

# 学位論文

ショウジョウバエキノコ体神経の軸索分岐制御における  
*DISCO Interacting Protein 2* 遺伝子の機能の研究

(Studies on the function of *DISCO Interacting Protein 2*  
in regulating the axonal bifurcation  
of *Drosophila* mushroom body neurons)

平成 27 年 12 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

新田 陽平





## 目次

1. Abstract (日本語)	6
Abstract (英語)	7
2. 序論	9
2.1 軸索枝の形成機構	10
2.2 キノコ体の構造及び発生様式	12
2.3 DISCO Interacting Protein 2 (DIP2)	15
3. 材料と方法	18
3.1 ショウジョウバエ系統	18
3.2 imprecise excision による変異体系統の作出	21
3.3 Gal4/UAS システム	24
3.4 MARCM 法	26
3.5 DIP2 の UAS 系統の作製	29
3.6 DIP2 抗体の作製	31
3.7 ウェスタンブロッティング法	33
3.8 免疫組織染色及び画像解析	34
3.9 表現型の分類法	36
3.10 細胞培養及び遺伝子導入、免疫細胞染色	40
3.11 マイクロアレイ解析	41
3.12 qRT-PCR 解析	42

4. 結果	43
4.1 <i>DIP2</i> 変異体系統の作出	43
4.2 脳における <i>DIP2</i> の発現解析	48
4.3 <i>DIP2</i> 変異体の解析	50
4.3.1 <i>DIP2</i> 変異体における成虫キノコ体の表現型解析	50
4.3.2 発生過程における <i>DIP2</i> 変異体のキノコ体表現型解析	53
4.3.3 <i>DIP2</i> 変異体のキノコ体ニューロンの 1 細胞レベルでの表現型解析	55
4.4 キノコ体形成における <i>DIP2</i> の組織・細胞自律性の検討	62
4.5 <i>DIP2</i> のドメイン機能の解析	68
4.6 <i>DIP2</i> の細胞内局在	71
4.7 <i>DIP2</i> によるキノコ体形成における <i>disconnected</i> の関与の検討	75
4.8 <i>DIP2</i> の下流因子の探索	77
4.9 <i>DIP2</i> と <i>Gkt</i> 及び <i>Gkt</i> の既知の相互作用因子との遺伝学的相互作用の検討	80
4.10 既知の軸索分岐・誘導関連因子群との遺伝学的相互作用の検討	85
4.11 ショウジョウバエの JNK ホモログである <i>Basket</i> による <i>DIP2</i> の発現制御	91
4.12 (補遺) キノコ体以外の神経組織における <i>DIP2</i> の影響	99
4.13 (補遺) キノコ体ニューロン軸索部への <i>DIP2</i> の局在の必要性	101
5. 考察	103
5.1 神経系における <i>DIP2</i> の機能解析	104
5.2 <i>DIP2</i> と <i>Gkt</i> 間の相互作用	106
5.3 ローブレベルの表現型と単一細胞レベルの表現型の乖離	109
5.4 <i>DIP2</i> の機能獲得型変異	112

5.5	DIP2 と Wnt5 の遺伝学的相互作用	115
5.6	DIP2 による軸索分岐制御の分子機構	118
6.	結論	122
7.	謝辞	125
8.	引用文献	126

## 1. Abstract (日本語)

学習や記憶といった脳の高次機能は複雑かつ緻密な神経細胞のネットワークによって成り立っている。多くの生物は、進化の過程においてより早く、より効率的に情報処理を行える様に神経の構造そのものを変化させてきた。多くの脊椎動物では、軸索にミエリン鞘を形成して跳躍伝導を行い、より早く情報の伝達を行える様に進化した。また、多くの生物種では軸索を分岐させる事で各々の軸索枝が異なる領域に投射出来るようになり、効率的かつ複雑な情報処理を行う事が可能となった。神経機能における重要性にも関わらず、軸索枝を形成する分子機構の全容は解明されておらず、なかでも軸索分岐 (axonal bifurcation) に依る軸索枝形成機構は殆ど解明されていない。本研究では、ショウジョウバエの三次嗅覚中枢であるキノコ体をモデルとして軸索分岐形成機構の解明を目指し、神経系における機能未知因子である *DISCO Interacting Protein 2* (*DIP2*) が関与する事を新たに見出した。*DIP2* の機能欠失変異体では異所性ローブの形成やローブ構造の投射異常が観察された。単一細胞レベルでの解析によって、上記の形態異常はキノコ体ニューロンの軸索枝の過剰形成や投射異常による事が明らかとなった。これらの表現型は AMP-synthetase ドメインを欠いた *DIP2* ではレスキューされなかった。以上の結果は、*DIP2* は AMP-synthetase ドメイン依存的に過剰な軸索枝の抑制や軸索枝の投射パターンを制御している事を示唆している。また、マイクロアレイ解析及び遺伝学的解析によって *DIP2* の下流因子として *glaiKit* (*gkt*) を同定した。また、既知の *Gkt* の相互作用因子であり、細胞極性制御因子でもある *crumbs* 及び *stardust* と遺伝学的相互作用が観察された。AMP-synthetase ドメインを持つ遺伝子の殆どが脂肪酸を基質としている事、*gkt* が phospholipase-D スーパーファミリーであると考えられている事等から、*DIP2* と *Gkt* は脂肪酸を介して軸索枝形成を制御している可能性を示唆している。そして、*Gkt* が極性制御因子である *Crb* 及び *Sdt* と相互作用をし、

キノコ体ニューロンの細胞極性を制御し、適切な軸索分岐・軸索枝の投射を誘導していると考えられる。

また、c-Jun N-terminal kinase (JNK) のホモログである Basket (Bsk) によって DIP2 が制御されている事が明らかとなった。遺伝学的解析からは DIP2 と Bsk が逆方向に作用している事が推測される一方、免疫組織染色によって Bsk が DIP2 を正に制御している事が判明した。これらの結果は、DIP2 が Bsk の下流でシグナル経路のバッファー様の機能を有している可能性を示唆している。

DIP2 はヒトを含む多くの生物種の神経系で発現している事から、本研究の結果が他の生物においても敷衍出来る可能性があると期待される。加えて、DIP2 と Gkt 及び細胞極性因子との相互作用による軸索分岐制御は全く報告されておらず、軸索枝の研究分野に新しい知見をもたらすものであり、これまで謎とされていた軸索分岐における細胞内分子機構の解明に大きな一歩をもたらすと予想される。

## Abstract (英語)

Axonal branching is one of the key processes within the enormous complexity of the nervous system to enable a single neuron to send information to multiple targets. However, the molecular mechanisms that control branch formation are poorly understood. In particular, previous studies have rarely addressed the mechanisms underlying axonal bifurcation, in which axons form new branches via splitting of the growth cone. We demonstrate that Disco-interacting protein 2 (DIP2) is required for axonal bifurcation in *Drosophila* mushroom body (MB) neurons by suppressing ectopic bifurcation and regulating the guidance of sister axons. Domain function analysis revealed that AMP-synthetase domains of DIP2 are essential for its function, which may involve exerting a catalytic activity that modifies fatty acids. A microarray analysis and a subsequent genetic analysis showed that Glaikit (Gkt), a member of the phospholipase D (PLD) superfamily, is involved in DIP2 function. This raises the possibility that DIP2 and Gkt act in the same fatty acid-stimulated PLD pathway and suggests the importance of the second-messenger signaling lipid phosphatidic acid (PA) yielded by PLD action in axonal branch formation. We further infer that this signaling interacts with the cell polarity determination in regulating axonal branching, as DIP2 and Gkt genetically interact with Crumbs (Crb) and Stardust (Sdt), which are known to be apical-basal cell polarity determinants. Together, our data substantiate the function of *DIP2* in the nervous system and provide new insight into the molecular mechanisms regulating the development of axonal bifurcation.

## 2. 序論

我々は感覚神経を介して外界からの情報を受け取って、中枢神経によって記憶や判断を行い、その結果は運動神経を介して筋組織へと命令され、最終的に行動を実行する。このような様々な種類の神経による情報処理は、我々の根幹を成すと言っても過言ではない。その為、多くの生物は進化の過程においてより早く、より効率的に情報処理を行える様に神経の構造そのものを変化させてきた。軸索枝の形成もその1つであり、軸索を分岐させる事で各々の軸索枝が異なる領域に投射出来るようになり、効率的かつ複雑な情報処理を行う事が可能となった。例えば、哺乳類の小脳顆粒細胞の軸索は分子層でT字状の分岐をして平行線維を形成し、左右のプルキンエ細胞へと情報を伝達する (Hatten and Heintz, 1995)。また、ショウジョウバエの嗅覚記憶中枢であるキノコ体では、軸索枝を形成する事によって多種多様な出力ニューロンがキノコ体内で連合された情報を受け取り、更に多くの領域に情報を伝達する (Aso et al., 2014a; Aso et al., 2014b)。線虫では VC5、VC4 運動ニューロンが軸索枝を作り産卵口筋 (vulval muscle) に投射し、産卵時に必要となる協調的な筋肉の動きを制御している (Li and Chalfie, 1990)。この様に軸索枝は幅広い生物種の幅広い種類のニューロンで観察され、神経系の機能発現においても非常に重要であるといえる。それに関わらず、その分子機構に関してはあまり省みられる事はなく、どの様な機構で軸索が分岐するのか、どの様な機構で同じ細胞に由来する軸索枝が異なる性質を持ち異なる方向に投射するのか殆ど解明されていない。そこで本研究では、遺伝学的ツールが豊富で広く発生生物学の研究に用いられているショウジョウバエを用いてキノコ体をモデルとして軸索枝形成機構の解明を目指した。

## 2.1 軸索枝の形成機構

軸索が軸索枝を形成する機構は2種類に大別される(図1)(Lewis et al., 2013; Schmidt and Rathjen, 2010)。1つは側枝形成(collateral formation)と呼ばれる、主枝(axon shaft)となる軸索が投射した後、主枝の途中で分枝が芽の様に形成され主枝とは異なる領域に投射する機構であり、多くの軸索枝はこの機構によって形成されている。もう1つは、軸索分岐(axonal bifurcation)と呼ばれる、成長円錐がT字状やY字状に分岐し同時に異なる方向に投射を始める機構であり、主にマウスの後根神経節(Dorsal Root Ganglion: DRG)ニューロンやショウジョウバエのキノコ体ニューロンで観察されている。

従来の研究は *in vitro* における側枝形成の分子機構の解明に焦点が当てられており、BDNF や Wnt、NGF 等によって分枝形成が誘導され、誘導された軸索では局所的にアクチンフィラメントや微小管の切断及び再構築が行われ、分枝が形成される事が報告されている(Kalil and Dent, 2014)。一方、軸索分岐の形成機構については殆ど解明されておらず、哺乳類ではcGMPシグナル経路が関与する事が報告されているのみであり、その下流にどのような実行因子が存在するのかも解明されていない(Schmidt et al., 2009; Ter-Avetisyan et al., 2014)。更に、cGMPシグナル経路を操作しても側枝形成には影響がない事から、側枝形成と軸索分岐は異なる分子機構によって制御されていると考えられる。また、ショウジョウバエのキノコ体ニューロンではDown Syndrome Cell Adhesion Molecule 1(Dscam1)と呼ばれる膜貫通タンパクが接触依存的に軸索枝形成を制御すると考えられているが、具体的な分子機構については全く解明されていない(Wang et al., 2002)。この様に、側枝形成と比べて軸索分岐の形成機構は殆ど解明されていないのが現状である。



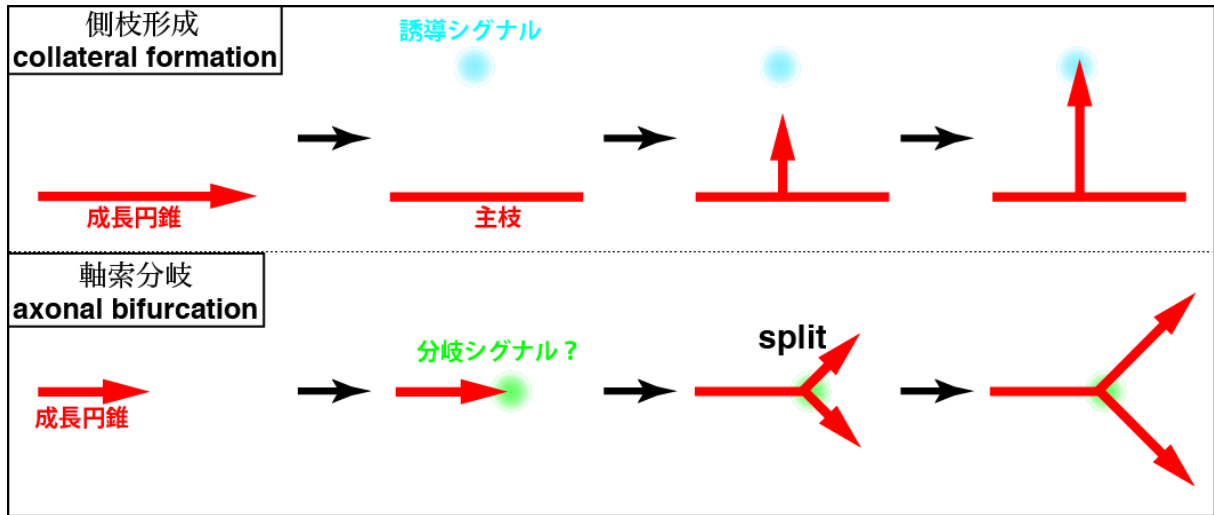


図 1：軸索枝を形成する 2 つの機構。

側枝形成では主枝が投射した後、軸索枝が形成され標的に投射をする。軸索分岐では分岐点に到達すると成長円錐が分岐して軸索枝が形成された後、各軸索枝が標的に投射を始める。

## 2.2 キノコ体の構造及び発生様式

ショウジョウバエのキノコ体は中枢脳に左右一対存在する神経線維構造であり、嗅覚学習や記憶、睡眠といった高次機能を担っている事が知られている (図 2) (Joiner et al., 2006; Keene and Waddell, 2007)。キノコ体は、片側約 2000 個のケニオン細胞 (Kenyon cell) と呼ばれるニューロンから構成されており、遺伝的にほぼ同一な 4 つの神経幹細胞から分化する事が知られている (Lee et al., 1999; Zhu et al., 2003)。キノコ体ニューロンは  $\gamma \cdot \alpha'/\beta'$ ・pioneer  $\alpha/\beta \cdot \alpha/\beta$  の 4 つのサブタイプに分類され、それぞれ異なる時期に同一の神経幹細胞から分化し、異なる軸索投射パターンを有している事が知られている (Ito et al., 1997)。

ケニオン細胞の細胞体は中枢脳の後方に位置しており、そこから前方へ軸索と樹状突起を投射している。樹状突起は細胞体の前方でカリックス (calyx) と呼ばれる構造体を形成する。軸索はペダングル (peduncle) と呼ばれる繊維束を形成しながら脳の前端まで投射し、その後それぞれのサブタイプに応じた投射パターンを示す (図 3)。 $\gamma$  ニューロンは最初に神経幹細胞から分化するキノコ体ニューロンであり、胚発生後期から孵化後 3.5 日の間に分化する。幼虫期の  $\gamma$  ニューロンは脳の前端部で分岐した後に、それぞれの軸索枝を背側と正中線側に投射しローブ構造を形成する。しかし、蛹期に入るとローブ構造が刈りこみ (pruning) を受けて両側のローブ構造を失った後、正中線側のみに軸索を再投射しローブ構造を再形成する。 $\alpha'/\beta'$  ニューロンは孵化後 3.5 日から蛹化 6 時間前間に神経幹細胞から分化する。 $\alpha'/\beta'$  ニューロンは脳の前端部で軸索分岐によって 1 回分岐した後に、それぞれの軸索枝を背側と正中線側に投射し、背側に  $\alpha'$  ローブ、正中線側に  $\beta'$  ローブをそれぞれ形成する。pioneer  $\alpha/\beta$  ニューロンは蛹化 6 時間前から蛹化開始時まで分化し、 $\alpha'/\beta'$  ニューロンと同様に分岐し背側に pioneer  $\alpha$  ローブ、正中線側に pioneer  $\beta$  ローブを形成する。最後に、蛹化開始後から羽化直前までキノコ体神経幹細胞は  $\alpha/\beta$  ニューロンへと分化

する。 $\alpha\beta$ ニューロンも $\alpha'\beta'$ ニューロンと同様に1回分岐した後、軸索を2方向に投射し背側に $\alpha$ ローブ、正中線側に $\beta$ ローブを形成する。また、新生されたキノコ体ニューロンの軸索はペダングルやローブの中心を通過して伸長する事が知られている (Kurusu et al., 2002)。

この様に、軸索が1回のみ分岐して2本の軸索枝が明確に異なる投射パターンを示すキノコ体ニューロンは軸索分岐を研究するのに非常に良いモデルといえる。

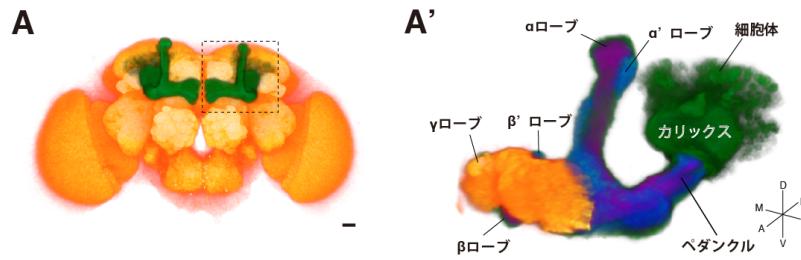


図2：キノコ体の構造。(A) ショウジョウバエ成虫脳（オレンジ）とキノコ体（緑）。(A) の点線部の拡大図が (A') である。γロブ（オレンジ）は正中線側だけに形成され、α'/β'ロブ（シアン）及びα/βロブ（マゼンタ）は背側（α'ロブとαロブ）と正中線側（β'ロブ及びβロブ）にロブ構造を形成する。スケールバーは 20 μm

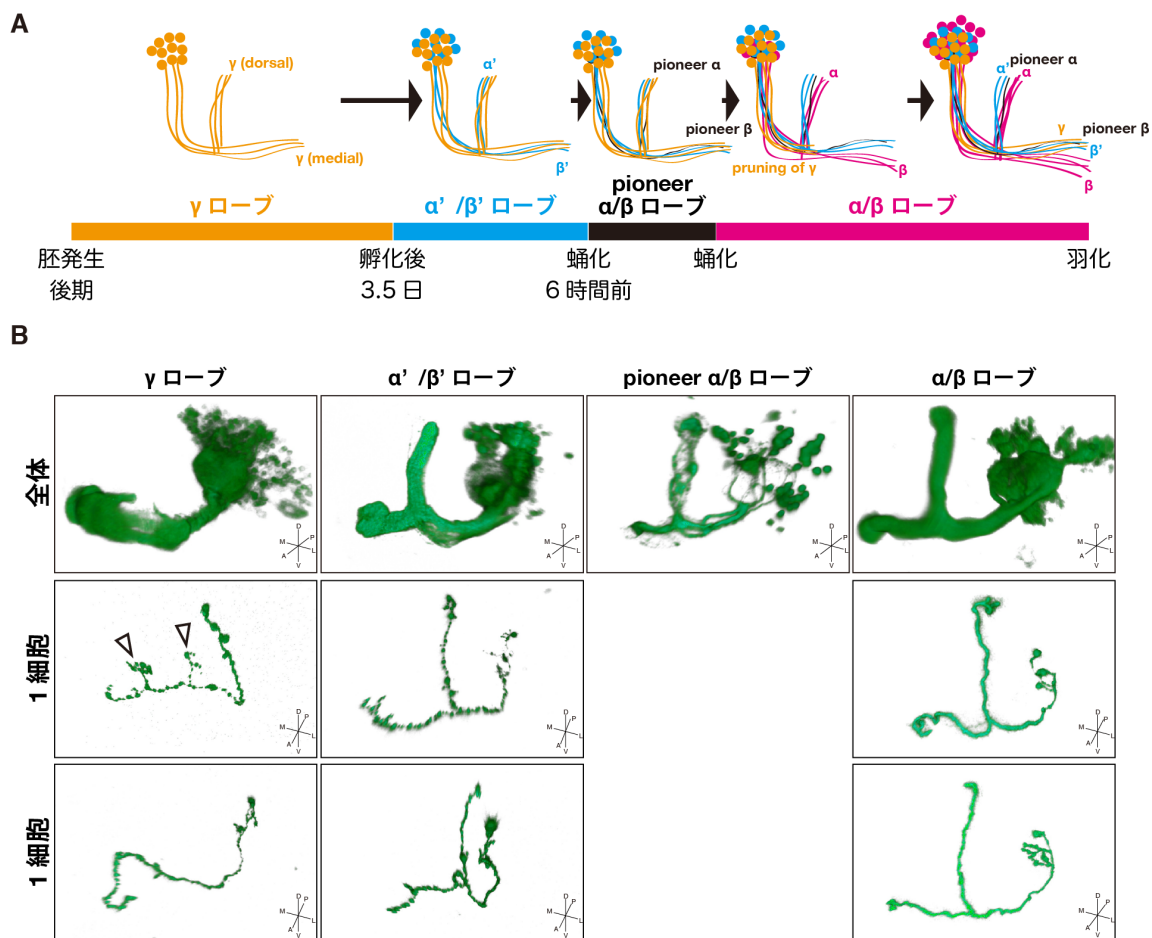


図3：(A) キノコ体の発生様式。キノコ体の神経幹細胞は発生初期から蛹化後 3.5 日までγニューロン（オレンジ）へと分化し、分岐した後に背側及び正中線側へとロブ構造を形成する。次に、蛹化 6 時間前まではα'/β'ニューロン（シアン）へと分化し、背側及び正中線側にロブ構造を形成する。蛹化 6 時間前から蛹化開始時までは pioneer α/β ニューロン(黒)へと分化する。蛹化後から羽化までは α/β ニューロン（マゼンタ）へと分化する。また、蛹化と同時期にγニューロンの軸索枝が刈りこみ（pruning）を受け、正中線側だけに再投射する。(B) 成虫時の各ロブ構造とニューロンの形状。γニューロンは軸索枝を形成しないが、短い軸索側枝（矢頭）を多く有する。

## 2.3 DISCO Interacting Protein 2 (DIP2)

DISCO Interacting Protein 2 (DIP2) は、酵母ツーハイブリッド法を用いたスクリーニングによって、軸索誘導に関与する転写因子である Disconnected (Disco) と結合するタンパク質としてショウジョウバエで同定された (図 4 A) (Mukhopadhyay et al., 2002)。DIP2 は線虫からヒトまで幅広い生物種で保存されており、多くの生物種で N 末端側に 1 つの DNA Methyltransferase-Associated Protein 1-binding ドメイン (DMP1-binding ドメイン) と C 末端側に 2 つの AMP-synthetase ドメイン (AMP ドメイン) がタンデムに並んでいるというタンパク構造を取っていると考えられている (図 4 B)。DMP1-binding ドメインは転写抑制活性を有する DMP1 と結合する為に必要であり (Rountree et al., 2000)、AMP ドメインは ATP 依存的に基質に AMP を結合させる触媒活性を有すると考えられている (図 4 C) (Schröder, 1989)。

