶³* ヘテロ2重変異体と掛け合わせクローンを誘導した。 *sickie^A* がのるアームと *ssh¹⁻⁶³* がのるアームの両方で乗換えが起こったときに初めてGal80による抑制が完全に解かれ、2重変異体クローンがラベルされるため、通常のクローンに比べ出現頻度が稀であった。観察された *sickie^Assh¹⁻⁶³* 機能欠失2重変異体クローンでは、 *LIMK^{WTM6}ssh¹⁻⁶³* 2重変異体クローンに見られるようなF-actinやリン酸化Cofilinのシグナルの激しい上昇は観察されなかった（図49A'、A"）。なお、本2重変異体クローンにおいても、Total-Cofilinの発現レベルに明らかな変化は検出されないことを確認した（図49B-B'）。また、形態的にはClass-II型に分類される表現型の頻度がわずかに増加している印象を受けたが、 *LIMK^{WTM6}ssh¹⁻⁶³* 2重変異体や、 *Rac sickie cofilin* ヘテロ3重変異体、 *cofilin-RNAi*変異体で観察されるようなPosterior arrest型の重篤な伸長阻害異常は観察されなかった（図49C'）。さらに、 *sickie^A* を過剰発現の変異に置き換えた *sickie^{WT}*過剰発現 *ssh¹⁻⁶³* 2重変異体を作製した。本変異体では、軸索伸長異常の明らかな緩和効果は観察されず（図50A,B）、Sickieの発現が確認されているクローンの変異体軸索で（図50A',B'）、リン酸化Cofilin（図50A''）とF-actin（図50B'）のシグナルの上昇が観察された。以上の結果は、Cofilin依存的なF-actinの制御を介した軸索伸長制御において、SickieがSsh依存的に機能している仮説を支持するものである。

また、Pak非依存的Racの機能がSshを介しているかどうかを検討するため、 *ssh¹⁻⁶³* 機能欠失変異体下で *Rac1^{Y40C}* を過剰発現する個体を作製し、クローンの

表現型を解析した（図51A,B）。*Rac1^{Y40C}* 過剰発現*ssh¹⁻⁶³* 2重変異体クローンでは、Class-II型よりClass-I型の形態学的表現型の出現頻度が若干増加している印象を受けたが、*Rac1^{Y40C}*の発現が確認されている変異体軸索において（図51A'、B''）、*ssh¹⁻⁶³* 変異体同様のリン酸化Cofilin（図51A''）とF-actin（図51B'）のシグナルの上昇が観察された。この結果は、Cofilin依存的なF-actinの制御を介した軸索伸長制御において、Pak非依存的RacがSsh依存的に機能することを示唆した。また、仮にClass-II型の出現頻度の低下とI型の頻度の上昇と、総和としてのlobe形成異常の浸透率が、*ssh* 単独の変異体に比して有意に低下しているならば、*Rac1^{Y40C}*の下流には、Sickie-Ssh-Cofilin経路とは並列に軸索伸長を正に制御する経路がさらに存在すると考えられた。

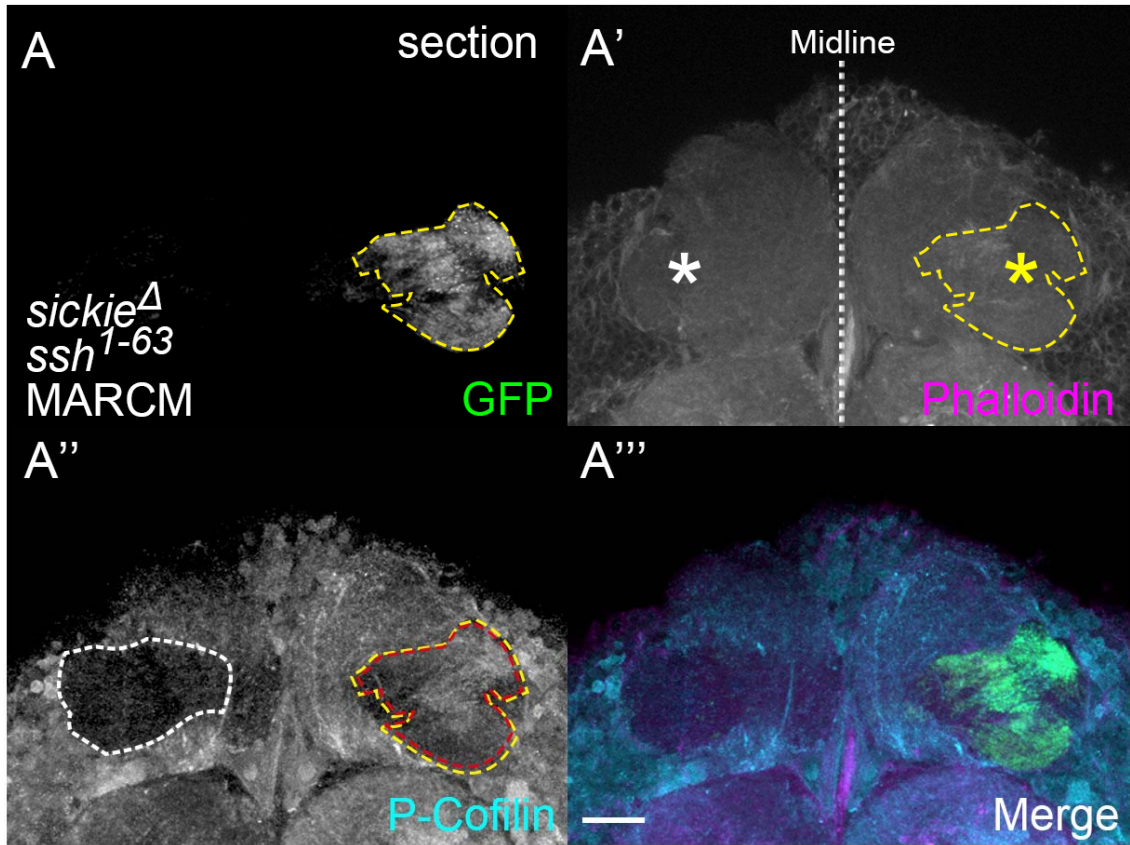


図49. (A-A''') *sickie*^Δ *ssh*¹⁻⁶³機能欠失2重変異体クローン。 *LIMK*^{WTM6}過剰発現 *ssh*¹⁻⁶³ 2重変異体クローンで見られたようなF-actinやリン酸化Cofilinのシグナルの激しい上昇は観察されない(図A',A''')。 Scale bar, 20 μ m。

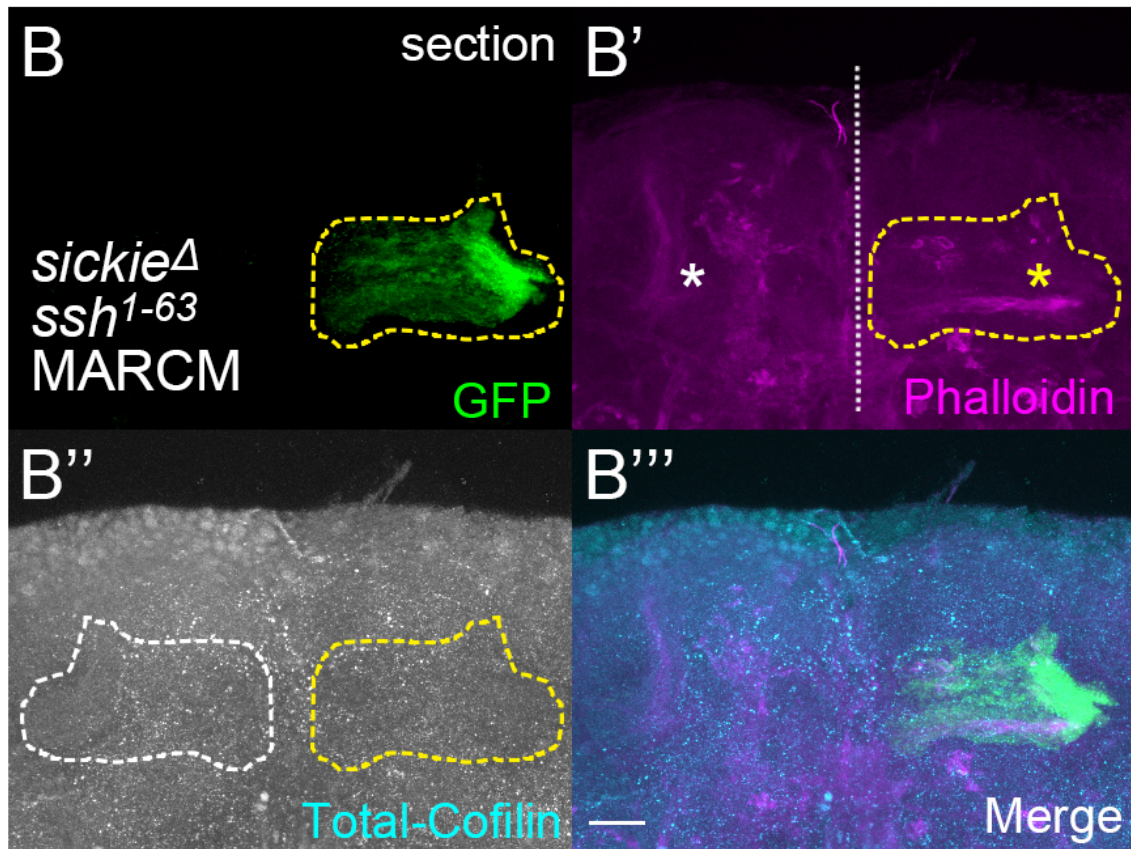


図49. (B-B''') *sickie* Δ *ssh*¹⁻⁶³機能欠失2重変異体クローン。(図B') *LIMK*^{WTM6} *ssh*¹⁻⁶³2重変異体クローンで観察されたようなF-actinの激しい上昇は観察されない。(B'')白点線で示すコントロールの軸索束領域と比較した際、黄点線で示す変異体軸索束におけるTotal-Cofilinの発現レベルに明らかな変化は検出されない。Scale bar, 20 μ m。

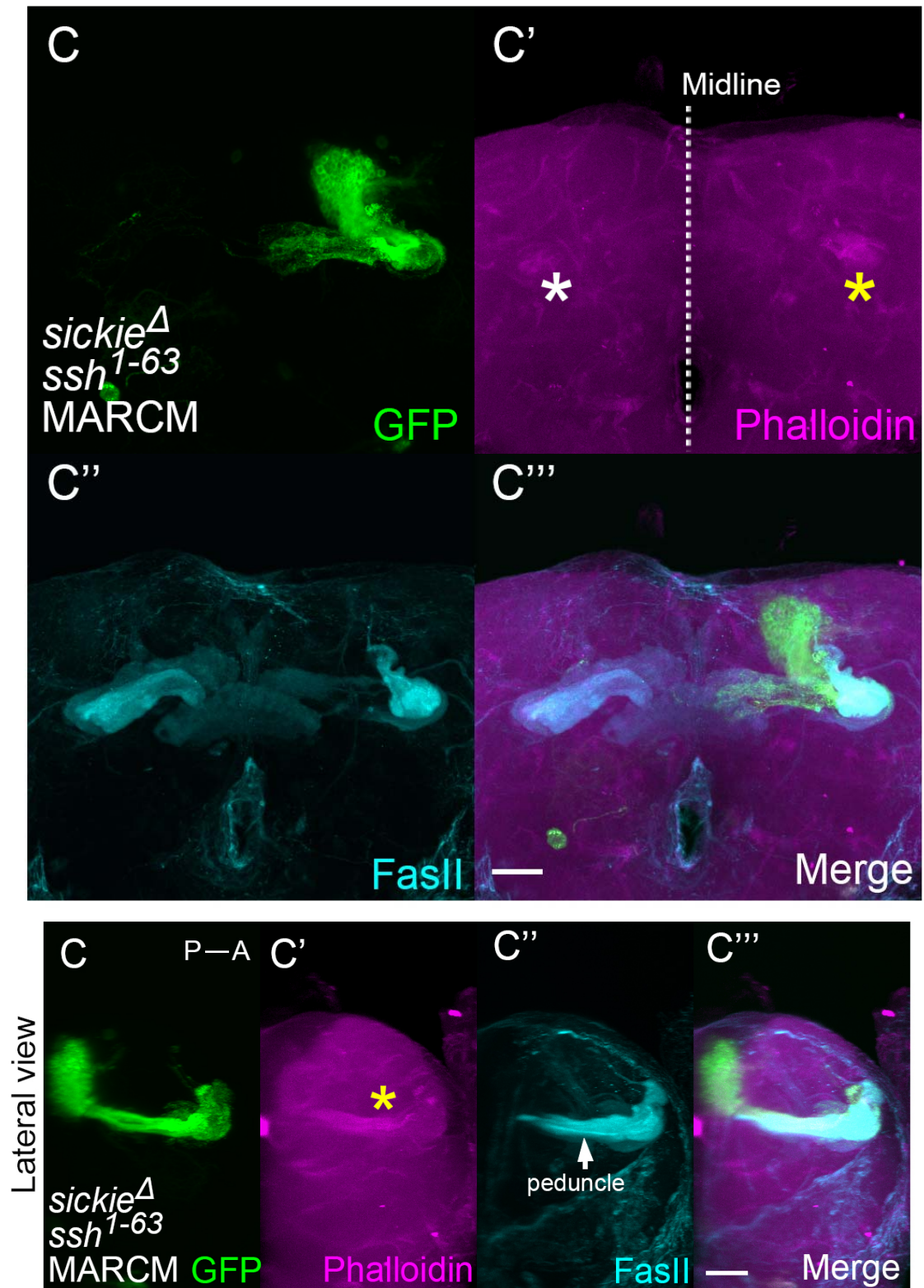


図49. (C-C''') *sickie* Δ *ssh*¹⁻⁶³機能欠失2重変異体クローン。(図C'') Class-II型に分類される表現型が観察されたが、(C'') Peduncleは形成され、Posterior arrest型の重篤な伸長阻害異常は観察されなかった。Scale bars, 20 μ m.

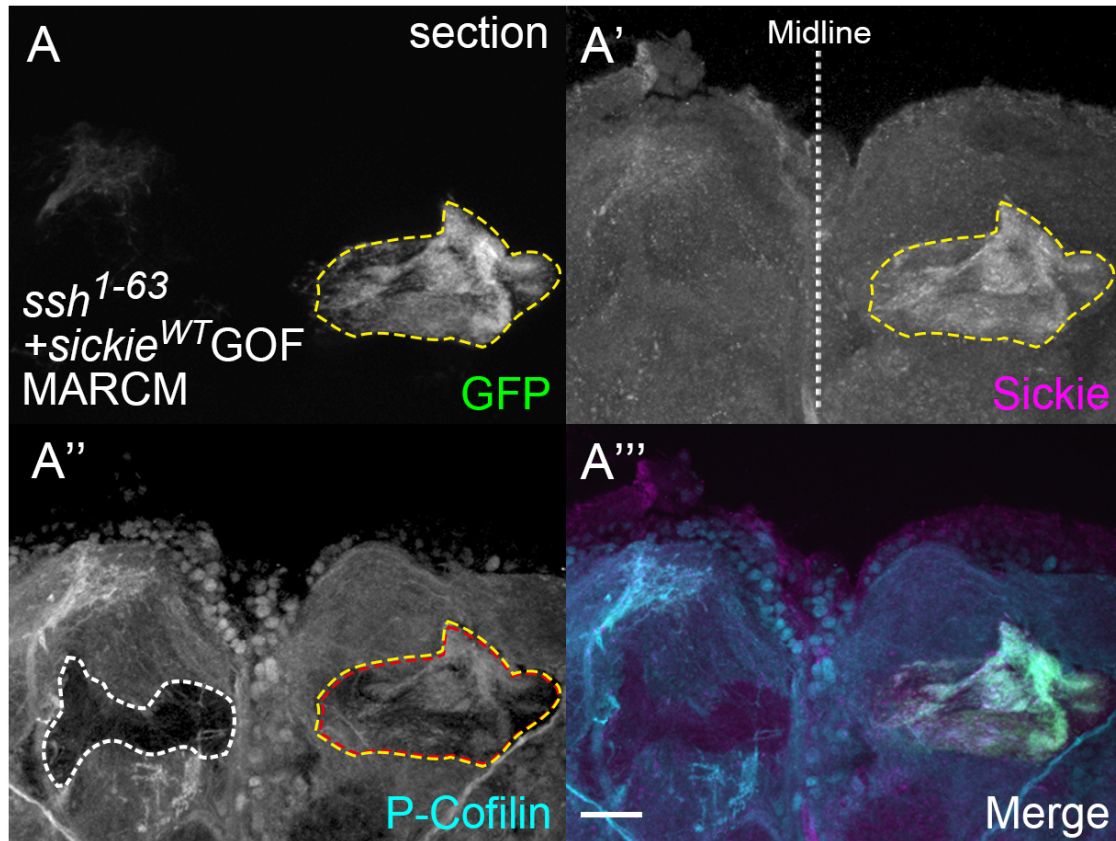


図50. (A-A''') *sickie*^{WT}過剰発現 *ssh*¹⁻⁶³ 2重変異体クローン。軸索伸長異常の明らかな緩和効果は観察されず(A)、Sickieの発現が確認されているクローンの変異体軸索で(A')、*ssh*¹⁻⁶³変異体クローンと同様のリン酸化Cofilinシグナルの上昇が観察される(A'')。Scale bar, 20 μ m。

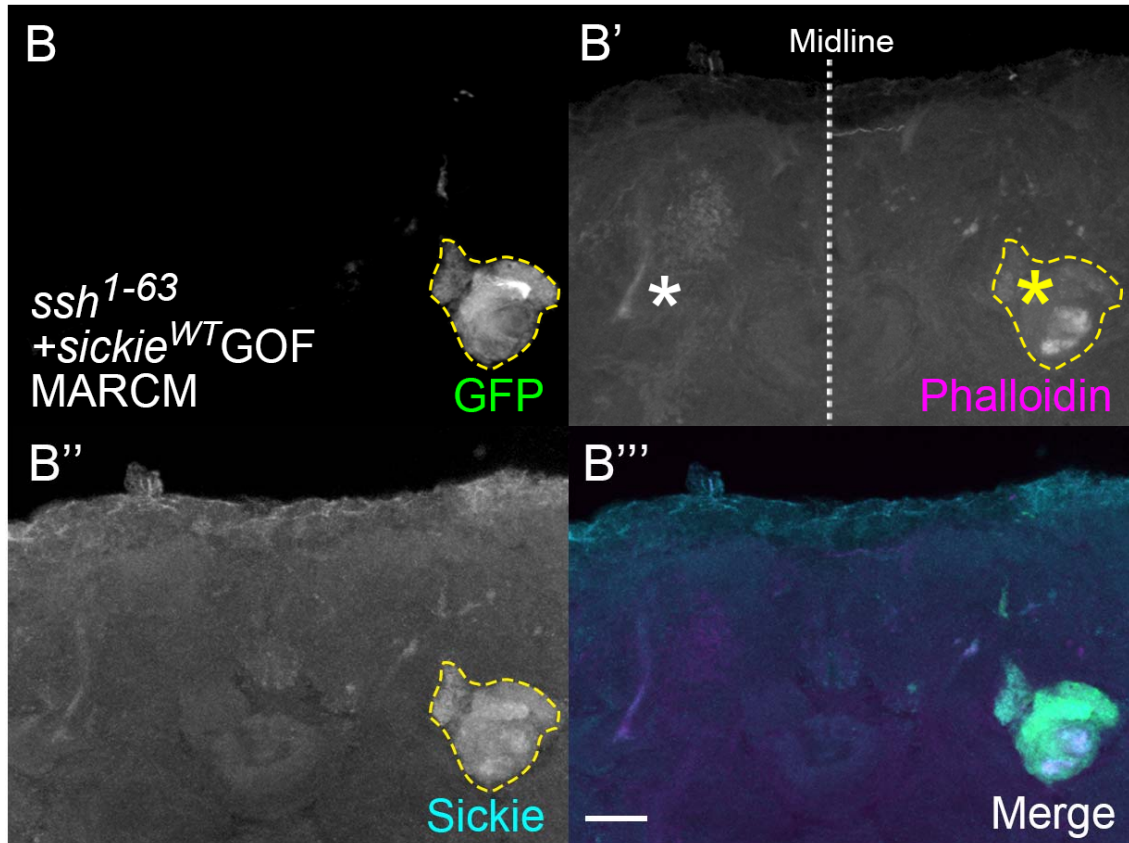


図50. (B-B''') *sickie^{WT}* 過剰発現 *ssh¹⁻⁶³* 2重変異体クローン。Class-II型の伸長異常が観察され(B)、Sickieの発現が確認されているクローンの変異体軸索で(B'')、*ssh¹⁻⁶³* 変異体クローンと同様のF-actinシグナルの上昇が観察される(B')。Scale bar, 20 μ m。

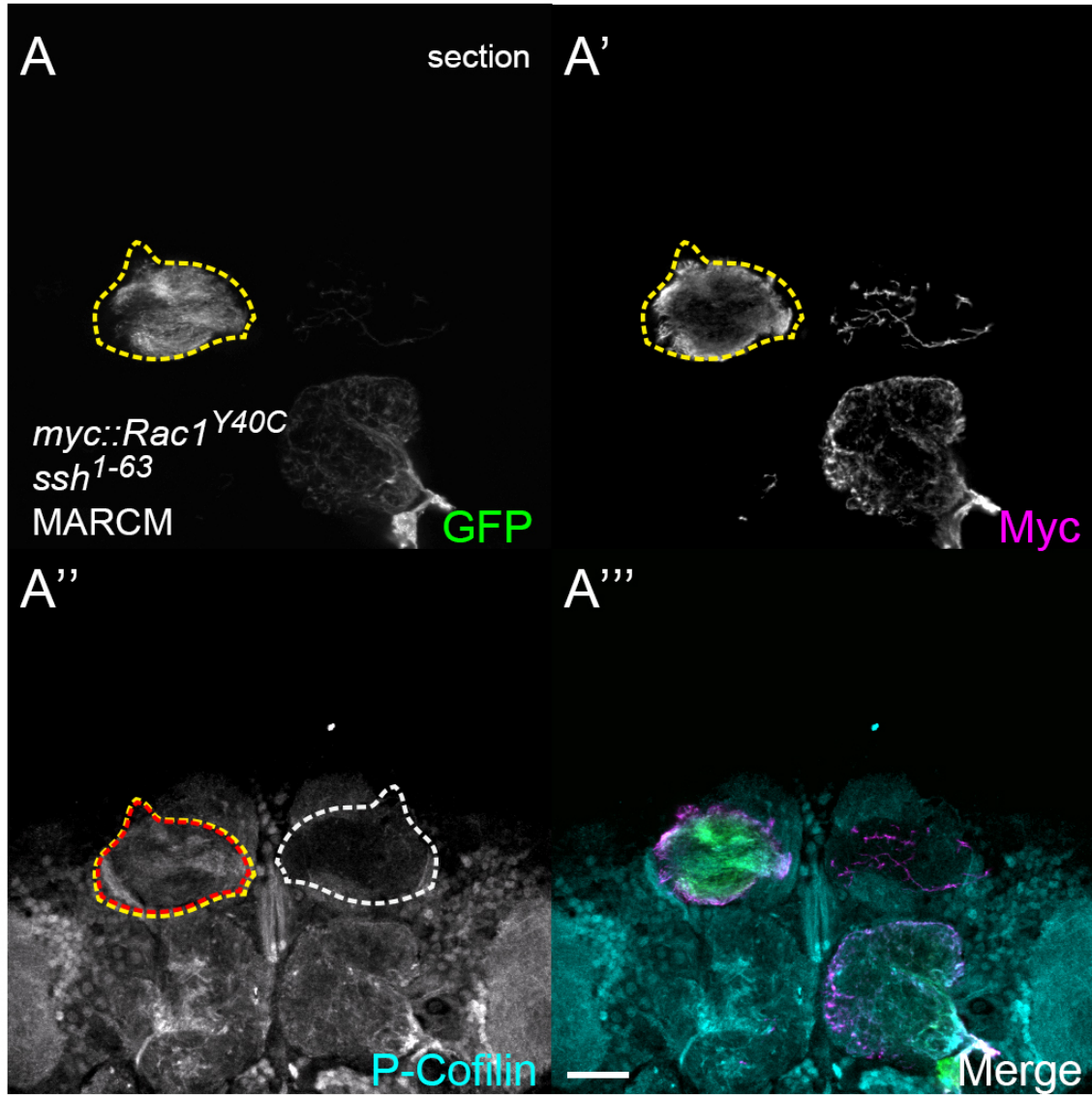


図51. (A-A''') *Rac1^{Y40C}* 過剰発現 *ssh¹⁻⁶³* 2重変異体クローン。 *Rac1^{Y40C}* の発現が確認されている変異体軸索において (A')、 *ssh¹⁻⁶³* 変異体同様のリン酸化Cofilin (A'') のシグナルの上昇が観察された。 Scale bar, 20 μ m。