ショウジョウバエ及びマウスの DIP2 は胚期において中枢神経系で強く発現する事 (Mukhopadhyay et al., 2002)、マウスの DIP2 ホモログである DIP2A 及び DIP2B は成体において大脳皮質で発現する事が報告されている (Ouchi et al., 2010; Tanaka et al., 2010; Zhang et al., 2015a)。また、連鎖解析によってヒト DIP2 に異常が生じると精神遅滞や難読症といった学習障害が起きる事が報告されている (Kong et al., 2015; Poelmans et al., 2009; Winpenninckx et al., 2007)。これらの報告は DIP2 が神経系において重要な機能を有している事を強く示唆しているが、DIP2 の分子機能・生物学的役割については殆ど解明されていない。唯一、培養細胞を用いた研究によって、マウスの DIP2 ホモログの 1 つである DIP2A が、Follistatin-like 1 (FSTL1) レセプターとして FSTL1 による Akt のリン酸化に関与している事が報告 (Ouchi et al., 2010; Tanaka et al., 2010) されているのみであり、神経系における機能については全く明らかにされていない (図 4 D)。本研究では、神経発生における DIP2

の機能を解明し、DIP2による軸索分岐制御機構のモデルを提示する。

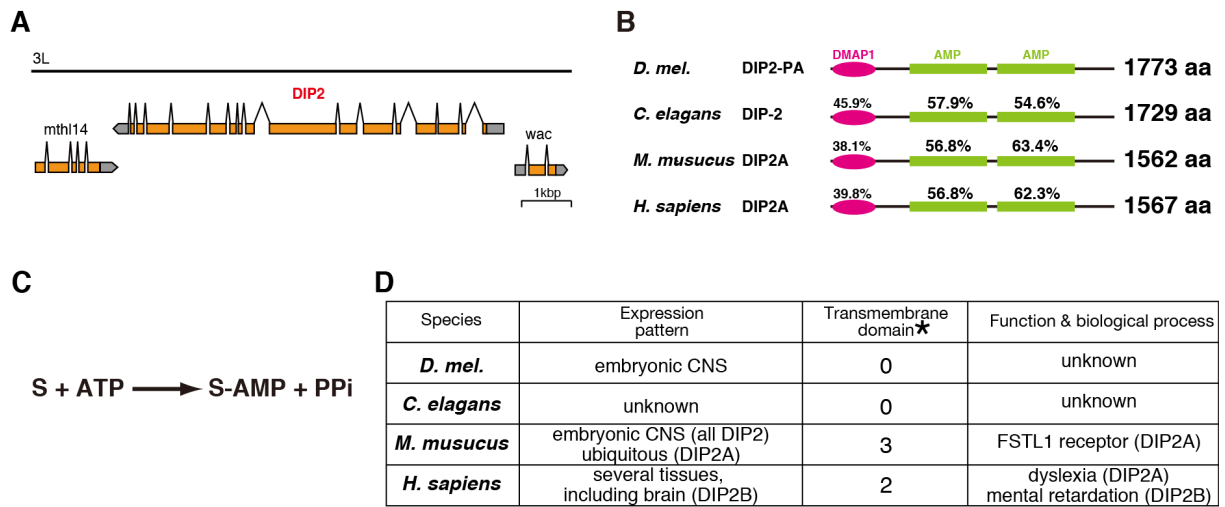


図 4：(A) DIP2 のゲノム構造。3 番染色体左腕に存在する。(B) DIP2 ホモログ。マゼンタが DMAP1-binding ドメイン、緑が AMP ドメインを示している。各ホモログのドメイン上の数値はショウジョウバエのドメインに対する同一性を表している。(C) AMP ドメインが有する触媒活性。ATP 依存的に、基質 (S) に AMP を結合させる。(D) 各 DIP2 ホモログの発現パターン、膜貫通ドメインの数、既知の機能。\*膜貫通ドメインの数は SOSUI によって予測されたものである。

### 3. 材料と方法

#### 3.1 ショウジョウバエ系統

RNAi 実験時 (29 °C) を除き、ショウジョウバエ系統は 25°C で飼育した。以下のショウジョウバエ系統を用いた。

*yw* : コントロールとして使用した系統。

*DIP2*<sup>34</sup> : 本研究で作製した *DIP2* 遺伝子の機能欠失変異体。

*DIP2*<sup>MI01352</sup> : 本研究で同定した *Minos* 挿入型変異体 (Metaxakis, 2005)。

*gkt*<sup>G85</sup> : *gkt* 遺伝子の完全機能欠失変異体 (Dunlop et al., 2004)。

*crb*<sup>11A22</sup> : *crb* 遺伝子の完全機能欠失変異体 (Tearle and Nüsslein-Volhard, 1987)。

*sdt*<sup>EH681</sup> : *sdt* 遺伝子の完全機能欠失変異体 (Eberl and Hilliker, 1988)。

*disco*<sup>1</sup> : *disco* 遺伝子の完全機能欠失変異体 (Steller et al., 1987)。

*Dscam1*<sup>1</sup> : *Dscam1* 遺伝子の完全機能欠失変異体 (Schmucker et al., 2000)。

*Wnt5*<sup>D7</sup> : *Wnt5* 遺伝子の完全機能欠失変異体 (Yoshikawa et al., 2003)。

*Wnt5*<sup>400</sup> : *Wnt5* 遺伝子の完全機能欠失変異体 (Fradkin et al., 2004)。

*dsh*<sup>1</sup> : *dsh* 遺伝子の部分機能欠失変異体。DEP ドメインにミスセンス変異が生じており、PCP 経路特異的に影響を及ぼす (Axelrod et al., 1998; Boutros et al., 1998)。

*OK107-Gal4* : ほぼ全てのキノコ体ニューロンで発現する Gal4 系統 (Connolly et al., 1996)。

*c739-Gal4* : キノコ体の  $\alpha/\beta$  ロープで発現する Gal4 系統 (Yang et al., 1995)。

*7B-Gal4* : キノコ体の  $\gamma$  ロープ及び  $\alpha/\beta$  ロープで発現する Gal4 系統 (Ferveur et al., 1995)。

*247-Gal4* : 比較的古いキノコ体ニューロン全体で発現する Gal4 系統 (McGuire et al., 2001)。



*201Y-Gal4* : キノコ体の  $\gamma$  ローブ及び  $\alpha/\beta$  ローブの中心領域で発現する Gal4 系統 (Yang et al., 1995)。

*NP2748-Gal4* : キノコ体の  $\alpha'/\beta'$  ローブで発現する Gal4 系統 (Hayashi et al., 2002)。

*NP7175-Gal4* :  $\alpha/\beta$  ローブの中心領域で発現する Gal4 系統 (Hayashi et al., 2002)。

*c708-Gal4* : キノコ体の pioneer  $\alpha/\beta$  ローブで発現する Gal4 系統 (Zhu et al., 2006)。

*elav-Gal4* : 中枢神経系全体で発現する Gal4 系統 (Luo et al., 1994)。

*EBI-Gal4* : 楕円体特異的に発現する Gal4 系統 (Wang et al., 2002)。

*UAS-GFP* : UAS の下流で GFP が発現する系統。

*UAS-mcd8::GFP* : UAS の下流で膜局在型の GFP が発現する系統 (Lee and Luo, 1999)。

*UAS-gkt* : UAS の下流で完全長 *Glaikit* が発現する系統 (Dunlop et al., 2004)。

*UAS-bsk* : UAS の下流で完全長 *Basket* が発現する系統。

*UAS-Bsk.DN* : UAS の下流でドミナントネガティブ型の *Basket* が発現する系統 (Adachi-Yamada et al., 1999)。

*UAS-Jbz* : UAS の下流でドミナントネガティブ型の *Jun-related antigen* が発現する系統 (Eresh et al., 1997)。

*UAS-Fbz* : UAS の下流でドミナントネガティブ型の *Kayak* が発現する系統 (Eresh et al., 1997)。

*UAS-Dscam1<sup>exon17.1</sup>* : UAS の下流で *Dscam1* 遺伝子の exon17.1 が発現する系統 (Wang et al., 2004)

*UAS-Wnt5* : UAS の下流で完全長 *Wnt5* が発現する系統 (Fradkin et al., 2004)。

*UAS-DIP2 dsRNA* : *DIP2* 遺伝子に対する IR 系統 (VDRC (#27796、#27797) 及び NIG (#7020R-2、#7020R-3) から供与)。

*UAS-gkt dsRNA* : *glaikit* 遺伝子に対する IR 系統 (VDRC (#109757) より供与)。

*UAS-Dscam1 dsRNA* : *Dscam1* 遺伝子に対する IR 系統 (VDRC (#108835) より供与)。

*UAS-Wnt5 dsRNA* : *Wnt5* 遺伝子に対する IR 系統 (VDRC (#101621) より供与)。

*UAS-bsk dsRNA* : *bsk* 遺伝子に対する IR 系統 (VDRC (#104569) より供与)。

*UAS-bgm like dsRNA* : *bgm like* 遺伝子 (CG4500) に対する IR 系統 (VDRC (#106260) より供与)。

*UAS-AcCoAS dsRNA* : *AcCoAS* 遺伝子に対する IR 系統 (VDRC (#100281) より供与)。

*UAS-bgm dsRNA* : *bgm* 遺伝子に対する IR 系統 (VDRC (#105635) より供与)。

*UAS-dicer2* : UAS の下流で *dicer2* が発現する系統 (VDRC (#60007) より供与)。



*Rev\_3* GACCGACCAATTAAGAAAAGTG

*Rev\_4* GAGTCGCTTATGAGCAAACCTCAC

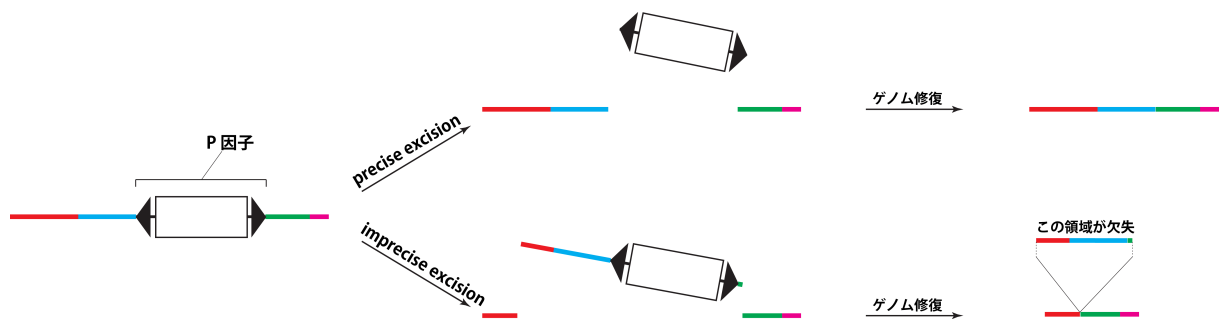


図5：P 因子の imprecise excision による変異体の作製。通常、転移酵素を用いて P 因子をゲノム上から切り出すと P 因子周囲のゲノムに影響を与えず P 因子が切り出される (precise excision)。稀に、周囲のゲノムごと P 因子が切りだされ、ゲノムに欠失が生じる (imprecise excision)。

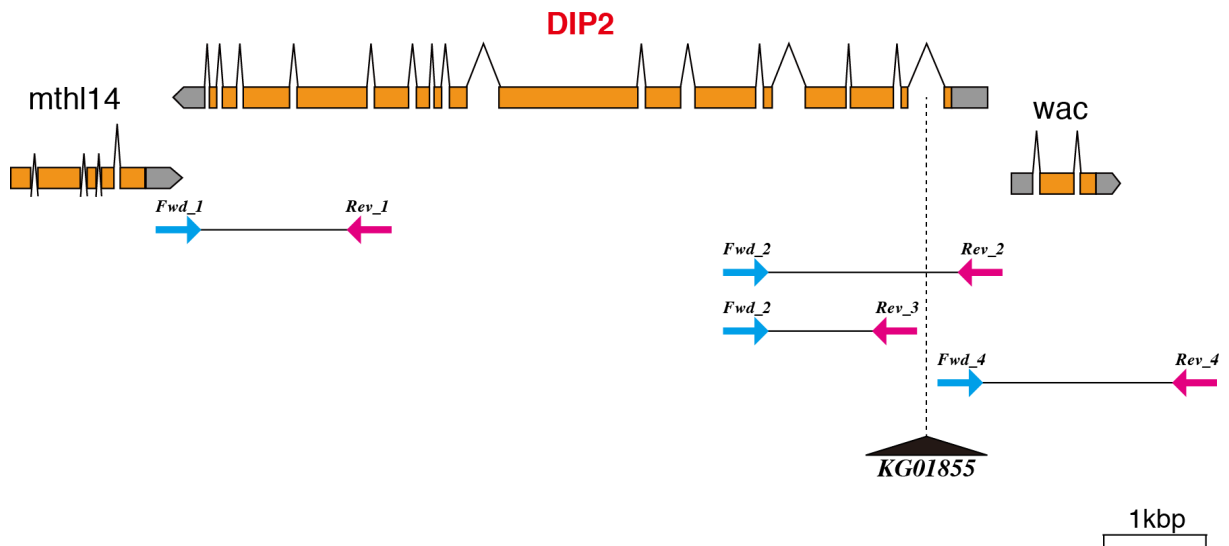


図6：各プライマーセットによって増幅される領域。KG0185 は P 因子の挿入位置を示している。

### 3.3 Gal4/UAS システム

ショウジョウバエにおいてある遺伝子を異所的に発現する方法として、酵母由来の転写因子である Gal4 とその認識配列である Upstream Activating Sequence (UAS) を用いた Gal4/UAS システムが幅広く用いられている (Brand and Perrimon, 1993)。異所発現させたい時期・組織で発現する事が知られている遺伝子のエンハンサーやプロモーターによって Gal4 の発現が誘導される系統と、UAS の下流に目的遺伝子を組み込んだ系統を交配する事によって、次の世代で先述したエンハンサーやプロモーターで規定される時期・組織で目的遺伝子を発現する事が可能となる (図7)。つまり、適切なエンハンサーやプロモーターを用いる事によって、目的の時期・組織であらゆる遺伝子を強制発現する事が可能となる。また、UAS の下流に標的遺伝子の逆向き反復配列を組み込む事によって RNAi を誘導する事が可能となり、時期・組織特異的に標的遺伝子をノックダウンする事が可能となる (Dietzl et al., 2007)。

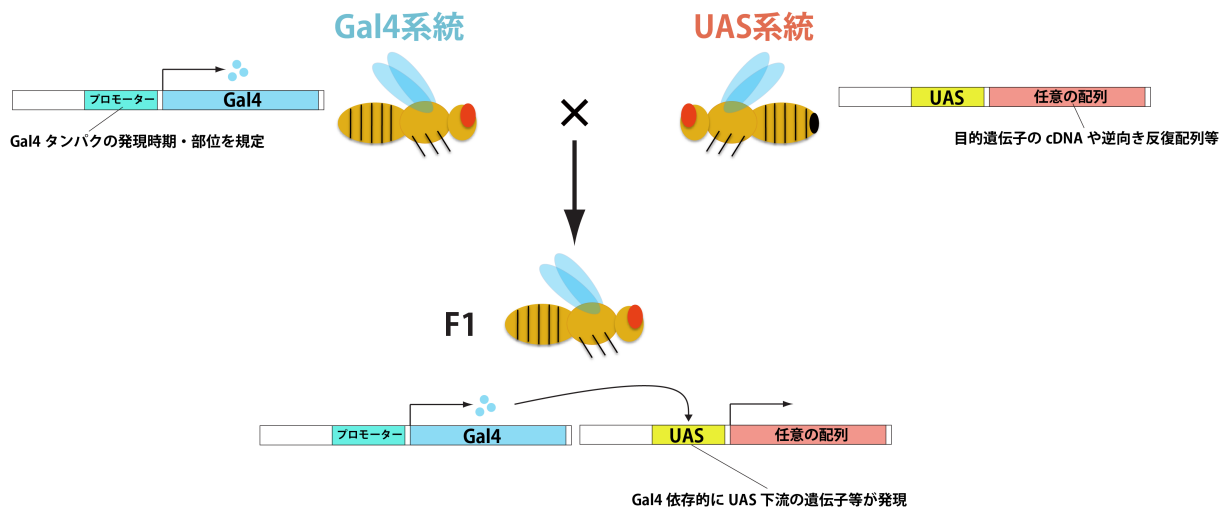


図7：GAL4/UAS システム。プロモーターの下流に Gal4 を有する系統（Gal4 系統）と UAS の下流に任意の配列（遺伝子や逆向き反復配列等）を有する系統（UAS 系統）を掛けあわせる事によって、F1 世代で任意の配列がプロモーターの間接的な制御下で発現する様になる。

### 3.4 MARCM 法

ある特定の遺伝子の機能を調べたい場合、最も簡便な方法はその遺伝子の機能欠失変異体を作成し表現型を観察する事である。しかし、全身変異体による遺伝子機能解析には以下のような技術的限界がある。

- ・ 遺伝子によっては観察したいステージより前に致死となってしまう。
- ・ 細胞自律性を検討する事が困難。
- ・ 組織内に於いて遺伝子が作用する細胞の特定が困難。

これらの問題を解決する為、クローン解析が開発された (図 8) (Xu and Rubin, 1993)。クローン解析とは、相同組換えを人為的に誘導して変異をホモに持つ細胞群 (クローン) を作製する手法であり、一般的には酵母由来の DNA 組み換え酵素である Flippase (Flp) とその認識配列である FRT を用いる。変異をヘテロに持つ細胞で一過的に Flp を発現させると FRT 間で相同組み換えが起こり、娘細胞の一方は変異をホモに持ち、もう一片の娘細胞は変異を全く持たなくなる。

MARCM (Mosaic Analysis with a Repressible Cell Marker) 法は従来のクローン解析を改良して、クローンの細胞群をラベルする手法である (図 9) (Lee and Luo, 1999)。細胞群をラベルする為に、Flp/FRT と前述した Gal4/UAS システムを利用する。まず、ラベルしたい細胞群で発現する Gal4 とマーカー遺伝子を導入した UAS をショウジョウバエに導入する。同時に、変異を持たせたい染色体の両方に FRT を導入する。次に、片側の染色体に変異を導入し、相同染色体に Gal4 の抑制因子である Gal80 を導入する。この時、Gal80 は *tubulin* 等の全細胞で恒常的に発現する遺伝子のプロモーター制御下におく。この状態のショウジョウバエの細胞では常に Gal80 が発現している為、Gal4/UAS システムが抑制されマーカー遺伝子の発現が抑制されている。次に、一過的に Flp を発現させると FRT 間で相同組換え



が生じる。すると、変異がホモとなった娘細胞では Gal80 が存在しない為、Gal4/UAS システムへの抑制が外れ、Gal4 の制御下で UAS の下流に存在するマーカー遺伝子が発現する。一方、Gal80 がホモとなった娘細胞では引き続き Gal4/UAS システムが抑制される。つまり、マーカー遺伝子が発現しているクローンでは変異がホモとなっている。MARCM 法を応用する事によって、クローンでのみ目的遺伝子を過剰発現・抑制したり、1 細胞だけ外来遺伝子を発現したりする事も可能となる。

本研究では一過的に Flp を発現させる為、hs-Flp を用いた。hs-Flp は熱ショックプロモーターの制御下で Flp が発現する組み換え遺伝子であり、制限温度以上になると Flp が発現する (Golic and Lindquist, 1989; Struhl and Basler, 1993)。1 本の  $\alpha/\beta$  ニューロンのみをラベルする為、親世代を交配後 8 日目にバイアルごと 37°C のウォーターバスに 15 分間漬けて熱ショックをかけた。また、 $\gamma$  ニューロンや  $\alpha'/\beta'$  ニューロンをラベルする為、交配後 5 日目に同様にウォーターバスを用いて熱ショックをかけた。本研究で用いた系統は以下の通りである。

1 細胞ラベル (野生型) : *yw<sup>h</sup>sflp, UAS-mcd8::GFP/+; tub-Gal80 FRT40/FRT40; ; OK107/+*

1 細胞ラベル (DIP2 変異体) : *yw<sup>h</sup>sflp, UAS-mcd8::GFP/+; tub-Gal80 FRT40/FRT40; DIP2<sup>34/M101352</sup>; OK107/+*

MARCM (野生型) : *yw<sup>h</sup>sflp, UAS-mcd8::GFP/+; tub-Gal80 FRT2A/FRT2A ; OK107/+*

MARCM (DIP2 変異体) : *yw<sup>h</sup>sflp, UAS-mcd8::GFP/+; tub-Gal80 FRT2A/ DIP2<sup>34</sup>, FRT2A ; OK107/+*

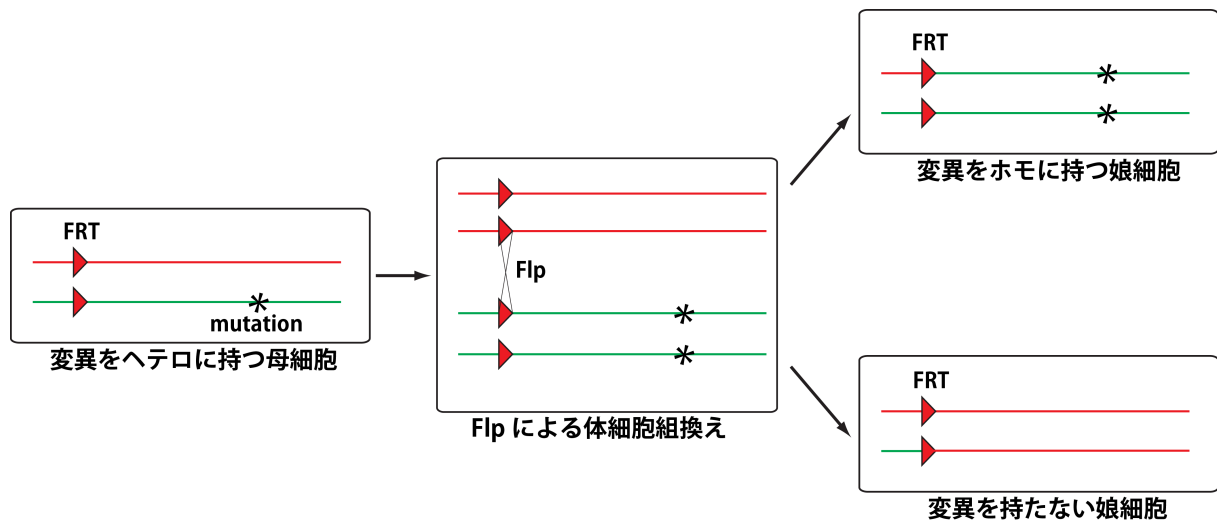


図8：クローン解析法。FlpによるFRT配列特異的な体細胞組換えを誘導する事によって、変異をヘテロに持つ母細胞から変異をホモに持つ娘細胞のクローンを作製する事が出来る。