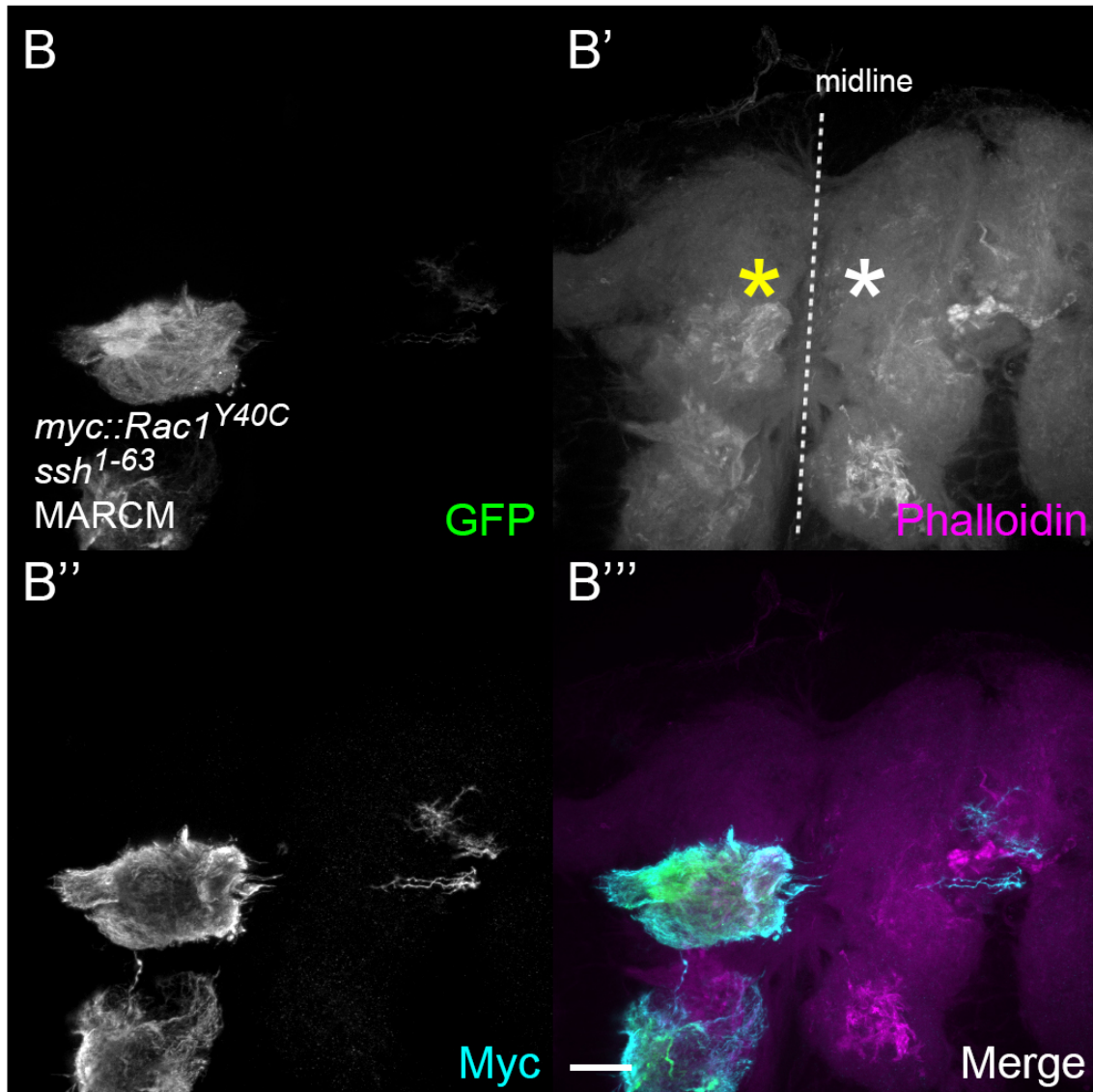


図51. (B-B''') *Rac1^{Y40C}* 過剰発現 *ssh¹⁻⁶³* 2重変異体クローン。Class-I型の形態学的表現型が観察され(B)、*Rac1^{Y40C}*の発現が確認されている変異体軸索において(B'')、*ssh¹⁻⁶³*変異体同様のF-actinのシグナルの上昇が観察された(B')。Scale bar, 20 μ m。

3.10 Sickie と微小管制御因子との相互作用

Sickie のホモログである NAV は当初、微小管結合タンパクとして単離されてきており (Maes et al., 2002; Martinez-Lopez et al., 2005; van Haren et al., 2009)、Sickie、NAV とともに微小管+端に集積する EB1 との SxIP 結合モチーフが保存されている (図 15)。本研究では Sickie の actin 骨格制御への関わりに焦点を当ててきたが、微小管制御因子との相互作用も検証した。

29°Cにおいて Dicer2 を共発現させた育成条件下では、*EB1* の RNA 干渉誘導個体において *sickie* 変異体の Class-I 型に類似の軸索束の形成異常が観察された (図 52A-A')。同様に 29°C、Dicer2 共発現の育成条件下では、*β-tubulin* の RNA 干渉誘導個体において *sickie* 変異体の Class-II 型の表現型に類似の軸索束の形成異常が観察された (図 53A-A')。25°Cにおいて Dicer2 の共発現なしで *EB1* や *β-tubulin* の単独の RNA 干渉を誘導した場合では、Class-I 型の軸索束形成異常個体が観察されるのみだったが、*sickie-RNAi* を共誘導すると、Class-I 型の比率が増加し、Class-II 型の表現型も観察されるようになり、軸索伸長異常の表現型の浸透率の有意な増加が確認された (図 52B, 53B)。また *OK107-gal4* 依存的に Sickie と GFP 融合型 EB1 を強制発現したところ、各々を単独で発現させた場合に比べ共発現させた場合では、lobe 末端領域における Sickie と EB1 のシグナルが上昇する様子が観察された (図 54C,C', 黄矢印')。加えて、正中線側に形成される lobe が過剰伸長し融合する表現型や、背側 lobe 末端では数本の軸索が lobe から飛び出している様子が観察された (図 54C'', 黄矢頭)。これらの結果は、Sickie は軸索束伸長において EB1 や *β-tubulin* と遺伝学的に相互作用することを示している。また、過剰発現の影響を細胞体近傍の領域で観察した。各々を単独で発現させた場合に比べ、共発現させた場合では、calyx に近接し

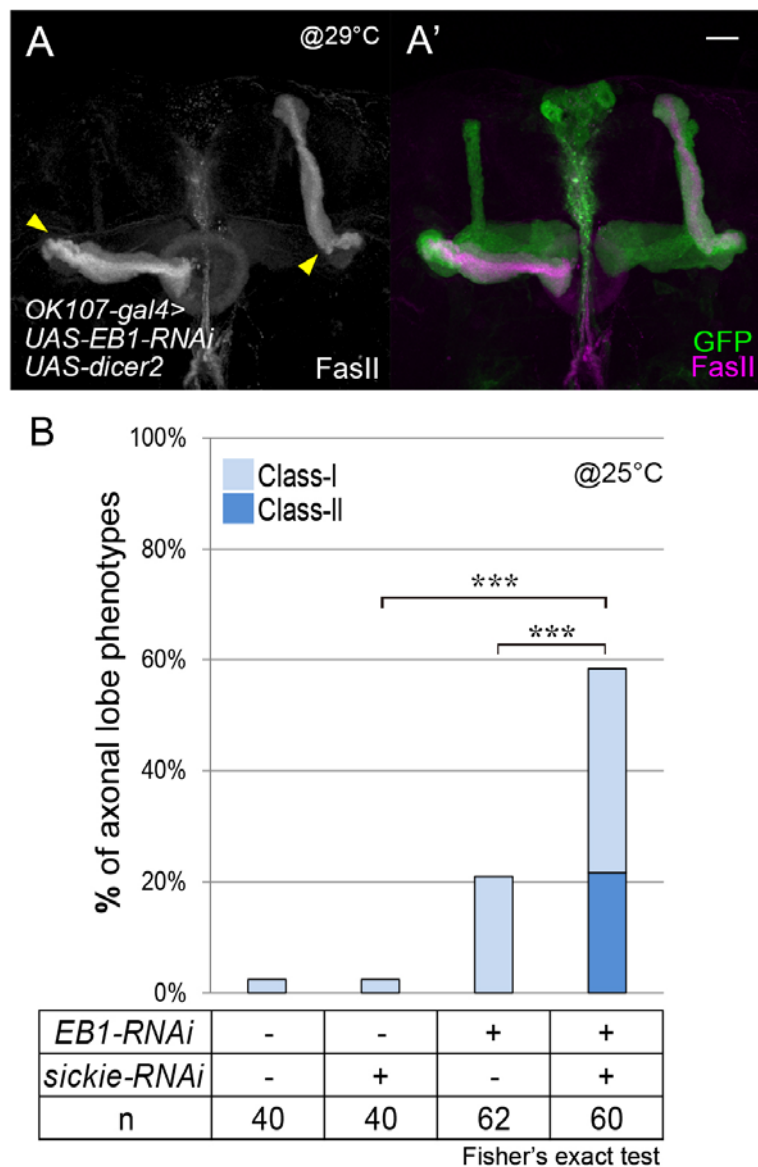


図 52. (A-A') 29°C、Dicer2 を共発現させた育成条件下では、*EB1-RNAi* 変異体において *sickie* 変異体の Class-I 型に類似の軸索束の形成異常が観察された。

(B) 表現型の比率の比較を行った。Dicer2 は共発現させず、25°C、EB1 単独の RNA 干渉誘導群では、約 20% の比率で Class-I 型の軸索束形成異常個体が観察されたが、*sickie* の RNA 干渉を同時に誘導すると (グラフ右端)、約 20% の個体で Class-II 型の表現型が観察されるようになり、Class-I 型の比率も増加した。この 2 重 RNA 干渉誘導群では、*sickie* 単独あるいは *EB1* 単独の RNA 干渉誘導群に比べ、表現型異常の比率の有意な増加が観察された。*sickie/sickie EB1-RNAi*: *** $p = 1.54 \times 10^{-9}$, *EB1/sickie EB1-RNAi*: *** $p = 3.63 \times 10^{-5}$ 。Scale bar, 20 μ m。

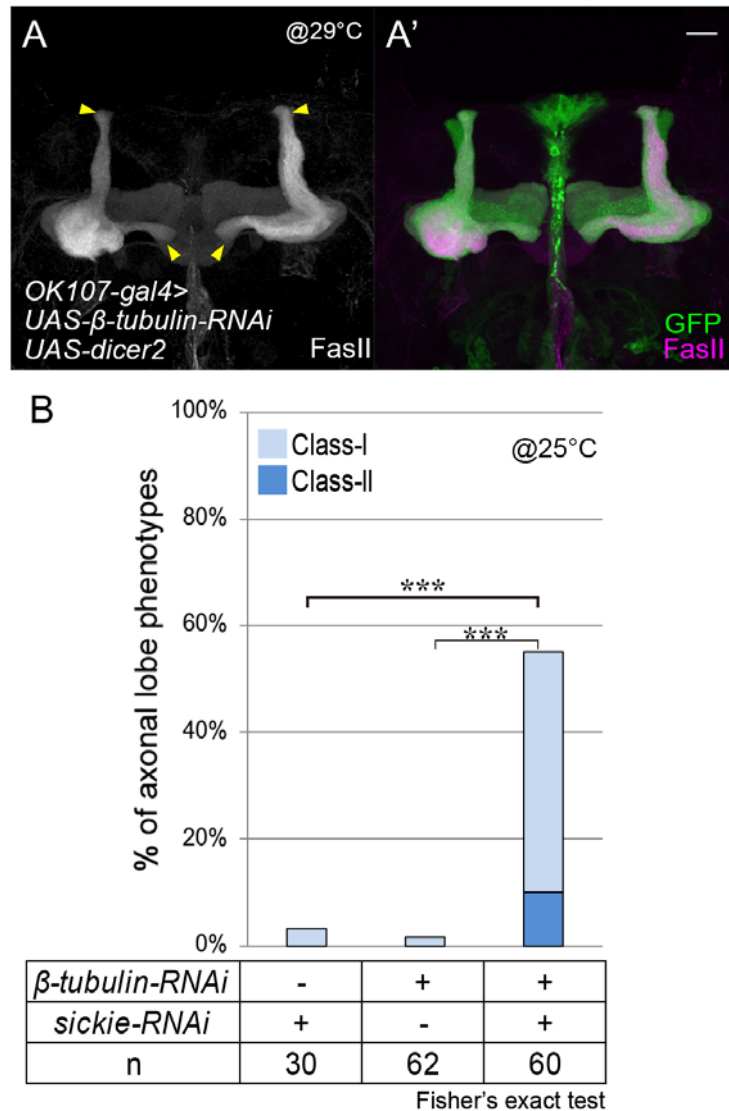


図 53. (A-A') 29°C、Dicer2 を共発現させた育成条件下では、いくつかの β -tubulin-RNAi 変異体において sickie 変異体の Class-II 型の表現型に類似の軸索束の形成異常が観察された。(B) 表現型の比率の比較を行った。Dicer2 は共発現させず、25°C、 β -tubulin 単独の RNA 干渉誘導群では、Class-I 型の軸索束形成異常個体が低頻度で観察されるのみだったが、sickie の RNA 干渉を同時に誘導すると(グラフ右端)、約 10% の個体で Class-II 型の表現型が観察されるようになり、Class-I 型の比率が約 40% 増加した。この 2 重 RNA 干渉誘導群では、sickie 単独あるいは β -tubulin 単独の RNA 干渉誘導群に比べ、表現型異常の比率の有意な増加が観察された。
 $sickie$ -RNAi/ $sickie$ β -tubulin-RNAi: *** $p=4.88 \times 10^{-7}$,
 β -tubulin-RNAi/ $sickie$ β -tubulin-RNAi: *** $p=3.25 \times 10^{-12}$ 。Scale bar, 20 μ m。

peduncle を形成する以前の、前方領域に向けて投射する 4 つのクラスターとして観察される軸索束領域において、Sickie と EB1 の顕著なシグナルが観察された (図 54F,F'、黄矢印)。また、GFP 融合型 α -Tubulin と Sickie を共発現させ Phalloidin を用いて 3 重染色した結果、細胞体領域においてシグナルが重なって観察された (図 55)。

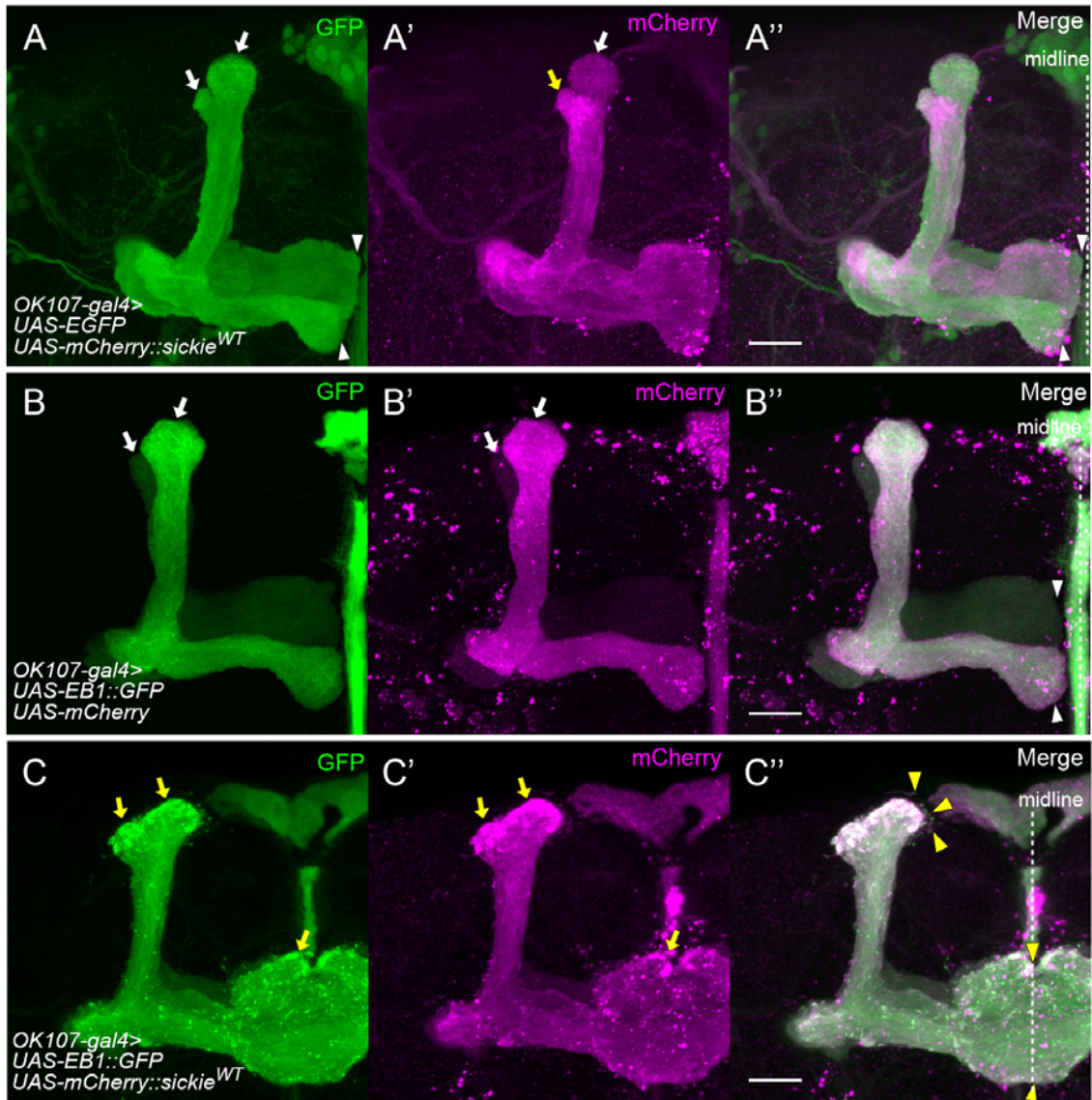


図 54. (A-C) *OK107-gal4* 依存的な Sickie、GFP 融合型 EB1 の強制発現の影響。各々を単独で発現させた場合に比べ、Sickie と EB1 を共発現させた場合では lobe 末端領域における Sickie と EB1 のシグナルが上昇する様子が観察された(図 C, C', 黄矢印)。正中線側に形成される lobe が過剰伸長し融合する表現型や、背側 lobe 末端では数本の軸索が lobe から飛び出している様子が観察された(図 C'', 黄矢頭)。Scale bars, 20 μ m。

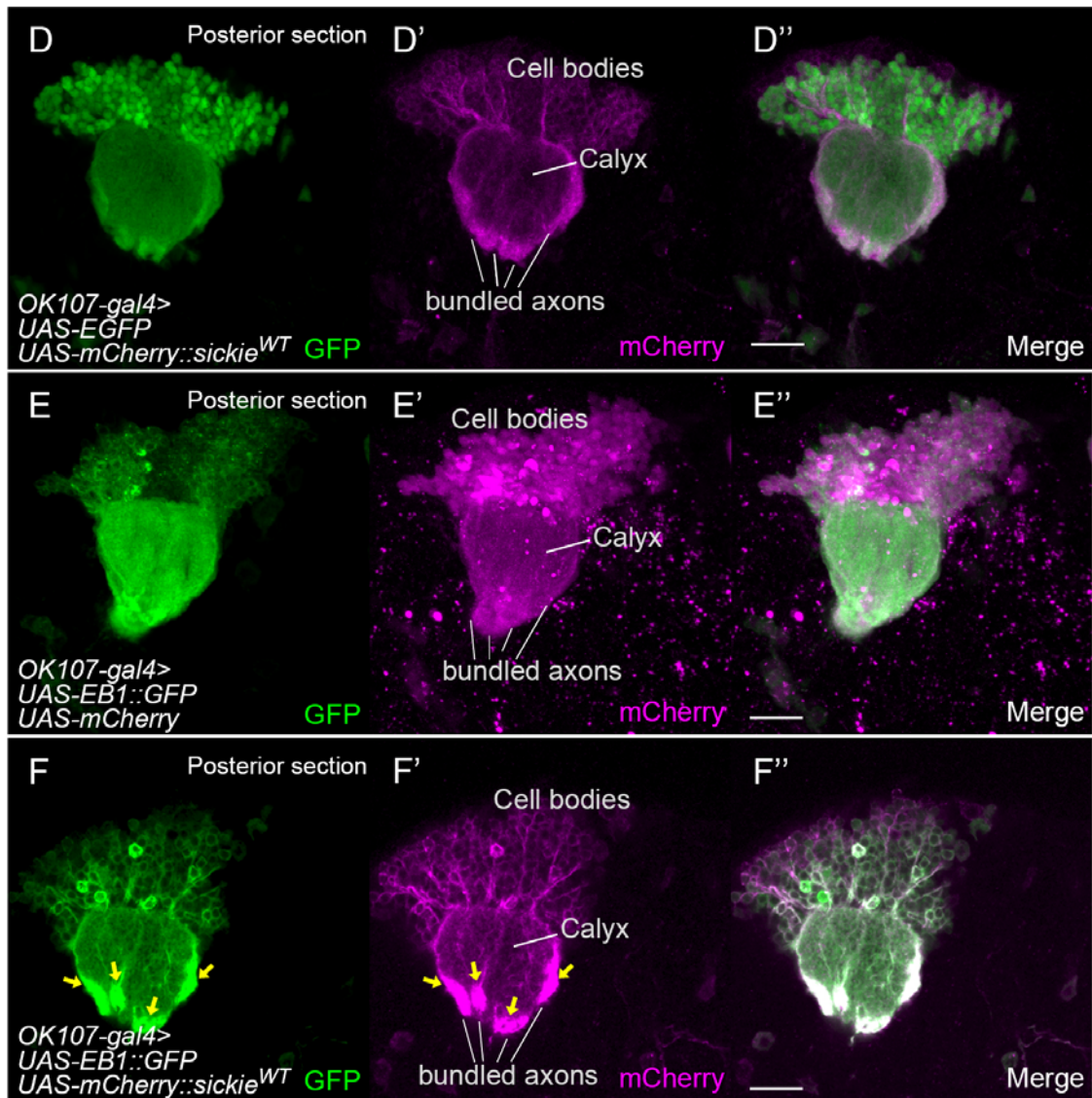


図 54. (D-F) *OK107-gal4* 依存的な Sickie、GFP 融合型 EB1 の強制発現の影響を細胞体近傍の領域で観察した。各々を単独で発現させた場合に比べ、Sickie と EB1 を共発現させた場合では、calyx に近接し、前方領域に向けて投射し peduncle を形成する前の、4 つのクラスターとして観察される軸索束において、Sickie と EB1 の顕著なシグナルが観察された(図 F, F', 黄矢印)。Scale bars, 20 μ m。

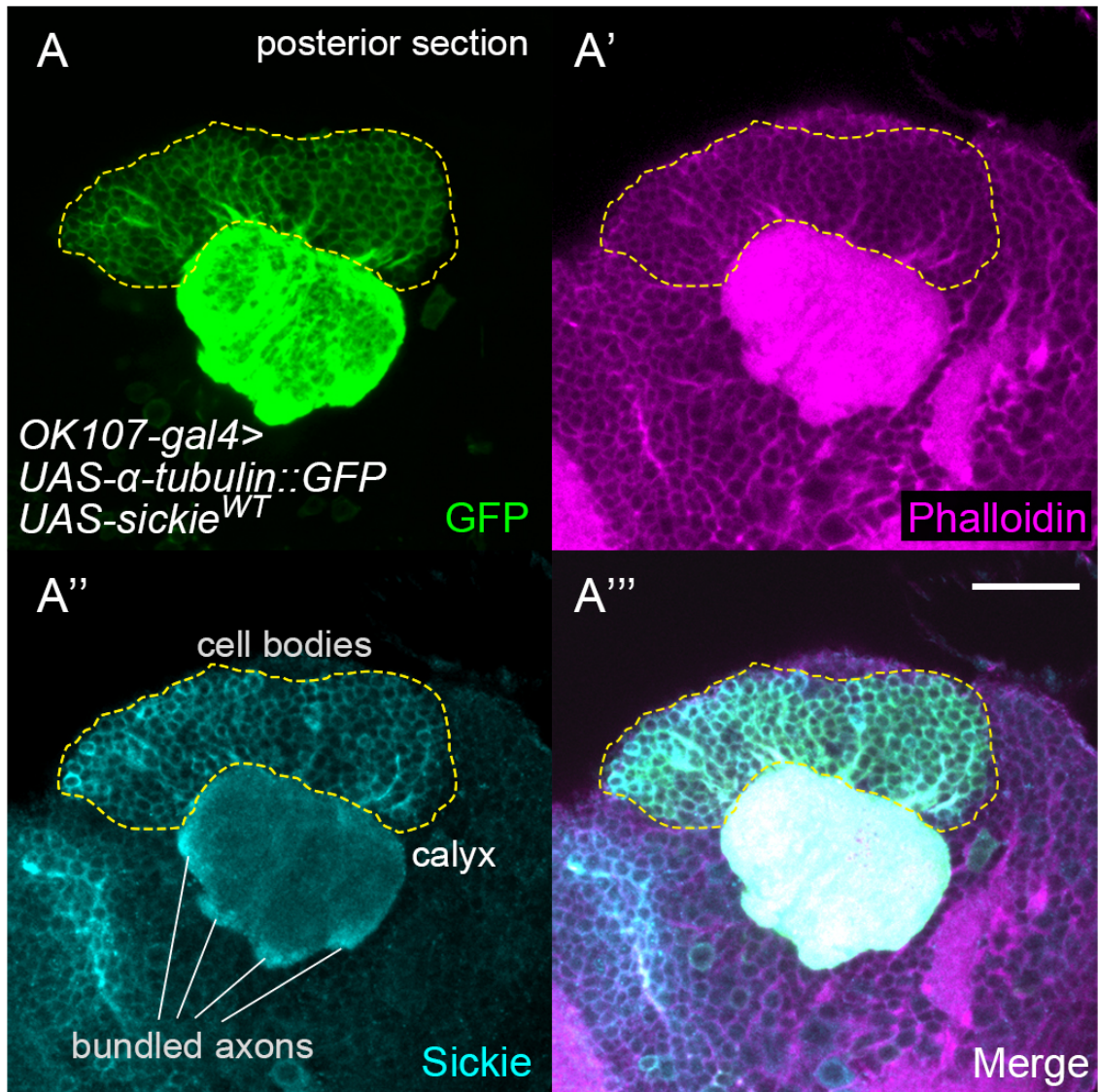


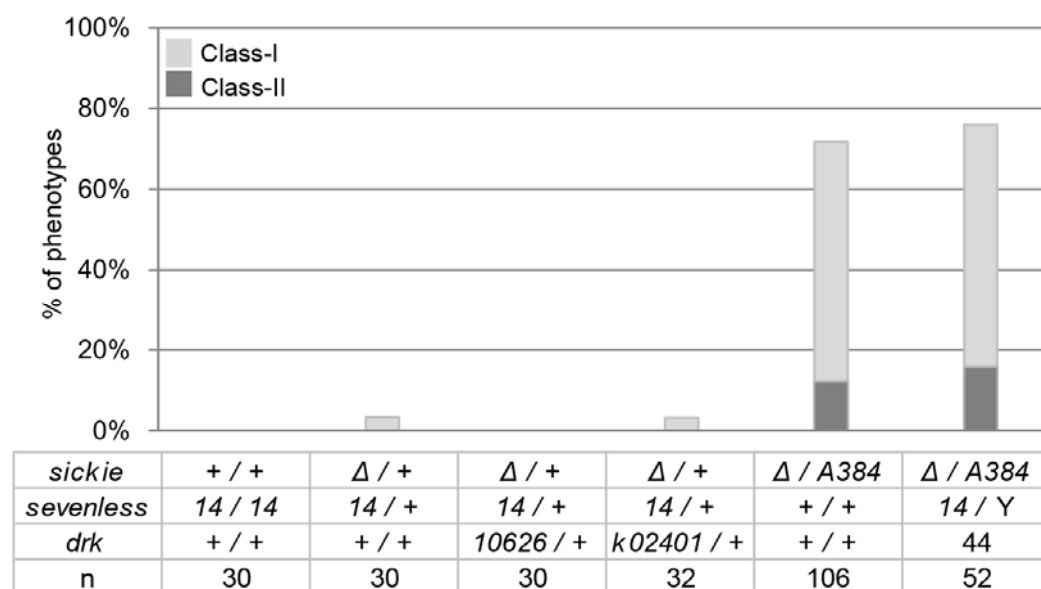
図 55. *OK107-gal4* 依存的な Sickie、GFP 融合型 α -Tubulin の強制発現の影響を細胞体近傍の領域で観察した。Phalloidin を用い 3 重染色した結果、3 者のシグナルが細胞体領域において重なって観察された。Scale bar, 20 μ m。