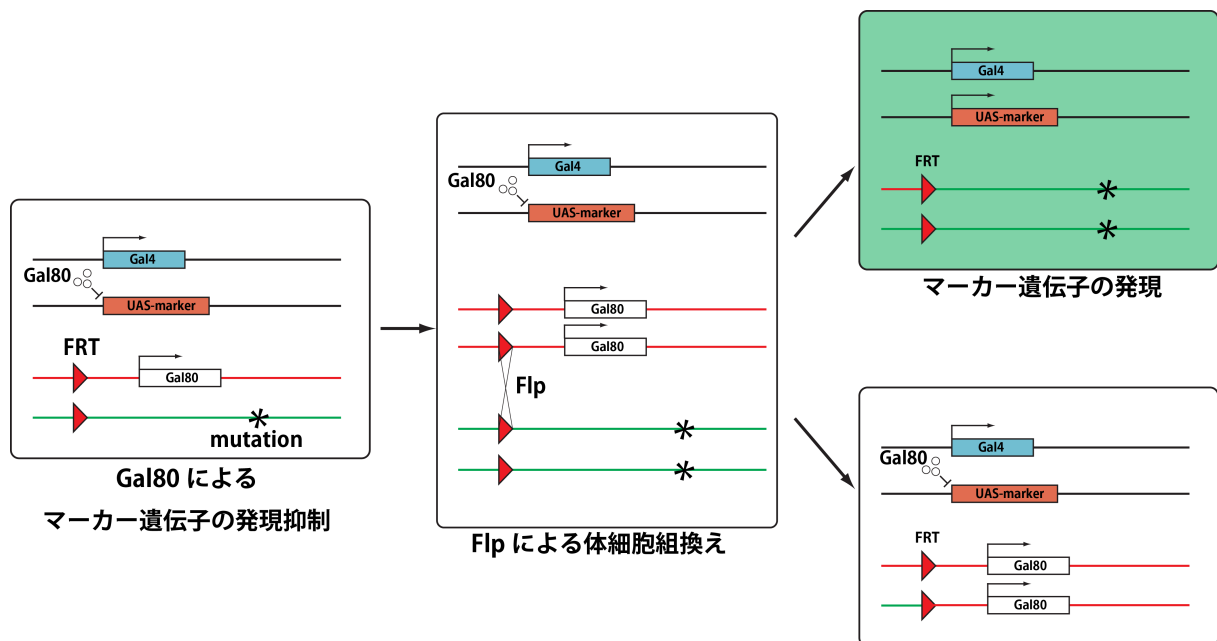


図9：MARCM法。母細胞では変異を持つ染色体の相同染色体にGal80が存在している為、Gal4/UASシステムが阻害され、マーカー遺伝子（GFP等）が発現しない。細胞分裂時にFlpによって確率的にGal80と変異を持つ相同染色体間で体細胞組換えが生じ、片方の娘細胞ではGal80がホモで存在し、もう片方の娘細胞では変異がホモに存在する。変異がホモに存在する娘細胞ではGal80が存在しない為、Gal4/UASが機能し、マーカー遺伝子等が発現する。つまり、マーカー遺伝子が発現しているクローンでは変異がホモとなっている事を意味している。

### 3.5 DIP2 の UAS 系統の作製

DIP2 の UAS 系統を作製する為、yw 系統のショウジョウバエから RNeasy purification kit (Qiagen, Venlo, Netherlands) を用いて total RNA を抽出した。抽出した total RNA を PrimeScript II High Fidelity RT-PCR Kit (Takara Bio, Shiga, Japan) を用いて逆転写した。この cDNA を鋳型にして PrimeSTAR DNA polymerase (Takara Bio) を用いて DIP2 cDNA を増幅した。シーケンシングはファスマック社に外注した。相同配列のアラインメントは DNADynamo (Blue Tractor Software Ltd, North Wales, UK) を用いた。DIP2 の各ドメインまたはリンカー配列を欠失したコンストラクトを作製する為、In-Fusion HD cloning kit (Takara Bio) を用いた。*UAS-DIP2 $\Delta$ DMAP1* 及び *UAS-DIP2 $\Delta$ AMP1*、*UAS-DIP2 $\Delta$ AMP2* では、それぞれ DIP2-PA の 2 番目から 114 番目、481 番目から 953 番目、1169 番目 1587 番目のアミノ酸残基が欠失している。また、*UAS-DIP2 $\Delta$ linker1* 及び *UAS-DIP2 $\Delta$ linker2*、*UAS-DIP2 $\Delta$ linker3* では、それぞれ 115 番目から 479 番目、954 番目から 1168 番目、1588 番目から 1773 番目のアミノ酸残基が欠失している (図 10)。全てのドメイン欠失コンストラクトには N 末端に myc タグ (GAGCAAAAGCTCATTCTGAAGAGGACTTG) を挿入した。これらのコンストラクトは pUAST ベクターに組み込まれた (Brand and Perrimon, 1993)。作製した組み換えベクターは BestGene Inc (Chino Hills, CA, USA) 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。

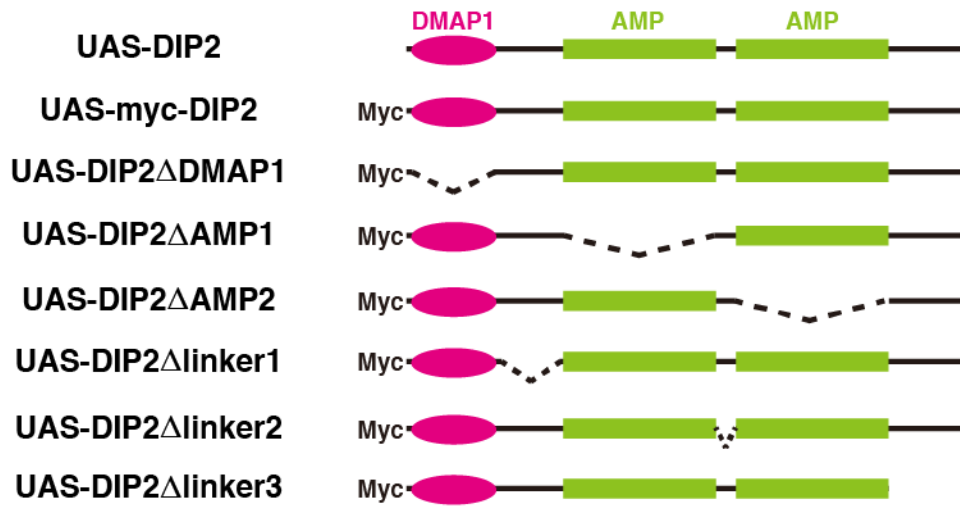


図 10：本研究で作製・使用した DIP2 コンストラクト。Myc タグは N 末端に付加している。

### 3.6 DIP2 抗体の作製

ラットポリクローナル抗 DIP2 抗体 (1:50) の作製はオペロンバイオテクノロジー社 (現: ユーロフィンジェノミクス社; Tokyo, Japan) に外注した。DIP2-PA の 1745 番から 1758 番までのアミノ酸残基と 1760 番から 1773 番までのアミノ酸残基のペプチドのカクテルを抗原とした (図 11 A)。作製した抗 DIP2 抗体が DIP2 タンパク質を検出する事が可能か確かめる為、*OK107-Gal4* 依存的に UAS-DIP2 を発現させた。その結果、成虫においてキノコ体を含む神経組織で *OK107-Gal4* 依存的に強いシグナルが観察された (図 11 B)。この事から、本研究において作製した抗 DIP2 抗体は DIP2 検出能があるといえる。

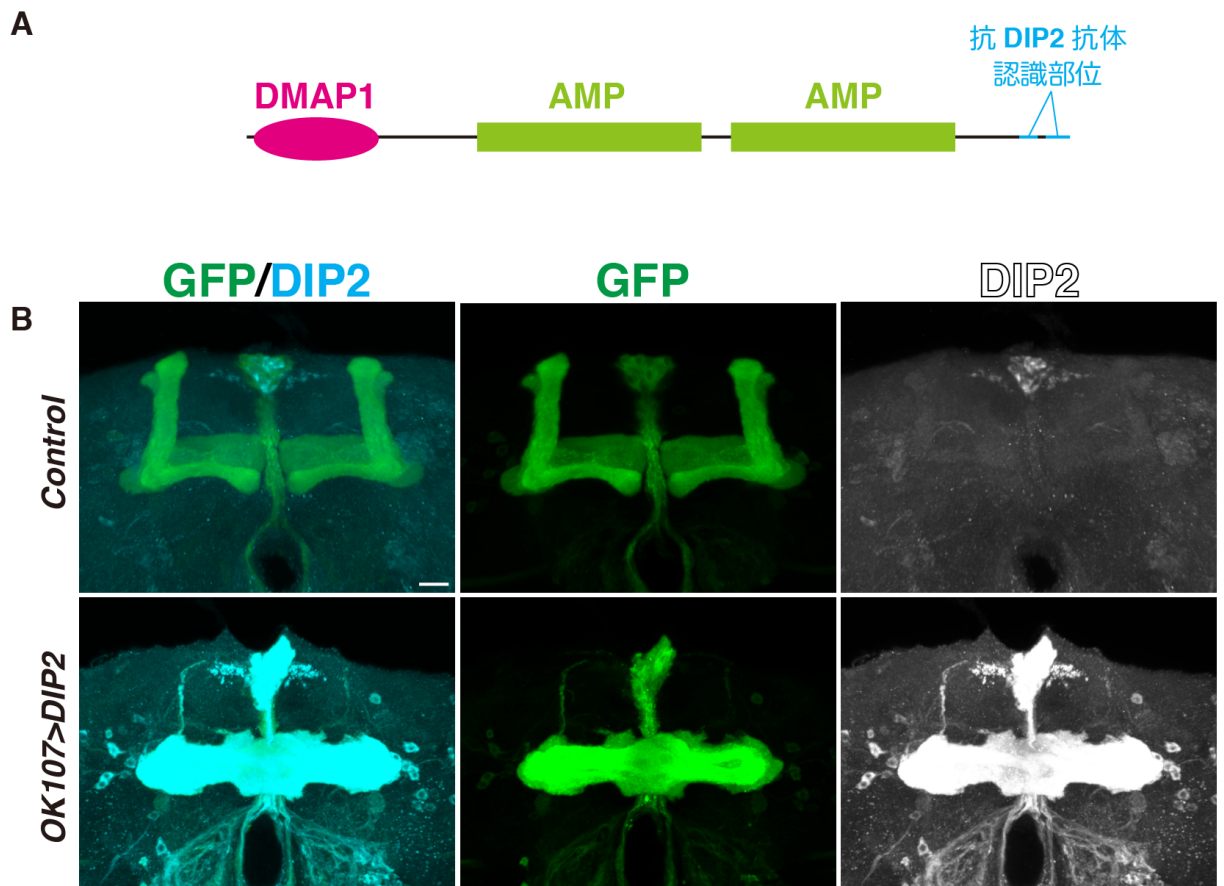


図 11 : (A) 抗 DIP2 抗体の認識部位 (シアン)。C 末端のアミノ酸配列及び C 末端付近の親水性アミノ酸配列を抗原として選択した。(B) キノコ体特異的 Gal4 ドライバーである *OK107-Gal4* を用いて DIP2 を強制発現 (下段) すると、DIP2 を発現させていないコントロール (上段) と比べて DIP2 シグナル (白) の大幅な上昇が観察された。スケールバーは 20  $\mu\text{m}$ 。

### 3.7 ウェスタンブロッティング法

蛹化後 24 時間経過した蛹の脳（各遺伝子型につき 10 個体分）を摘出し、サンプルバッファー（Cosmo Bio, Tokyo, Japan）に溶解させヒートブロックを用いて 95°C で 15 分間ボイルした。ウェスタンブロットには Hybond-P PVDF membrane（GE Healthcare UK Ltd., Buckinghamshire, UK）、PVDF blocking reagent（Toyobo）を用いた。シグナル検出には ECL Prime Detection System（GE Healthcare UK Ltd.）を説明書通りに用いた。ゲル撮影には ImageQuant LAS 4000（GE Healthcare UK Ltd）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。

#### 1 次抗体

Rat anti-DIP2（本研究で作製, 1:5,000）

Mouse anti- $\alpha$ -tubulin（T9026, 1:100,000; sigma）

#### 2 次抗体

ECL<sup>TM</sup> Anti-Rat IgG, HRP linked whole antibody（NA935V, 1:1000; GE Healthcare UK Ltd.）

anti-Mouse Immunoglobulin/HRP（P0447, 1:1000; Dako）

### 3.8 免疫組織染色及び画像解析

免疫組織染色は以前に記載されている方法に従って行った (Abe et al., 2014; Kunes, 1996)。摘出した脳を 4%ホルムアルデヒド/PBS 溶液を用いて 40 分間室温で固定した。その後、PBT (0.3% Triton X-100/PBS) 溶液で 3 回洗浄後、10% Fatal Normal Donkey Serum: FNDS (017-000-121; Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, USA) /PBT 溶液を用いて室温で 1 時間ブロッキングを行った。ブロッキング後、1% FNDS/PBT 溶液を用いて適切な濃度で希釈した 1 次抗体を加え、4°Cのシーソーに適切な期間置いた。抗 DIP2 抗体以外は 1 晩、抗 DIP2 抗体のみ 3 日間置いた。PBT 溶液で 4 度洗浄後、1% FNDS/PBT 溶液を用いて適切な濃度で希釈した 2 次抗体を加え、4°Cのシーソーに 1 晩置いた。再び PBT で 5 度洗浄後、PBS に置換し Vectashield mounting medium (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) を用いて包埋した。標本は LSM710 (Carl-Zeiss, Jena, Germany) を用いて観察・撮影し、Imaris software (Bitplane, Zurich, Switzerland) を用いて三次元構築画像を作製した。

キノコ体ローブにおける各シグナルの定量には、Image J (NIH, Bethesda, MD, USA) を用いた。*OK107-Gal4* によってラベルされる領域をキノコ体と定義し、キノコ体内のシグナル強度を、同一スライス内のキノコ体以外のニューロパイル内のシグナル強度で割ることによってキノコ体内のシグナルを標準化した。シグナルの有意差の検定には Unpaired t-test を採用し、GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA) を用いて両側検定で行った。



本研究の免疫組織染色において用いた 1 次抗体及び 2 次抗体は以下の通りである。

## 1 次抗体

Rat anti-DIP2 (本研究で作製; 1:50)

Mouse anti-Fasciclin II (1D4, 1:50; Developmental Studies Hybridoma Bank (DSHB))

Mouse anti-Myc (9B11, 1:1000; Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA)

Rabbit anti-Green Fluorescent Protein Alexa Fluor 488 conjugate (A21311, 1:2000; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)

Rabbit anti-ACTIVE JNK (V793A, 1:500; Promega Corporation, Madison, WI, USA)

Rabbit anti-Dscam1 (1:500; (Zhan et al., 2004))

## 2 次抗体

anti-mouse Cy3 (715-165-151, 1:200; Jackson ImmunoResearch)

anti-rat DyLight 649 (405411, 1:200; BioLegend, San Diego, CA, USA)

anti-rabbit DyLight 649 (406406, 1:200; BioLegend)

### 3.9 表現型の分類法

キノコ体ローブの表現型について、独自の基準で三種類のクラス分けを行った(図 12)。背側及び正中線側のローブ構造が共に存在し、なおかつ背側及び正中線側の片方もしくは両方に異所性のローブ構造が観察された場合、表現型を異所性ローブと定義した。ローブ構造が2つ認められ、なおかつ背側もしくは正中線側にしかローブ構造が存在しない場合、表現型を投射異常と定義した。最後に、ローブ構造が3つ以上認められ、なおかつ背側もしくは正中線側にしかローブ構造が存在しない場合、表現型を異所性ローブ+投射異常と定義した。

キノコ体単一ニューロンでの表現型についても同様に3種類のクラス分けを行った(図 13)。背側及び正中線側に軸索枝が共に存在し、なおかつ背側及び正中線側の片方もしくは両方に更に軸索枝が形成されていた場合、表現型を異所性軸索と定義した。軸索枝が2つ認められ、なおかつ背側もしくは正中線側にしか軸索枝が存在しない場合、表現型を投射異常と定義した。最後に、軸索枝が3本以上認められ、なおかつ背側もしくは正中線側にしか軸索枝が存在しない場合、表現型を異所性軸索+投射異常と定義した。

Wnt5 及び PCP 因子の変異体バックグラウンドでのキノコ体表現型解析においては、既存の分類方法を一部改変した (Shimizu et al., 2011)。Imaris software を用いて各個体のキノコ体の三次元立体構築画像を撮影し、Image J を用いて  $\alpha$  ローブと  $\beta$  ローブの太さを測定した。ローブの太さが共に基準値以上であれば正常、少なくとも片方のローブが基準値未満であれば細径化と分類した。また、ローブ構造が1つしか認められない場合に欠失、2つのローブ構造が背側もしくは正中線側の1方向に投射している場合は投射異常、少なくとも片方のローブが短い場合は短縮、軸索が細胞体近傍に凝集した場合は凝集とそれぞれ表現型

を分類した。正常と細径化を分ける基準値は次ページの計算式で設定した。

$$\text{基準値} = \text{野生型 (yw) の平均値} - \text{標準偏差} \times 3$$

$\alpha$ ローブ及び $\beta$ ローブの平均値、標準偏差、基準値を以下に順に示す。

	平均値	標準偏差	基準値
$\alpha$ ローブ	59.67	6.00	41.67
$\beta$ ローブ	52.58	5.29	36.70

楕円体の表現型については楕円体の軸索部の腹側に切れ込みが入っていた場合、表現型を切れ込みと定義する（図 14）。

表現型の有意差の検定には Fisher's exact test を採用し、オープンソースの統計解析ソフトである R を用いて両側検定で行った。

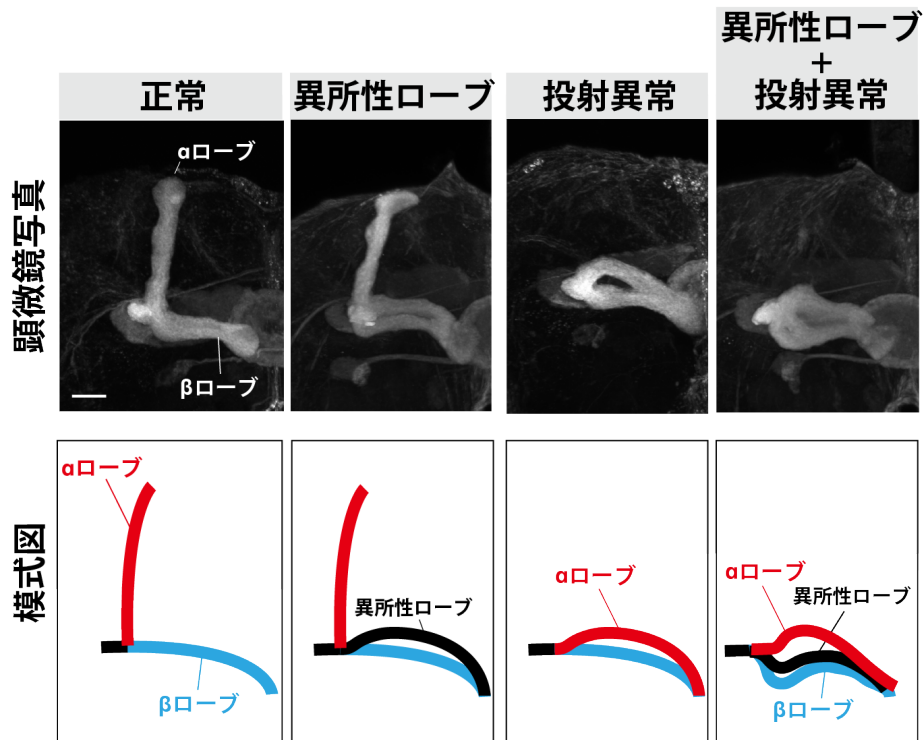


図 12：キノコ体の各表現型の代表例と模式図。スケールバーは 20  $\mu\text{m}$ 。

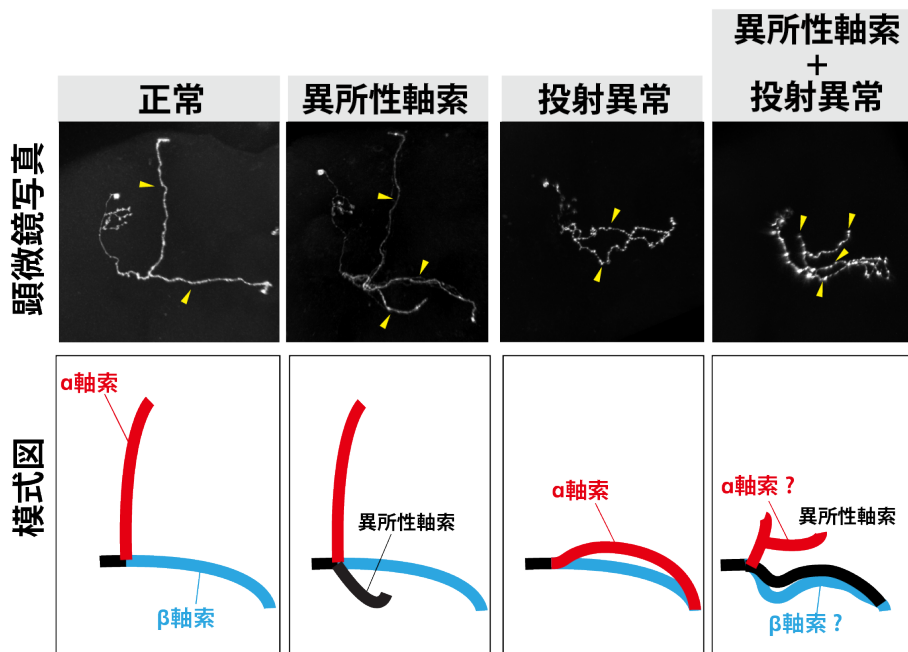


図 13： $\alpha'/\beta'$ ニューロン及び $\alpha/\beta$ ニューロンの表現型の代表例と模式図。  
黄矢頭は軸索枝を指し示している。

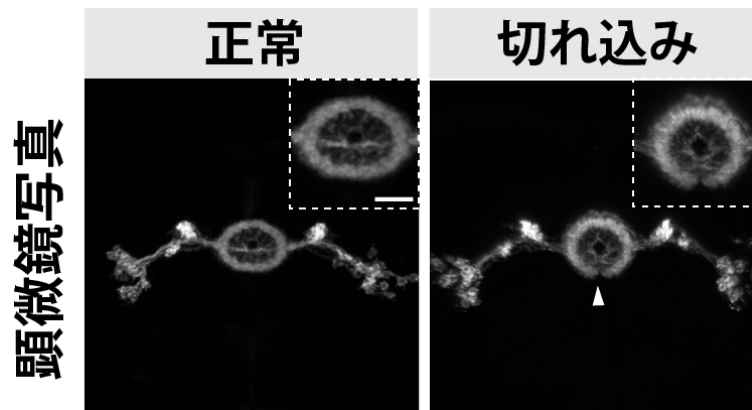


図 14: 楕円体の各表現型の代表例。点線内の図は軸索部の拡大図。白矢頭は表現型を指し示している。スケールバーは  $20\mu\text{m}$ 。

### 3.10 細胞培養及び遺伝子導入、免疫細胞染色

S2 細胞は、熱不活化処理をした fetal bovine serum (Nichirei Biosciences, Tokyo, Japan) を 10%、Anti-Anti (Thermo Fisher Scientific) を 1%加えた Schneider's Drosophila Medium (Thermo Fisher Scientific) を用いて 25°Cで培養した。S2 細胞に Cellfectine II (Thermo Fisher Scientific) を説明書通りに用いて *Actin-Gal4* 及び *UAS-GFP*、*UAS-myc-DIP2* を導入した。

免疫染色は以下の方法で行った。まず、培地を吸引した後、PBS を用いて 2 回洗浄した。次に、4%ホルムアルデヒド/PBS 溶液を用いて 15 分間室温で固定した。再び PBS を用いて 3 回洗浄し、PBT 溶液を用いて室温で 15 分間浸透化処理を行った。PBS で 3 回洗浄した後、10% FNDS/PBS 溶液を用いて室温で 1 時間ブロッキングを行った。ブロッキング後、3% FNDS/PBS 溶液を用いて適切な濃度で希釈した 1 次抗体を加え、4°Cで 1 晩静置した。PBS で 3 回洗浄した後、3% FNDS/PBS 溶液を用いて適切な濃度で希釈した 2 次抗体を加え、室温で 1 時間静置した。再び PBS で 3 回洗浄した後、Vectashield mounting medium with DAPI (Vector Laboratories) を用いて包埋すると同時に DAPI で細胞核を染色した。標本は LSM510 META (Carl-Zeiss) を用いて観察・撮影した。本研究の免疫細胞染色において用いた 1 次抗体及び 2 次抗体は以下の通りである。

#### 1 次抗体

Rat anti-DIP2 (本研究で作製; 1:150)

#### 2 次抗体

anti-rat DyLight 649 (405411, 1:200; BioLegend, San Diego, CA, USA)

### 3.11 マイクロアレイ解析

蛹化後 24 時間経過した野生型及び DIP2 RNAi 変異体の中枢脳を 50 個体分 (n = 4) 取り出し、-80°C で保存しマイクロアレイに供した。RNeasy Purification Kit を用いて total RNA を抽出した。この時、Experion (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA, USA) を用いて total RNA のクオリティをチェックした。ファーストストランド cDNA 合成及び Cy3-labeled RNA の増幅は Agilent Low-Input QuickAmp Labeling Kit (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) を説明書通りに用いた。Agilent Gene Expression Hybridization Kit (Agilent Technologies) を用いて、Cy3-labeled RNA を Agilent Drosophila Gene Expression array (Agilent Technologies) にハイブリダイズした。マイクロアレイは Agilent G2565CA Microarray scanner (Agilent Technologies) を用いてスキャンし、Feature Extraction 10.5.1.1 (Agilent Technologies) を用いて各シグナルを定量化した。GeneSpring GX software (Agilent Technologies) を用いて、コントロール系統と DIP2 RNAi 系統の遺伝子発現を比較し、mRNA の発現量が 1.5 倍以上かつ有意 ( $p < 0.01$ ) に変化しており、神経発生に関与している事が報告されている遺伝子を候補遺伝子とした。比較用のサンプルとして用いた系統は以下の通りである。

コントロール系統	<i>elav-Gal4/UAS-dicer2</i>
DIP2 RNAi 系統	<i>elav-Gal4/UAS-dicer2; UAS-DIP2 RNAi/+</i>

いずれの系統も 29°C で飼育し、実験は 4 つの生物学的反復を用いて行った。

### 3.12 qRT-PCR 解析

*yw* 及び *DIP2* 機能欠失変異体 (*yw*;; *DIP2*<sup>34</sup>/*DIP2*<sup>M101352</sup>)、*DIP2* ノックダウン系統 (*elav-Gal4/UAS-dicer2*; *UAS-DIP2-IR/+*)、*glaikit* ノックダウン系統 (*elav-Gal4/UAS-dicer2*; *UAS-gkt-IR/+*)、*Glaikit* 過剰発現系統 (*elav-Gal4/+*; *UAS-gkt/+*) の 20 個体分の成虫脳 (羽化後 1 日以内) から RNeasy Purification Kit を用いて total RNA を抽出した。逆転写はランダム 6-mer プライマーを用いて PrimeScript II High Fidelity RT-PCR Kit (Takara Bio) で行った。cDNA は THUNDERBIRD SYBR qPCR mix (Toyobo) を使用して LightCycler 480 (Roche, Basel, Switzerland) で定量した。*Rp49* の mRNA をリファレンスとして相対定量を行った。実験は 3 つの生物学的反復及び 2 つの技術的反復を用いて行った。本研究の qRT-PCR 解析において用いたプライマーは以下の通りである。

*gkt\_fwd* GCCATTGAGCATAACGCTGC

*gkt\_rev* GTGGCTTGTCAGTATCCCCG

*Rp49\_fwd* TACAGGCCCAAGATCGTGAA

*Rp49\_rev* TCTCCTTGCGCTTCTTGGA



## 4. 結果

### 4.1 *DIP2* 変異体系統の作出

キノコ体の軸索枝形成に関与する新規因子を同定する為、RNAi スクリーニングを行った。キノコ体特異的な Gal4 ドライバーである *OK107-Gal4* を持つ系統と標的遺伝子を抑制する shRNA を発現する系統を交配し、標的遺伝子をキノコ体特異的にノックダウンして成虫キノコ体の形態異常の有無を観察した。その結果、1692 系統 (1279 遺伝子) の内 689 系統でキノコ体の形態異常が観察された (図 15)。

689 系統の中から、解析対象として *DIP2* を選出した。*DIP2* をキノコ体特異的に抑制すると  $\beta$  ローブが  $\alpha$  ローブに誤投射する表現型が観察された (93.8%, n = 48) (図 16 A, C)。オフターゲット効果による表現型である可能性を否定する為、*DIP2* の異なる領域を抑制する shRNA (図 16 B) をキノコ体特異的に発現させた所、同様の表現型を得る事が出来た (46.7%, n = 30) (図 16 C)。これらの結果は、*DIP2* は  $\alpha/\beta$  ニューロン特異的に投射を制御している可能性を示唆している。

次に、*DIP2* の機能欠失型系統を作出する為に imprecise excision を行った。*DIP2* の第 1 イントロン内に P 因子が挿入されている系統である *DIP2*<sup>KG01855</sup> からの P 因子切り出しを試みた。その結果、*DIP2*<sup>34</sup> 系統を作出した。*DIP2*<sup>34</sup> のゲノム DNA をシーケンシングした所、*DIP2*<sup>34</sup> では *DIP2* の 5'-UTR から第 4 エキソンまで完全に欠失している事が確認された (図 17 A)。また、第 6 エキソンにトランスポゾン的一种である *Minos* が挿入されている *DIP2*<sup>MI01352</sup> 系統を *DIP2* の機能欠失変異体の候補とした (Venken et al., 2011) (図 17 A)。

これらの *DIP2* 変異体候補の系統における *DIP2* タンパク質の発現の有無を確認する為、ウェスタンブロッティング法を用いた。その結果、*DIP2*<sup>34</sup> のホモ接合体及び *DIP2*<sup>MI01352</sup> のホ

モ接合体、 $DIP2^{34/M101352}$  のトランスヘテロ接合体全てにおいて正常な DIP2 タンパク質の発現を確認する事は出来なかった (図 17 B)。これらの結果から、 $DIP2^{34}$  及び  $DIP2^{M101352}$  系統は DIP2 の機能欠失型アリルである事を意味している。以降の解析では、 $DIP2^{34/M101352}$  のトランスヘテロ変異体を  $DIP2$  機能欠失変異体として用いている。

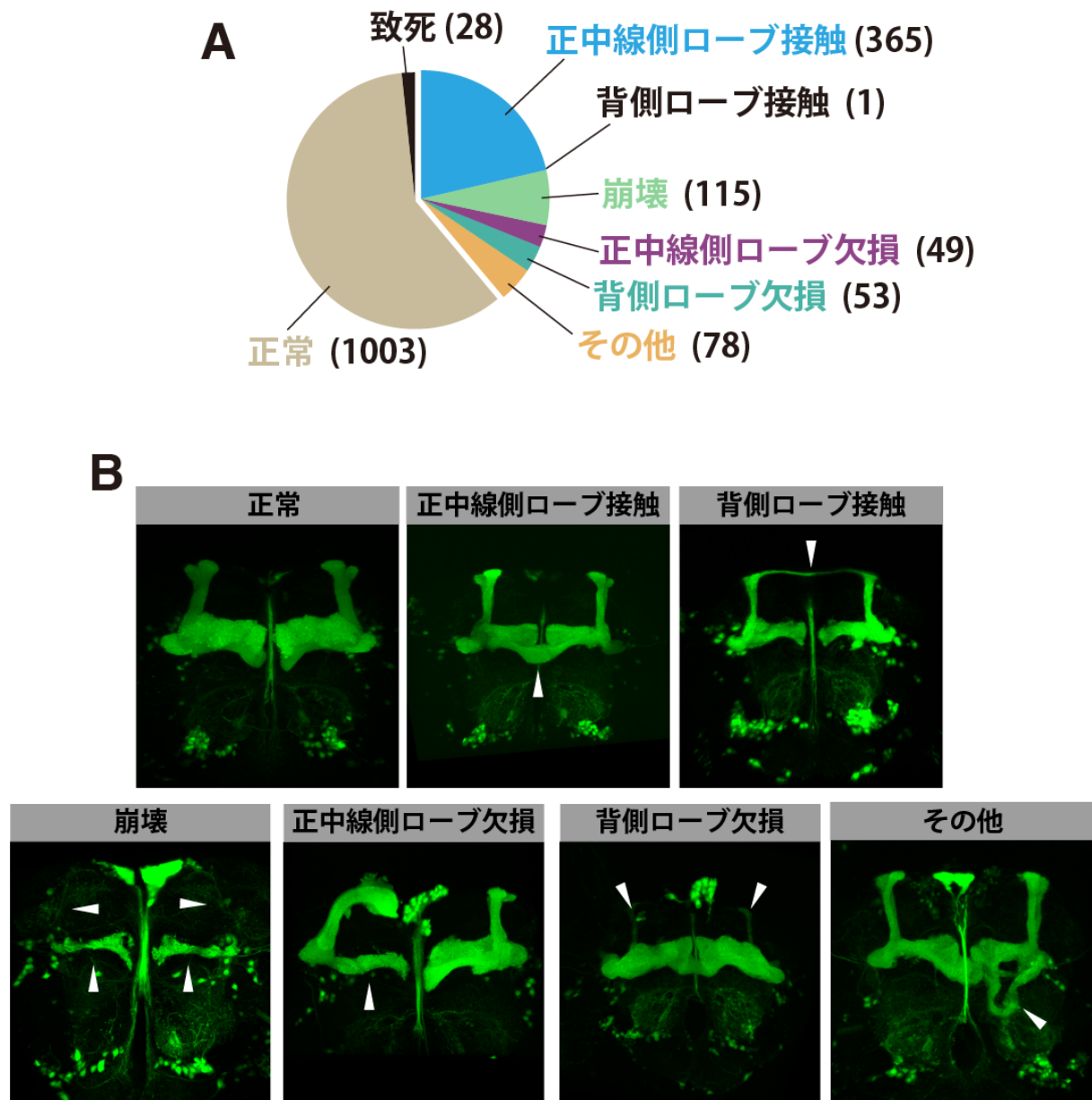


図 15 : (A) RNAi スクリーニングの結果。約 40% の shRNA 系統で形態異常が観察された。(B) 各表現型の代表例。白矢印は異常部位を指し示している。正中線側ローブ接触では、正中線側のローブが接触している。背側ローブ接触では、背側のローブが接触している。崩壊では、全ローブの細径化または消失している。正中線側ローブ欠損では、正中線側のローブが一部または全部欠損している。背側ローブ欠損では、背側のローブが一部または全部欠損している。キノコ体は *OK107-Gal4* を用いて GFP を発現 (緑) させる事によって可視化した。

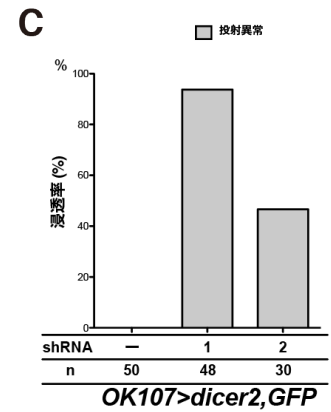
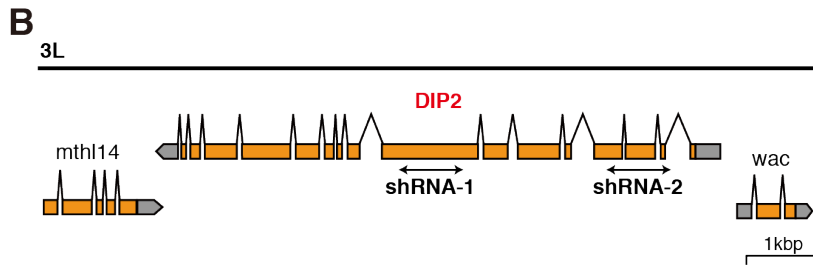
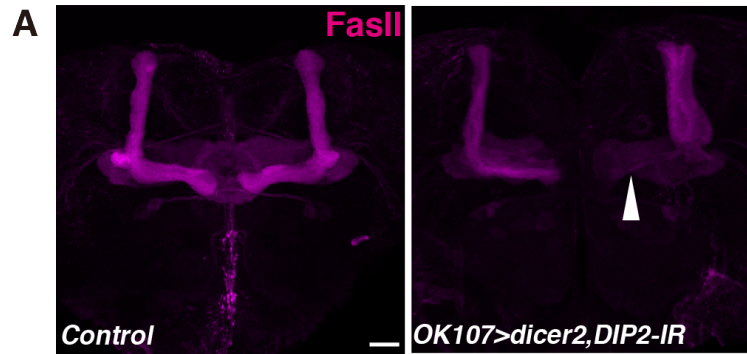


図 16: (A) DIP2 をノックダウンすると  $\beta$  ロープが背側へと誤投射する表現型 (白矢頭) が観察された。キノコ体は抗体 Fas II 抗体を用いた染色 (マゼンタ) によって可視化した。(B) 各 shRNA が標的とする領域。(C) 各 shRNA を用いて DIP2 をノックダウンした時の表現型の浸透率。スケールバーは  $20 \mu\text{m}$ 。

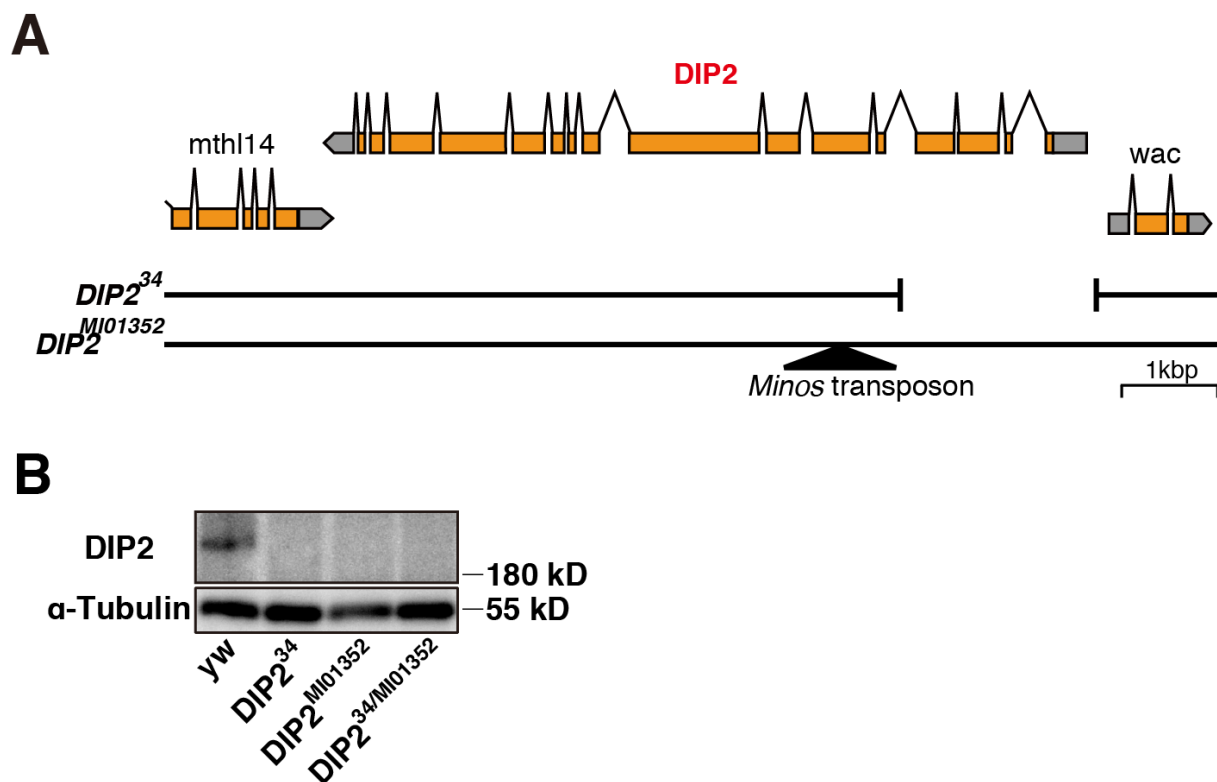


図 17 : *DIP2* 変異体。(A) 各 *DIP2* 変異体の構造。*DIP2*<sup>34</sup>では 5'-UTR を含む 4つのエクソンが欠失している。*DIP2*<sup>MI01352</sup>では 6番目のエクソンに 11kb の *Minos* トランスポゾンが挿入されている。(B) 抗 *DIP2* 抗体を用いたウェスタンブロット。対照として  $\alpha$ -Tubulin を用いた。各 *DIP2* 変異体のホモ接合体及びトランスヘテロ接合体では *DIP2* シグナルを確認する事が出来なかった。

## 4.2 脳における DIP2 の発現解析

キノコ体の形態形成における DIP2 の機能を解明する為、まず発生過程における DIP2 の発現の有無を確認した (図 18)。免疫組織染色による発現解析を行った所、三齢幼虫後期、蛹化 24 時間後、蛹化 48 時間後いずれにおいても脳の広範囲にわたって発現が確認された (図 18 A)。キノコ体に限局すると、三齢幼虫後期ではキノコ体のペダンクル及びローブ構造の中心領域で強い発現が観察された (図 18 C-G')。この時期には  $\alpha'/\beta'$  ニューロンが神経幹細胞から分化し、ペダンクルとローブ構造の中心領域を通して投射している事が報告されている (Kurusu et al., 2002; Lee et al., 1999)。従って、DIP2 の強い発現が確認された領域は  $\alpha'/\beta'$  ニューロンであると考えられる。一方、蛹化 24 時間後、蛹化 48 時間後では DIP2 の発現はペダンクル、ローブ構造だけでなくキノコ体全体で確認された (図 18 H-L')。これらの DIP2 シグナルが抗 DIP2 抗体のバックグラウンドである可能性を排除する為、DIP2 機能欠失変異体において DIP2 シグナルを確認した所、脳全体で DIP2 シグナルが減少している事が観察された (図 18 B, D, I)。以上の結果から、DIP2 は発生過程においてキノコ体に限らず脳全体で広範囲に発現している事、抗 DIP2 抗体は内在性の DIP2 の発現を組織染色レベルで検出出来る事が判明した。