結果（補遺）

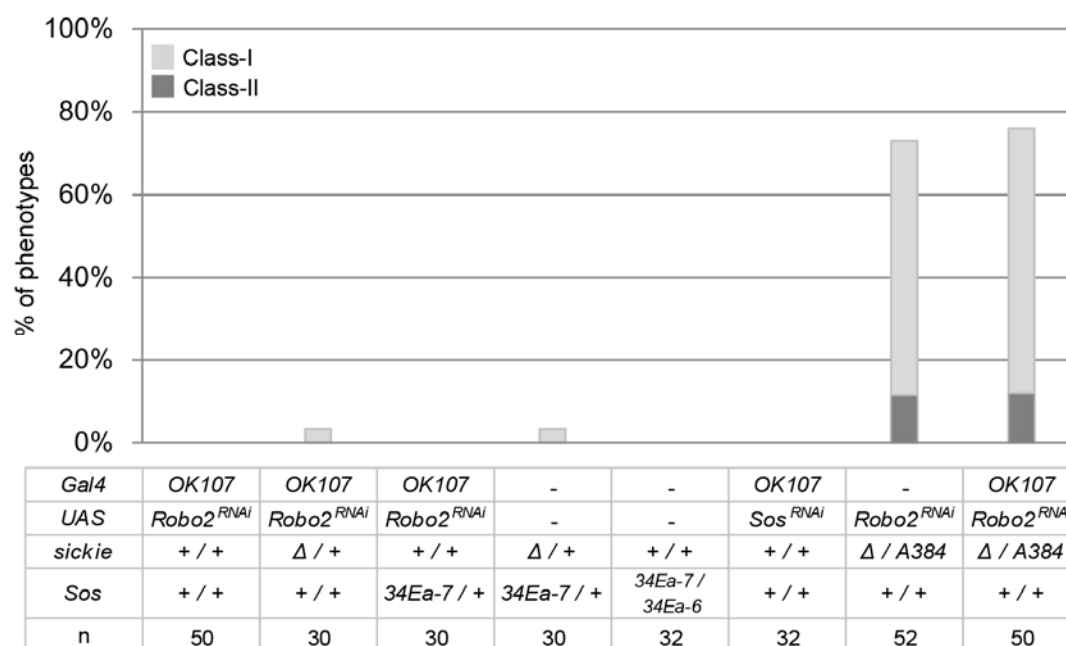
3.11（補遺）Sevenless 経路および Robo-Sos 経路と Sickie の相互作用の検討

これまでの報告で、Sickie の線虫ホモログである UNC-53 に関して、SH2 SH3 アダプタータンパク質である SEM-5/GRB2 と UNC-53 が生化学的に結合し、遺伝学的な相互作用を示すことが示唆されていた (Stringham et al., 2002)。ショウジョウバエの SEM-5/GRB2 ホモログとしては Drk が既知であり、Drk の上流では Receptor Tyrosine Kinase である Sevenless が機能し、視細胞の分化を制御することが明らかになっている (Raabe, 2000)。このため、これらの因子との遺伝学的相互作用を調べた。*sevenless* のホモのアモルフ変異体では、キノコ体神経軸索の伸長に明らかな異常は認められず、*sevenless drk sickie* ヘテロ 3 重変異体においても、表現型の浸透率は低いままであった (補遺 図 1)。このため、Sevenless の経路と Sickie の関わりはキノコ体神経の軸索伸長においては大きくないと考えられたため、解析対象から除外した。

Drk はアダプタータンパク質として様々な因子と相互作用することが知られているが、ショウジョウバエにおいては Son of sevenless (Sos) とも結合することが明らかになっていた (Olivier et al., 1993)。Sos は胚期の腹側神経節の軸索走行の制御において、上流の Slit-Robo シグナルを仲介することが示唆されていたため、これら因子との相互作用を調べた (Yang and Bashaw, 2006)。Sos の機能欠失変異体と *OK107-gal4* 依存的 *Robo2* の RNA 干渉を組み合わせることで *sickie* との多重変異体を作製したが、Sevenless 経路のときと同様、明らかな軸索束形成の表現型の亢進は観察されなかったため、これ以上の解析は行わなかった (補遺 図 2)。



補遺 図 1. *sevenless* と *sickie* の遺伝学的相互作用の検討。



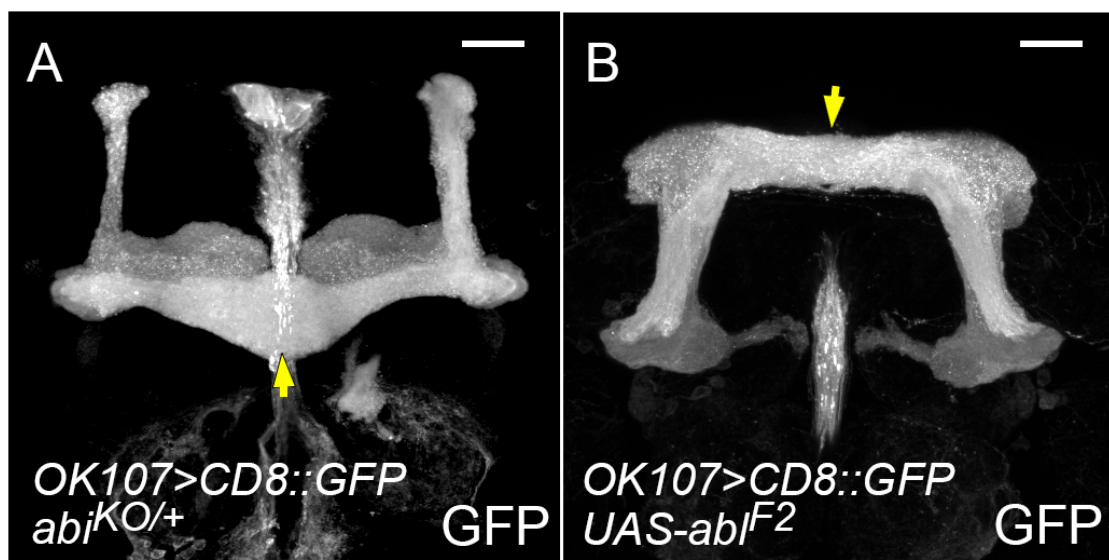
補遺 図 2. *Robo-Sos* 経路と *sickie* の遺伝学的相互作用の検討。

3.12 (補遺) *abi* および *abl* 変異体の表現型の解析と *Sickie* との相互作用

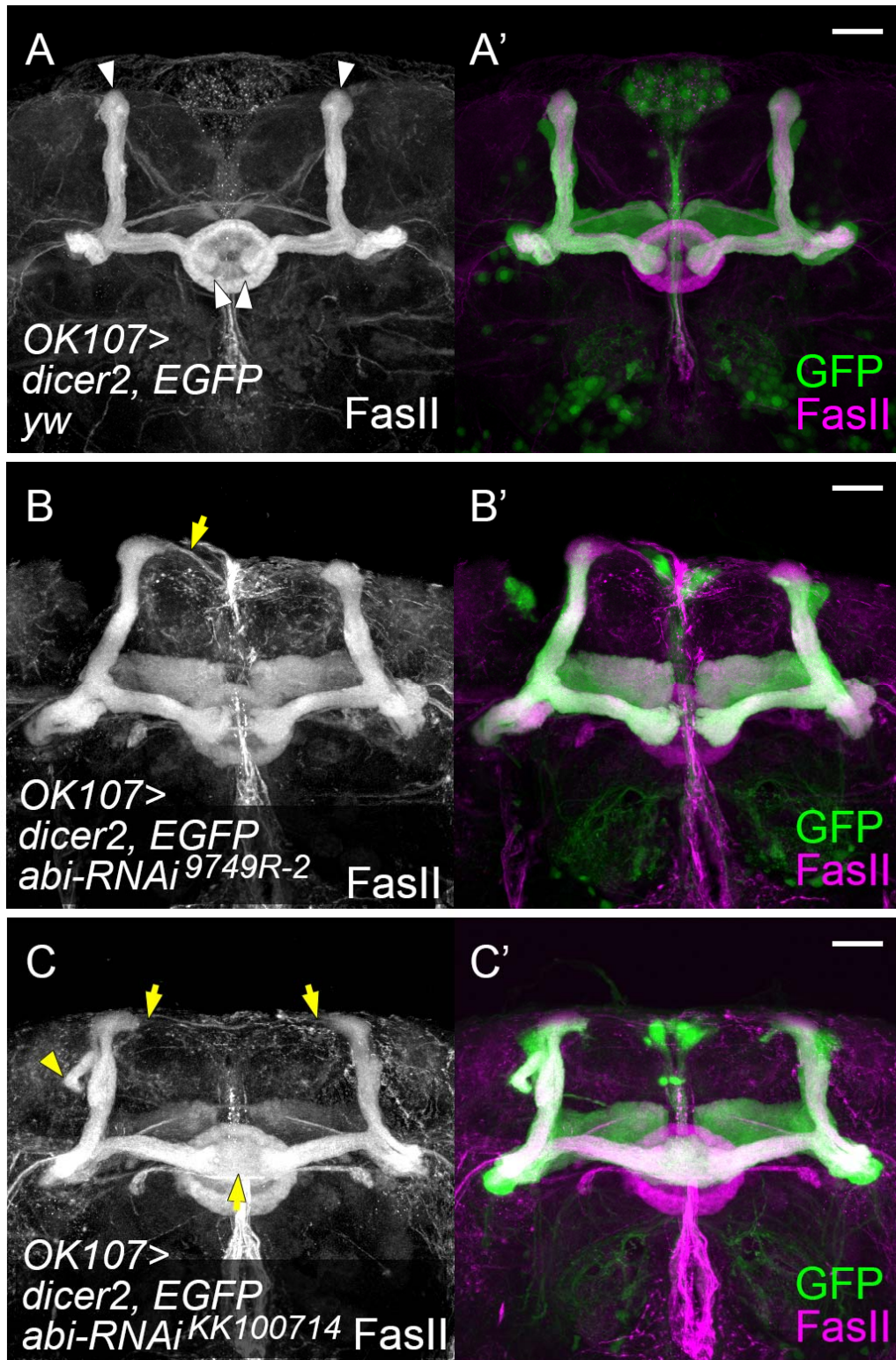
線虫において、Abelson kinase (Abl) と相互作用することが既知である Abelson-interactor-1 (ABI-1) と Sickie ホモログの UNC-53 が生化学的に結合し、excretory cell や motoneuron の移動において遺伝学的に相互作用することが示されていた (Schmidt et al., 2009; Shi et al., 1995)。一方ショウジョウバエの ABI-1 ホモログ Abi は胚期の中枢神経系の軸索新生やシナプス形成において機能し、Abl とは逆方向に作用することが示唆されていた (Lin et al., 2009)。また、Abl はその変異体が胚期の中枢神経系の軸索形成において形態異常を示すことが複数報告されていた (Crowner et al., 2003; Gertler et al., 1989; Hill et al., 1995)。このため、*abi* の機能欠失変異体 (*abi^{KO}*)、*abl* のハイポモルフ変異体 (*abl^{F2}*, *abl^{F3}*) の表現型をヘテロ変異体下で調べた。*abi^{KO}* ヘテロ変異体では、正中線側へ投射する左右の lobe が過剰伸長し融合する表現型が観察された (補遺 図 3A)。一方、*abl^{F2}* ヘテロ変異体は明らかな軸索形成異常を示さなかった。このため、先の Abi と Abl が逆方向に作用するという知見を踏まえ、キノコ体特異的に Abl を強制発現する実験を行った。*OK107-gal4* 依存的に Abl を発現する個体において、キノコ体の背側方向に投射する lobe が過剰に伸長し、正中線付近の脳間部領域で融合する表現型や (補遺 図 3B)、*abi^{KO}* ヘテロ変異体と同様に正中線側へ投射する左右の lobe が融合する表現型が観察された。2 つの独立の系統 *UAS-abl^{F2}*、*UAS-abl^{F3}* を用いた結果、*UAS-abl^{F2}* の発現系統のほうがより表現型の強さや浸透率も顕著であったが、*UAS-abl^{F3}* 発現系統でも lobe の融合が観察された (補遺 図 5 右端)。なお、このような激しい過剰伸長は、*OK107-gal4* 依存的に野生型 Sickie を強制発現した際には観察されなかった。

次に、このような *abi* ヘテロ変異体の過剰伸長の表現型がキノコ体における

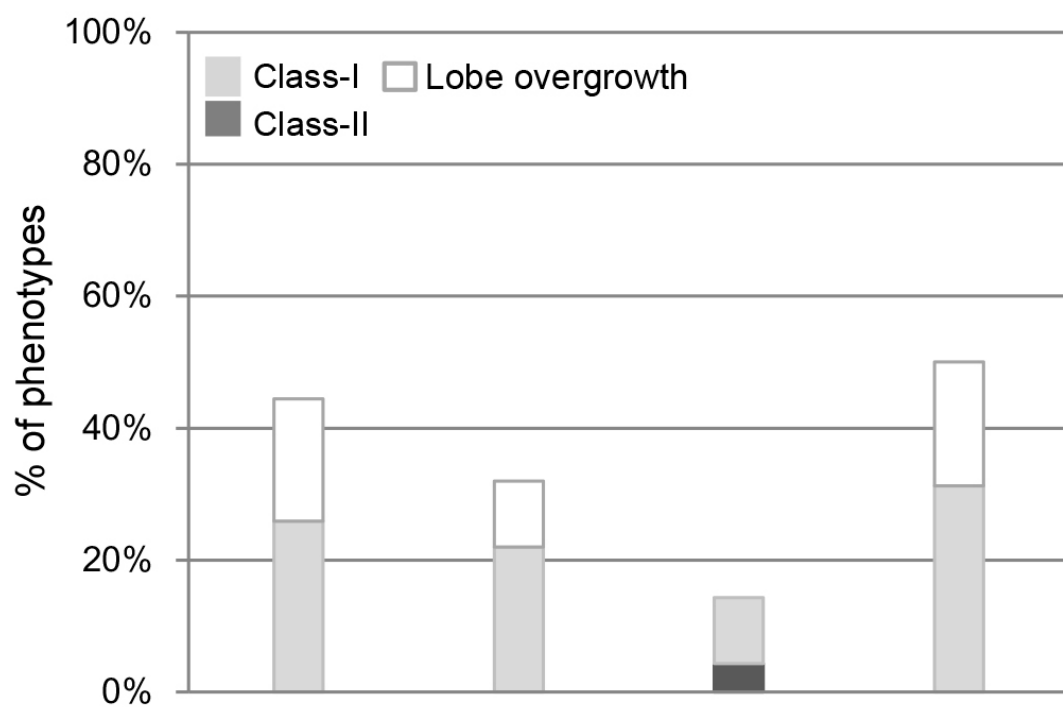
Abi の機能異常に起因するかを推定するため、キノコ体特異的に RNA 干渉を誘導した（補遺 図 4）。対照群に比べ（補遺 図 4A）、*abi* をノックダウンした個体では、 α/β lobe を構成する神経軸索が過剰に伸長する表現型が観察された（補遺 図 4B）。独立の RNAi 系統を使った場合も同様の表現型が観察されたため、Abi はキノコ体の軸索束伸長において抑制的に機能していることが示唆された（補遺 図 4C, 5）。



補遺 図 3.(A) *abi* の機能欠失系統 (*abi*^{KO}) のヘテロ変異体、(B) *abi* の過剰発現変異体 (*UAS-abi*^{F2}) のキノコ体を *OK107-gal4* 依存的 GFP でラベルした。lobe の過剰伸長が観察された。Scale bars, 20 μm。



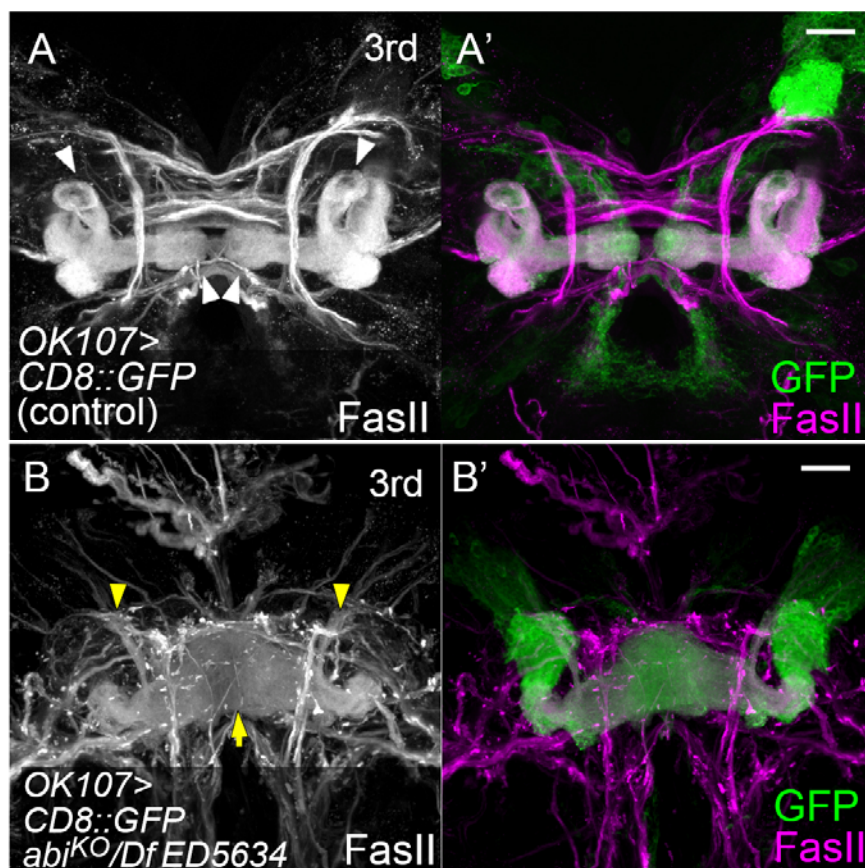
補遺 図 4. Abi のキノコ体特異的 RNAi。abi ヘテロ変異体同様 lobe の過剰伸長が観察された。Scale bars, 20 μ m。



	RNAi (with <i>UAS-dicer2</i> , 29 °C)		Overexpression (25 °C)	
<i>Gal4</i>	<i>OK107</i>	<i>OK107</i>	<i>OK107</i>	<i>OK107</i>
<i>UAS</i>	<i>abi^{RNAi KK110714}</i>	<i>abi^{RNAi 9749R-2}</i>	<i>GFP-abi</i>	<i>abl^{F3}</i>
n	54	50	70	32

補遺 図 5. *Abi* のキノコ体特異的 RNAi、強制発現、*Abl*の強制発現の表現型の浸透率の定量。

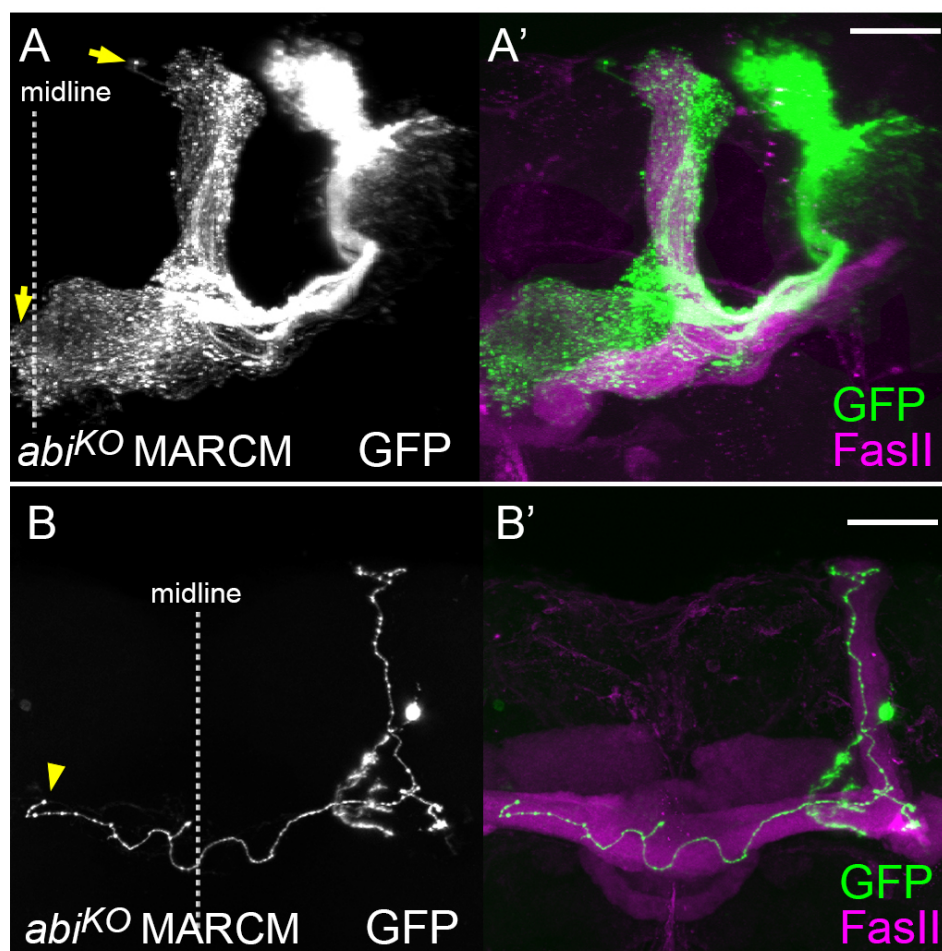
次に、これらの因子の機能がより大きく低下した状態で、Abi、Abl のキノコ体形態形成における役割を明らかにするため、それぞれの変異体のホモまたはトランスヘテロ変異体を観察した。*abi*^{KO} のホモ変異体は 1-2 令幼虫期でほとんどが致死となってしまったため、*abi* の Deficiency 系統 *Df* (3*R*) *ED5634* とのトランスヘテロ変異体を作製した。この変異体も蛹形成前後で致死となってしまったため、3 令幼虫後期におけるキノコ体の形態を観察した。成虫型キノコ体の RNAi ノックダウンのときと同様に、野生型に比べ（補遺 図 6A）、*abi*^{KO}/*Df* (3*R*) *ED5634* 変異体のキノコ体の γ 神経により形成される lobe 構造も正中線付近で融合する表現型が観察された（補遺 図 6B、黄矢印）。一方、背側方向に形成される lobe は著しく細くなっていた（黄矢頭）。



補遺 図 6.

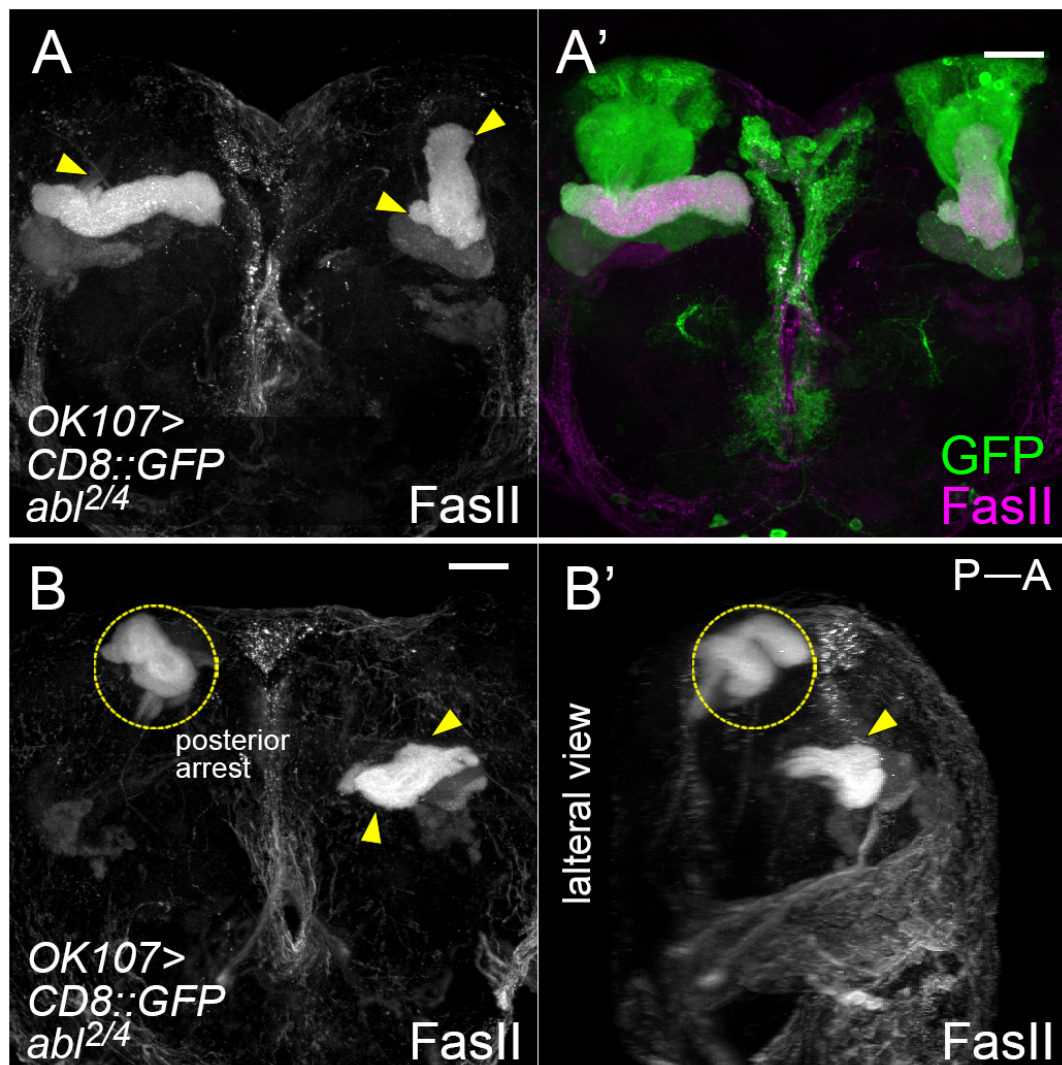
abi^{KO}/*Df*(3*R*)*ED5634* 全身変異体の 3 令幼虫期のキノコ体。Scale bars, 20 μ m。

さらに、成虫型キノコ体での *abi* 変異体の表現型を観察するため、*abi*^{KO} を *FRT82B* に載せかえ、MARCM 法によるクローン解析を行った。RNA 干渉を誘導したときよりも、表現型の浸透率、重篤度ともに低かったが、ニューロブラストクローン（補遺 図 7A）、単一の α/β 神経細胞クローン（補遺 図 7B）のいずれにおいても過剰伸長するキノコ体神経軸索が観察された（黄矢印）。これらの結果は、Abi がキノコ体神経において細胞自律的に軸索伸長を抑制的に制御していることを示唆している。なお、*abi* のニューロブラストクローンは細胞数が野生型クローンに比べ減少している傾向が見られた。



補遺 図 7. *abi*^{KO} 変異体で MARCM クローンを誘導したキノコ体。過剰伸長が観察された。 *FRT82B* にのせかえた系統を用いた。Scale bars, 20 μ m。