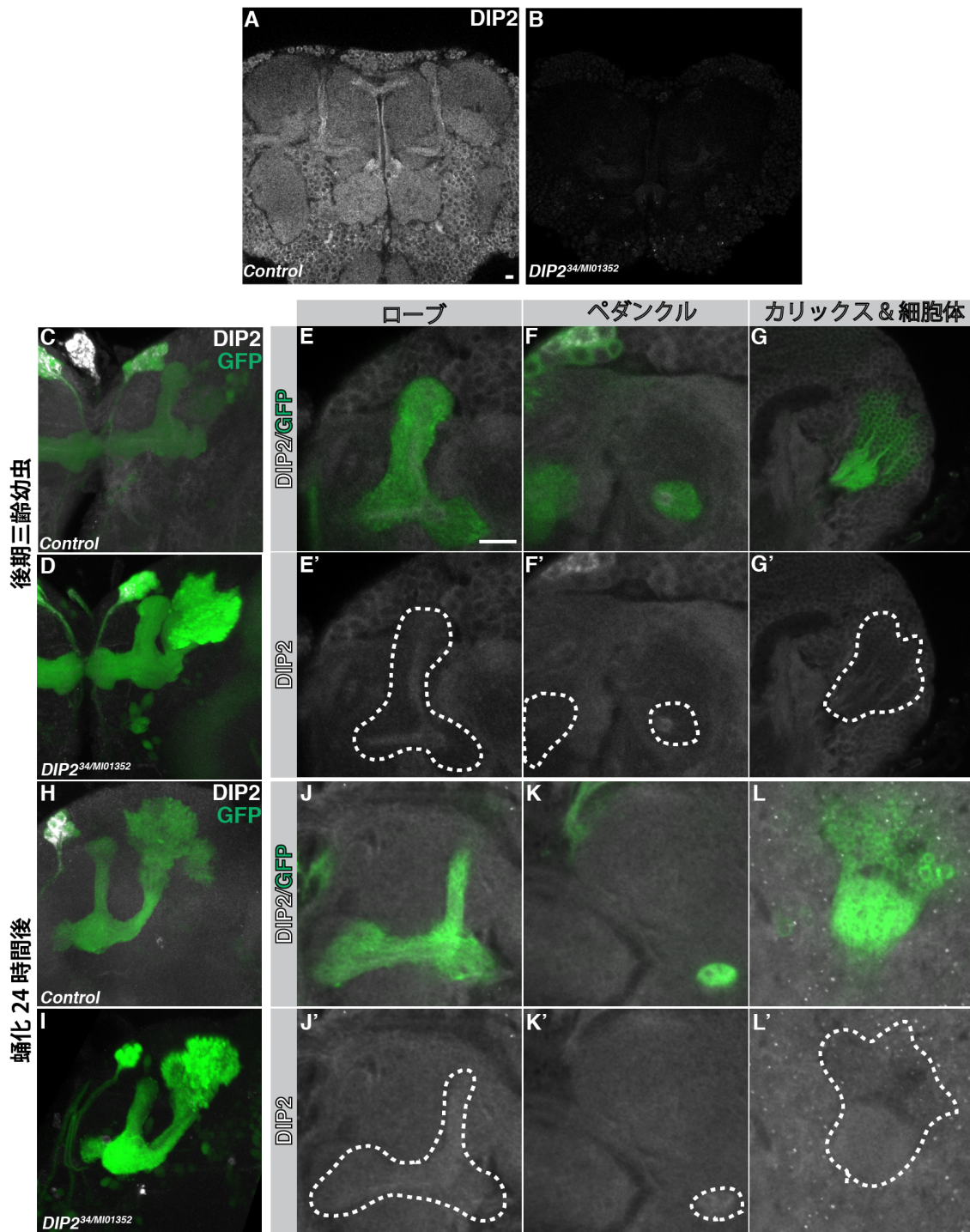


図 18: 発生期の脳における DIP2 の発現パターン。キノコ体は *OK107-Gal4* を用いて GFP を発現 (緑) させる事によって可視化し、抗 DIP2 抗体のシグナルは白で示した。(A) 蛹化 48 時間後では中枢脳の広範囲で DIP2 が検出された。(C、E-G') 後期三齢幼虫ではキノコ体軸索部の中心でシグナルが観察された。蛹化 24 時間後 (H、J-L') では、DIP2 シグナルはキノコ体全体で観察された。後期三齢幼虫 (D) 及び蛹化 24 時間後 (I)、蛹化 48 時間後 (B) の *DIP2* 変異体を用いて抗 DIP2 抗体の特異性を確認した。(E'-G') 及び (J'-L') の点線部はキノコ体を表している。スケールバーは  $20\ \mu\text{m}$ 。

### 4.3 DIP2 変異体の解析

#### 4.3.1 DIP2 変異体における成虫キノコ体の表現型解析

DIP2 変異体におけるキノコ体の形態を観察する為、OK107-Gal4 による GFP の発現、抗 Fasciclin II (Fas II) 抗体及び抗 Trio 抗体による免疫組織染色でキノコ体を可視化した。OK107-Gal4 によってキノコ体全体、抗 FasII 抗体によって  $\gamma$  ロープと  $\alpha\beta$  ロープ、抗 Trio 抗体によって  $\gamma$  ロープと  $\alpha'\beta'$  ロープがそれぞれラベルされる(Awasaki et al., 2000; Crittenden et al., 1998)。野生型のキノコ体  $\alpha\beta$  ロープでは背側に 1 本の  $\alpha$  ロープ、正中線側に 1 本の  $\beta$  ロープが存在する。しかし、DIP2 機能欠失変異体 (n=83) の  $\alpha\beta$  ロープでは、通常の  $\alpha\beta$  ロープに加え新たなロープ (66.0%) や両ロープが同方向に投射する投射異常 (6.02%)、異所性ロープが形成され、なおかつ全てのロープが同方向に投射する表現型 (4.82%) が観察された (図 19)。遺伝学的背景の違いによる表現型の浸透率の有意な差は検出されなかった (DIP2<sup>34</sup> 74.1% n=54、DIP2<sup>M101352</sup> 65.5% n=58、DIP2<sup>34/M101352</sup> 67.5% n=83) (図 20 A)。異所性ロープや投射異常が生じるロープの方向性を定量した所、正中線側では背側の約 2 倍の浸透率でロープの形成や投射異常が確認された (図 20 B)。一方、 $\alpha'\beta'$  ロープや  $\gamma$  ロープでは野生型との有意な違いは観察されなかった (図 21, 図 22)。DIP2 機能欠失変異体においては同一キノコ体内で  $\alpha\beta$  ロープが投射異常を起こしていても  $\alpha'\beta'$  ロープの投射異常は観察されなかった (図 21)。また、DIP2 変異体のカリックスや細胞体に特段の変化は認められなかった。以下の解析では、断りのない限り  $\alpha\beta$  ロープの形態を表現型の解析に用いた。



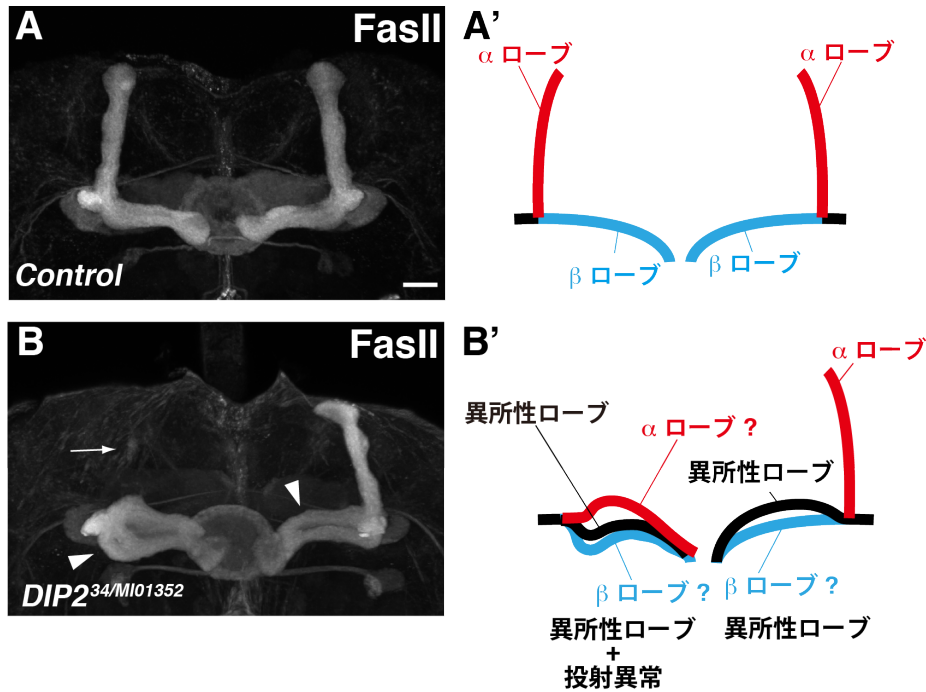
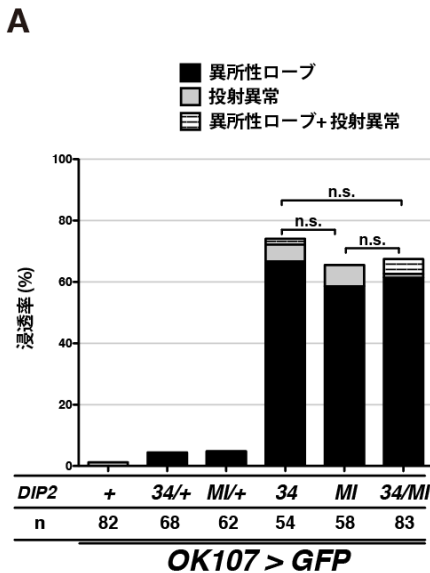


図 19: *DIP2* 変異体の  $\alpha/\beta$  ロープ。  $\alpha/\beta$  ロープは抗 Fas II 抗体による染色 (白) で可視化した。野生型 (A) と比べ *DIP2* 変異体 (B) では異所性ローブ (白矢頭) 及び投射異常 (白矢印) が観察された。(A')、(B') は (A)、(B) それぞれの模式図。スケールバーは  $20\mu\text{m}$ 。



遺伝子型	ローブ表現型	方向			n
		背側	正中線側	両方	
<i>DIP2</i> <sup>34</sup>	異所性ローブ	10	19	7	36
	投射異常	0	4	0	4
	異所性ローブ+投射異常	0	1	0	1
<i>DIP2</i> <sup>MI01352</sup>	異所性ローブ	9	21	4	34
	投射異常	2	2	0	4
	異所性ローブ+投射異常	0	0	0	0
<i>DIP2</i> <sup>34/MI01352</sup>	異所性ローブ	15	26	10	51
	投射異常	1	0	0	1
	異所性ローブ+投射異常	1	3	0	4

図 20: (A) *DIP2* 変異体における各表現型の割合。34 は *DIP2*<sup>34</sup> を、MI は *DIP2*<sup>MI01352</sup> をそれぞれ意味している。*DIP2*<sup>34</sup> のホモ接合体、*DIP2*<sup>MI01352</sup> のホモ接合体、*DIP2*<sup>34</sup> と *DIP2*<sup>MI01352</sup> のトランスヘテロ接合体で表現型浸透率の有意差は検出されなかった。(B) 各遺伝子型における異所性ローブ及び投射異常が生じる方向の定量。正中線側でより多くの表現型が観察された。

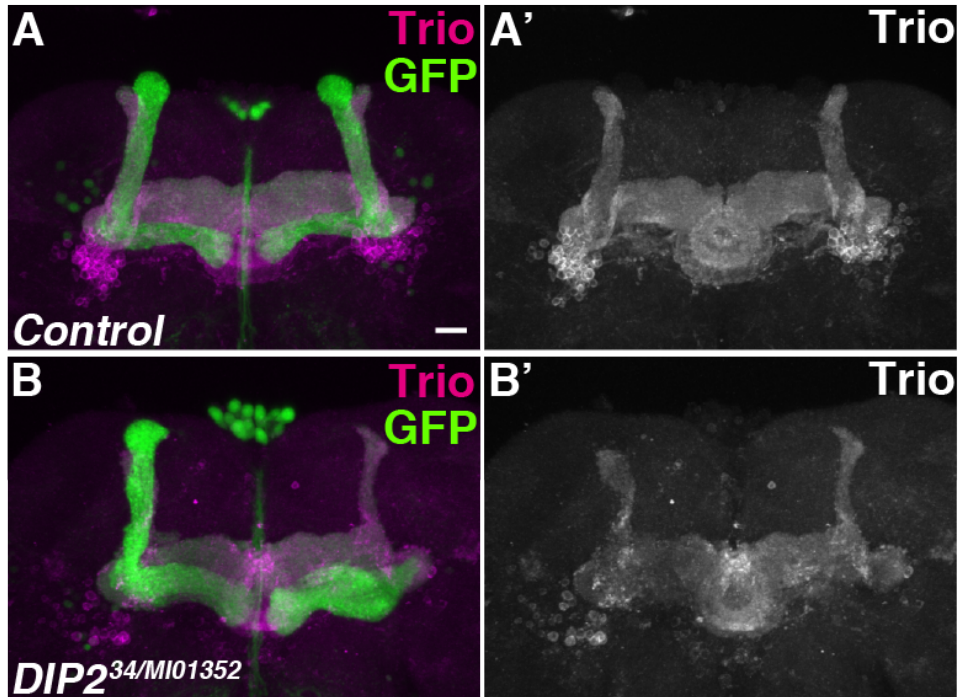


図 21 : *DIP2* 変異体の  $\alpha'/\beta'$  ロープ。キノコ体全体は *OK107-Gal4* による GFP の発現 (緑) で、 $\alpha'/\beta'$  ロープは抗 *Trio* 抗体による染色 (A、B ではマゼンタ、A'、B' では白) で可視化した。コントロール (A-A') でも、*DIP2* 変異体 (B-B') でも  $\alpha'/\beta'$  ロープの形態に差は見られなかった。スケールバーは  $20\ \mu\text{m}$ 。

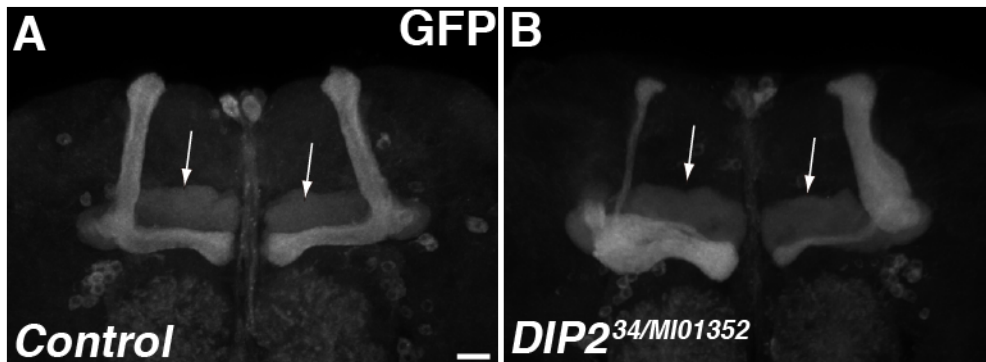


図 22 : *DIP2* 変異体の  $\gamma$  ロープ。キノコ体は *7B-Gal4* による *mcd8::GFP* の発現 (白) で可視化した。コントロール (A) でも、*DIP2* 変異体 (B) でも  $\gamma$  ロープ (白矢印) の形態異常は観察されなかった。スケールバーは  $20\ \mu\text{m}$ 。

#### 4.3.2 発生過程における *DIP2* 変異体のキノコ体表現型解析

キノコ体の形態形成には、軸索分岐や誘導、時期特異的分化、刈り込みなど多くの現象が関与している事が知られている (Lee et al., 1999; Rallis et al., 2010; Shin and DiAntonio, 2011; Zhu et al., 2006)。また、 $\gamma$  ニューロンは幼虫期では  $\alpha'/\beta'$  ロープや  $\alpha/\beta$  ロープの様に軸索枝を形成し背側と正中線側にローブ構造を形成する事が知られている。*DIP2* 変異体の成虫脳で観察されたキノコ体の表現型が観察され始める時期の同定、幼虫期の  $\gamma$  ロープにおける *DIP2* の影響を確認する為、発生過程における *DIP2* 変異体のキノコ体の表現型解析を行った。三齢幼虫後期及び蛹化 24 時間後、蛹化 48 時間後のキノコ体を観察した。三齢幼虫後期では野生型と *DIP2* 変異体のキノコ体の間に有意な差は認められなかった (図 23 A, E)。しかし、蛹化 24 時間後以降では成虫と同様に、異所性の  $\alpha/\beta$  ロープや  $\alpha/\beta$  ロープの投射異常が観察された (図 23 B-D, F-H)。また、蛹化 24 時間後の表現型の浸透率は成虫時の浸透率と有意差が得られなかった事 (図 24) から、*DIP2* 変異体の表現型は正常発生後に縮退や刈り込みを受けた事によって引き起こされた訳ではなく、発生異常によって引き起こされた可能性が示唆される。

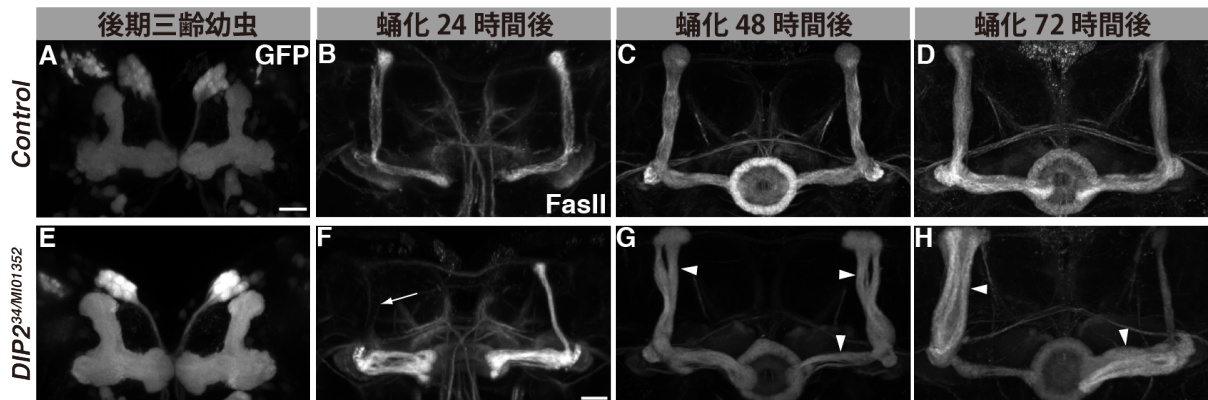


図 23: 各ステージにおける野生型 (A-D) および *DIP2* 変異体 (E-H) のキノコ体。後期三齢幼虫 (A、E) では *OK107-Gal4* を用いてキノコ体全体を可視化、蛹化 24 時間後 (B-D、F-H) では抗 FasII 抗体を用いて  $\alpha/\beta$  ロープを可視化している。後期三齢幼虫 (A、E) ではコントロールと *DIP2* 変異体のキノコ体の形態に差を認める事は出来なかったが、蛹化 24 時間後 (B-D、F-H) 以降では投射異常 (白矢印) や異所性ローブ (白矢頭) が観察された。スケールバーは 20  $\mu\text{m}$ 。

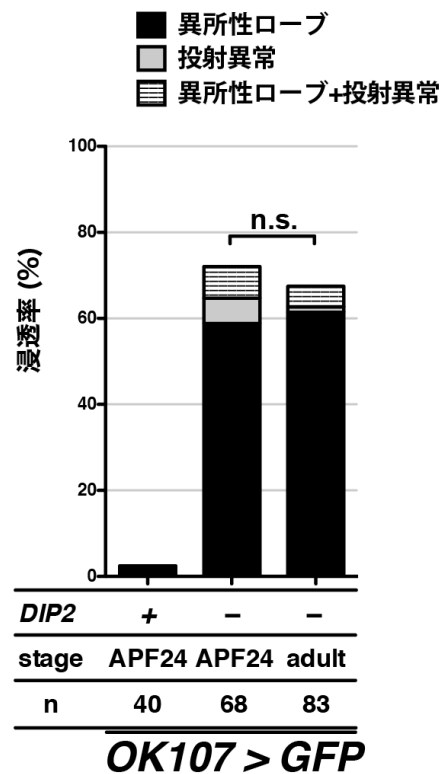


図 24: 蛹化 24 時間後 (APF24) 及び成虫における野生型及び *DIP2* 変異体の各表現型の割合。蛹化 24 時間後と成虫時の表現型の浸透率に有意な差は得られなかった。

### 4.3.3 *DIP2* 変異体のキノコ体ニューロンの 1 細胞レベルでの表現型解析

*DIP2* 変異体のローブ構造で観察された表現型の原因として、3通りの可能性が考えられる (図 25)。(1) 束状化 (fasciculation) に異常が生じ、本来 1 本の束状になる筈であったローブ構造が複数に分かれてしまう可能性。この場合、 $\alpha\beta$  ニューロンは 1 細胞レベルでは正常な構造・投射パターンを有する筈である。(2) ローブ構造を形成する  $\alpha\beta$  ニューロンの一部に投射異常が生じ、異所性のローブを形成している可能性である。単一細胞レベルで観察すると、一部の  $\alpha\beta$  ニューロンは異常な投射パターンを示す筈である。(3) 軸索形成異常によって 3 本以上の軸索枝が生じ、それぞれの軸索枝がローブ構造を形成するという可能性。 $\alpha\beta$  ニューロンは 3 本以上の軸索枝を有すると考えられる。*DIP2* 変異体で観察された表現型の真の原因を探る為、MARCM 法を用いて *DIP2* 変異体バックグラウンドで  $\alpha\beta$  ニューロンを単一細胞レベルで観察した。

野生型の  $\alpha\beta$  ニューロンはローブ構造の根本で 1 回分岐し、 $\alpha$  ニューロンは背側へ  $\beta$  ニューロンは正中線側へ投射する (図 26 A-A")。しかし、*DIP2* 変異体でラベルされた  $\alpha\beta$  ニューロンはローブ構造の根本付近で複数回分岐し、3 本以上の軸索枝が背側もしくは正中線側へと投射していた (図 26 B-B")。また、軸索枝の本数は正常なものの両方の軸索枝が背側もしくは正中線側へと投射するパターンも観察された。中には、3 本以上の軸索枝を形成しつつ、異所性の軸索枝を含めて全ての軸索枝が同方向へ投射するパターンも観察された (図 26 C-C")。なお、単一細胞レベルでも樹状突起に顕著な異常は観察されなかった。

次に、*DIP2* 変異体で観察された  $\alpha\beta$  ローブ構造の異常の原因が  $\alpha\beta$  ニューロンの過剰な軸索枝形成及び軸索枝の投射異常に由来するか確認する為、 $\alpha\beta$  ローブで観察された表現型と  $\alpha\beta$  ニューロンで観察された表現型を対応させた (図 28 A)。その結果、異所性ロー

ブの表現型のみを示した 31 個のキノコ体の内、87.1%のキノコ体で過剰な軸索枝形成、3.23%で軸索枝の投射異常、9.68%で両方の表現型が観察された。ローブの投射異常のみを示したキノコ体 (n=5) では 40%で軸索枝の投射異常、60%で過剰な軸索枝形成と軸索枝の投射異常が観察された。異所性ローブと投射異常の両方を示したキノコ体 (n=3) では全てのキノコ体で過剰な軸索枝形成と投射異常が観察された。これらの結果から、*DIP2* 変異体で観察された  $\alpha\beta$  ローブの表現型は  $\alpha\beta$  ニューロンの過剰な軸索枝形成及び軸索枝の投射異常に起因するといえる。全ての遺伝子型について単一細胞レベルで観察するのは非常に時間・労力が必要となるので、以後に出てくる遺伝子間相互作用等の評価においては全て  $\alpha\beta$  ローブでの表現型のみで議論する。また、各表現型が生じる方向性を定量した所、単一細胞レベルでも背側と比べて 2 倍の浸透率で正中線側で表現型が確認された (図 28 B)。

$\alpha\beta$  ニューロンと同様に  $\alpha'/\beta'$  ニューロンもローブの根本で 1 回分岐し、 $\alpha'$  ニューロンは背側、 $\beta'$  ニューロンは正中線側へと投射する事が知られている (図 29 A-A')。 *DIP2* 変異体の  $\alpha'/\beta'$  ニューロンでも表現型が生じるか確認する為、 $\alpha'/\beta'$  ニューロンの 1 細胞をラベルした (図 27 B)。その結果、 $\alpha'/\beta'$  ニューロンにおいても軸索枝の過剰形成 (図 29 B-B') と投射異常 (図 30 C-C') が観察された。 $\alpha\beta$  ニューロンも  $\alpha'/\beta'$  ニューロンも 1 細胞レベルで観察すると同様の表現型が得られたにも関わらず、*DIP2* 変異体において  $\alpha'/\beta'$  ローブに顕著な構造異常を認める事は出来なかった (図 21)。これは、各々のローブ構造の密度及び軸索枝の投射パターンの決定の違いに起因すると考えられる (5.3 参照)。