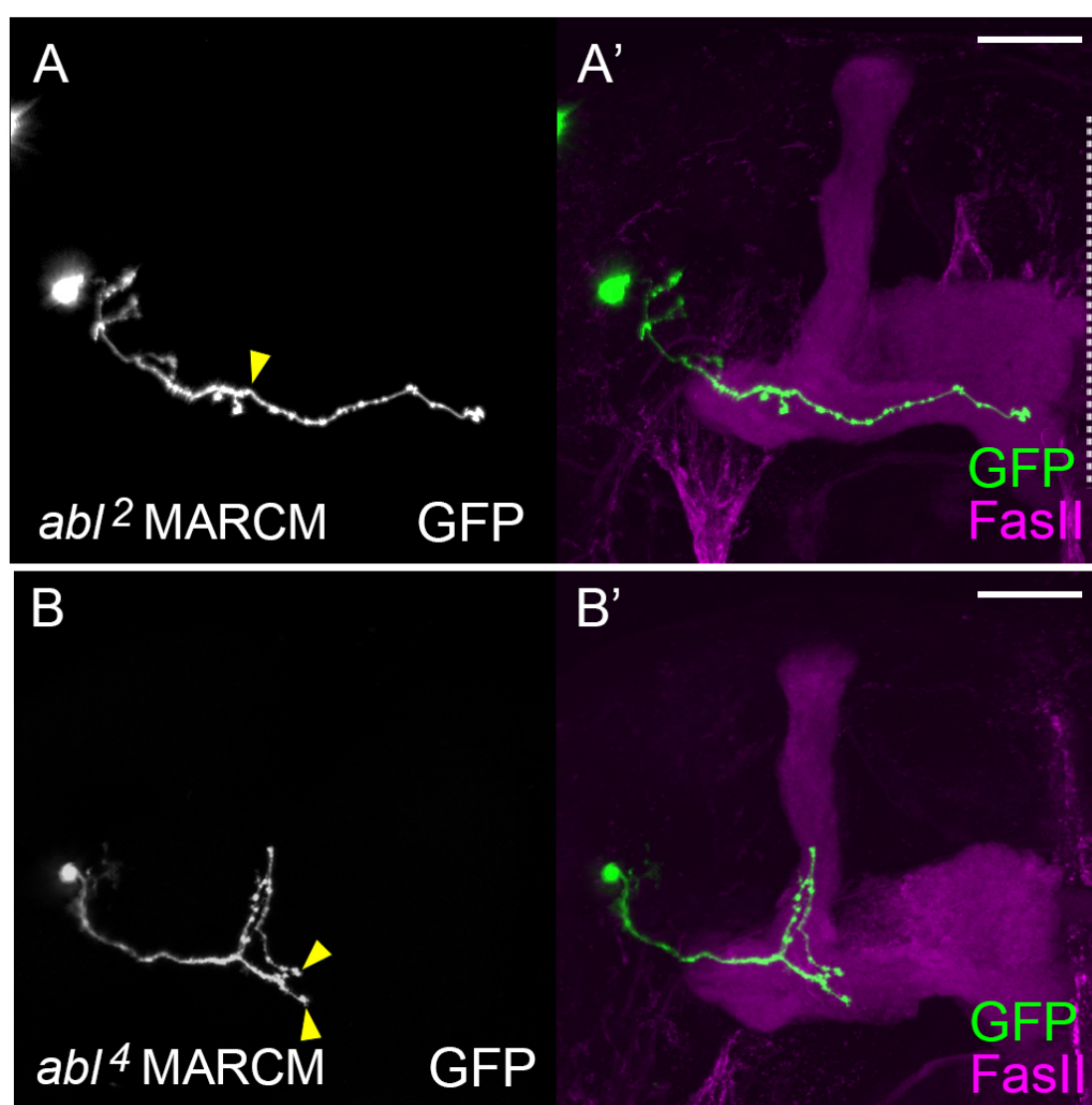
次に、*abl* のトランスヘテロ変異体 (*abl*^{2/4}) のキノコ体を観察した。本全身変異体は蛹期にかなりの個体が致死となったが、翅化直前まで発生する個体が少数観察されたため、それらを解剖した。*abl*^{2/4}変異体では、*sickie* 変異体と同様に α/β lobe が軸索伸長異常を示し、Class-I 型の表現型が観察されることが多かった (補遺 図 8A)。また、Class-II 型の表現型や、peduncle の時点で軸索束の形成が異常となっている Posterior arrest 型の表現型を示す個体も確認された (補遺 図 8B-B')。



補遺 図 8.

abl^{2/4} 全身変異体。軸索束の伸長阻害が観察された。Scale bars, 20 μ m。

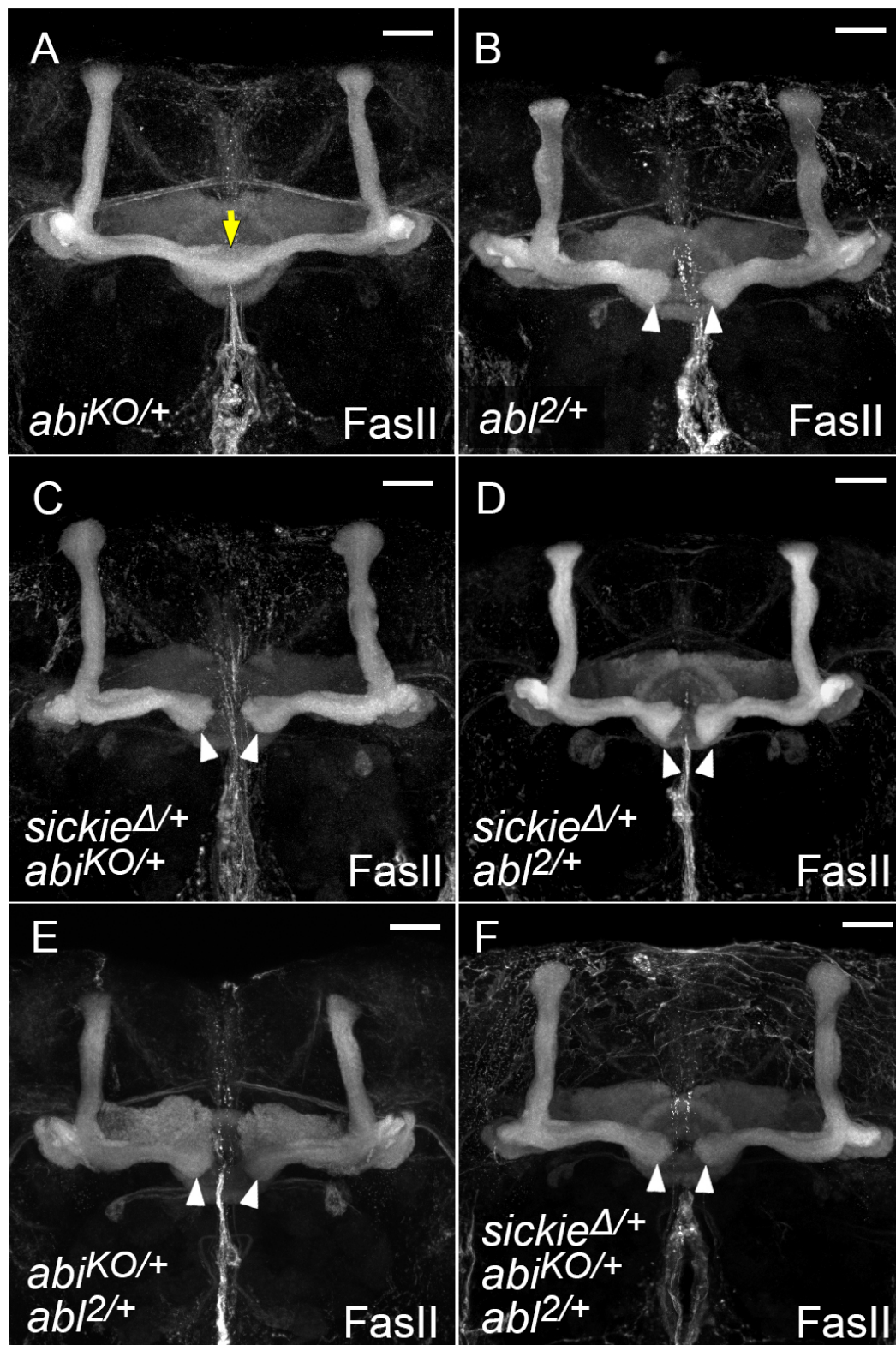
Abl の機能のキノコ体における細胞自律性を調べるため、MARCM 法による解析を行った。単一細胞レベルで *abl* クローンを誘導したところ、全身変異体に比べ低頻度ではあったが、軸索の伸長阻害の異常が α/β 神経において観察された（補遺 図 9A,B）。これらの結果は、Abl がキノコ体神経において細胞自律的に軸索伸長を正に制御していることを示唆している。



補遺 図 9. *abl*²、*abl*⁴ MARCM 変異体。 α/β 神経軸索の伸長阻害が観察された。*FRT2A*にのせかえた系統を用いた。Scale bars, 20 μ m.

Sickie 同様、Abi、Abl がキノコ体の軸索伸長において細胞自律的に機能することが予想されたため、これら因子の遺伝学的相互作用を調べた。*abi* のヘテロ変異体では軸索束の過剰伸長による融合異常が優占的に観察されたため（補遺 図 10A）、*sickie* や *abl* とのヘテロ多重変異体とした際に本表現型が変化するかどうかを調べた。*sickie*、*abl* それぞれの単独のヘテロ変異体は lobe 伸長に異常を示さないことを既に確認していた（図 18、補遺 図 10B）。*sickie* と *abi* のヘテロ 2 重変異体では、*abi* 単独ヘテロ変異体で見られたような lobe 過剰伸長がまったく観察されなくなることが明らかになった（補遺 図 10C）。同様に、*abl* と *abi* のヘテロ 2 重変異体でも、lobe 過剰伸長が観察されなくなった（補遺 図 10E）。これらの結果は、キノコ体の軸索形成において *sickie* と *abi* が、また *abl* と *abi* が、それぞれ遺伝学的に逆向きに相互作用することを示唆している。次に、*sickie* と *abl* の相互作用を調べるためヘテロ 2 重変異体を作製したところ、EB において下部領域にわずかな切れ込みが入る程度の異常が少数観察されるようになったが、*sickie* 全身変異体のような環状構造の断裂（図 19）は示さなかった。また、lobe 形成には目立った異常が観察されなかった（補遺 図 10D）。次に *sickie*、*abi*、*abl* のヘテロ 3 重変異体を作製したが、ヘテロ 2 重変異体のときと同様に *abi* の表現型が抑制された（補遺 図 10F）。

これまでの結果から、Abi は軸索伸長において抑制的に機能することが示唆されたことから、キノコ体において Abi を強制的に機能亢進させる実験を行った。GFP 融合型の Abi を *OK107-gal4* 依存的にキノコ体で強制発現した（補遺 図 11A-A'）。25℃の誘導条件下では、 α/β lobe の形成に大きな異常は観察されなかった。図 21A,C に示したとおり、*sickie* の RNA 干渉は 25℃条件下では軸索束の形成に異常が観察されない。そこで、Abi の強制発現と *sickie-RNAi* を同時に誘導する系統を作製し観察したところ、25℃条件下でも、*sickie* 全身変異体に

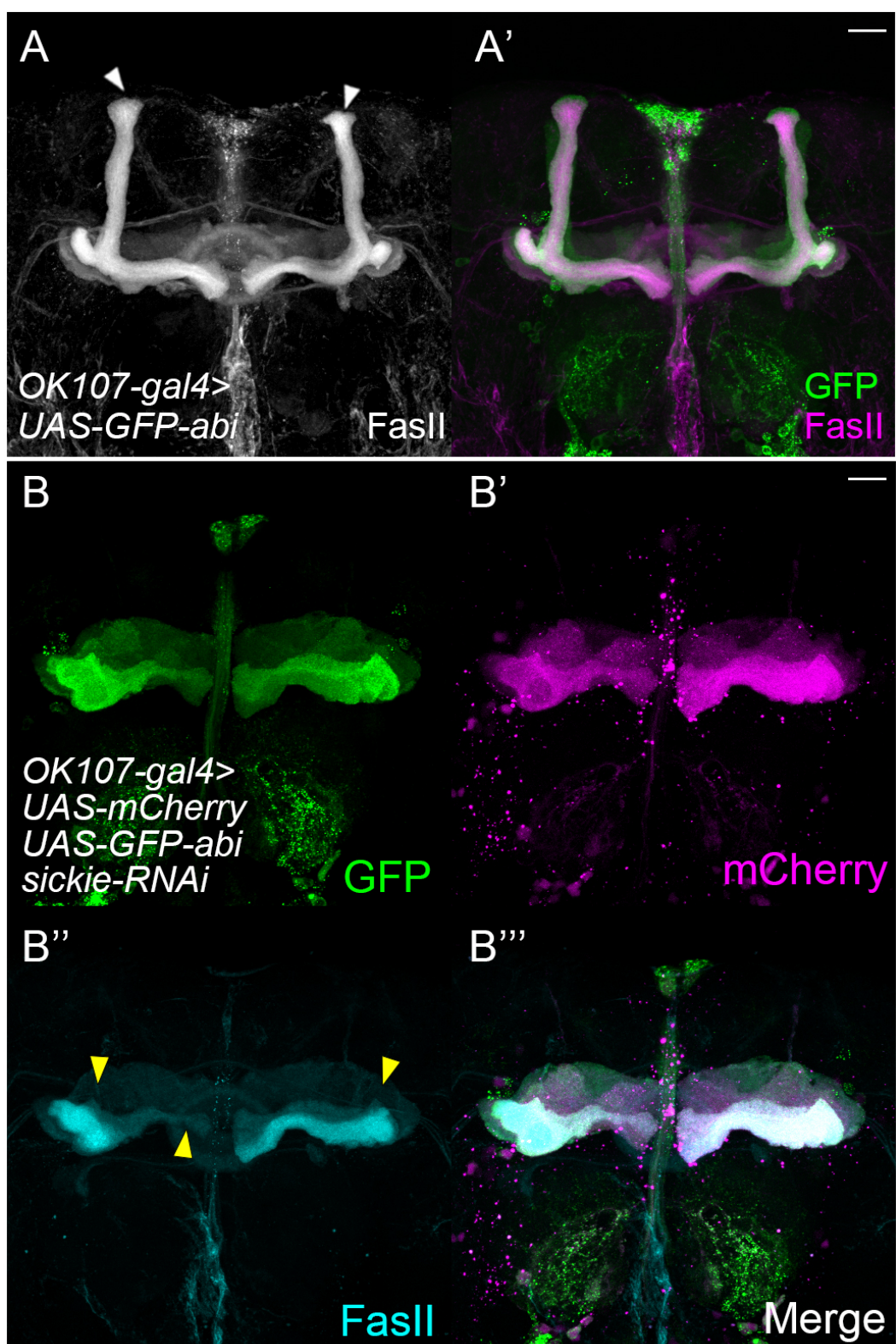


補遺 図 10. *sickie*、*abi*、*abl*の遺伝学的相互作用。Scale bars, 20 μ m.

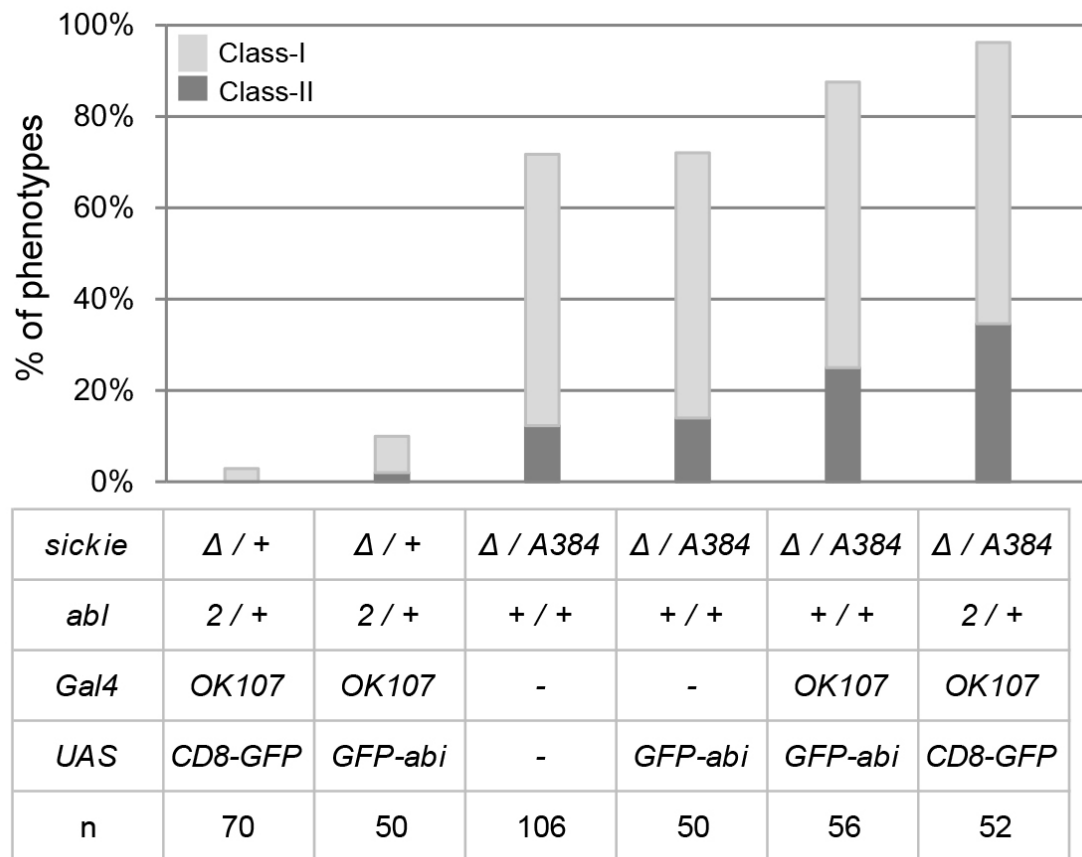
において観察されるような Class-I 型の lobe 伸長異常が現れるようになった（補遺 図 11B・B'）。

先に行った *sickie*、*abi*、*abl* のヘテロ 3 重変異体を用いた相互作用の解析に関して、3 因子間に相乗的な遺伝学的相互作用があるかどうか不明瞭だったため、*sickie*、*abl* 変異体と *OK107* 依存性 *GFP-abi* 過剰発現系統を組み合わせた多重変異体の解析を行った。*abi* 過剰発現 *sickie abl* ヘテロ 3 重変異体において、lobe 伸長阻害の異常が亢進することが期待されたが、わずかな浸透率の上昇が観察されたのみだった（補遺 図 12）。*sickie* を機能欠失変異体にして同様に 3 重変異体を作り浸透率を測定したが、同様に、劇的な上昇は観察されなかった。

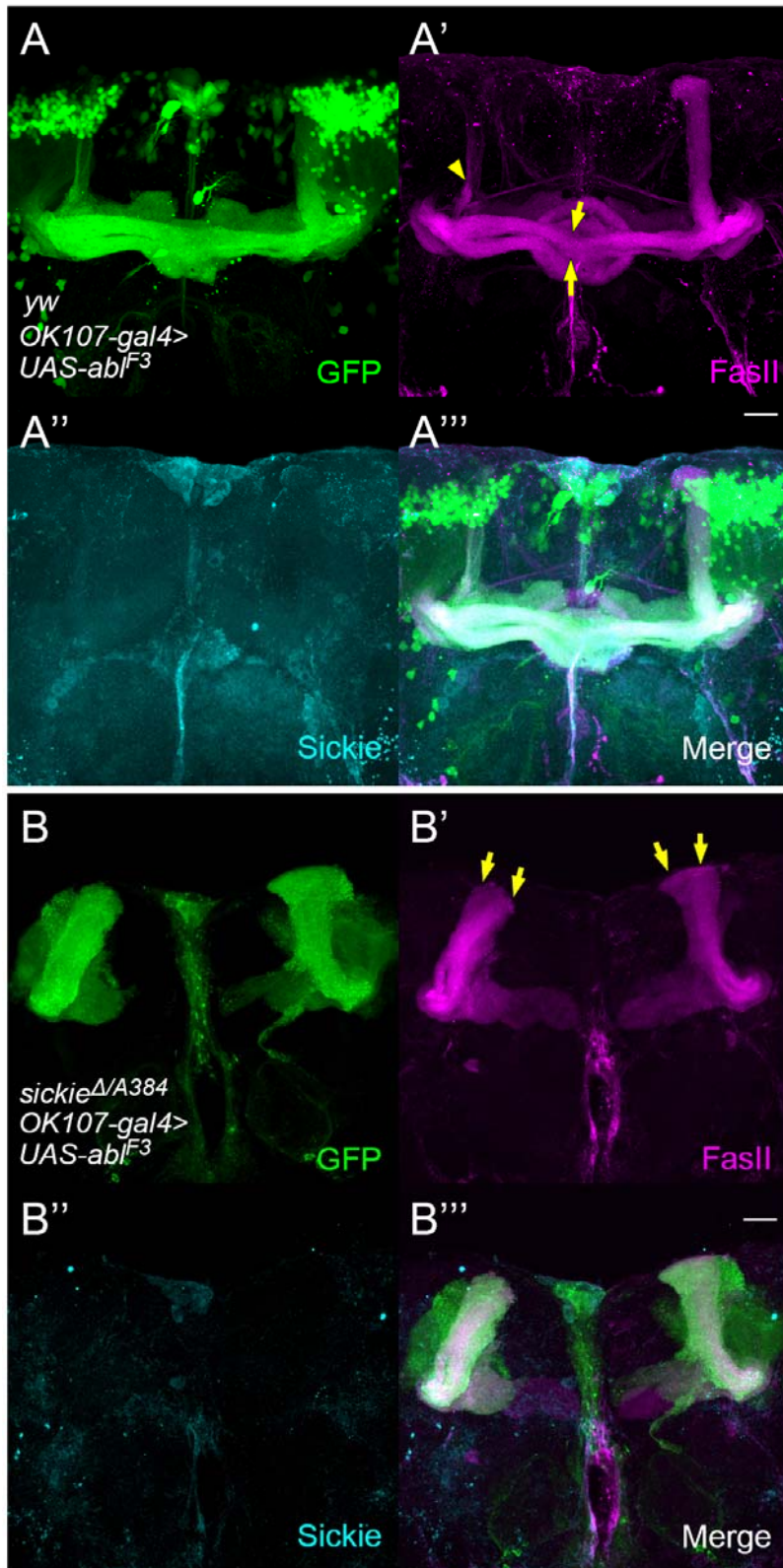
次に *sickie* と *abl* の遺伝学的上下関係を推定するため、*sickie* の機能欠失変異体条件下で *abl* を過剰発現させる実験を行った。仮に *Abl* の下流で *Sickie* が機能するならば、*sickie* 変異体では *Abl* の過剰発現による lobe 過剰伸長が抑制されることが予想された。比較群として野生型条件下で *UAS-Abl^{F3}* をキノコ体特異的に過剰発現させたところ、lobe の過剰伸長を確認した（補遺 図 13A・A'）。次に *sickie* 変異体下で過剰発現させたところ、軸索束の投射方向が背側または正中線側のいずれかの方向に偏ることが多いものの、通常 of 投射末端まで lobe が伸長し形成されることが明らかになった（補遺 図 13B・B'）。より強い発現系統と推察される *UAS-Abl^{F2}* を用いた場合でも、同様に lobe の過剰伸長が *sickie* 機能欠失変異体下において観察された（補遺 図 13C,D）。これらの結果は、キノコ体の軸索伸長において *Sickie* とは独立の経路で *Abl* が機能できることを示唆した。



補遺 図 11.キノコ体における *Abi* の強制発現と *sickie-RNAi* の同時誘導による表現型亢進。Scale bars, 20 μ m。

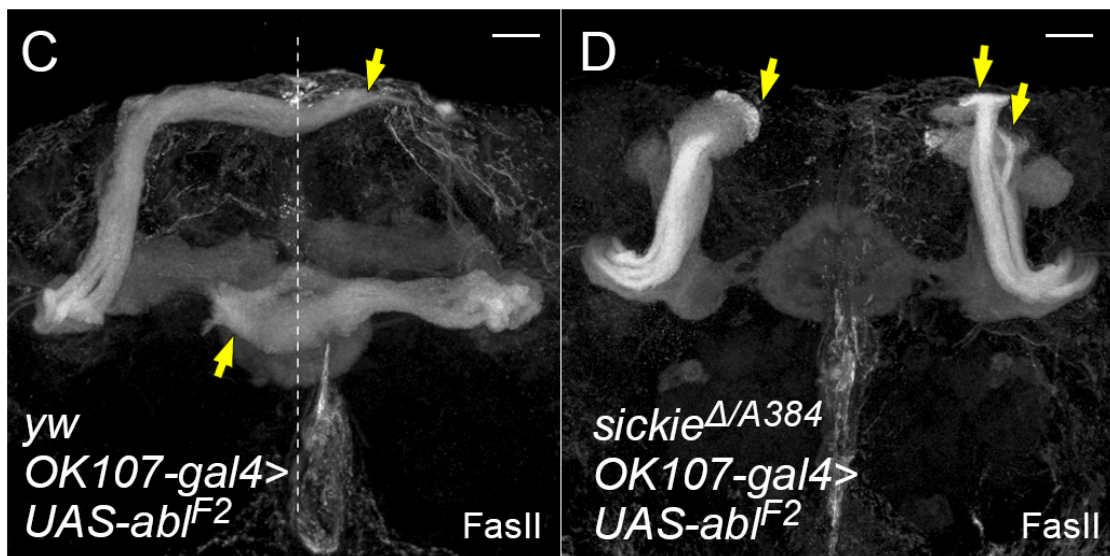


補遺 図 12. キノコ体における *Abi* の強制発現と *sickie,abl* 変異体の組み合わせによる遺伝学的相互作用の解析。



補遺 図 13. *sickie* 全身変異体下でも Abl の過剰発現は lobe の過剰伸長を誘導する。

Scale bars, 20 μ m.



補遺 図 13.

(C)野生型条件下で Abl をキノコ体で過剰発現すると軸索が過剰伸長する。(D) *sickie* 全身変異体下でも Abl の過剰発現は lobe の過剰伸長を誘導する。Scale bars, 20 μ m.