最後に、*DIP2* 変異体における  $\gamma$  ニューロンの形態異常の有無を確認した (図 30)。成虫の  $\gamma$  ニューロンは他種のキノコ体ニューロンと異なり背側に投射せず正中線側のみに投射する一方、短い軸索側枝 (arbor) を複数本有する事が知られている。*DIP2* 変異体と野生型の  $\gamma$  ニューロンを比較したが、顕著な差を認める事は出来なかった (図 27 C)。以前の

研究によって、キノコ体ニューロンの短い軸索側枝のみに影響を与え軸索枝には影響を与えない因子が報告 (Zhu et al., 2005) されている事から、短い軸索側枝と軸索枝は異なる分子機構によって制御されている可能性が示唆されている。

以上の *DIP2* 変異体におけるキノコ体の表現型解析から以下の事が言える。

- *DIP2* 変異体では  $\alpha\beta$  ロープ特異的に異所性ローブの形成及びローブの投射異常が観察される。
- 前述の表現型は少なくとも蛹化後 24 時間から観察される。
- 前述の表現型は  $\alpha\beta$  ニューロンの軸索枝の過形成及び投射異常に起因する。
- $\alpha'/\beta'$  ロープにおいては 1 細胞レベルでのみ  $\alpha\beta$  ニューロンと同様の表現型が観察される。
- $\alpha\beta$  ニューロンでも  $\alpha'/\beta'$  ニューロンでも軸索部、特にペダングルの終端部以降でしか表現型が観察されない。

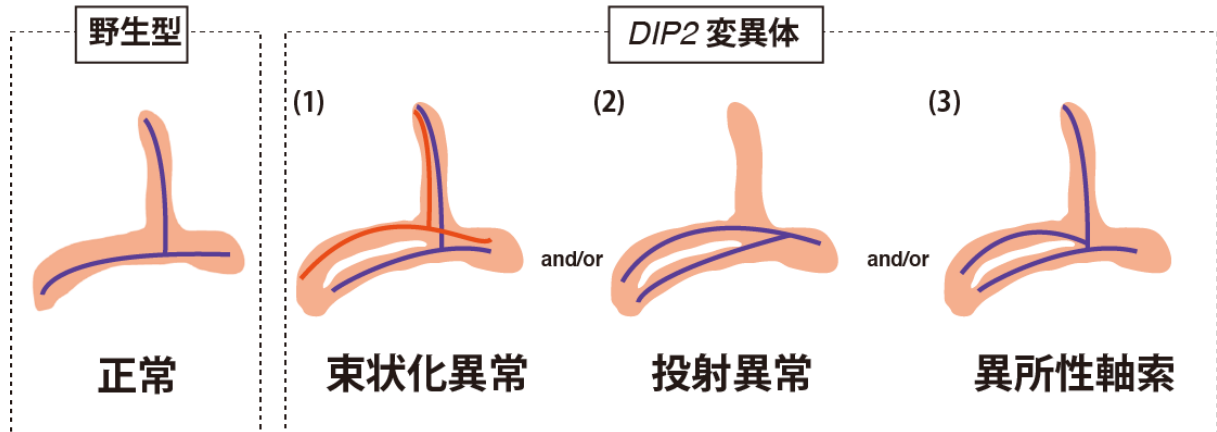


図 25 : *DIP2* 変異体のローブ構造から予測される  $\alpha/\beta$  ニューロンの投射パターン。野生型の  $\alpha/\beta$  ニューロンはローブ構造の根本で 1 回分岐し、 $\alpha$  ニューロンを背側へ、 $\beta$  ニューロンを正中線側へと投射している。一方、*DIP2* 変異体では (1)  $\alpha/\beta$  ニューロンの束状化機構に異常が生じ、ローブ構造に亀裂が走っている可能性、(2) 一部のニューロンだけが投射異常を起こし、結果的に 3 本以上のローブ構造が観察されている可能性、(3) 過剰な軸索分岐が生じ、ローブ構造が 3 本以上形成される可能性が考えられる。



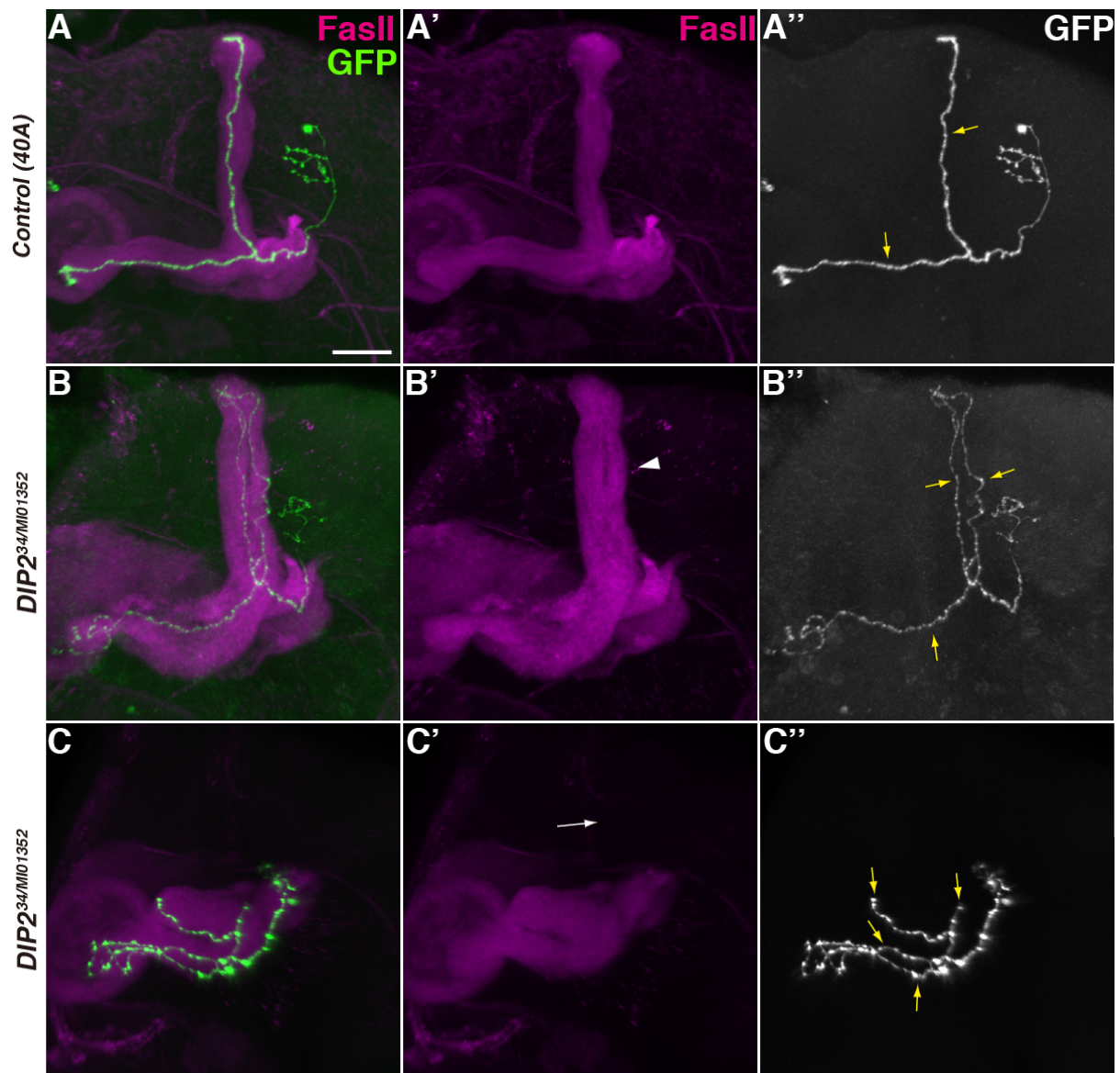


図 26: 野生型および *DIP2* 変異体の  $\alpha/\beta$  ニューロンを MARCM 法を用いて可視化した。キノコ体は抗 Fas II 抗体 (マゼンタ) を用いて可視化し、クローンを緑 (A、B、C) または白 (A''、B''、C'') で可視化した。(A-A'') 野生型の  $\alpha/\beta$  ニューロンは一回分岐し、各々の軸索枝を背側と正中線側へと投射する。(B-B'') *DIP2* 変異体では複数回軸索分岐が誘導され、各々の軸索枝が異所性ローブ (白矢頭) を含む全てのローブ構造へと投射する。(C-C'') また、ローブ構造の投射異常が観察されたキノコ体 (白矢印) の  $\alpha/\beta$  ニューロンは複数の軸索枝を有しつつ全て同方向へと投射する表現型が観察された。黄矢印は軸索枝を示している。スケールバーは  $20\ \mu\text{m}$ 。

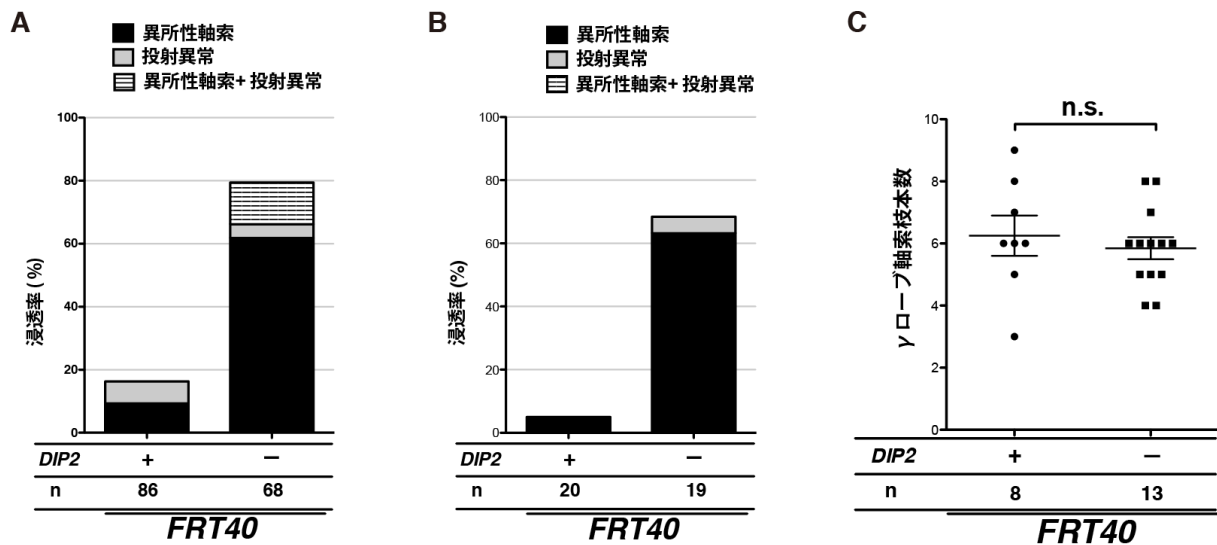


図 27：(A) 野生型及び *DIP2* 変異体の  $\alpha/\beta$  ニューロンの各表現型の割合。(B) 野生型及び *DIP2* 変異体の  $\alpha'/\beta'$  ニューロンの各表現型の割合。(C) 野生型及び *DIP2* 変異体の  $\gamma$  ニューロンの短い軸索側枝本数。

**A**

遺伝子型	ローブ表現型	単一細胞クローン表現型				n
		正常	異所性軸索	投射異常	異所性軸索 + 投射異常	
Control	正常	72	8	1	0	81
	異所性ローブ	0	0	0	0	0
	投射異常	0	0	5	0	5
	異所性ローブ + 投射異常	0	0	0	0	0
<i>DIP2</i> <sup>34/Mi01352</sup>	正常	14	15	0	0	29
	異所性ローブ	0	27	1	3	31
	投射異常	0	0	2	3	5
	異所性ローブ + 投射異常	0	0	0	3	3

**B**

遺伝子型	表現型	方向			n
		背側	正中線側	両方	
<i>DIP2</i> <sup>34/Mi01352</sup>	異所性ローブ	6	21	4	31
	投射異常	3	2	0	5
	異所性ローブ + 投射異常	1	2	0	3
<i>DIP2</i> <sup>34/Mi01352</sup>	異所性軸索	15	24	3	42
	投射異常	2	1	0	3
	異所性軸索 + 投射異常	4	5	0	9

図 28：(A) 各ローブ表現型における単一細胞の表現型の割合。縦軸がローブの表現型、横軸が単一細胞レベルでの表現型を示している。(B) *DIP2* 変異体におけるローブ及び単一細胞の各表現型が生じる方向の定量。正中線側でより多くの表現型が観察された。

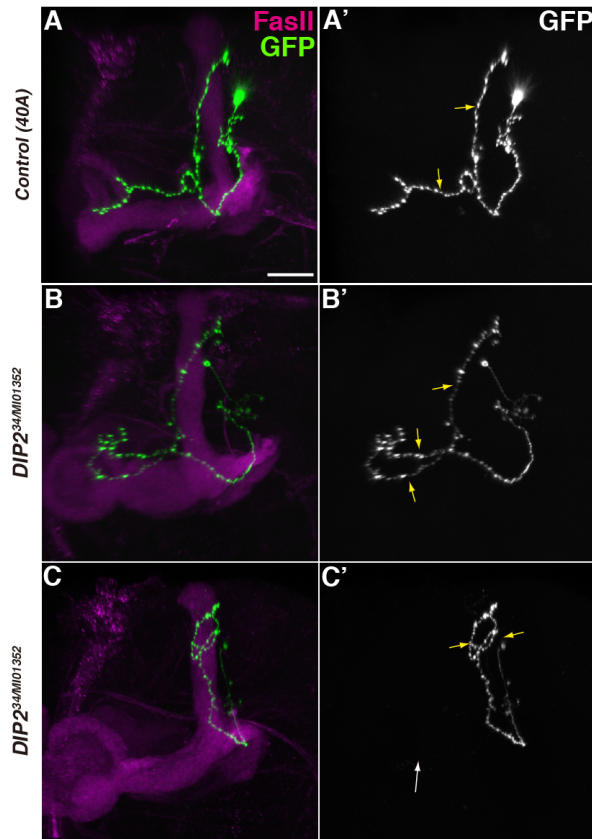


図 29：野生型 (A-A') 及び *DIP2* 変異体 (B-C') の  $\alpha/\beta$  ニューロン。キノコ体は抗 Fas II 抗体 (マゼンタ) を用いて可視化し、クローンを緑 (A、B、C) または白 (A'、B'、C') で可視化した。  $\alpha/\beta$  ニューロンと同様に過剰な軸索枝形成、投射異常 (白矢印) が観察された。黄矢印は軸索枝を示している。スケールバーは  $20\mu\text{m}$ 。

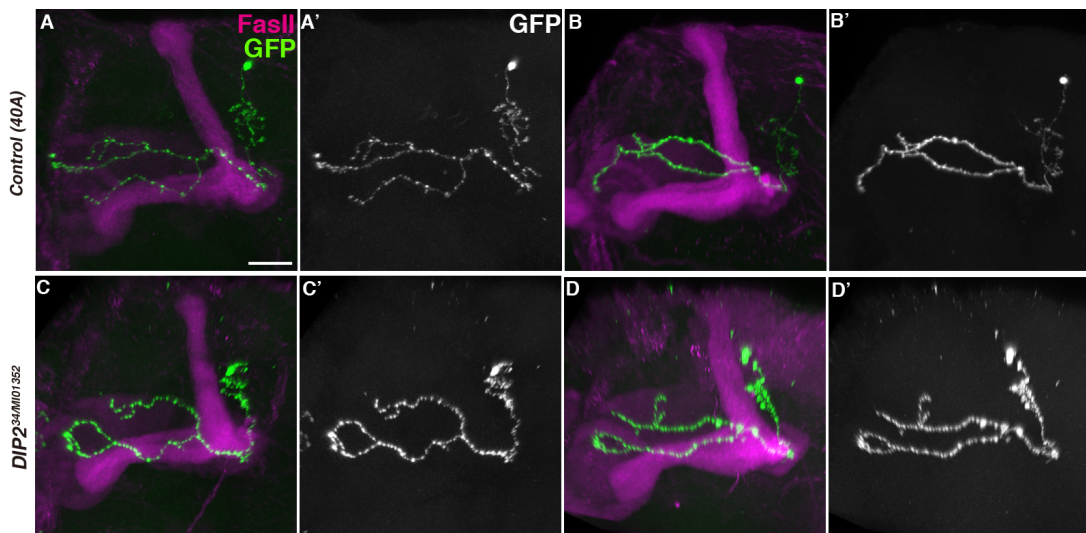


図 30：野生型 (A-A') 及び *DIP2* 変異体 (B-C') の  $\gamma$  ニューロン。キノコ体は抗 Fas II 抗体 (マゼンタ) を用いて可視化し、クローンを緑 (A、B、C、D) または白 (A'、B'、C'、D') で可視化した。スケールバーは  $20\mu\text{m}$ 。

#### 4.4 キノコ体形成における DIP2 の組織・細胞自律性の検討

前項の解析では DIP2 の全身変異体を用いている為、DIP2 がキノコ体以外の組織で機能して  $\alpha/\beta$  ニューロンの形成異常に寄与している可能性を排除出来ていない。そこでキノコ体で特異的な発現パターンを示す様々な Gal4 系統を用いてレスキュー実験を行い、DIP2 のキノコ体における組織自律性について検討した。まず、DIP2 の過剰発現によってキノコ体に形態異常が生じるか確認した。*OK107-Gal4* 及び神経系全体で発現する事が知られている *elav-Gal4* を用いて DIP2 を過剰発現すると、軸索枝の投射異常及び過伸展が高い浸透率で観察された (図 31)。驚くべき事に、DIP2 を RNAi でノックダウンした場合と真逆に、主に背側のローブ ( $\alpha$  および  $\alpha'$ ) が正中線側へと誤投射している表現型が確認された。しかし、*OK107-Gal4* と同様にキノコ体全体をラベルする事が報告されている *MB247-Gal4* や  $\alpha/\beta$  ローブをラベルする事が報告されている *c739-Gal4*、*7B-Gal4* を用いて DIP2 を過剰発現しても殆ど形態異常は観察されなかった (図 32)。

次に、これらの Gal4 系統を用いてレスキュー実験を行った (図 33、図 34 A)。*DIP2* 変異体バックグラウンドで *OK107-Gal4* 及び *elav-Gal4* を用いて DIP2 を過剰発現した所、野生型バックグラウンドで DIP2 を過剰発現した場合と同様の表現型を示した (図 34 A)。一方、*c739-Gal4* 及び *7B-Gal4* を用いてレスキュー実験を行った所、*DIP2* 変異体で観察された表現型が有意に回復している事が確認された (*c739>mcd8; DIP2<sup>34/M101352</sup>* 70.1% n = 77、*c739>mcd8, DIP2; DIP2<sup>34/M101352</sup>* 10.8% n = 74、*7B>mcd8; DIP2<sup>34/M101352</sup>* 58.6% n = 70、*7B>mcd8, DIP2; DIP2<sup>34/M101352</sup>* 14.6% n = 89) (図 33)。また、この時レスキューされる表現型の方向性に偏りはなかった (図 34 B)。

近年の研究によって、 $\alpha/\beta$  ローブの投射パターンは非細胞自律的であり  $\alpha'/\beta'$  ローブや pioneer  $\alpha/\beta$  ローブが重要な役割を持つ可能性が示唆されている (Fushima and Tsujimura,

2007; Shin and DiAntonio, 2011; Zhu et al., 2003)。 $\alpha\beta$  ロープの投射パターンが、これらのロ  
ープにおける DIP2 の発現に依存している可能性を検討する為、 $\alpha'\beta'$  ロープと pioneer  $\alpha\beta$   
ロープそれぞれ特異的に発現する事が知られている Gal4 系統を用いてレスキュー実験を  
行ったがどちらのロープで DIP2 を強制発現させても、*DIP2* 変異体の投射異常を回復する  
事は出来なかった (図 34)。

最後に DIP2 の細胞自律性を確かめる為、MARCM 解析を行い 1 細胞だけ DIP2 ホモ変異  
体となる  $\alpha\beta$  ニューロンのクローンを誘導した。野生型の  $\alpha\beta$  ニューロン (8.64%, n = 81)  
に比べて、*DIP2* 変異体の  $\alpha\beta$  ニューロンでは *DIP2* 全身変異体と同様に軸索枝の過剰形成  
の有意な増加が観察された (51.4%, n = 74) (図 35 B-B'、図 36)。しかし、軸索枝の投射異  
常の有意な増加は確認されなかった。キノコ体では新しい軸索はペダングルやロープの中  
心部を通って投射する為、投射経路が既に投射した (= 古い) キノコ体ニューロンによって  
制限されてしまう。その為、1 細胞以外全てヘテロ変異体となっている MARCM 法では投  
射異常は観察され難い。また、1 細胞レベルでレスキュー実験を行った所、軸索枝の過剰  
形成のレスキューが確認された (*DIP2*<sup>34</sup> 51.4%, n = 74、*UAS-DIP2*;*DIP2*<sup>34</sup> 19.7%, n = 56) (図  
35 D-D'、図 36)。

以上の DIP2 のレスキュー実験等から以下の事が言える。

- ・ DIP2 を過剰発現すると主に背側から正中線側方向への投射異常が引き起こされる。
- ・ 少なくとも、DIP2 は細胞自律的に  $\alpha\beta$  ニューロンの軸索枝の過剰形成を抑制して  
いる。
- ・ *DIP2* 変異体で観察される投射異常は  $\alpha'\beta'$  ロープ非依存的である。

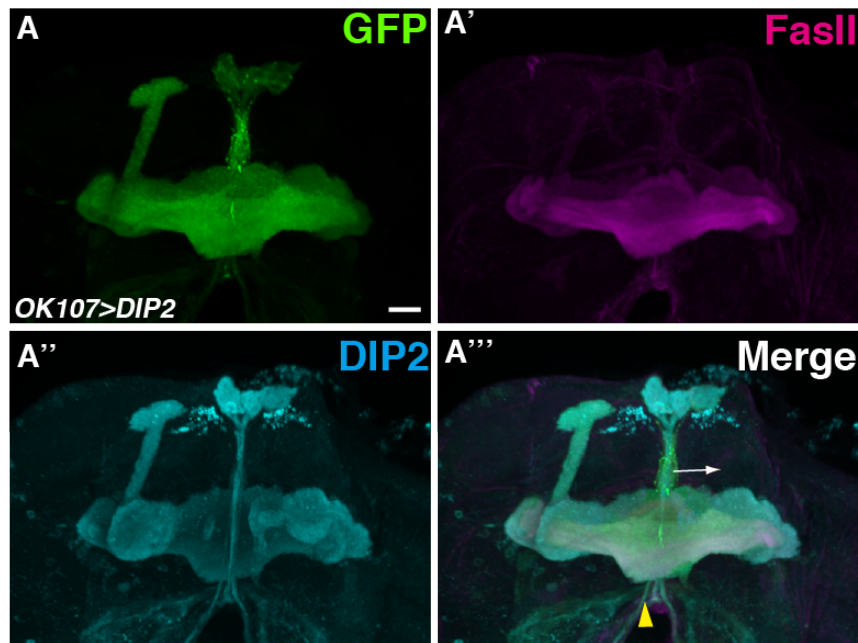


図 31：DIP2 過剰発現の表現型。キノコ体全体を *OK107-Gal4* を用いて GFP を発現（緑）させる事によって可視化し、 $\alpha/\beta$  ローブを抗 Fas II 抗体による染色（マゼンタ）で可視化した。DIP2 の発現をシアンで示した。*OK107-Gal4* を用いてキノコ体特異的に DIP2 を過剰発現させると投射異常（白矢印）及び正中線側ローブ構造の伸長（黄矢頭）が観察された。スケールバーは  $20\mu\text{m}$ 。

Gal4 系統	成虫における発現パターン	過剰発現表現型	
		浸透率 (%)	n
OK107	全ローブ	87.2	94
247	全ローブ	5	20
201Y	$\alpha/\beta$ ローブ(中心), $\gamma$ ローブ	2.2	44
NP2748	$\alpha'/\beta'$ ローブ	0	20
NP7175	$\alpha/\beta$ ローブ(中心)	0	20
c708	pioneer $\alpha/\beta$ ローブ	4.2	24
c739	$\alpha/\beta$ ローブ	0	40
7B	$\alpha/\beta$ ローブ, $\gamma$ ローブ	3.4	88
elav	中枢神経系全体	53.3	45

図 32：各 Gal4 系統を用いて DIP2 を過剰発現した時の表現型の浸透率。



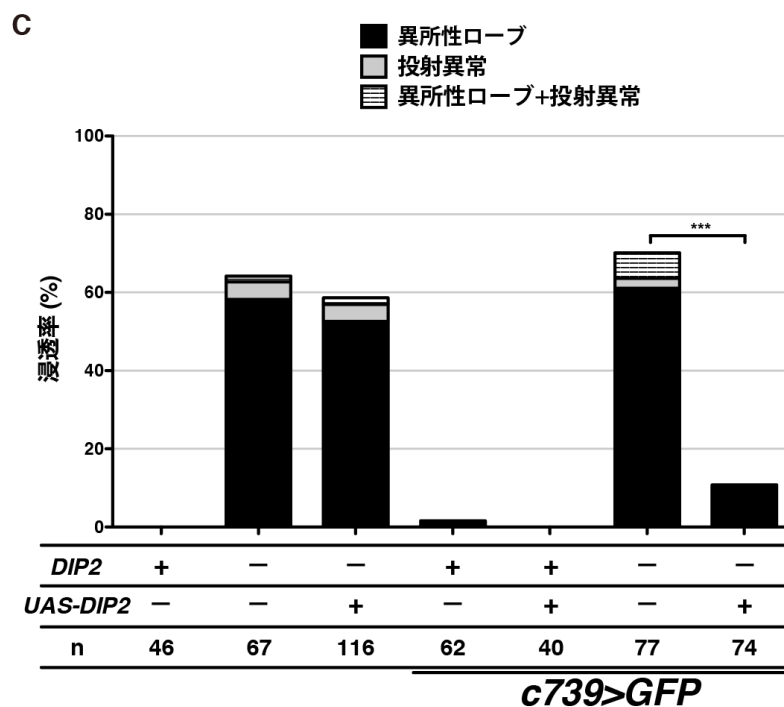
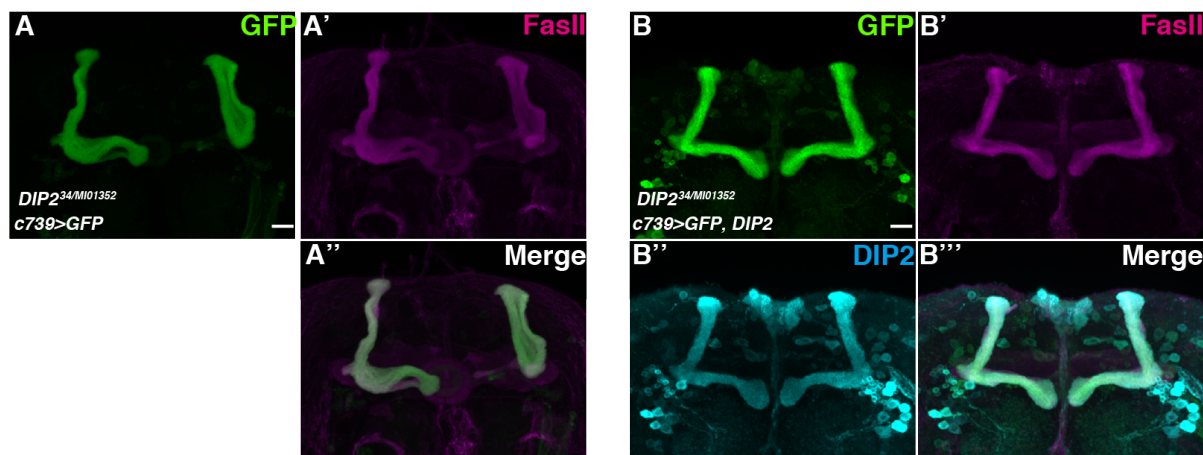


図 33: *c739-Gal4* を用いたレスキュー実験。α/β ローブを *c739-Gal4* を用いた GFP の発現 (緑)、抗 Fas II 抗体による染色 (マゼンタ) で可視化し、DIP2 の発現をシアンで示した。DIP2 変異体 (A-A') と比べ、DIP2 変異体バックグラウンドで *c739-Gal4* を用いて DIP2 を過剰発現 (B-B'') すると α/β ローブの形態異常が回復した。(C) レスキュー実験の定量化。 *c739-Gal4* を用いて DIP2 を発現すると DIP2 変異体の表現型が有意に回復した。 (\*\*\*)  $P < 0.001$ 、Fisher の正確確率検定)。スケールバーは 20 μm。

A

Gal4 系統	成虫における発現パターン	レスキュー実験	
		表現型	n
OK107	全ローブ	過剰発現	40
247	全ローブ	変異体	67
201Y	$\alpha/\beta$ ローブ (中心), $\gamma$ ローブ	-	-
NP2748	$\alpha'$ / $\beta'$ ローブ	変異体	116
NP7175	$\alpha/\beta$ ローブ (中心)	変異体	77
c708	pioneer $\alpha/\beta$ ローブ	変異体	98
c739	$\alpha/\beta$ ローブ	レスキュー <sup>***</sup>	74
7B	$\alpha/\beta$ ローブ, $\gamma$ ローブ	レスキュー <sup>***</sup>	89
elav	中枢神経系全体	過剰発現	64

B

遺伝子型	ローブ 表現型	方向			n
		背側	正中線側	両方	
c739>GFP DIP2 <sup>34</sup> /MIO1352	異所性ローブ	19	26	2	47
	投射異常	0	2		2
	異所性ローブ + 投射異常	1	4		5
c739>DIP2 DIP2 <sup>34</sup> /MIO1352	異所性ローブ	2	5	1	8
	投射異常	0	0		0
	異所性ローブ + 投射異常	0	0		0
7B>GFP DIP2 <sup>34</sup> /MIO1352	異所性ローブ	10	22	5	37
	投射異常	0	2		2
	異所性ローブ + 投射異常	0	2		2
7B>DIP2 DIP2 <sup>34</sup> /MIO1352	異所性ローブ	2	8	1	11
	投射異常	0	2		2
	異所性ローブ + 投射異常	0	0		0

図 34 : (A) 各 Gal4 系統を用いてレスキュー実験を行った結果。表現型の項目で変異体と書かれている系統は表現型が有意に回復しなかった系統、レスキューと書かれている系統は表現型が有意に回復した系統、過剰発現と書かれている系統は過剰発現時の表現型 (図 32 参照) が観察された系統をそれぞれ意味している。 (\*\*\*) $P < 0.001$ , Fisher の正確確率検定)。(B) レスキュー実験におけるローブ及び単一細胞の各表現型が生じる方向の定量。レスキューされる表現型の方向性に偏りは確認されなかった。



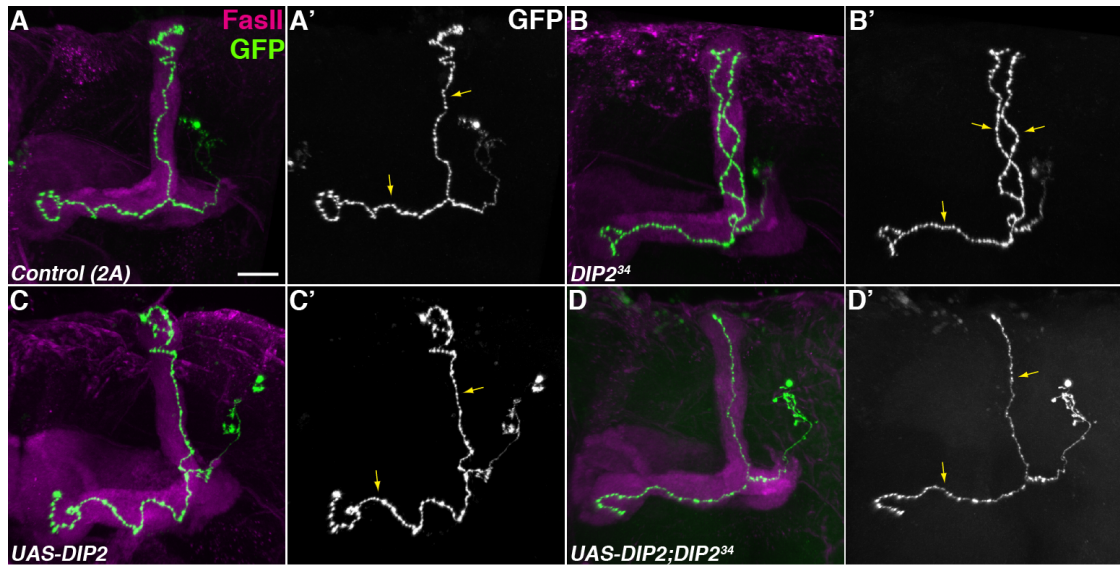


図 35 : *DIP2* 変異体の MARCM 解析。キノコ体は抗 Fas II 抗体による染色（マゼンタ）で可視化し、クローンを緑（A、B、C、D）または白（A'、B'、C'、D'）で可視化した。野生型（A-A'）と比べて、*DIP2* 変異体の MARCM クローン（B-B'）では過剰な軸索枝形成が確認された。（D-D'）この表現型は MARCM クローンでのみ *DIP2* を過剰発現させると回復した。スケールバーは 20  $\mu\text{m}$ 。

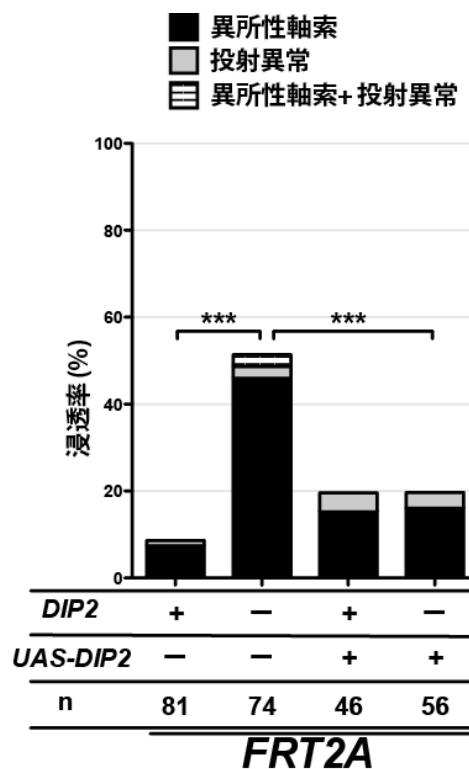


図 36 : MARCM 実験の定量化。コントロールと比べ、単一細胞のみ *DIP2* 変異を導入すると異所性軸索の表現型が有意に増加した。そして、その表現型は変異体クローンでのみ *DIP2* を強制発現することによって有意に回復した。（\*\*\* $P < 0.001$ 、Fisher の正確確率検定）。

#### 4.5 DIP2 のドメイン機能の解析

ヒト DIP2 の研究によって、DIP2 変異体の DNA Methyltransferase-Associated Protein 1-binding ドメイン (DMAP1-binding ドメイン) によるメチル化の制御異常が精神遅滞を引き起こす可能性が示唆されている (Winnepenninckx et al., 2007)。ハエ DIP2 の変異体において神経組織に形態異常が生じる事から、ヒトにおいても DIP2 に変異が生じると脳構造に形態異常が生じ、結果として精神遅滞が引き起こされている可能性が考えられる。つまり、ハエにおいて DIP2 の DMAP1-binding ドメインが神経発生に重要な機能を有している可能性が示唆される。

キノコ体ニューロンの軸索枝制御に必須となる DIP2 の機能ドメインを同定する為、DMAP1-binding ドメインと AMP-synthetase ドメイン (AMP ドメイン) をそれぞれ欠失した UAS-DIP2 コンストラクトを作製し、*c739-Gal4* を用いてレスキュー実験を行った (図 37)。予想に反し、DMAP1-binding ドメインを欠失した DIP2 は、野生型 DIP2 と同様に DIP2 変異体の表現型を有意にレスキューした (*c739>mcd8; DIP2<sup>34/M101352</sup>* 70.1%, n = 77、*c739>mcd8, DIP2 ΔDMAP1; DIP2<sup>34/M101352</sup>* 18.1%, n = 72)。一方、タンデムに並んでいる 2 つの AMP ドメインの内どちらを欠いた DIP2 も DIP2 変異体の表現型をレスキューする事は出来なかった (*c739>mcd8, DIP2 ΔAMP1; DIP2<sup>34/M101352</sup>* 68.1%, n = 72、*c739>mcd8, DIP2 ΔAMP2; DIP2<sup>34/M101352</sup>* 60.0%, n = 80)。これらの結果は、DIP2 の AMP ドメインが軸索枝制御に必須であり、DMAP1-binding ドメインは関与していない可能性を強く示唆している。

DMAP1-binding ドメインのキノコ体発生への関与を確かめる為、DMAP1-binding ドメインによって結合する相手と考えられている DMAP1 を RNAi によってキノコ体特異的にノックダウンした (図 38)。その結果、キノコ体の細胞数が極端に減少し、全ローブが細くなるという表現型が観察された (100%, n = 20)。しかし、この表現型は DIP2 変異体 (図

19) や DIP2 の過剰発現時 (図 31) と全く異なる事から、DMAP1 は DIP2 の DMAP1-binding ドメインを介さずに機能している可能性が強く示唆される。つまり、DMAP1 はキノコ体の発生に必要なではあるが、DIP2 の DMAP1-binding ドメイン非依存的であると言える。

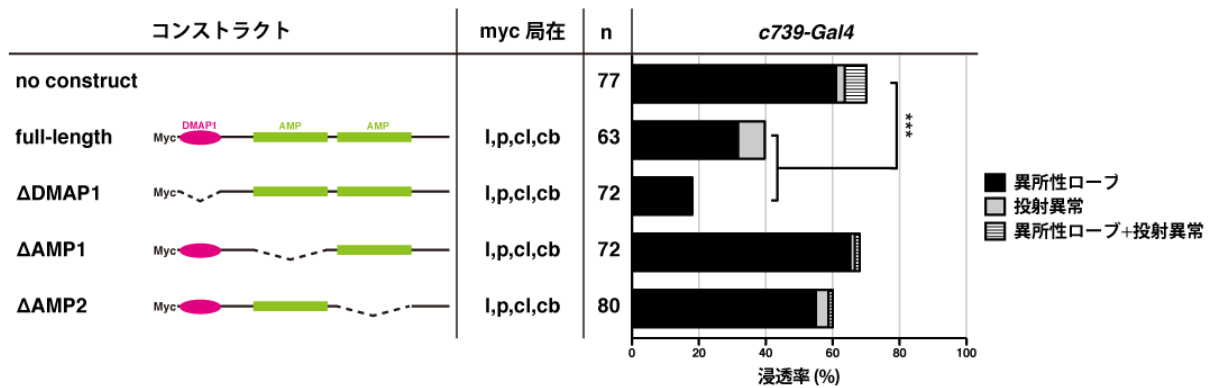


図 37: 各ドメインを欠損した DIP2 コンストラクトを用いたレスキュー実験。Full-length の DIP2 及び DMAP1-binding ドメインを欠損した DIP2 ( $\Delta$ DMAP1) は *DIP2* 変異体の表現型を有意にレスキューしたが、AMP ドメインを欠損した DIP2 ( $\Delta$ AMP1、 $\Delta$ AMP2) は表現型をレスキューすることは出来なかった。myc 局在は各コンストラクトを発現した時の myc シグナルの局在を意味している。l、p、cl、cb はそれぞれローブ構造、ペダングル、カリックス、細胞体を意味している。(\*\*\*) $P < 0.001$ 、Fisher の正確確率検定)。

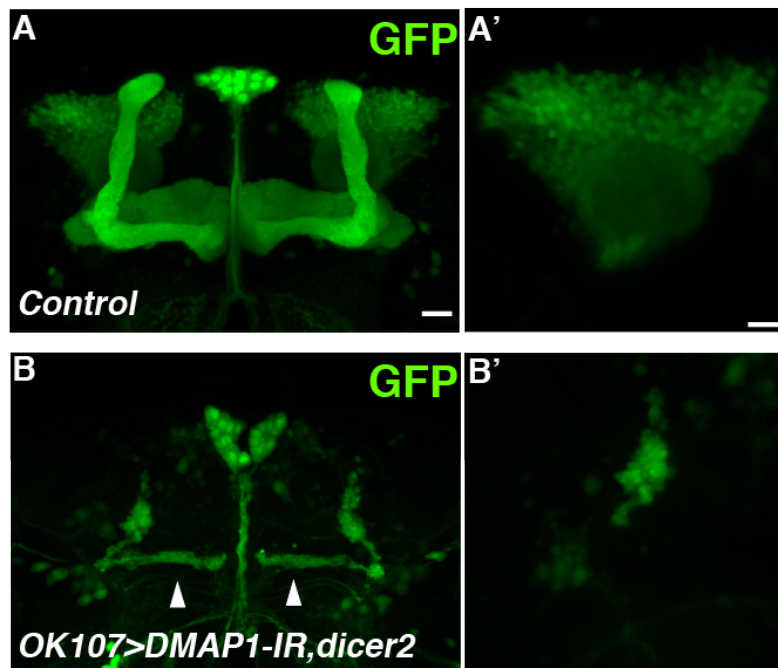


図 38: キノコ体特異的な DMAP1 の機能抑制。キノコ体は *OK107-Gal4* を用いて GFP を発現 (緑) させる事によって可視化した。コントロール (A、A') と比べて、DMAP1 をノックダウン (B、B') するとローブの著しい細径化 (白矢頭) や細胞体の減少 (B') が観察された。(A')、(B') は (A)、(B) の細胞体及びカリックスをそれぞれ拡大表示している。スケールバーは  $20 \mu\text{m}$ 。

#### 4.6 DIP2 の細胞内局在

DIP2 は (1) DMAP1-binding ドメインを有している為、(2) DIP2 が結合すると考えられている *disconnected* が核に局在する (Lee et al., 1991) 為、細胞核に局在していると考えられている。しかし、キノコ体の発生において DMAP1-binding ドメインが必須でない事が明らかとなった為、DIP2 の細胞内局在を検討した。抗 DIP2 抗体を用いてキノコ体の細胞体を免疫染色し内在性及び強制発現した DIP2 の細胞内局在を観察した所、共に核への局在を確認する事は出来なかった (図 39)。成虫期以外での DIP2 の核への局在の有無を確認する為、三齢幼虫後期、蛹化 24 時間後、蛹化 48 時間後のキノコ体の細胞体を免疫染色したが、いずれの時期でも核への局在を確認する事は出来なかった。また、DIP2 が分解され断片が核へと移行して機能する可能性を検討する為、N 末端に myc タグを付与した DIP2 を強制発現させ、N 末端側を抗 myc 抗体で C 末端側を抗 DIP2 抗体で染色したが、両抗体ともキノコ体細胞の表面でシグナルが観察され、細胞内局在に違いは見られなかった (図 40)。

キノコ体細胞は巨核細胞 (図 41) (Lin and Lee, 2011) である為、細胞膜と細胞質を区別する事が出来ない。DIP2 の局在を正確に把握する為、S2 細胞で DIP2 を強制発現させ細胞内局在を確認した。その結果、細胞膜及び細胞質でシグナルが検出されたが、特に細胞膜で強いシグナルが検出された (図 42)。また、S2 細胞でも細胞核にて DIP2 シグナルは検出されなかった。DIP2 の膜貫通ドメインの有無を予測する為、SOSUI (Hirokawa et al., 1998) 及び TMHMM (Krogh et al., 2001) を用いたが、どちらのアルゴリズムを用いても膜貫通ドメインの存在は予測されなかった。従って、DIP2 は膜タンパク質と結合して細胞膜に局在している可能性が考えられる。

以上の DIP2 のドメイン機能及び細胞内局在の解析から以下の点を示唆している。

- ・ DIP2 によるキノコ体の軸索枝制御において AMP ドメインが必須であり、DMAP1-binding ドメインは必要ではない。
- ・ DMAP1 はキノコ体の形態形成に必須であるが、DIP2 の DMAP1-binding ドメインを介していない。
- ・ DIP2 は細胞核に局在せず、細胞膜及び細胞質に局在している。

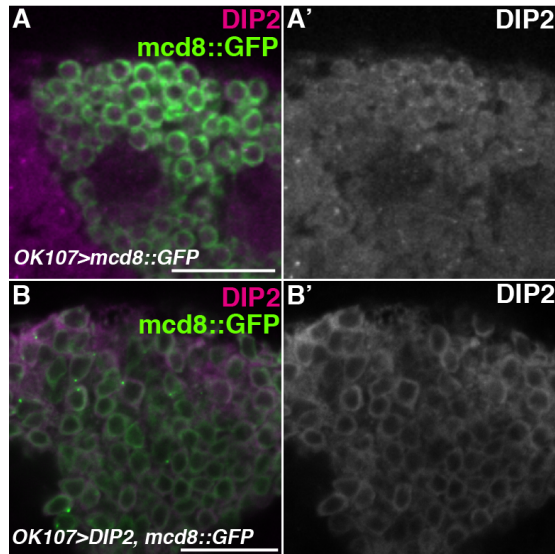


図 39：蛹化 48 時間後の DIP2 の細胞内局在。キノコ体の細胞膜は *OK107-Gal4* を用いて *mcd8::GFP* を発現（緑）させる事によって可視化し、DIP2 の発現はマゼンタ（A、B）または白（A'、B'）で示した。内在性 DIP2（A-A'）及び過剰発現した DIP2（B-B'）の細胞核への局在は確認されなかった。スケールバーは  $20\mu\text{m}$ 。