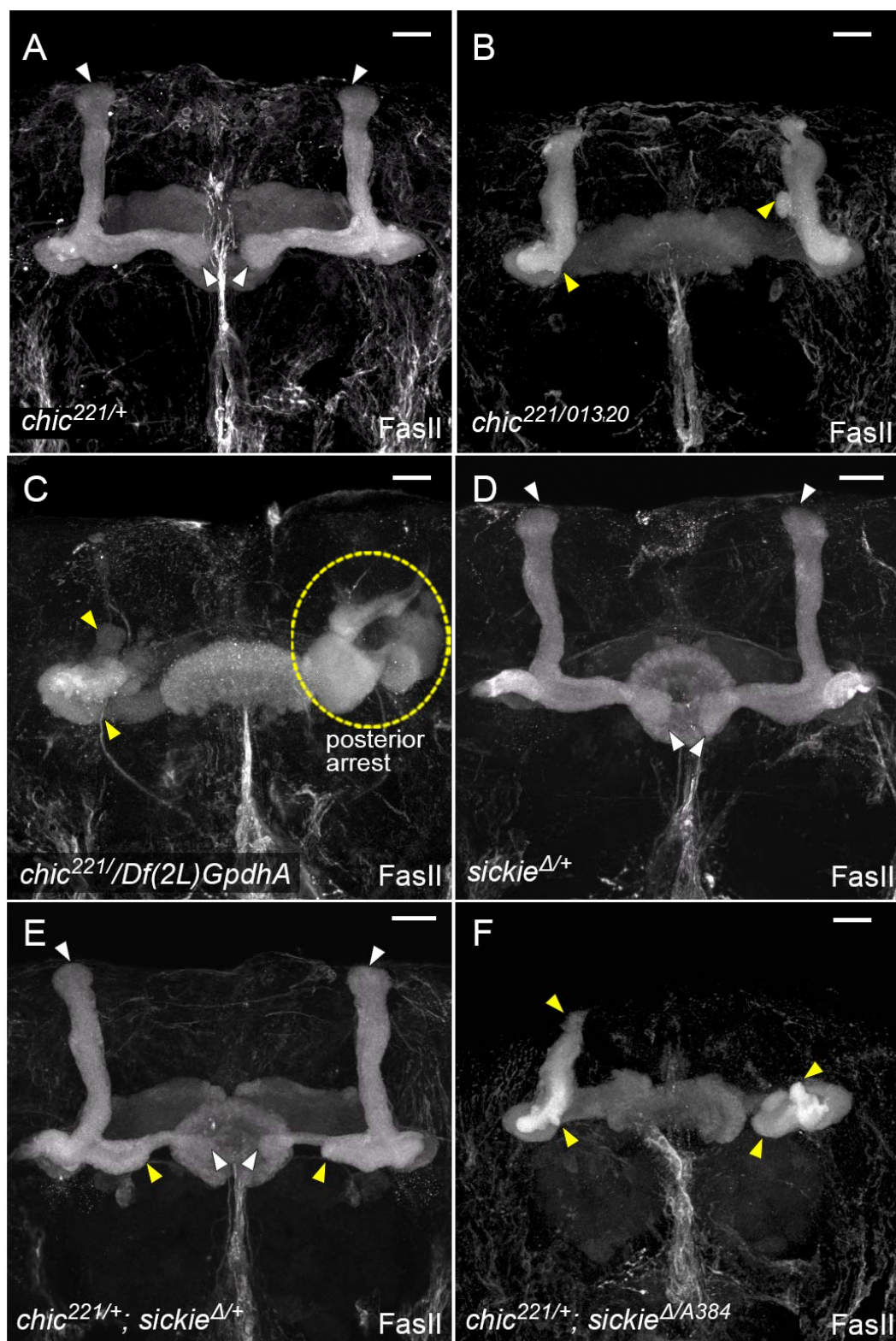
3.13 (補遺) *chic* および *cib* 変異体の表現型の解析と *Sickie* との相互作用

actin 骨格を制御する因子のひとつとして、Profilin があげられる。Profilin は actin の重合の調節において ADP 結合型 actin に結合することで抑制的に機能し、ADP と ATP の交換反応をうながすことで促進的に機能する (Carlsson et al., 1977; Witke et al., 1998)。ショウジョウバエの Profilin ホモログとしては Chickadee (Chic) が同定されており、神経系以外にも生殖系列や上皮などの様々な組織において形態形成を制御することが明らかになっている (Brock et al., 2012; Cooley et al., 1992; Hopmann and Miller, 2003; Reeve et al., 2005; Shields et al., 2014)。キノコ体においても、*chic* 変異体が軸索伸長に異常を示すことが既知であったが (Ng and Luo, 2004)、先の報告とは独立のアリルを用いて同様に軸索伸長異常が見られるか観察した。*chic*²²¹ ヘテロ変異体では *sickie* や *abl* のヘテロ変異体と同様に lobe 形成に目立った異常は観察されなかったが (補遺 図 14A)、*chic*^{221/01320} トランスヘテロ変異体では *sickie* 変異体の Class-I 型や II 型に対応する lobe 形成異常が主に観察された (補遺 図 14B)。*chic*²²¹ とその Deficiency 系統のトランスヘテロ変異体では、前者同様 Class-I、II 型の異常が観察され、Posterior arrest に分類される重篤な伸長異常も少数観察された (補遺 図 14C)。これらの結果は過去の知見と同様に、キノコ体神経軸索の形成に *chic* が必要であることを示している。

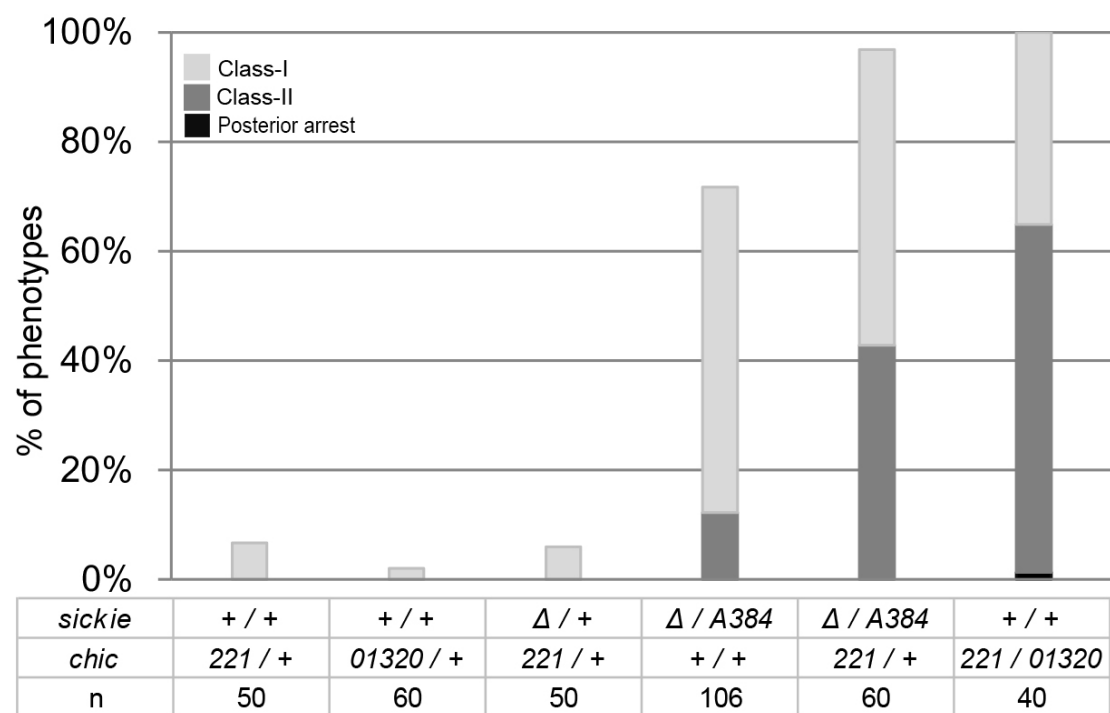
このため、*sickie* と *chic* の遺伝学的相互作用を調べた。*sickie chic* ヘテロ 2 重変異体では、Class-I、II 型に分類されるような表現型の明らかな亢進は認められなかったが、正中線側 lobe の末端が細くなるような異常が観察された (補遺 図 14E)。次に *sickie* 機能欠失変異体下でさらに *chic* のヘテロの変異を持たせた系統では、*sickie* 機能欠失変異体単独の表現型の浸透率よりも Class-II

型の比率が増加し、軸索形成に障害が起こっていることが示唆された（補遺 図 15）。この結果は、actin 骨格制御を多様な調節因子によって制御される複合的な現象として考えたとき、Chic と Sickie が協調的に機能している可能性を示唆した。

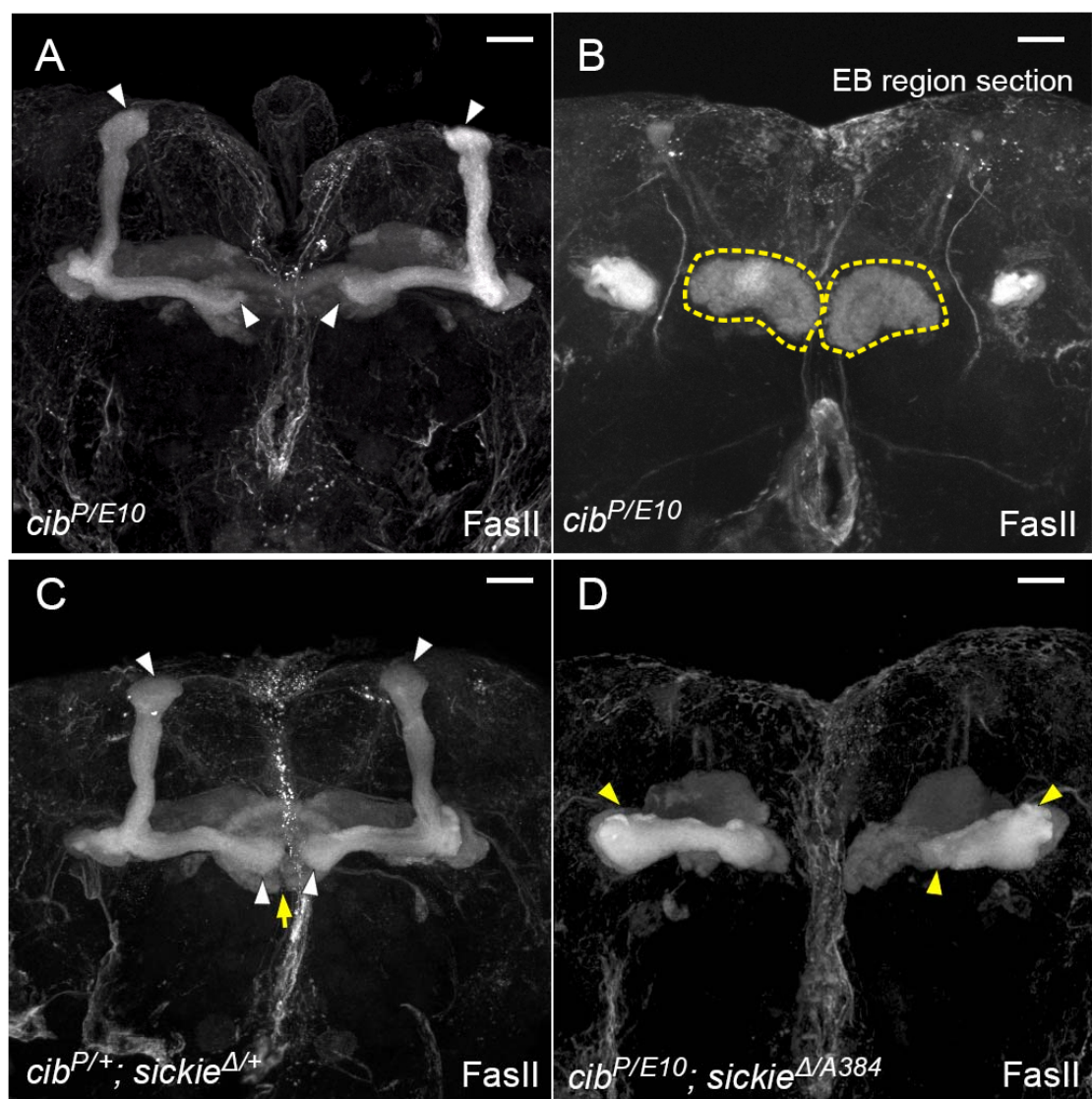
次に、単量体 actin に結合して actin フィラメントの重合を調節する因子である β -thymosin の 3 回リピート構造を持つ、ショウジョウバエの Ciboulot (Cib) との相互作用を調べた (Dominguez, 2007; Husson et al., 2010)。過去の報告で、*cib* の機能欠失変異体では EB の環状構造が乱れるものの、キノコ体の lobe 形成には顕著な異常は観察されないことが報告されており、この結果を再現した (Boquet et al., 2000) (補遺 図 16A,B)。本因子と *sickie* のヘテロ 2 重変異体では EB の下部領域に切れ込みが入る表現型が観察されたが、キノコ体の lobe 形成に異常は認められなかった (補遺 図 16C)。*cib* 機能欠失変異体は viable であったため、*sickie* と *cib* の機能欠失 2 重変異体を作製したが、Posterior arrest などの重篤なレベルの伸長障害が観察されることはなかった (補遺 図 16D)。表現型の浸透率はわずかではあるが相乗的に増加する結果が得られた (補遺 図 17)。これらの結果は Chic の結果と同様に、actin 骨格の制御を複合的な現象として捉えたときに、Sickie と Cib はキノコ体や EB の形成において協調的に機能している可能性を示唆した。



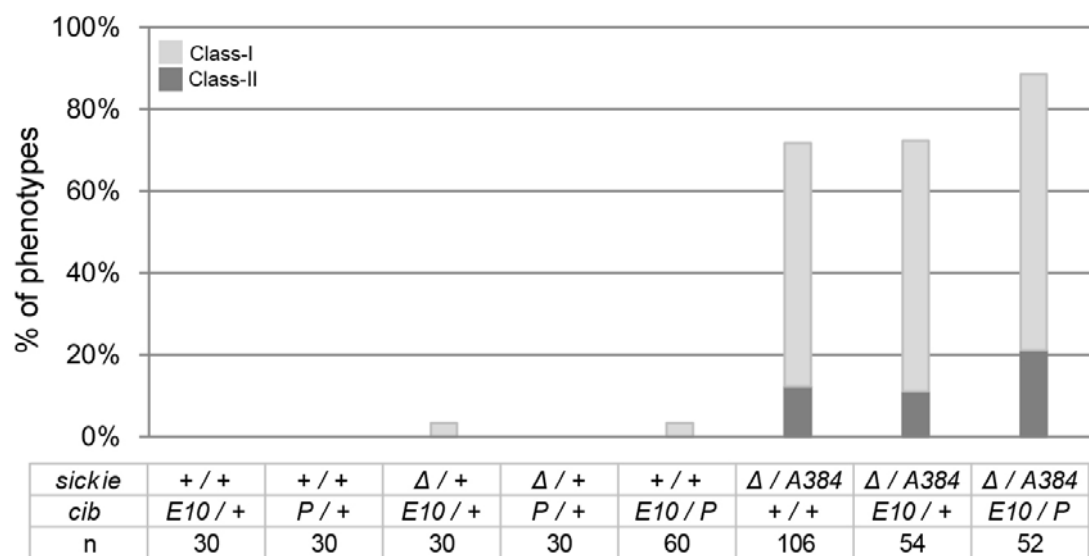
補遺 図 14.(A-F) *chic* 変異体の表現型と *sickie* との遺伝学的相互作用の解析。
Scale bars, 20 μm.



補遺 図 15. *chic*と *sickie* の遺伝学的相互作用の解析。



補遺 図 16.(A-D) *cib*変異体の表現型と *sickie*との遺伝学的相互作用。
Scale bars, 20 μm.



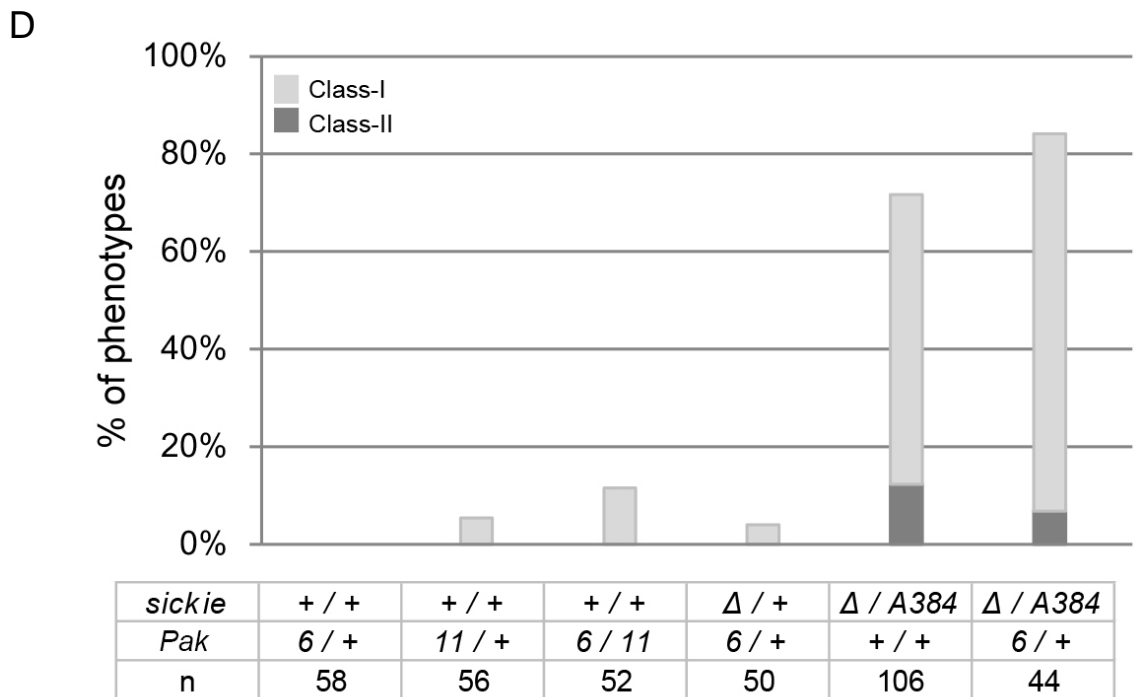
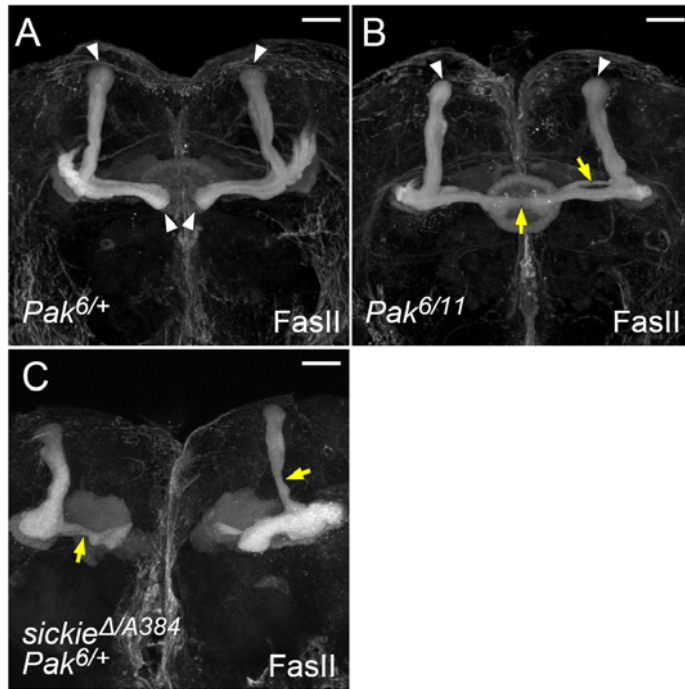
補遺 図 17. *cib*と *sickie* の遺伝学的相互作用。

3.14 (補遺) *Pak* および *dock* 変異体の表現型の解析と *sickie* との相互作用

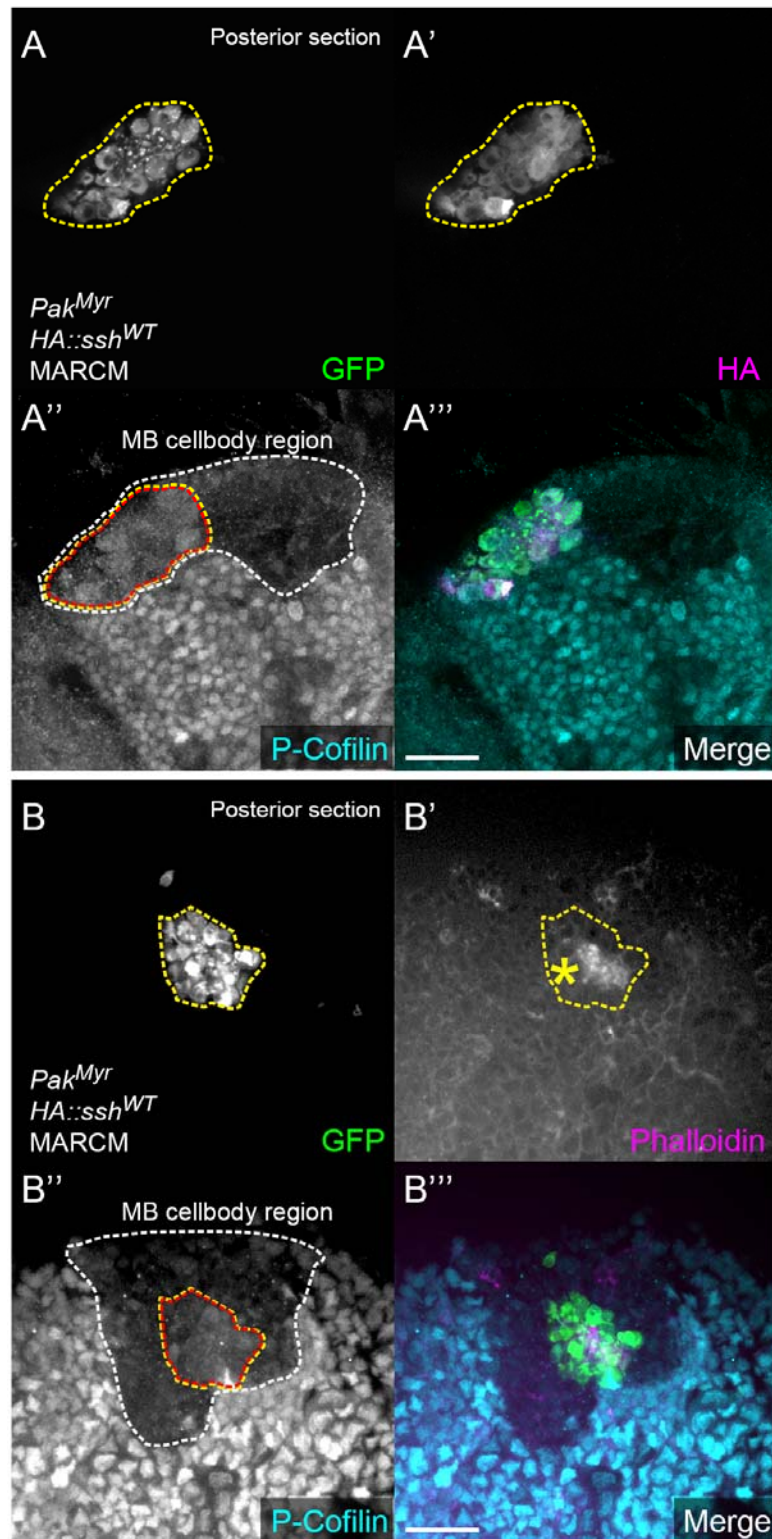
今回提示する Rac-Cofilin 経路による軸索伸長制御モデルを補強するために、*Pak* と *Sickie* の遺伝学的相互作用を検討した。*Pak* のヘテロ変異体は目立った軸索形成異常を示さず (補遺 図 18A)、アモルフとされるアリのトランスヘテロ変異体も軸索の束状構造が多少乱れる場合があるものの、明らかな伸長異常の表現型を示さなかった (補遺 図 18B)。*sickie* の機能欠失変異体下で *Pak* をヘテロ変異にしたところ、軸索束が lobe 分岐領域に近いところで細くなる個体が観察されたが (補遺 図 18C)、Class-II 型の浸透率はわずかに減少する結果となった一方、Class-I,II 型の浸透率の総和は増加した (補遺 図 18D)。なお *Pak* と *sickie* の機能欠失 2 重変異体は致死となり観察できなかった。

また、*LIMK^{WTM6}ssh¹⁻⁶³* 2 重変異体において観察されたリン酸化 Cofilin と F-actin レベルの上昇、Posterior arrest 型の重篤な軸索伸長異常は、*Pak* 恒常活性化変異体 *Pak^{Myr}* の表現型 (図 39F-F'') に類似していた。このため恒常活性化型 *Pak* と野生型 *Ssh* を共発現するクローンを誘導し、*Pak* と *ssh* の遺伝学的な上下関係を検討した。*Pak^{Myr}ssh^{WT}* 過剰発現 2 重変異体クローンでは、*Pak^{Myr}* 単独の変異体と同様に Posterior arrest 型の軸索伸長阻害が観察され、細胞体領域において、変異体になっていない細胞系譜のキノコ体の細胞体領域に比べ、リン酸化 Cofilin と F-actin のレベルが上昇していることが確認された (補遺 図 19A",B",B')。

先に述べた線虫の実験系では、SH2-SH3 ドメインをもつ *Drk* ホモログの SEM-5 が、*Sickie* のホモログである UNC-53 と相互作用することが報告されていたが (Stringham et al., 2002)、*Sickie* と *Drk* の間には明瞭な遺伝学的相互作用を見出せなかった。このため、同様に SH2-SH3 ドメインをもつ *Dock* との



補遺 図 18.(A, B) *Pak* 変異体は目立った軸索形成異常を示さない。(C) *sickie* 機能欠失変異体下で *Pak* をヘテロ変異にしたところ、分岐領域に近いところで軸索束が細くなる個体が観察された。(D) *sickie* 機能欠失 *Pak* ヘテロ 2 重変異体では Class-II 型の浸透率が *sickie* 単独の変異体に比べわずかに減少した。Class-I,II 型の浸透率の総和は増加した。Scale bars, 20 μ m。



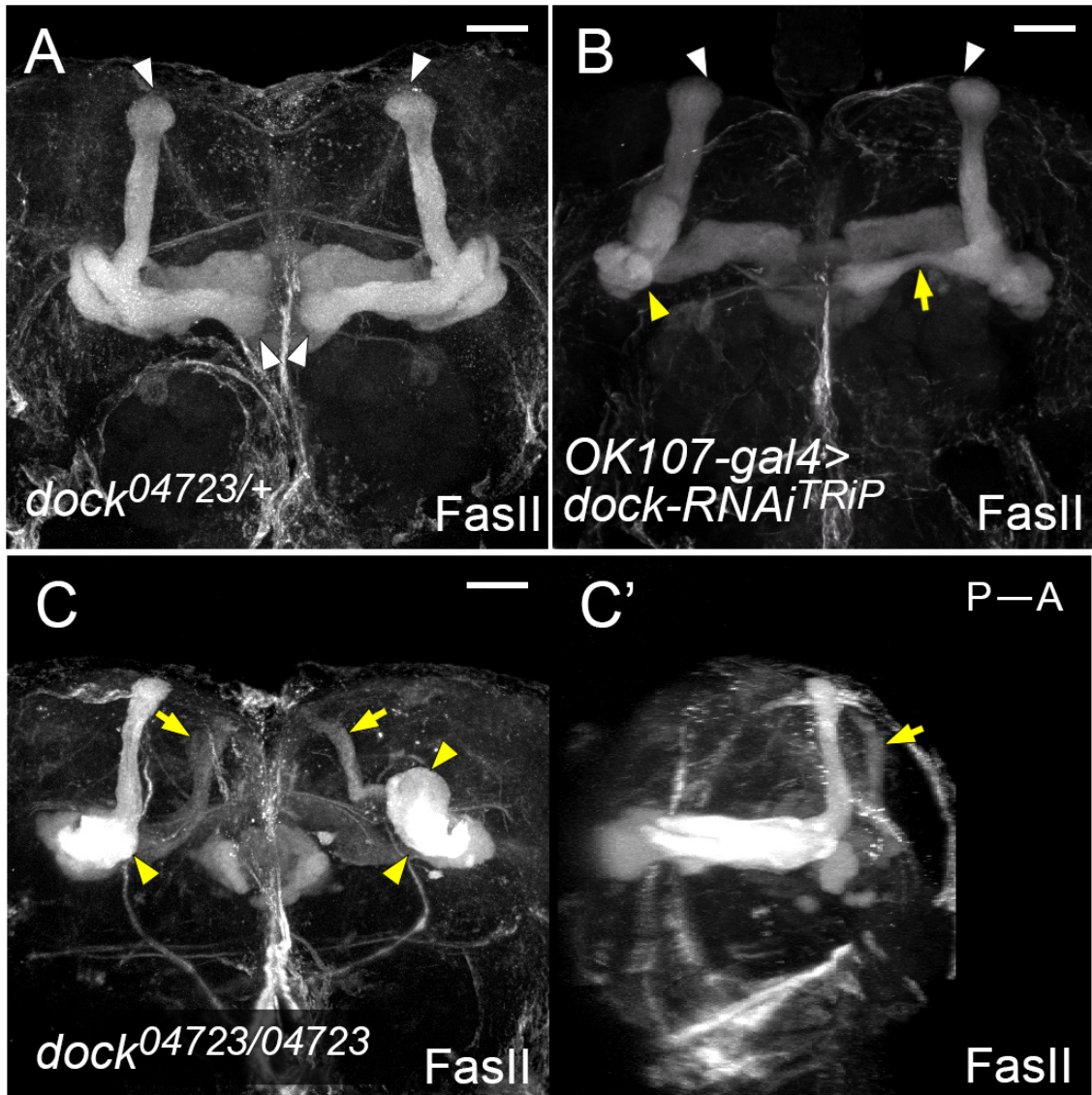
補遺 図 19.

Pak^{Myr} ssh^{WT} FRT40A 過剰発現 2 重変異体クローンでは、細胞体領域においてリン酸化 Cofilin(A'', B'')と F-actin(B')のレベルが上昇していることが確認された。Scale bars, 20 μ m。

関連を解析した。また、ショウジョウバエにおいては Dock が Pak の上流で機能することも提唱されていることも理由の 1 つである (Hing et al., 1999)。dock のヘテロ変異体は目立った軸索形成異常を示さなかったが (補遺 図 20A)、キノコ体で RNA 干渉を誘導したところ、Pak 変異体と同様に lobe が途中で細くなる表現型や、Class-I 型の表現型が観察された (補遺 図 20B)。

dock のアモルフのアリルのホモ変異体では、Posterior arrest に分類される表現型が高頻度で観察され (補遺 図 20D-D', F)、Class-I 型、II 型に分類される軸索束伸長異常や (補遺 図 20C)、主たる lobe とは独立に脳間部へ向かって斜め方向に投射する線維束 (補遺 図 20C', 黄矢印) などを示す個体も観察された。

本変異をヘテロに持ち、かつ sickie が機能欠失した系統では、Class-II 型の浸透率が増加し、sickie 変異体では観察されない Posterior arrest の表現型も少数観察された (補遺 図 20E,F)。これらの結果は、キノコ体の軸索伸長制御において Sickie と Dock が協調的に機能しうることを示唆している。



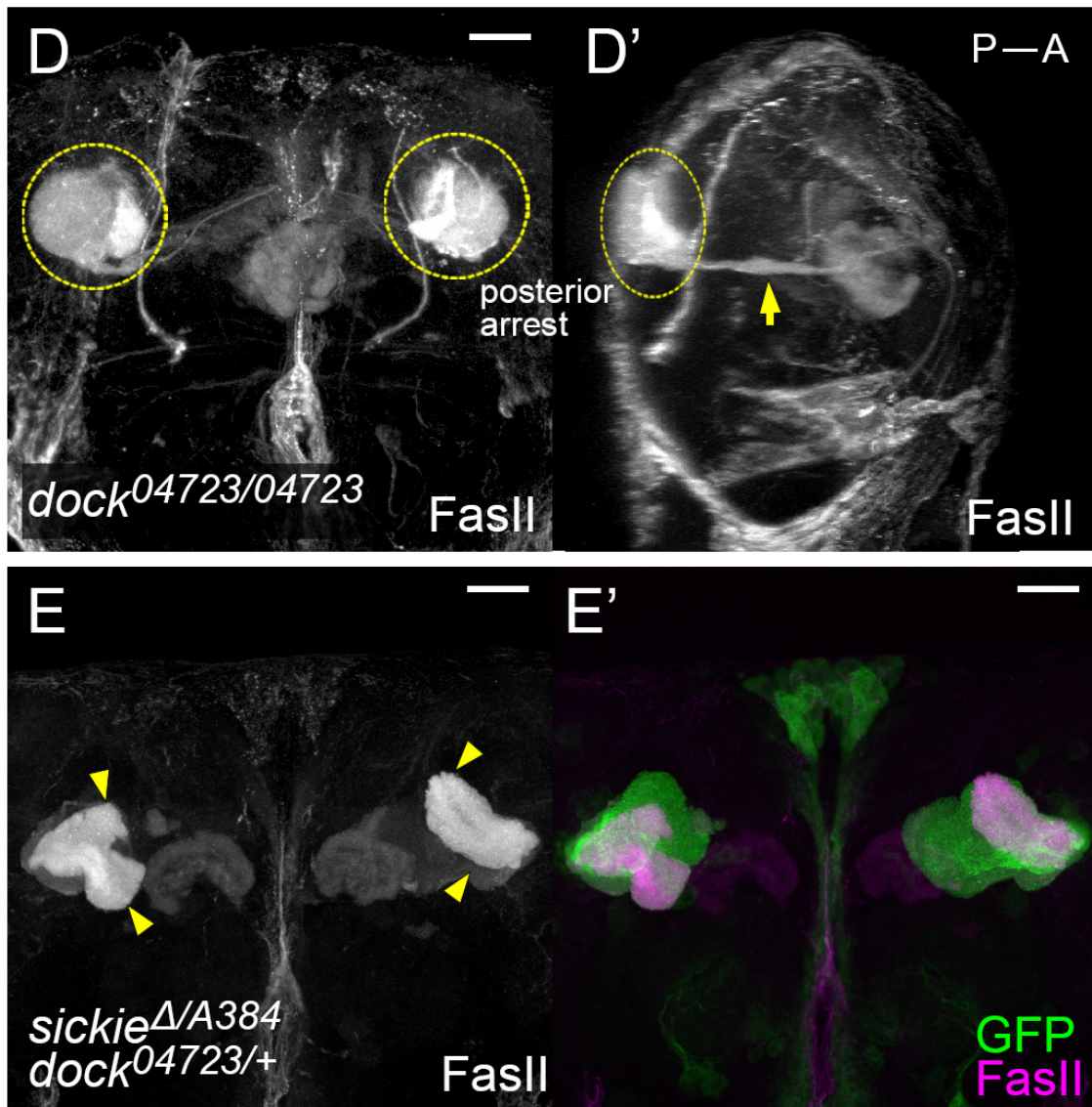
補遺 図 20.

(A) *dock* のヘテロ変異体は目立った軸索形成異常を示さない。

(B) キノコ体で *dock* の RNA 干渉を誘導したところ、*Pak* 変異体と同様に lobe が途中で細くなる表現型や、Class-I 型の表現型が観察される。

(C-C') *dock* のアモルフのアリルのホモ変異体では、Class-I 型、II 型に分類される軸索束伸長異常や、主たる lobe とは独立に脳間部へ向かって斜め方向に投射する線維束 (黄矢印) などを示す個体も観察された。

Scale bars, 20 μ m.



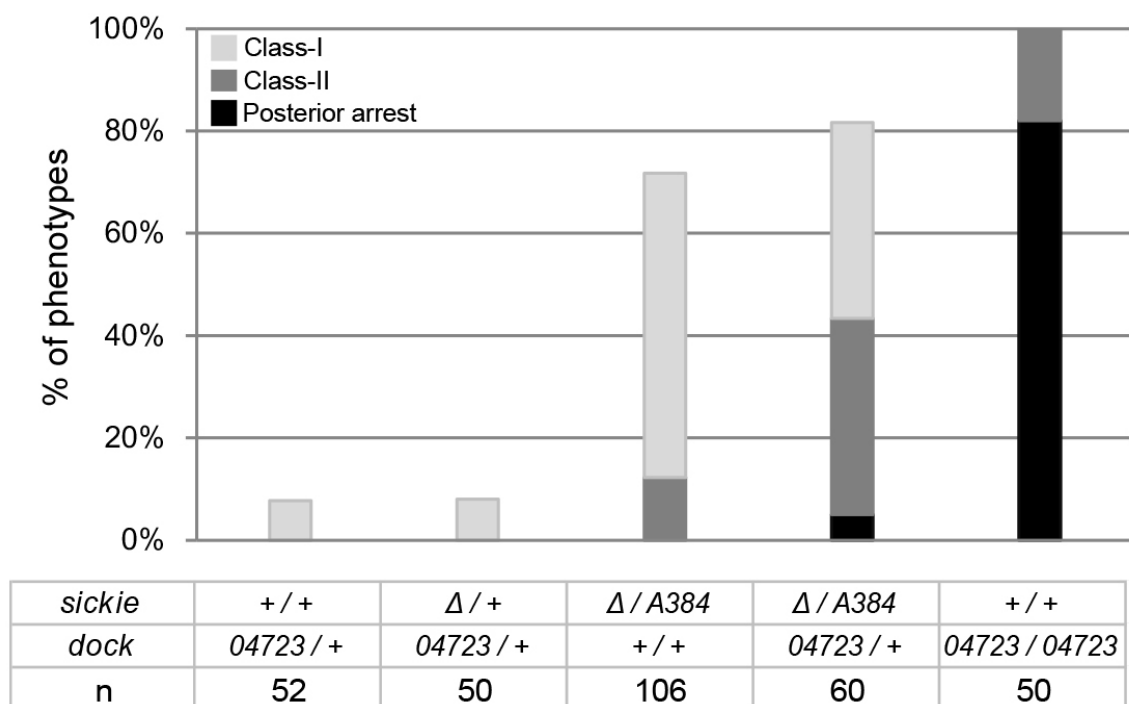
補遺 図 20.

(D-D') 同 *dock* ホモ変異体では、Posterior arrest に分類される表現型が高頻度で観察された。

(E-E') *dock* 変異をヘテロに持ち、かつ *sickie* が機能欠失した系統で観察された Class-II 型の表現型。

Scale bars, 20 μ m.

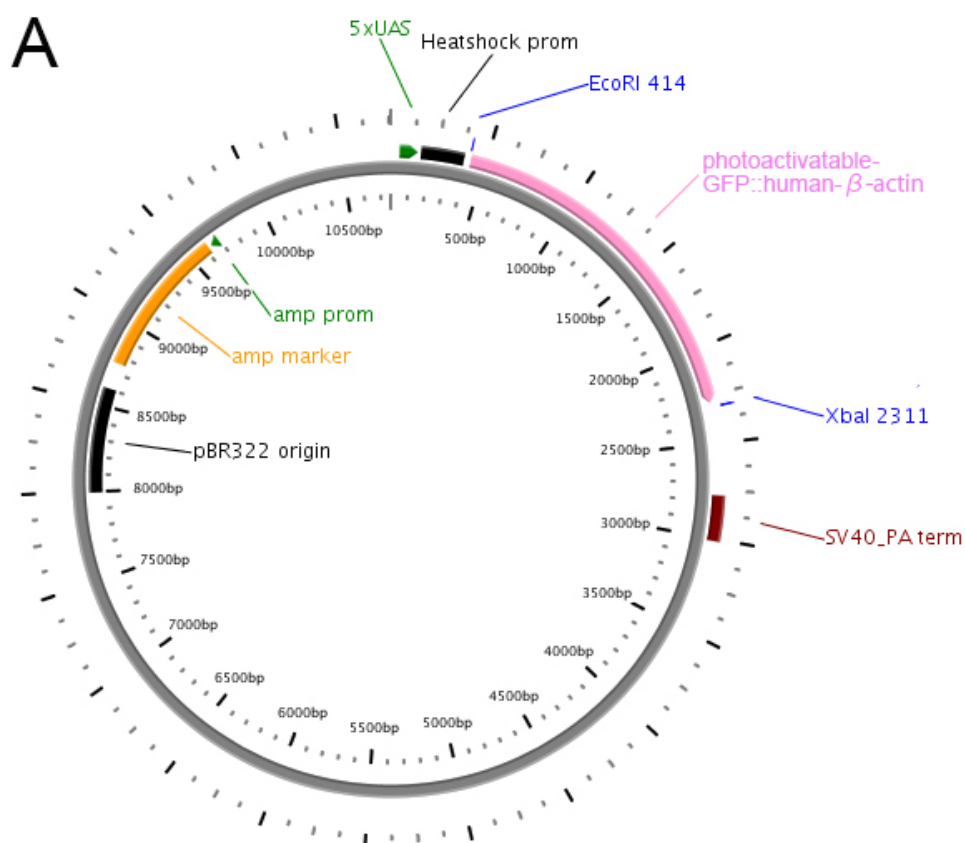
F



遺伝学的相互作用の検討。*dock* 変異をヘテロにもち *sickie* が機能欠失した系統では、Class-II 型の浸透率が増加し、*sickie* 単独の変異体では観察されない Posterior arrest の表現型も少数観察された

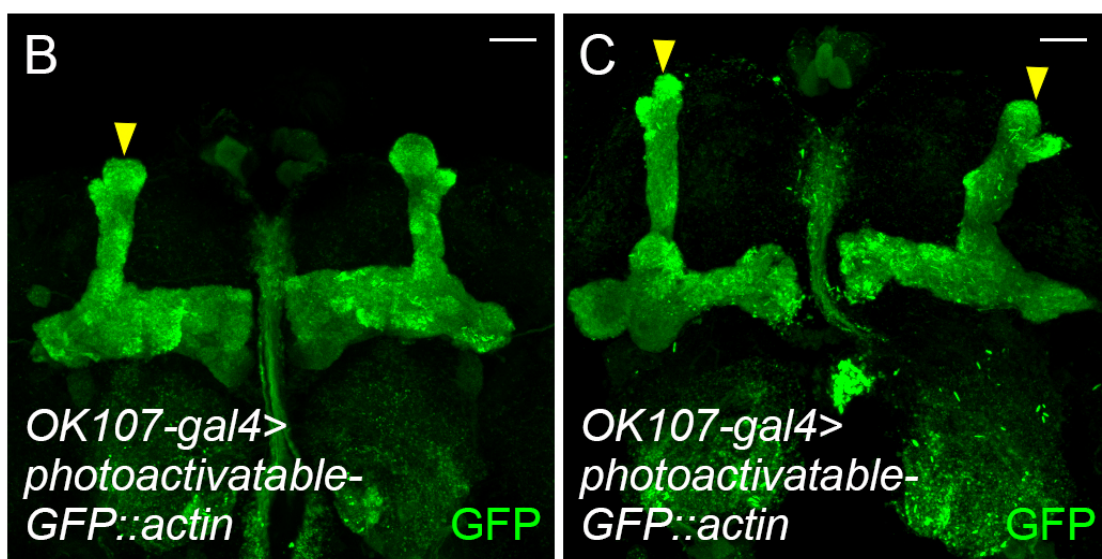
3.15 (補遺) Sickie に関するその他の解析結果

Sickie の分子機能を細胞生物学的側面から明らかにするために、発生過程の神経軸索で Sickie が Actin に対してどのような作用を及ぼすかを解析することを検討した。光活性化型 GFP を融合させたヒト β -actin を pUAST ベクターに導入し (補遺 図 21A)、キノコ体で発現させ、Sickie の機能欠失あるいは過剰発現により遺伝学的摂動を与えイメージングを行うことを計画したが、本融合タンパク質を *OK107-gal4* 依存的にキノコ体で過剰発現させた場合、lobe 構造が細くなったり投射方向がおかしくなったりする軸索束の形成異常が見られることが明らかになり、以降の解析を中止した (補遺 図 21B,C)。



補遺

図 21.(A) 光活性化型 GFP を融合させたヒト Actin を pUAST ベクターに導入した。

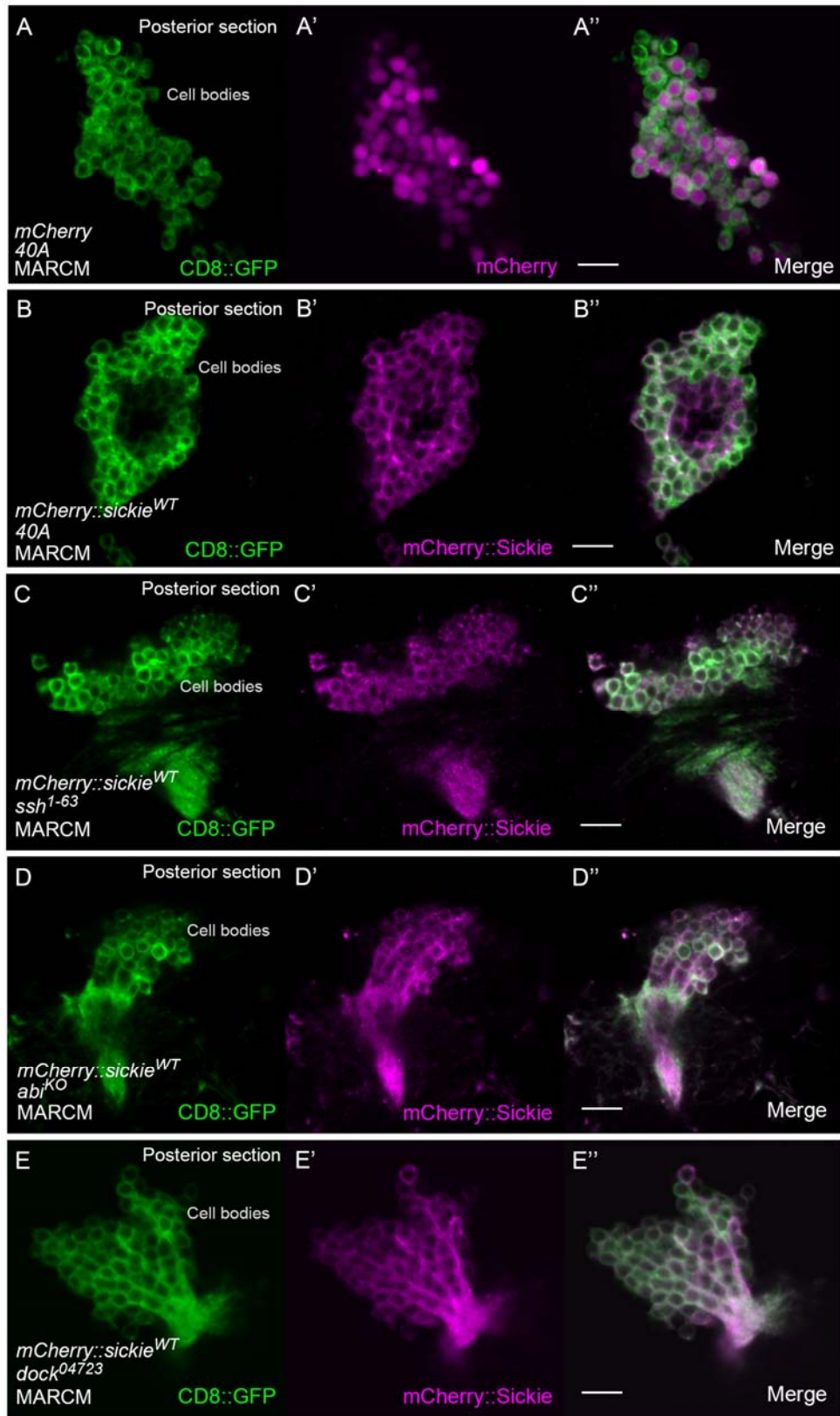


補遺 図 21.(B,C) *OK107-gal4* 依存的に *photoactivatable-GFP::human β -actin* をキノコ体で過剰発現させた場合、キノコ体の形成に異常が見られた。Scale bars, 20 μ m。

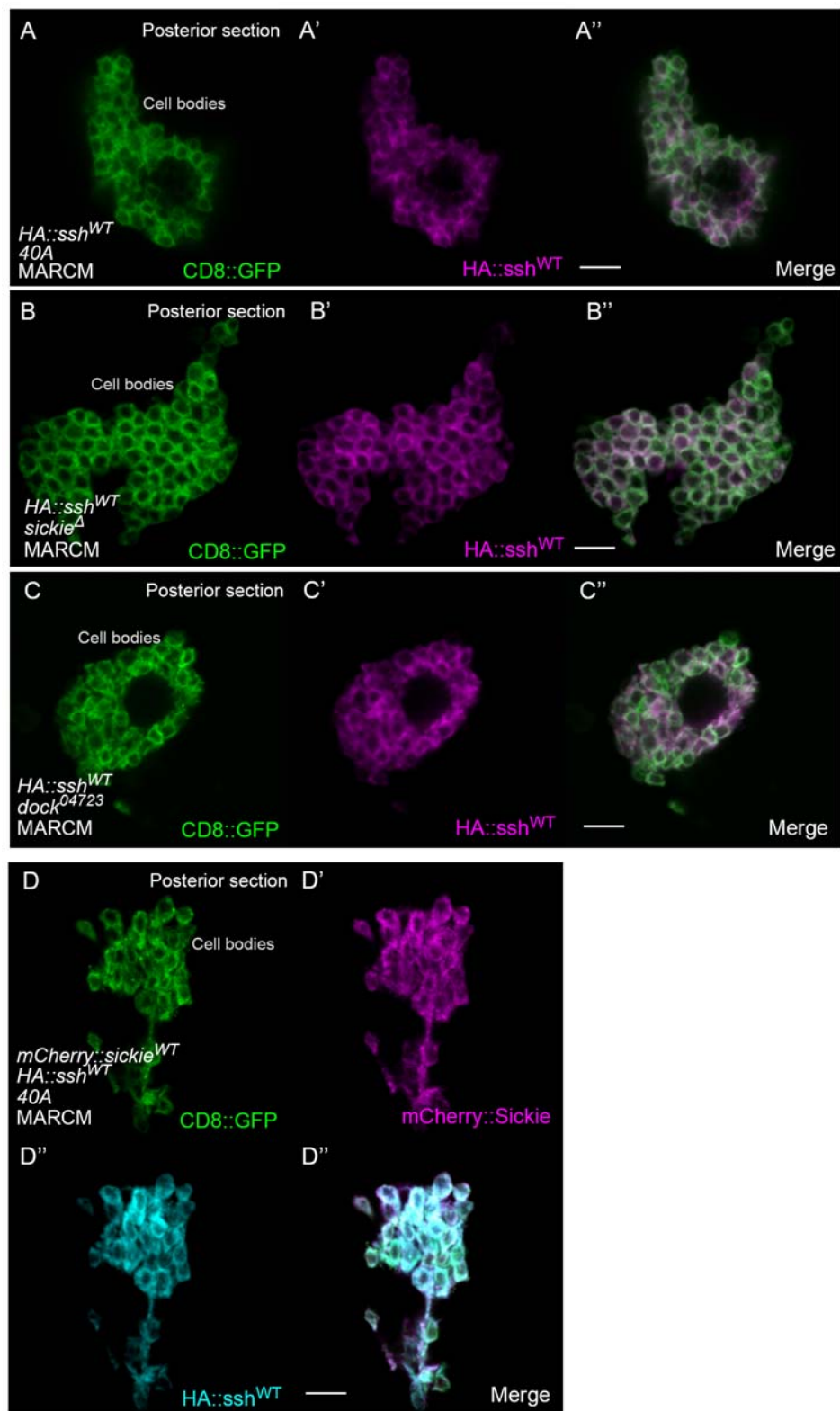
内在性の発現パターンとして、Sickie は新生の神経軸索で強い発現を示すことが明らかになったが、より微細なレベルでの細胞内での局在は不明であった。そこで、mCherry 融合型 Sickie をキノコ体で MARCM 法を用いて発現させ、軸索束に比べ変化の検出が相対的に容易であると考えられる細胞体領域での局在変化を調べることにした。mCherry を野生型クローンで発現させると、細胞質全体にわたってシグナルが観察された（補遺 図 22A'）。一方、mCherry 融合型 Sickie を発現させた場合、CD8::GFP でラベルされ、相対的に F-actin に富む細胞膜とその近傍の細胞質で顕著な mCherry::Sickie のシグナルが検出された（補遺 図 22B'）。このような局在パターンが、*sickie* と相互作用すると考えられる *ssh* をはじめ、*abi*, *dock* の変異体クローンで変化するかどうか調べたが、明瞭な変化を検出することはできなかった（補遺 図 22C',D',E'）。

Ssh の機能制御に Sickie が具体的にどう関わっているかを検討するため、同様の手法で、Ssh をクローンで強制発現させる実験を行った。培養細胞の系において、Ssh の細胞内局在が 14-3-3 タンパク質に調節され変化することが観察されていたためである（Mizuno, 2013; Soosairajah et al., 2005）。野生型条件下で過剰発現された Ssh^{WT} は F-actin に富む細胞膜領域とその近傍で顕著なシグナルが観察された（補遺 図 23A'）。このような細胞体領域における局在様式が *sickie* や *dock* の変異体クローンにおいて変化するかどうかを調べたが、いずれの変異体下でも、明瞭な Ssh^{WT} の局在様式の変化は検出できなかった（補遺 図 23B',C'）。

最後に、Sickie、Ssh を強制発現したクローンで、CD8::GFP でラベルされる細胞膜とその近傍の細胞質領域において、Sickie、Ssh のシグナルを同時に検出した（補遺 図 23D-D''）。



補遺 図 22.(A-E) *ssh*, *abi*, *dock* の変異体において Sickie の明瞭な局在変化は検出できなかった。*dock*⁰⁴⁷²³ は *FRT40A* にのせかえたものを用いた。Scale bars, 20 μ m.



補遺 図 23. (A-C) *sickie*、*dock* の変異体クローンにおいて Ssh^{WT} の明瞭な局在様式の変化は検出できなかった。(D) Sickle、Ssh を強制発現したクローンでは(D) CD8:GFP と (D') Sickle、(D'') Ssh のシグナルが重なった。Scale bars, 20 μ m.

4. 考察

4.1 actin 細胞骨格を介したキノコ体神経軸索の伸長における非古典的 Rac-Cofilin 経路の役割

本研究では、Sickie が新生のキノコ体神経軸索において機能し、その伸長を非古典的 Rac-Cofilin 経路依存的な F-actin の再構成を介して制御することを示唆する結果を得た。これに加え、これまで明らかになっている知見も踏まえ以下の制御モデルを提起する（図 68）。野生型個体では、Sickie は古典的 Rac-Pak-LIMK 経路に拮抗的に機能する非古典的 Rac 経路を Ssh に仲介することで、F-actin を介した軸索伸長を正に制御している（左図）。*sickie* 変異体においては、この非古典的 Rac-Sickie-Ssh 経路の仲介が損なわれることで Cofilin 活性の制御のバランスが崩れ、機能が低下し、軸索伸長が阻害されていると考える（右図）。

種々の細胞において、細胞骨格を構成する actin の存在量には上限があることが予想され、また、軸索や樹状突起をもつ神経細胞は形態学的な極性が相対的に大きい細胞種であると考えられる（Bugyi and Carlier, 2010）。このため発生過程の神経軸索においては、actin 骨格の再構成がより効率的に制御されることが重要なかもしれない。これを支持する結果として、キノコ体で *actin* の RNA 干渉を誘導すると 25°C の誘導条件下では Class-I 型や II 型の軸索伸長異常が観察されたのに対し（図 28A-A'）、より *actin* の発現量が低下していることが予想される 29°C 条件下では Posterior arrest 型の異常が観察されていることが挙げられる（図 28B-B'）。また、actin の RNA 干渉と *sickie* の欠失を同時に誘導した変異体で Class-II 型や Posterior arrest 型の出現頻度が増加していることか

ら（図 28C）、キノコ体や EB のような中枢神経系の伸長中の神経細胞軸索においては、非古典的 Rac-Sickie-Ssh 経路と古典的 Rac-Pak-LIMK 経路のバランスが適切に保たれることで Cofilin の活性が調節され、actin 骨格の再構成が制御されている可能性がある。加えて、*LIMK^{WTM6}ssh¹⁻⁶³* や *LIMK* 過剰発現 *sickie* 機能欠失などの 2 重変異体では、*sickie*、*ssh*、*LIMK* の単独の変異体と比べ、より重篤な軸索伸長異常の表現型を伴って、リン酸化 Cofilin のシグナルの上昇が観察されている（図 48E'', 39E'', 47B''）。2 重変異体の神経軸索では、非古典的 Rac-Sickie-Ssh 経路に対し古典的 Rac-Pak-LIMK 経路が優勢となることで、Cofilin のリン酸化制御のバランスが崩れ、活性が低下していることが予想される。Cofilin の活性制御機構における古典的 Rac 経路への拮抗的要素として、非古典的 Rac-Sickie-Ssh 経路が必須の役割を担っていることが推察される。

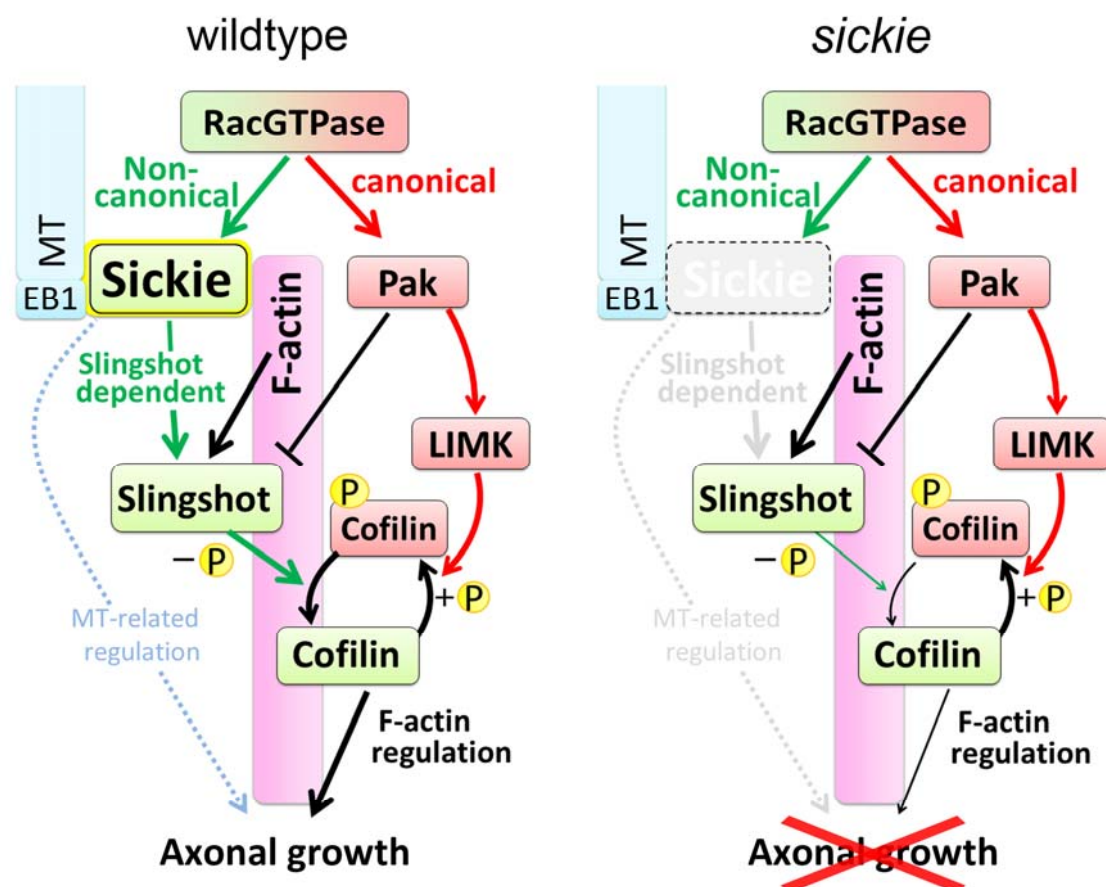


図 68. 神経軸索伸長における Rac-Cofilin 経路のモデル。正常型個体のキノコ体神経軸索では、非古典的 Rac-Sicking-Ssh 経路(緑矢印)が古典的 Rac-Pak-LIMK 経路(赤矢印)に対して拮抗的にはたらくことで、Cofilin のリン酸化、脱リン酸化による活性制御のバランスが適切に保たれ、F-actin の再構成を介した軸索伸長がなされる。*sickie* 変異体下では、Pak 非依存的 Rac 経路が正常に機能しないことや、Ssh の機能調節への Sicking の寄与が失われることで、軸索における Ssh の活性が低下し、Cofilin の活性制御のバランスが崩れ、結果、F-actin 制御が異常となり、軸索伸長が阻害されている可能性がある。Sicking から下流に点線で示される微小管(MT)を介した伸長制御の機構は、今後より詳細な解析が必要であると考えられる経路。

4.2 生体神経軸索におけるリン酸化 Cofilin と F-actin の発現変化の同時検出

ssh 変異体の神経軸索ではリン酸化 Cofilin のシグナルの顕著な上昇が観察されたのに対し (図 39A’), *LIMK* 恒常活性化型変異体の神経軸索では、より強い F-actin レベルの上昇を示しているにもかかわらず (図 39D’), リン酸化 Cofilin の明らかな上昇が観察されなかった (図 39D’’)。この一見矛盾するように考えられる結果は、F-actin の結合による Ssh の活性化機構を考慮すれば、一つの仮説が考えられる。過去の生化学的な解析で、Ssh の活性は F-actin の添加によって 1,200 倍以上に増加するという報告がなされており (Nagata-Ohashi et al., 2004; Yamamoto et al., 2006)、*LIMK* 恒常活性化型変異体の神経軸索では、Cofilin のリン酸化が亢進し活性が低下することで F-actin は増加し (図 39D’), 軸索伸長は阻害されたが、結果的にこの蓄積した F-actin の結合によって内在性の Ssh が活性化されることで、Cofilin の脱リン酸化が進み、明瞭なリン酸化 Cofilin のレベルの上昇が観察されなかった可能性がある。この仮説と矛盾しない結果として、先も述べたように *LIMK^{WTM6}ssh¹⁻⁶³* 2 重変異体において非常に高いリン酸化 Cofilin と F-actin が同時に検出されていることがあげられる (図 48E’,E’’)。この 2 重変異体においては、脱リン酸化酵素である Ssh の不在により、*LIMK* 恒常活性化による Cofilin のリン酸化が一方的に進み、その活性が著しく低下し、F-actin が蓄積することで、*cofilin-RNAi* 変異体に見られたような Posterior arrest 型の重篤な軸索伸長異常 (図 48E’’) が起こっていると推察される。加えて、*LIMK* 過剰発現 *sickie* 機能欠失 2 重変異体においてもリン酸化 Cofilin のシグナルの上昇が観察されている (図 39E’’, 47B’’)。これらの結果は、Sickie が Cofilin の活性を正に制御する際 Ssh と同一の経路で機能し、内在性の Ssh の機能制御に寄与することで、古典的 Rac-Pak-LIMK 経路に対し

て拮抗的に作用するというモデル (図 68 左) を支持している。*sickie* 変異体の神経軸索では、Pak 非依存的な Rac の機能が正常に発揮されないために、下流の Ssh の機能が低下し、古典的 Rac-Pak-LIMK 経路が Cofilin 活性を低下させることで伸長阻害が起こっている可能性が考えられる (図 68 右)。

また、*LIMK^{WTM6}ssh¹⁻⁶³* 2 重変異体において観察されたリン酸化 Cofilin と F-actin レベルの上昇、Posterior arrest 型の重篤な軸索伸長異常は、*Pak* 恒常活性化変異体 *Pak^{Myr}* の表現型 (図 39F-F'') に類似していた。さらに *Pak^{Myr}ssh^{WT}* 過剰発現 2 重変異体クローンでは、*Pak^{Myr}* 単独の変異体と同様に Posterior arrest 型の軸索伸長阻害が観察され、リン酸化 Cofilin と F-actin のレベルが上昇していることが確認されている (補遺 図 19A'',B'',B')。以上の結果は、ヒトの Pak-4 が Slingshot-1L を不活性化するという生化学的研究の報告と矛盾しない (Soosairajah et al., 2005; Van Troys et al., 2008)。このため、今回われわれが提唱するモデルでも、神経軸索の伸長において、ショウジョウバエの Pak は LIMK を活性化すると同時に、Ssh に対し抑制的に作用しているとした (図 68)。

4.3 Sickie の未知の分子機能

ssh や *cofilin* の全身変異体は胚性致死であり、これらの変異体クローンは上皮などの非神経系においても発生学的異常を示す (Corrigall et al., 2007; Nagel et al., 2010; Niwa et al., 2002)。一方、*sickie* 全身変異体は胚性致死とならず、発生学的な異常はキノコ体や EB などの中枢神経系組織に顕著に観察されている。このことは、Ssh や Cofilin が actin 骨格制御機構の必須因子として広範な組織・細胞種において機能を発現しているのに対し、Sickie は、脳などの物理的構造がより複雑な環境下で、神経細胞が形態的に大きな構造変化をおこす際に、より精巧で円滑な actin 骨格の制御を実現するために機能を発揮している可能性がある。抹消の神経系と比較した際、キノコ体神経は密に束状化された軸索線維束を形成していると考えられ、Sickie は新生の神経軸索において actin 骨格と微小管骨格の再構成の統合的な制御に関わり、狭い軸索束の内部を新生の線維がよりスムーズに伸長し通過できるように寄与しているのかもしれない。Sickie のホモログである NAV は当初、微小管結合タンパクとして単離されてきており (Maes et al., 2002; Martinez-Lopez et al., 2005; van Haren et al., 2009)、事実、Sickie、NAV とともに微小管+端に集積する EB1 との SxIP 結合モチーフを保存しており (図 15)、Sickie が軸索束伸長において EB1 や β -tubulin と遺伝学的に相互作用することを確認している (図 52,53)。最近の細胞生物学的な解析によると、束状化された微小管が伸長するための空間が Cofilin の活性によって調節されていることが示唆されることから、Cofilin と微小管には機能的な関連があることが提唱されている (Flynn et al., 2012)。EB1 との結合を介して、Sickie は微小管+端を Rac-Cofilin 経路によって制御される actin 骨格へとリンクさせるための先導役としての役割を持っており、その結果として脳形

成における精巧な回路構築が実現しているのかもしれない。

神経軸索形成における複数のシグナル伝達経路による制御機構を統合的に理解するためには、今回示した以外の、Cofilin 経路と関連がある因子との関係を調べる必要があるとなる。これまでの報告によると、Protein Kinase-D、14-3-3 protein、Pak4 が Ssh の機能の抑制において重要な役割を担うことが示唆されている (Eiseler et al., 2009; Kligys et al., 2009; Spratley et al., 2011)。近年の生化学的解析の報告によると Sickie の哺乳類ホモログである NAV2 は 14-3-3 と、NAV1 は RacGEF である TRIO と結合することが示されており (Marzinke et al., 2013; van Haren et al., 2014)、これら因子はより詳細な Sickie の分子機能に迫るための解析候補と考えられる。また、Ssh や LIMK 以外の Cofilin 脱リン酸化、リン酸化酵素である、Chronophin や TESKs といった因子も神経系での発現が報告されており (Gohla et al., 2005; Huang et al., 2008; Toshima et al., 2001a; Toshima et al., 2001b)、これらの因子との相互作用の解析も必要であると考えられる。

最後に、発生が完了した成体脳における Sickie の役割について考察する。現在、本研究室で稼動している電気ショックとにおい刺激による連合学習による記憶形成の実験系で、温度依存的 Gal80 と RNA 干渉法を組み合わせることで、成体脳キノコ体特異的に *sickie* の RNA 干渉を行ったところ、記憶学習能が低下することが確認されている (山崎氏、未発表データ)。これに関連して、Rac、Cofilin が記憶の忘却において機能していることを示す事例が報告されているため (Shuai et al., 2011; Shuai et al., 2010)、発生後の記憶学習の分子機構の制御においても Sickie が Rac-Cofilin 経路と関わっている可能性が考えられる。また、哺乳類ホモログ NAV に関して、NAV と Cofilin が神経変性疾患に関与する可能性が提唱されている。アルツハイマー病の症状を示す脳においては、

NAV3 の発現制御を抑制する MiR-29a が減少し、NAV3 転写産物のレベルが上昇していることや、Cofilin-actin rod-shaped inclusion が豊富に存在することが報告されている (Maloney and Bamburg, 2007; Minamide et al., 2000) 。 Cofilin-actin rod-shaped inclusion は Cofilin 脱リン酸化因子 Chronophin による Cofilin の過剰活性化によって形成されることが報告されているため、NAV/Sickie と Chronophin がどのような相互作用を及ぼしうるかも今後研究されるべき問題の一つと考えられる (Bernstein et al., 2012; Davis et al., 2011; Jang et al., 2005)。次第にその役割が明らかになりつつある Sickie/NAV だが、今後も種々の生物の多様な実験系で解析がなされ、中枢神経系における発生機構の制御と高次機能発現の両面における詳細な分子機能が明らかになっていくことを期待したい。

5. 結論

本研究では、ショウジョウバエキノコ体の神経軸索束の形成をモデルとして、軸索伸長において重要な役割を持つ因子 **Sickie** の分子遺伝学的な解析を行った。本研究の主たる結果を以下に示す。

(1) エンハンサートラップスクリーニングと *in situ* hybridization を用いた発現解析から、キノコ体神経軸索束の形成に関わる候補因子として **Sickie** を同定した。

(2) FLP-FRT 法により *sickie* の機能欠失変異体を作成し表現型を解析したところ、キノコ体軸索束の形成異常が観察された。MARCM 法により単一細胞レベルで確認したところ、軸索伸長阻害が起きていることが明らかになった。

(3) **Sickie** 抗体を作成し組織染色を行った結果、脳全体で広範に発現が観察され、キノコ体新生神経の軸索において特に顕著な発現が検出された。

(4) **Sickie** の野生型や変異型の UAS 系統を作成しレスキュー実験を行った結果、**Sickie** は新生神経で機能し、その C 末端側に存在する AAA ドメインの機能が重要であることが示唆された。

(5) **Sickie** は新生のキノコ体神経の軸索で占められる軸索束中心領域において顕著な発現を示し、F-actin の発現と重なった。

(6) *actin* の RNA 干渉による軸索伸長阻害の表現型が *sickie* の機能欠失により増強されたことや、*Rac*、*Cofilin* と強い遺伝学的相互作用を示した際に *actin* のノックダウン時と同様の重篤な軸索伸長阻害が観察されたことから、*actin* 骨格の制御を介した軸索伸長制御に関与する可能性が示唆された。

(7) 全身変異体、MARCM 変異体を用いた解析から、*sickie* および *Rac-Cofilin* シグナル経路構成因子の各種変異体の神経軸索では、F-*actin* の発現レベルが上昇していることが明らかになり、*Sickie* が F-*actin* の制御を介した軸索伸長に関与することが示唆された。

(8) MARCM 法を用いた解析から、*ssh* 変異体、*Rac* 恒常活性化型変異体、*Pak* 恒常活性化型変異体の神経軸索では、リン酸化 *Cofilin* の発現レベルの上昇が観察されたのに対し、*sickie* 変異体では明らかな上昇が観察されなかった。また、*ssh* 変異体より強い F-*actin* レベルの上昇が継続していた *LIMK* 恒常活性化型変異体においても、リン酸化 *Cofilin* の際立った上昇は観察されなかった。

(9) *sickie* 全身変異体の蛹期の脳で Western blotting を行ったところ、コントロールの *yw* 系統の脳に比べリン酸化 *Cofilin* の発現レベルが約 1.8 倍に上昇しており、*Sickie* が *Cofilin* の脱リン酸化に寄与していることが示唆された。

(10) *LIMK* 過剰発現 *sickie* 機能欠失 2 重変異体においては、リン酸化 *Cofilin* と F-*actin* の上昇が検出され、これらの単独の変異体と比較して免疫組織化学レベルで検出できる程度まで *Cofilin* の活性が低下していること、*Sickie* は *LIMK* と逆方向に作用するはたらきを持つことが推察された。加えて、F-*actin* とリン

酸化 Cofilin のシグナルレベルの上昇の程度は必ずしも相関しないことが示唆された。

(11) *sickie* 変異体において人為的に Cofilin を機能亢進させることにより表現型の緩和効果が確認されたことから、Sickie は遺伝学的には Ssh、Cofilin の下流に存在していないことが示唆された。

(12) LIMK の強制発現によって惹起される軸索伸長異常と F-actin レベルの上昇が Sickie の共発現によって緩和されたことから、Cofilin 依存的な F-actin 制御を介した軸索伸長において、Sickie は Ssh や Pak 非依存的 Rac と同様に促進的に機能している可能性が示された。

(13) LIMK の強制発現による軸索伸長異常と F-actin レベルの上昇が、Pak 非依存的 Rac または Ssh の共発現によって緩和される効果が、Sickie 変異体下では阻害されたことから、非古典的 Rac、Ssh が LIMK に拮抗的に作用するためには Sickie が必要であることが明らかになり、Sickie が非古典的 Rac 経路を Ssh へ仲介している可能性が示された。

(14) LIMK の強制発現による軸索伸長異常と F-actin レベルの上昇が、Sickie の共発現によって緩和される効果が、*ssh* 変異体下では観察されなかったことから、Sickie は Ssh 依存的に Cofilin と F-actin を介した軸索伸長において促進的に機能していることが示唆された。

(15) *sickie^Δssh¹⁻⁶³* 2重変異体では、*LIMK^{WTM6}ssh¹⁻⁶³* 2重変異体において観察されたようなリン酸化CofilinとF-actinレベルの高い上昇や、Posterior arrest型の重篤な軸索伸長異常は観察されなかった。また、*sickie^{WT}*過剰発現*ssh¹⁻⁶³* 2重変異体、*Rac1^{Y40C}* 過剰発現*ssh¹⁻⁶³* 2重変異体のいずれにおいても、軸索伸長異常の明らかな緩和効果は観察されず、リン酸化CofilinとF-actinのシグナルの上昇が観察された。以上から、Cofilin依存的なF-actinの制御を介した軸索伸長制御において、SickieとPak非依存的RacはSsh依存的に機能していることが示唆された。

(16) *EB1* や *β-tubulin* の RNA 干渉誘導個体において *sickie* 変異体に類似の軸索束の形成異常が観察され、*sickie* の RNA 干渉を同時に誘導すると Class-II 型の表現型の出現や Class-I 型の浸透率の増加が起こったことや、Sickie と EB1 を共発現した際、各々を単独で発現させた場合に比べ lobe が過剰伸長する表現型が観察されたことから、Sickie が EB1 や *β-tubulin* といった微小管構成因子と遺伝学的に相互作用することが示唆された。

以上の結果から、Sickie は非古典的 Rac-Sickie-Ssh 経路を構成し古典的 Rac-Pak-LIMK 経路に拮抗的に作用することで、Cofilin の活性制御のバランスが調節され円滑な actin 骨格の再編成がおこり、同時に、微小管制御因子とも相互作用することで、中枢神経系における神経軸索の伸長を制御していると考えられた。

6. 謝辞

はじめに、本研究を行うにあたり、恵まれた研究環境と長期にわたる支援によって忍耐強く見守ってくださった多羽田哲也教授のご厚意に、心より深謝申し上げます。膨大な時間を要してしまいましたが、ショウジョウバエを用いた研究の醍醐味である、スクリーニングから候補因子の同定、遺伝学的解析、モデルの提唱という一連の過程を完遂することができたことは貴重な経験であり、今後も研究を続けていく上での私の大きな財産となりました。そして、論文として研究成果をまとめる段階でも、基本的な文法的作法から文章の論理の構成や展開、表現技法など、様々な重要な事項を先生から直接ご指導いただけたことは非常に得難い経験でした。重ねて感謝申し上げます。また、学部生時代に分子生物学の基礎を指導してくださり、発生生物学に興味を持つきっかけを与えてくださった東北大の鈴木徹教授に感謝申し上げます。仙台で開催された発生学会への参加を提案してくださったことで、現在の自分があると思います。

多羽田研のメンバー、OB・OGの方々から大変お世話になりました。村上智史先生、山崎大介先生、廣井誠先生からは、研究に対する慎重な思考法や技術的なサポート、多くのアドバイスをいただきました。前山有子先生にはエンハンサートラップシステムの初期のスクリーニング、ラボストックの維持などでも大変お世話になりました。佐藤純先生、吉田章子先生からは解剖の手法、系統樹立の方法など多くの基本的実験技法を教わりました。大坪真樹さん、八杉徹雄先輩、梅津大輝先輩、杉江淳先輩、河盛治彦先輩、小木曾由梨先輩、清水一道君からは多くの研究遂行上のアドバイスをいただきました。中林麻依さんにはショウジョウバエの飼料作製でお世話になりました。滝下仁美さん、高野かおりさん、河野真実子さん、真下圭緒里さんには事務手続きの際に大変お世話

になりました。スクリーニング、変異体の表現型解析の初期段階、Cofilin の制御機構に関する考察等において、栗崎健先生、上村匡先生、佐藤純先生、林貴史先生、鈴木崇之先生よりたくさんの貴重なアドバイスをいただきました。ショウジョウバエの系統および研究試薬を分与してくださった下記の先生方に深く御礼申し上げます。上村匡先生、C. Desplan 博士、Frank Laski 博士、H. Hing 博士、J. Ng 博士、J.L. Juang 博士、L. Luo 博士、M. Peifer 博士、T. Lee 博士、U. Haecker 博士。また、下記のショウジョウバエストックセンターの方々へ感謝申し上げます。Kyoto DGRC、NIG-Fly、Bloomington stock center、Berkeley Drosophila Genome Project、Exelixis Collection at Harvard medical school、Vienna Drosophila RNAi Center の関係諸氏。一次抗体やプラスミドベクターを分与してくださった水野健作先生、伊藤啓先生、広海健先生、DSHB 関係諸氏へ御礼申し上げます。最後に、これまでの長い研究生生活を支え、辛抱強く見守ってくれた家族に心より感謝いたします。

7. 引用文献

- Aizawa, H., Wakatsuki, S., Ishii, A., Moriyama, K., Sasaki, Y., Ohashi, K., Sekine-Aizawa, Y., Sehara-Fujisawa, A., Mizuno, K., Goshima, Y., et al. (2001) . Phosphorylation of cofilin by LIM-kinase is necessary for semaphorin 3A-induced growth cone collapse. *Nat Neurosci* **4**, 367-373.
- Akhmanova, A. and Steinmetz, M. O. (2010) . Microtubule +TIPs at a glance. *Journal of Cell Science* **123**, 3415-3419.
- Ang, L. H., Chen, W., Yao, Y., Ozawa, R., Tao, E., Yonekura, J., Uemura, T., Keshishian, H. and Hing, H. (2006) . Lim kinase regulates the development of olfactory and neuromuscular synapses. *Dev Biol* **293**, 178-190.
- Aso, Y., Grubel, K., Busch, S., Friedrich, A. B., Siwanowicz, I. and Tanimoto, H. (2009) . The mushroom body of adult *Drosophila* characterized by GAL4 drivers. *J Neurogenet* **23**, 156-172.
- Auer, M., Hausott, B. and Klimaschewski, L. (2011) . Rho GTPases as regulators of morphological neuroplasticity. *Ann Anat* **193**, 259-266.
- Awasaki, T., Huang, Y., O'Connor, M. B. and Lee, T. (2011) . Glia instruct developmental neuronal remodeling through TGF-beta signaling. *Nat Neurosci* **14**, 821-823.
- 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.
- Banuelos, S., Saraste, M. and Djinojic Carugo, K.** (1998) . Structural comparisons of calponin homology domains: implications for actin binding. *Structure* **6**, 1419-1431.
- Bernard, O.** (2007) . Lim kinases, regulators of actin dynamics. *Int J Biochem Cell Biol* **39**, 1071-1076.
- Bernstein, B. W. and Bamburg, J. R.** (2010) . ADF/cofilin: a functional node in cell biology. *Trends Cell Biol* **20**, 187-195.
- Bernstein, B. W., Shaw, A. E., Minamide, L. S., Pak, C. W. and Bamburg, J. R.** (2012) . Incorporation of cofilin into rods depends on disulfide intermolecular bonds: implications for actin regulation and neurodegenerative disease. *J Neurosci* **32**, 6670-6681.
- Billuart, P., Winter, C. G., Maresh, A., Zhao, X. and Luo, L.** (2001) . Regulating axon branch stability: the role of p190 RhoGAP in repressing a retraction signaling pathway. *Cell* **107**, 195-207.
- Boquet, I., Boujemaa, R., Carlier, M. F. and Preat, T.** (2000) . Ciboulot regulates actin assembly during *Drosophila* brain metamorphosis. *Cell* **102**, 797-808.
- Boulanger, A., Clouet-Redt, C., Farge, M., Flandre, A., Guignard, T., Fernando, C., Juge, F. and Dura, J. M.** (2011) . ftz-f1 and Hr39 opposing roles on EcR expression during *Drosophila* mushroom body neuron remodeling. *Nat Neurosci* **14**, 37-44.
- Brand, A. H. and Perrimon, N.** (1993) . Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes.

Development **118**, 401-415.

Brock, A. R., Wang, Y., Berger, S., Renkawitz-Pohl, R., Han, V. C., Wu, Y. and Galko, M. J. (2012) . Transcriptional regulation of Profilin during wound closure in *Drosophila* larvae. *Journal of Cell Science* **125**, 5667-5676.

Bugyi, B. and Carlier, M. F. (2010) . Control of actin filament treadmilling in cell motility. *Annu Rev Biophys* **39**, 449-470.

Carlsson, L., Nystrom, L. E., Sundkvist, I., Markey, F. and Lindberg, U. (1977) . Actin polymerizability is influenced by profilin, a low molecular weight protein in non-muscle cells. *Journal of molecular biology* **115**, 465-483.

Chen, J., Godt, D., Gunsalus, K., Kiss, I., Goldberg, M. and Laski, F. A. (2001) . Cofilin/ADF is required for cell motility during *Drosophila* ovary development and oogenesis. *Nature cell biology* **3**, 204-209.

Cooley, L., Verheyen, E. and Ayers, K. (1992) . chickadee encodes a profilin required for intercellular cytoplasm transport during *Drosophila* oogenesis. *Cell* **69**, 173-184.

Corrigall, D., Walther, R. F., Rodriguez, L., Fichelson, P. and Pichaud, F. (2007) . Hedgehog signaling is a principal inducer of Myosin-II-driven cell ingression in *Drosophila* epithelia. *Dev Cell* **13**, 730-742.

Crowner, D., Le Gall, M., Gates, M. A. and Giniger, E. (2003) . Notch steers *Drosophila* ISNb motor axons by regulating the Abl signaling pathway. *Curr Biol* **13**, 967-972.

- Davis, R. C., Marsden, I. T., Maloney, M. T., Minamide, L. S., Podlisny, M., Selkoe, D. J. and Bamburg, J. R. (2011) . Amyloid beta dimers/trimers potently induce cofilin-actin rods that are inhibited by maintaining cofilin-phosphorylation. *Molecular neurodegeneration* **6**, 10.
- Dominguez, R. (2007) . The beta-thymosin/WH2 fold: multifunctionality and structure. *Ann NY Acad Sci* **1112**, 86-94.
- Dong, X., Stothard, P., Forsythe, I. J. and Wishart, D. S. (2004) . PlasMapper: a web server for drawing and auto-annotating plasmid maps. *Nucleic Acids Res* **32**, W660-664.
- Eiseler, T., Döppler, H., Yan, I. K., Kitatani, K., Mizuno, K. and Storz, P. (2009) . Protein kinase D1 regulates cofilin-mediated F-actin reorganization and cell motility through slingshot. *Nature Cell Biology* **11**, 545-556.
- Endo, M., Ohashi, K. and Mizuno, K. (2007) . LIM kinase and slingshot are critical for neurite extension. *J Biol Chem* **282**, 13692-13702.
- Endo, M., Ohashi, K., Sasaki, Y., Goshima, Y., Niwa, R., Uemura, T. and Mizuno, K. (2003) . Control of growth cone motility and morphology by LIM kinase and Slingshot via phosphorylation and dephosphorylation of cofilin. *J Neurosci* **23**, 2527-2537.
- Erzberger, J. P. and Berger, J. M. (2006) . Evolutionary relationships and structural mechanisms of AAA+ proteins. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* **35**, 93-114.
- Flynn, K. C., Hellal, F., Neukirchen, D., Jacob, S., Tahirovic, S., Dupraz, S., Stern, S., Garvalov, B. K., Gurniak, C., Shaw, A. E., et al. (2012) .

- ADF/cofilin-mediated actin retrograde flow directs neurite formation in the developing brain. *Neuron* **76**, 1091-1107.
- Foley, E. and O'Farrell, P. H.** (2004) . Functional Dissection of an Innate Immune Response by a Genome-Wide RNAi Screen. *PLoS Biology* **2**, e203.
- Garrity, P. A., Rao, Y., Salecker, I., McGlade, J., Pawson, T. and Zipursky, S. L.** (1996) . Drosophila photoreceptor axon guidance and targeting requires the dreadlocks SH2/SH3 adapter protein. *Cell* **85**, 639-650.
- Gertler, F. B., Bennett, R. L., Clark, M. J. and Hoffmann, F. M.** (1989) . Drosophila abl tyrosine kinase in embryonic CNS axons: a role in axonogenesis is revealed through dosage-sensitive interactions with disabled. *Cell* **58**, 103-113.
- Gohla, A., Birkenfeld, J. and Bokoch, G. M.** (2005) . Chronophin, a novel HAD-type serine protein phosphatase, regulates cofilin-dependent actin dynamics. *Nat Cell Biol* **7**, 21-29.
- Guven-Ozkan, T. and Davis, R. L.** (2014) . Functional neuroanatomy of Drosophila olfactory memory formation. *Learning & memory* **21**, 519-526.
- Hakeda-Suzuki, S., Ng, J., Tzu, J., Dietzl, G., Sun, Y., Harms, M., Nardine, T., Luo, L. and Dickson, B. J.** (2002) . Rac function and regulation during Drosophila development. *Nature* **416**, 438-442.
- Hall, A. and Lalli, G.** (2010) . Rho and Ras GTPases in axon growth, guidance, and branching. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **2**, a001818.
- Hanson, P. I. and Whiteheart, S. W.** (2005) . AAA+ proteins: have engine,

will work. *Nature reviews. Molecular cell biology* **6**, 519-529.

Heuer, J. G., Li, K. and Kaufman, T. C. (1995) . The Drosophila homeotic target gene centrosomin (cnn) encodes a novel centrosomal protein with leucine zippers and maps to a genomic region required for midgut morphogenesis. *Development* **121**, 3861-3876.

Hill, K. K., Bedian, V., Juang, J. L. and Hoffmann, F. M. (1995) . Genetic interactions between the Drosophila Abelson (Abl) tyrosine kinase and failed axon connections (fax) , a novel protein in axon bundles. *Genetics* **141**, 595-606.

Hing, H., Xiao, J., Harden, N., Lim, L. and Zipursky, S. L. (1999) . Pak functions downstream of Dock to regulate photoreceptor axon guidance in Drosophila. *Cell* **97**, 853-863.

Honnappa, S., Gouveia, S. M., Weisbrich, A., Damberger, F. F., Bhavesh, N. S., Jawhari, H., Grigoriev, I., van Rijssel, F. J., Buey, R. M., Lawera, A., et al. (2009) . An EB1-binding motif acts as a microtubule tip localization signal. *Cell* **138**, 366-376.

Hopmann, R. and Miller, K. G. (2003) . A balance of capping protein and profilin functions is required to regulate actin polymerization in Drosophila bristle. *Mol Biol Cell* **14**, 118-128.

Hsouna, A., Kim, Y. S. and VanBerkum, M. F. (2003) . Abelson tyrosine kinase is required to transduce midline repulsive cues. *J Neurobiol* **57**, 15-30.

Huang, T. Y., Minamide, L. S., Bamburg, J. R. and Bokoch, G. M. (2008) . Chronophin mediates an ATP-sensing mechanism for cofilin

- dephosphorylation and neuronal cofilin-actin rod formation. *Dev Cell* **15**, 691-703.
- Husson, C., Cantrelle, F. X., Roblin, P., Didry, D., Le, K. H., Perez, J., Guittet, E., Van Heijenoort, C., Renault, L. and Carlier, M. F. (2010) . Multifunctionality of the beta-thymosin/WH2 module: G-actin sequestration, actin filament growth, nucleation, and severing. *Ann NY Acad Sci* **1194**, 44-52.
- Ito, K., Awano, W., Suzuki, K., Hiromi, Y. and Yamamoto, D. (1997) . The *Drosophila* mushroom body is a quadruple structure of clonal units each of which contains a virtually identical set of neurones and glial cells. *Development* **124**, 761-771.
- Jang, D. H., Han, J. H., Lee, S. H., Lee, Y. S., Park, H., Lee, S. H., Kim, H. and Kaang, B. K. (2005) . Cofilin expression induces cofilin-actin rod formation and disrupts synaptic structure and function in *Aplysia* synapses. *Proc Natl Acad Sci USA* **102**, 16072-16077.
- Joneson, T., McDonough, M., Bar-Sagi, D. and Van Aelst, L. (1996) . RAC regulation of actin polymerization and proliferation by a pathway distinct from Jun kinase. *Science* **274**, 1374-1376.
- Kim, M. D., Kamiyama, D., Kolodziej, P., Hing, H. and Chiba, A. (2003) . Isolation of Rho GTPase effector pathways during axon development. *Developmental biology* **262**, 282-293.
- Klein, C., Mikutta, J., Krueger, J., Scholz, K., Brinkmann, J., Liu, D., Veerkamp, J., Siegel, D., Abdelilah-Seyfried, S. and le Noble, F. (2011) . Neuron navigator 3a regulates liver organogenesis during

- zebrafish embryogenesis. *Development* **138**, 1935-1945.
- Kligys, K., Yao, J., Yu, D. and Jones, J. C. (2009) . 14-3-3zeta/tau heterodimers regulate Slingshot activity in migrating keratinocytes. *Biochem Biophys Res Commun* **383**, 450-454.
- Kurusu, M., Awasaki, T., Masuda-Nakagawa, L. M., Kawauchi, H., Ito, K. and Furukubo-Tokunaga, K. (2002) . Embryonic and larval development of the *Drosophila* mushroom bodies: concentric layer subdivisions and the role of fasciclin II. *Development* **129**, 409-419.
- Kussick, S. J., Basler, K. and Cooper, J. A. (1993) . Ras1-dependent signaling by ectopically-expressed *Drosophila* src gene product in the embryo and developing eye. *Oncogene* **8**, 2791-2803.
- Lamarche, N., Tapon, N., Stowers, L., Burbelo, P. D., Aspenstrom, P., Bridges, T., Chant, J. and Hall, A. (1996) . Rac and Cdc42 induce actin polymerization and G1 cell cycle progression independently of p65PAK and the JNK/SAPK MAP kinase cascade. *Cell* **87**, 519-529.
- Lee, T., Lee, A. and Luo, L. (1999) . Development of the *Drosophila* mushroom bodies: sequential generation of three distinct types of neurons from a neuroblast. *Development* **126**, 4065-4076.
- Lee, T. and Luo, L. (1999) . Mosaic analysis with a repressible cell marker for studies of gene function in neuronal morphogenesis. *Neuron* **22**, 451-461.
- (2001) . Mosaic analysis with a repressible cell marker (MARCM) for *Drosophila* neural development. *Trends Neurosci* **24**, 251-254.
- Lee, T., Winter, C., Marticke, S. S., Lee, A. and Luo, L. (2000) . Essential

- roles of *Drosophila* RhoA in the regulation of neuroblast proliferation and dendritic but not axonal morphogenesis. *Neuron* **25**, 307-316.
- Liebl, E. C., Rowe, R. G., Forsthoefel, D. J., Stammler, A. L., Schmidt, E. R., Turski, M. and Seeger, M. A.** (2003) . Interactions between the secreted protein Amalgam, its transmembrane receptor Neurotactin and the Abelson tyrosine kinase affect axon pathfinding. *Development* **130**, 3217-3226.
- Lin, T. Y., Huang, C. H., Kao, H. H., Liou, G. G., Yeh, S. R., Cheng, C. M., Chen, M. H., Pan, R. L. and Juang, J. L.** (2009) . Abi plays an opposing role to Abl in *Drosophila* axonogenesis and synaptogenesis. *Development* **136**, 3099-3107.
- Luo, L., Liao, Y. J., Jan, L. Y. and Jan, Y. N.** (1994) . Distinct morphogenetic functions of similar small GTPases: *Drosophila* Drac1 is involved in axonal outgrowth and myoblast fusion. *Genes Dev* **8**, 1787-1802.
- Maes, T., Barcelo, A. and Buesa, C.** (2002) . Neuron navigator: a human gene family with homology to unc-53, a cell guidance gene from *Caenorhabditis elegans*. *Genomics* **80**, 21-30.
- Maloney, M. T. and Bamburg, J. R.** (2007) . Cofilin-mediated neurodegeneration in Alzheimer's disease and other amyloidopathies. *Molecular neurobiology* **35**, 21-44.
- Martinez-Lopez, M. J., Alcantara, S., Mascaro, C., Perez-Branguli, F., Ruiz-Lozano, P., Maes, T., Soriano, E. and Buesa, C.** (2005) . Mouse neuron navigator 1, a novel microtubule-associated protein involved in neuronal migration. *Mol Cell Neurosci* **28**, 599-612.

- Marzinke, M. A., Mavencamp, T., Duratinsky, J. and Clagett-Dame, M.**
(2013) . 14-3-3epsilon and NAV2 interact to regulate neurite outgrowth and axon elongation. *Arch Biochem Biophys* **540**, 94-100.
- McNeill, E. M., Klockner-Bormann, M., Roesler, E. C., Talton, L. E., Moechars, D. and Clagett-Dame, M.** (2011) . Nav2 hypomorphic mutant mice are ataxic and exhibit abnormalities in cerebellar development. *Dev Biol* **353**, 331-343.
- McNeill, E. M., Roos, K. P., Moechars, D. and Clagett-Dame, M.** (2010) . Nav2 is necessary for cranial nerve development and blood pressure regulation. *Neural Dev* **5**, 6.
- Minamide, L. S., Striegl, A. M., Boyle, J. A., Meberg, P. J. and Bamburg, J. R.**
(2000) . Neurodegenerative stimuli induce persistent ADF/cofilin-actin rods that disrupt distal neurite function. *Nat Cell Biol* **2**, 628-636.
- Miura, S. K., Martins, A., Zhang, K. X., Graveley, B. R. and Zipursky, S. L.**
(2013) . Probabilistic splicing of Dscam1 establishes identity at the level of single neurons. *Cell* **155**, 1166-1177.
- Mizuno, K.** (2013) . Signaling mechanisms and functional roles of cofilin phosphorylation and dephosphorylation. *Cell Signal* **25**, 457-469.
- Mohr, S. E. and Perrimon, N.** (2012) . RNAi screening: new approaches, understandings, and organisms. *Wiley Interdiscip Rev RNA* **3**, 145-158.
- Nagaso, H., Murata, T., Day, N. and Yokoyama, K. K.** (2001) . Simultaneous detection of RNA and protein by in situ hybridization and

- immunological staining. *J Histochem Cytochem* **49**, 1177-1182.
- Nagata-Ohashi, K., Ohta, Y., Goto, K., Chiba, S., Mori, R., Nishita, M., Ohashi, K., Kousaka, K., Iwamatsu, A., Niwa, R., et al. (2004) . A pathway of neuregulin-induced activation of cofilin-phosphatase Slingshot and cofilin in lamellipodia. *J Cell Biol* **165**, 465-471.
- Nagel, A. C., Schmid, J., Auer, J. S., Preiss, A. and Maier, D. (2010) . Constitutively active protein kinase D acts as negative regulator of the Slingshot-phosphatase in Drosophila. *Hereditas* **147**, 237-242.
- Ng, J. and Luo, L. (2004) . Rho GTPases Regulate Axon Growth through Convergent and Divergent Signaling Pathways. *Neuron* **44**, 779-793.
- Ng, J., Nardine, T., Harms, M., Tzu, J., Goldstein, A., Sun, Y., Dietzl, G., Dickson, B. J. and Luo, L. (2002) . Rac GTPases control axon growth, guidance and branching. *Nature* **416**, 442-447.
- Nishita, M., Tomizawa, C., Yamamoto, M., Horita, Y., Ohashi, K. and Mizuno, K. (2005) . Spatial and temporal regulation of cofilin activity by LIM kinase and Slingshot is critical for directional cell migration. *J Cell Biol* **171**, 349-359.
- Niwa, R., Nagata-Ohashi, K., Takeichi, M., Mizuno, K. and Uemura, T. (2002) . Control of actin reorganization by Slingshot, a family of phosphatases that dephosphorylate ADF/cofilin. *Cell* **108**, 233-246.
- Olivier, J. P., Raabe, T., Henkemeyer, M., Dickson, B., Mbamalu, G., Margolis, B., Schlessinger, J., Hafen, E. and Pawson, T. (1993) . A Drosophila SH2-SH3 adaptor protein implicated in coupling the sevenless tyrosine kinase to an activator of Ras guanine nucleotide exchange,

- Sos. *Cell* **73**, 179-191.
- Ono, S.** (2007) . Mechanism of depolymerization and severing of actin filaments and its significance in cytoskeletal dynamics. *Int Rev Cytol* **258**, 1-82.
- Parks, A. L., Cook, K. R., Belvin, M., Dompe, N. A., Fawcett, R., Huppert, K., Tan, L. R., Winter, C. G., Bogart, K. P., Deal, J. E., et al.** (2004) . Systematic generation of high-resolution deletion coverage of the *Drosophila melanogaster* genome. *Nat Genet* **36**, 288-292.
- Pfeiffer, B. D., Ngo, T. T., Hibbard, K. L., Murphy, C., Jenett, A., Truman, J. W. and Rubin, G. M.** (2010) . Refinement of tools for targeted gene expression in *Drosophila*. *Genetics* **186**, 735-755.
- Phelps, C. B. and Brand, A. H.** (1998) . Ectopic gene expression in *Drosophila* using GAL4 system. *Methods* **14**, 367-379.
- Raabe, T.** (2000) . The sevenless signaling pathway: variations of a common theme. *Biochim Biophys Acta* **1496**, 151-163.
- Ramakrishnan, C., Dani, V. S. and Ramasarma, T.** (2002) . A conformational analysis of Walker motif A [GXXXXGKT (S)] in nucleotide-binding and other proteins. *Protein Eng* **15**, 783-798.
- Reeve, S. P., Bassetto, L., Genova, G. K., Kleyner, Y., Leyssen, M., Jackson, F. R. and Hassan, B. A.** (2005) . The *Drosophila* fragile X mental retardation protein controls actin dynamics by directly regulating profilin in the brain. *Curr Biol* **15**, 1156-1163.
- Roch, F., Serras, F., Cifuentes, F. J., Corominas, M., Alsina, B., Amoros, M., Lopez-Varea, A., Hernandez, R., Guerra, D., Cavicchi, S., et al.** (1998) .

- Screening of larval/pupal P-element induced lethals on the second chromosome in *Drosophila melanogaster*: clonal analysis and morphology of imaginal discs. *Mol Gen Genet* **257**, 103-112.
- Rogge, R. D., Karlovich, C. A. and Banerjee, U.** (1991) . Genetic dissection of a neurodevelopmental pathway: Son of sevenless functions downstream of the sevenless and EGF receptor tyrosine kinases. *Cell* **64**, 39-48.
- Rolls, M. M., Satoh, D., Clyne, P. J., Henner, A. L., Uemura, T. and Doe, C. Q.** (2007) . Polarity and intracellular compartmentalization of *Drosophila* neurons. *Neural development* **2**, 7.
- Ryder, E., Ashburner, M., Bautista-Llacer, R., Drummond, J., Webster, J., Johnson, G., Morley, T., Chan, Y. S., Blows, F., Coulson, D., et al.** (2007) . The DrosDel deletion collection: a *Drosophila* genomewide chromosomal deficiency resource. *Genetics* **177**, 615-629.
- Saraste, M., Sibbald, P. R. and Wittinghofer, A.** (1990) . The P-loop--a common motif in ATP- and GTP-binding proteins. *Trends in biochemical sciences* **15**, 430-434.
- Sato, M., Umetsu, D., Murakami, S., Yasugi, T. and Tabata, T.** (2006) . DWnt4 regulates the dorsoventral specificity of retinal projections in the *Drosophila melanogaster* visual system. *Nat Neurosci* **9**, 67-75.
- Schmidt, K. L., Marcus-Gueret, N., Adeleye, A., Webber, J., Baillie, D. and Stringham, E. G.** (2009) . The cell migration molecule UNC-53/NAV2 is linked to the ARP2/3 complex by ABI-1. *Development* **136**, 563-574.
- Scott, R. W. and Olson, M. F.** (2007) . LIM kinases: function, regulation and

- association with human disease. *J Mol Med (Berl)* **85**, 555-568.
- Shi, Y., Alin, K. and Goff, S. P.** (1995) . Abl-interactor-1, a novel SH3 protein binding to the carboxy-terminal portion of the Abl protein, suppresses v-abl transforming activity. *Genes & development* **9**, 2583-2597.
- Shields, A. R., Spence, A. C., Yamashita, Y. M., Davies, E. L. and Fuller, M. T.** (2014) . The actin-binding protein profilin is required for germline stem cell maintenance and germ cell enclosure by somatic cyst cells. *Development* **141**, 73-82.
- Shimizu, K., Sato, M. and Tabata, T.** (2011) . The Wnt5/Planar Cell Polarity Pathway Regulates Axonal Development of the Drosophila Mushroom Body Neuron. *Journal of Neuroscience* **31**, 4944-4954.
- Shuai, Y., Hu, Y., Qin, H., Campbell, R. A. and Zhong, Y.** (2011) . Distinct molecular underpinnings of Drosophila olfactory trace conditioning. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **108**, 20201-20206.
- Shuai, Y., Lu, B., Hu, Y., Wang, L., Sun, K. and Zhong, Y.** (2010) . Forgetting Is Regulated through Rac Activity in Drosophila. *Cell* **140**, 579-589.
- Soosairajah, J., Maiti, S., Wiggan, O., Sarmiere, P., Moussi, N., Sarcevic, B., Sampath, R., Bamburg, J. R. and Bernard, O.** (2005) . Interplay between components of a novel LIM kinase-slingshot phosphatase complex regulates cofilin. *EMBO J* **24**, 473-486.
- Spratley, S. J., Bastea, L. I., Doppler, H., Mizuno, K. and Storz, P.** (2011) . Protein kinase D regulates cofilin activity through p21-activated kinase 4. *J Biol Chem* **286**, 34254-34261.

- Stringham, E., Pujol, N., Vandekerckhove, J. and Bogaert, T.** (2002) . *unc-53* controls longitudinal migration in *C. elegans*. *Development* **129**, 3367-3379.
- Stringham, E. G. and Schmidt, K. L.** (2009) . Navigating the cell: UNC-53 and the navigators, a family of cytoskeletal regulators with multiple roles in cell migration, outgrowth and trafficking. *Cell Adh Migr* **3**, 342-346.
- Takei, Y., Ozawa, Y., Sato, M., Watanabe, A. and Tabata, T.** (2004) . Three *Drosophila* EXT genes shape morphogen gradients through synthesis of heparan sulfate proteoglycans. *Development* **131**, 73-82.
- Tanaka, N. K., Tanimoto, H. and Ito, K.** (2008) . Neuronal assemblies of the *Drosophila* mushroom body. *The Journal of Comparative Neurology* **508**, 711-755.
- Toshima, J., Toshima, J. Y., Amano, T., Yang, N., Narumiya, S. and Mizuno, K.** (2001a) . Cofilin phosphorylation by protein kinase testicular protein kinase 1 and its role in integrin-mediated actin reorganization and focal adhesion formation. *Mol Biol Cell* **12**, 1131-1145.
- Toshima, J., Toshima, J. Y., Takeuchi, K., Mori, R. and Mizuno, K.** (2001b) . Cofilin phosphorylation and actin reorganization activities of testicular protein kinase 2 and its predominant expression in testicular Sertoli cells. *The Journal of biological chemistry* **276**, 31449-31458.
- van Haren, J., Boudeau, J., Schmidt, S., Basu, S., Liu, Z., Lammers, D., Demmers, J., Benhari, J., Grosveld, F., Debant, A., et al.** (2014) .

- Dynamic microtubules catalyze formation of navigator-TRIO complexes to regulate neurite extension. *Current biology : CB* **24**, 1778-1785.
- van Haren, J., Draegestein, K., Keijzer, N., Abrahams, J. P., Grosveld, F., Peeters, P. J., Moechars, D. and Galjart, N. (2009) . Mammalian Navigators are microtubule plus-end tracking proteins that can reorganize the cytoskeleton to induce neurite-like extensions. *Cell Motil Cytoskeleton* **66**, 824-838.
- Van Troys, M., Huyck, L., Leyman, S., Dhaese, S., Vandekerkhove, J. and Ampe, C. (2008) . Ins and outs of ADF/cofilin activity and regulation. *Eur J Cell Biol* **87**, 649-667.
- Verheyen, E. M. and Cooley, L. (1994) . Profilin mutations disrupt multiple actin-dependent processes during *Drosophila* development. *Development* **120**, 717-728.
- Wang, J., Zugates, C. T., Liang, I. H., Lee, C. H. and Lee, T. (2002) . *Drosophila* Dscam is required for divergent segregation of sister branches and suppresses ectopic bifurcation of axons. *Neuron* **33**, 559-571.
- Wills, Z., Marr, L., Zinn, K., Goodman, C. S. and Van Vactor, D. (1999) . Profilin and the Abl tyrosine kinase are required for motor axon outgrowth in the *Drosophila* embryo. *Neuron* **22**, 291-299.
- Witke, W., Podtelejnikov, A. V., Di Nardo, A., Sutherland, J. D., Gurniak, C. B., Dotti, C. and Mann, M. (1998) . In mouse brain profilin I and profilin II associate with regulators of the endocytic pathway and

- actin assembly. *The EMBO journal* **17**, 967-976.
- Wu, J. S. and Luo, L.** (2006) . A protocol for mosaic analysis with a repressible cell marker (MARCM) in *Drosophila*. *Nat Protoc* **1**, 2583-2589.
- Xu, T. and Rubin, G. M.** (1993) . Analysis of genetic mosaics in developing and adult *Drosophila* tissues. *Development* **117**, 1223-1237.
- Yamamoto, M., Nagata-Ohashi, K., Ohta, Y., Ohashi, K. and Mizuno, K.** (2006) . Identification of multiple actin-binding sites in cofilin-phosphatase Slingshot-1L. *FEBS letters* **580**, 1789-1794.
- Yang, L. and Bashaw, G. J.** (2006) . Son of sevenless directly links the Robo receptor to rac activation to control axon repulsion at the midline. *Neuron* **52**, 595-607.
- Yang, N., Higuchi, O., Ohashi, K., Nagata, K., Wada, A., Kangawa, K., Nishida, E. and Mizuno, K.** (1998) . Cofilin phosphorylation by LIM-kinase 1 and its role in Rac-mediated actin reorganization. *Nature* **393**, 809-812.
- Yu, X. M., Gutman, I., Mosca, T. J., Iram, T., Ozkan, E., Garcia, K. C., Luo, L. and Schuldiner, O.** (2013) . Plum, an immunoglobulin superfamily protein, regulates axon pruning by facilitating TGF-beta signaling. *Neuron* **78**, 456-468.
- Zheng, X., Zugates, C. T., Lu, Z., Shi, L., Bai, J. M. and Lee, T.** (2006) . Baboon/dSmad2 TGF-beta signaling is required during late larval stage for development of adult-specific neurons. *EMBO J* **25**, 615-627.
- Zhu, S., Chiang, A. S. and Lee, T.** (2003) . Development of the *Drosophila*

mushroom bodies: elaboration, remodeling and spatial organization of dendrites in the calyx. *Development* **130**, 2603-2610.

Zhu, S., Lin, S., Kao, C. F., Awasaki, T., Chiang, A. S. and Lee, T. (2006) .
Gradients of the Drosophila Chinmo BTB-zinc finger protein govern neuronal temporal identity. *Cell* **127**, 409-422.