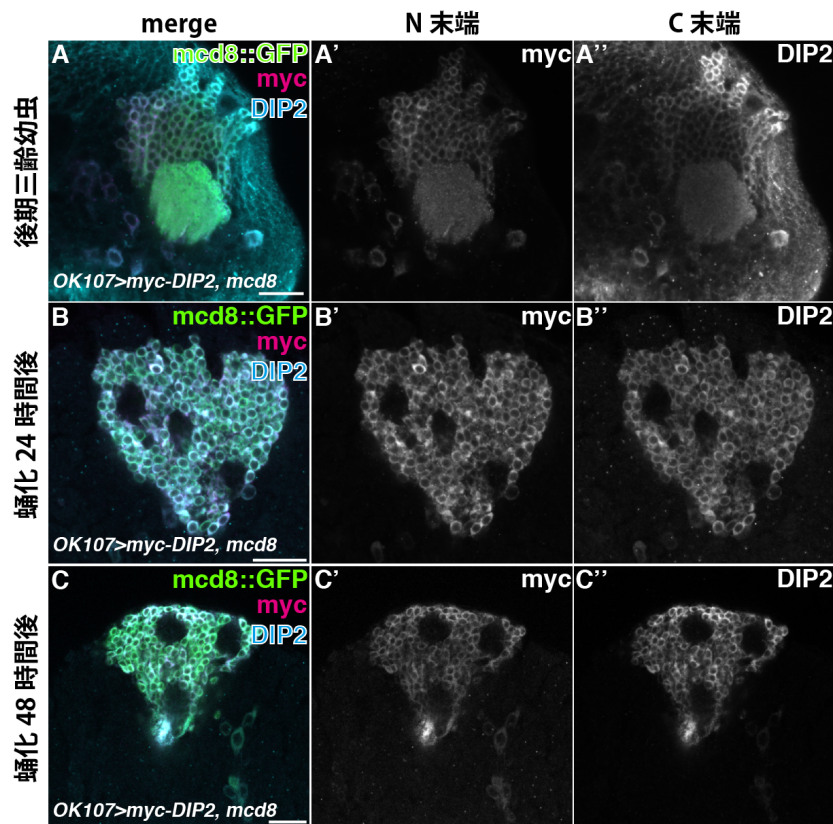


図 40：各ステージにおける外来性 DIP2 の局在。キノコ体の細胞膜は *OK107-Gal4* を用いて *mcd8::GFP* を発現（緑）させる事によって可視化し、DIP2 の N 末端の局在は抗 myc 抗体を用いてマゼンタ（A、

B、C) または白 (A', B', C') で可視化し、DIP2 の C 末端の局在は抗 DIP2 抗体を用いてシアン (A、B、C) または白 (A'', B'', C'') で可視化した。どのステージでも N 末端及び C 末端のシグナルは細胞核で観察されなかった。スケールバーは 20  $\mu$ m。

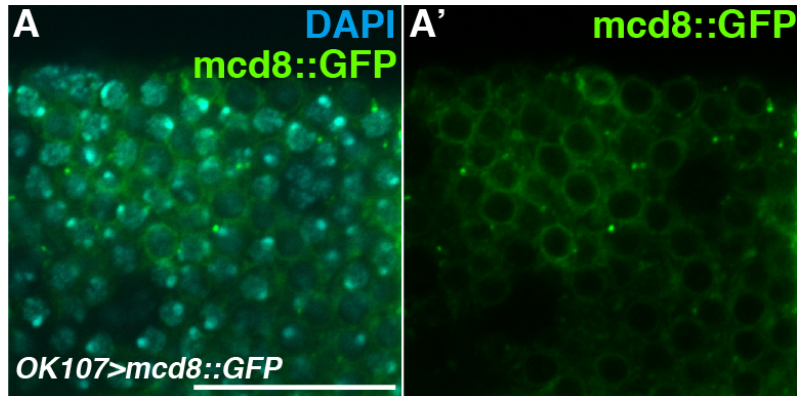


図 41：キノコ体の細胞体。キノコ体の細胞膜は *OK107-Gal4* を用いて *mcd8::GFP* を発現（緑）させる事によって可視化し、細胞核は DAPI（シアン）を用いて可視化した。(A) 細胞膜（緑）に囲われた部分の大半が細胞核（シアン）である。スケールバーは 20  $\mu$ m。

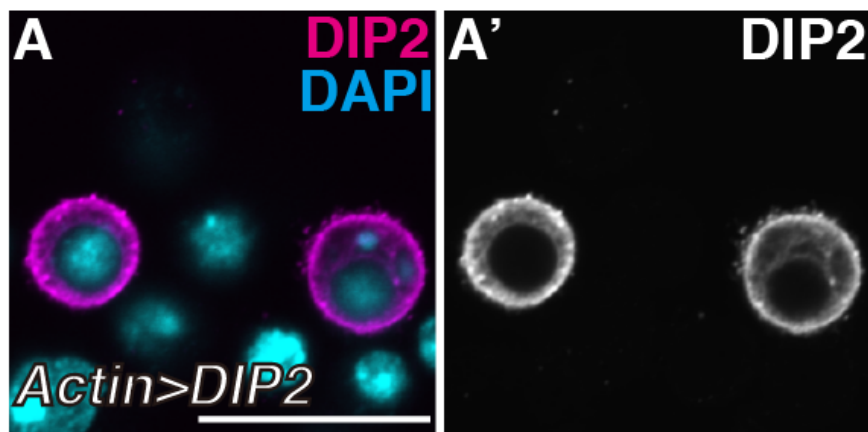


図 42：S2 細胞における過剰発現した DIP2 の局在。DIP2 をマゼンタ (A) 及び白 (A') で示した。細胞核は DAPI（シアン）を用いて可視化した。DIP2 は細胞膜及び細胞質で局在が確認された。スケールバーは 20  $\mu$ m。



#### 4.7 DIP2によるキノコ体形成における *disconnected* の関与の検討

前項より、DIP2は細胞核に局在していない可能性が強く示唆された。これは、DIP2が *disconnected* (*disco*) と *in vivo* において結合せず、直接的な相互作用を有していない可能性を示唆している。キノコ体軸索枝形成におけるDIP2と *disco* の相互作用の有無を確認する為、まず、キノコ体の正常な形態形成における *disco* の必要性を検討した。*disco* の機能欠失変異体である *disco*<sup>l</sup> のヘミ接合体ではキノコ体の  $\alpha/\beta$  ローブ特異的に投射異常が観察された (14.6%, n = 48) が、DIP2変異体で観察された異所性ローブの表現型は全く見られなかった (図43)。また、Discoをキノコ体特異的に強制発現させると胚性致死となった。次にDIP2と *disco* が同経路で協調的に機能する可能性を検討した (図44)。DIP2<sup>34</sup>と *disco*<sup>l</sup> の二重ヘテロ接合体でもキノコ体の表現型は殆ど観察されず、*disco*<sup>l</sup> のヘミ接合体バックグラウンドでDIP2<sup>34</sup>をヘテロ接合体としても *disco* 変異体の表現型の浸透率の有意な上昇は観察されなかった (9.09%, n = 44)。逆に、DIP2変異体バックグラウンドで *disco*<sup>l</sup> のヘテロ接合体やヘミ接合体にしてもDIP2変異体で観察された表現型の浸透率の有意な上昇は観察されなかった (*disco*<sup>l</sup>/Y;DIP2<sup>34/M101352</sup> 75.0%, n = 52、+/Y;DIP2<sup>34/M101352</sup> 70.4%, n = 54)。これらの結果から、少なくともキノコ体の形態形成においてはDIP2とDiscoは相互作用を有していないといえる。

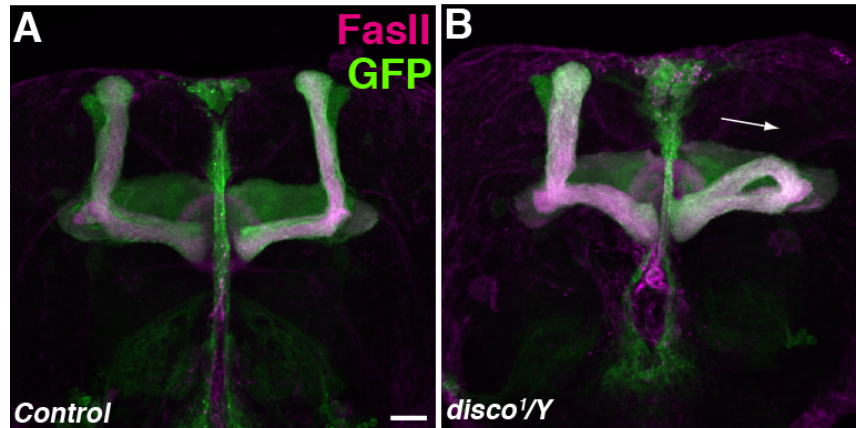


図 43 : *disco* 変異体のキノコ体。キノコ体は *OK107-Gal4* を用いて GFP を発現 (緑) させる事によって、 $\alpha/\beta$  ロープは抗 Fas II 抗体による染色 (マゼンタ) で可視化した。野生型 (A) と比べて、*disco* 変異体 (B) では  $\alpha/\beta$  ロープの投射異常 (白矢印) が観察された。スケールバーは  $20\mu\text{m}$ 。

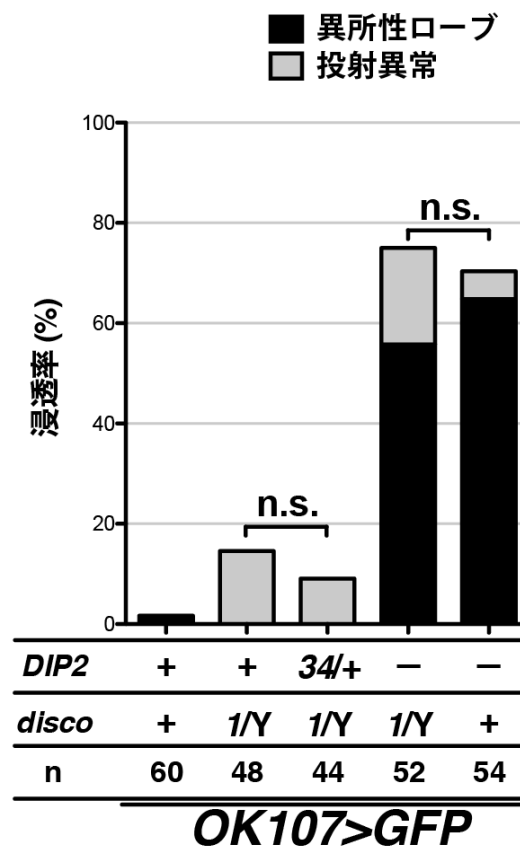


図 44 : *DIP2* と *disco* の遺伝学的相互作用の定量化。*DIP2* 変異体バックグラウンドで *disco* の変異をヘミ接合で持たせても、*DIP2* 変異体の表現型浸透率の有意な増加は観察されなかった。

#### 4.8 DIP2 の下流因子の探索

DIP2 と相互作用をする因子の有力候補であった *disco* との遺伝学的相互作用が確認出来なかった事 (4.7 参照)、既知の軸索分岐・誘導関連因子が下流因子と確認出来なかった事 (4.10 参照) から、DIP2 の下流因子を探索する為に一次スクリーニングとしてマイクロアレイ解析による網羅的な遺伝子発現プロファイリングを行った。*elav-Gal4* を用いて神経系全体で *Dicer2* のみを発現した系統と、DIP2 の逆向き反復配列も共発現させ DIP2 の発現量を減らした系統の中脳を直接取り出して検体とした。DIP2 をノックダウンした系統 (DIP2 RNAi 系統) とノックダウンしていない系統 (コントロール系統) を比較して、mRNA の発現量が 1.5 倍以上かつ有意 ( $p < 0.01$ ) に変化している 91 の遺伝子を候補遺伝子とした。これらの候補遺伝子の内、過去の報告を参考にして神経発生に関与している可能性が高いと考えられる 41 の遺伝子を選抜した。RNAi 法を用いてこれらの遺伝子群をキノコ体特異的にノックダウンする事によって二次スクリーニングとした。その結果、*glaiKit* (*gkt*) をノックダウンした場合のみ DIP2 変異体と同様の表現型を示した (49.4%,  $n = 77$ ) (図 45、図 46)。*gkt* の逆向き反復配列がオフターゲット効果によって DIP2 を抑制し、結果として DIP2 変異体と同様の表現型が得られている可能性を排除する為、抗 DIP2 抗体を用いて *gkt* ノックダウン系統を免疫染色したが DIP2 シグナルの有意な変化は検出されなかった (図 47、図 48)。以上の結果から、DIP2 制御下でキノコ体の軸索枝制御に関与する候補遺伝子として *gkt* を同定した。*gkt* はホスホリパーゼ D スーパーファミリーに属するタンパク質をコードしていると考えられており、頂底極性 (apicobasal polarity) に関与する遺伝子群と相互作用をして上皮細胞の極性形成や、軸索投射に関与している事が報告されている (Dunlop et al., 2004)。

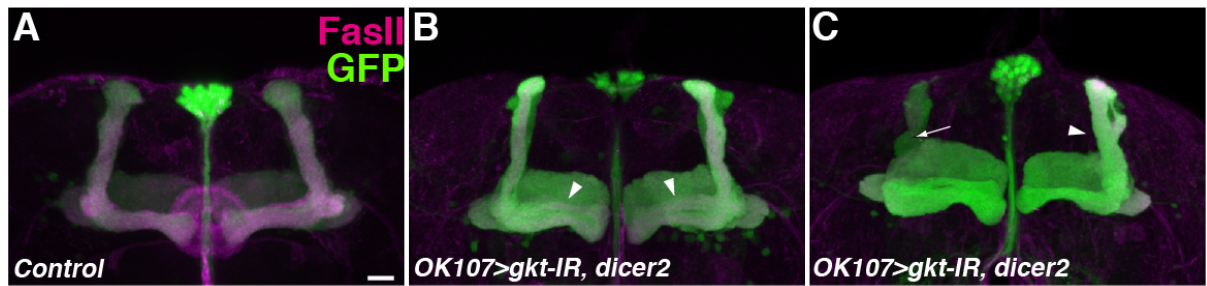


図 45：キノコ体特異的な Gkt 機能抑制。キノコ体は *OK107-Gal4* を用いて GFP を発現（緑）させる事によって可視化し、 $\alpha/\beta$  ロープは抗 Fas II 抗体による染色（マゼンタ）で可視化した。コントロール（A）と比べて、*gkt* をノックダウン（B、C）すると異所性ロープ（白矢頭）や投射異常（白矢印）が観察された。スケールバーは  $20\ \mu\text{m}$ 。

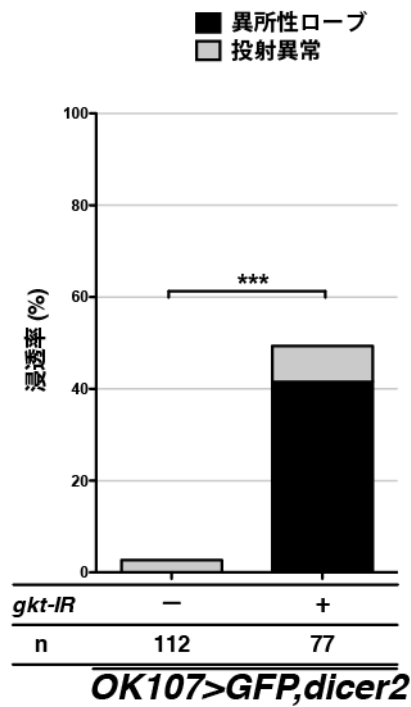


図 46：キノコ体特異的 *gkt* ノックダウンの表現型の定量化。*gkt* をノックダウンすると異所性ロープや投射異常といった表現型が有意に増加した。（\*\*\* $P < 0.001$ 、Fisher の正確確率検定）。

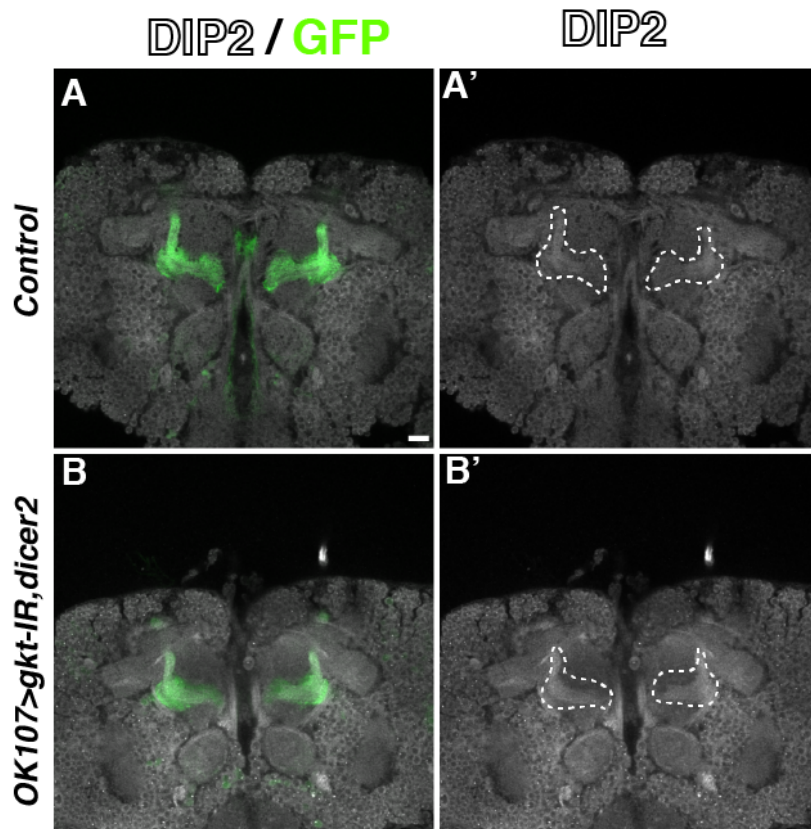


図 47：蛹化 24 時間後における、コントロール (A、A') と *gkt* ノックダウン時 (B、B') の抗 DIP2 抗体 (白) のシグナル。キノコ体は *OK107-Gal4* を用いて GFP を発現 (緑) させる事によって可視化した。(A'、B') の点線部はキノコ体領域を示す。スケールバーは  $20\mu\text{m}$ 。

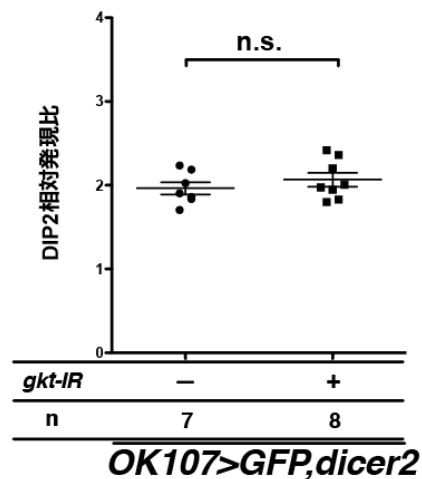


図 48：*gkt* ノックダウン時の抗 DIP2 抗体のシグナルの定量化。*gkt* をノックダウンしても DIP2 シグナルの有意な減少は観察されなかった。

#### 4.9 DIP2 と Gkt 及び Gkt の既知の相互作用因子との遺伝学的相互作用の検討

前項のマイクロアレイ解析では *DIP2 RNAi* 系統を用いてコントロール系統と比較を行った。*DIP2* 変異体でも野生型と比べて *gkt* の発現量が有意に減少するか検討する為、リアルタイム RT-PCR を行った (図 49)。*DIP2* 変異体及び野生型の成虫の中脳を検体とした。結果の再現性を高める為、3 つの生物学的反復 (biological replicates) と各生物学的反復につき 2 つの技術的反復 (technical replicates) を行った。その結果、*DIP2* 変異体においても *gkt* の有意な減少が確認された (図 50)。また、同時に *elav-Gal4* 依存的に *gkt* 及び *DIP2* の逆向き反復配列、野生型 *gkt* を発現させた系統を用いてリアルタイム PCR を行っており、各系統での *gkt* 発現量の上昇及び低下を確認している。

次にキノコ体形成における *DIP2* と *Gkt* の遺伝学的相互作用を調べる事で、2 つの遺伝子が同経路で協調的に機能する可能性を検討した (図 51)。*gkt* の機能欠失変異体である *gkt<sup>G85</sup>* のホモ接合体は胚性致死である。*DIP2* 変異体バックグラウンドで *gkt<sup>G85</sup>* をヘテロ接合体にすると *DIP2* 変異体で観察された表現型の浸透率の有意な上昇が観察された (*gkt<sup>G85</sup>/+*; *DIP2<sup>34/M101352</sup>* 92.1%, n = 76)。次に、*gkt* の発現量低下が *DIP2* 変異体で観察された表現型の原因として必要十分であるか確認する為、*UAS-gkt* を用いて *DIP2* 変異体のレスキュー実験を行った。*DIP2* 変異体バックグラウンドでキノコ体特異的に *gkt* を強制発現したが、表現型の浸透率の有意な変化は検出されなかった (*UAS-gkt*; *DIP2<sup>34/M101352</sup>* 69.7%, n = 89)。これらの結果は、*Gkt* が *DIP2* の下流において同経路でキノコ体の軸索枝を制御している事を示している一方、*Gkt* 以外の下流因子の存在や酵素活性を持つと考えられている *Gkt* の基質を *DIP2* が直接的もしくは間接的に供給している可能性 (Dunlop et al., 2004; Kang et al., 2011b; Wang and Oram, 2005)を示唆している (5.2 参照)。

先行研究によって、*Gkt* は *crumbs* (*crb*)、*stardust* (*sdt*) といった頂底極性に関係する遺

伝子や *Neuroglian* (*Nrg*)、*Lachesin* (*Lac*) といった神経発生に関与する事が知られている遺伝子と遺伝学的相互作用を有している事が報告されている (Dunlop et al., 2004)。キノコ体の軸索枝制御においても Gkt がこれらの因子と協働して機能しているか調べる為、遺伝学的相互作用の検討を行った (図 52、図 53)。各遺伝子の単一ヘテロ接合体、各遺伝子のヘテロ接合体と *gkt*<sup>G85</sup> または *DIP2*<sup>34</sup> との二重ヘテロ接合体では *sdt*<sup>EH681</sup>; *DIP2*<sup>34</sup> を除き表現型の浸透率の有意な増加は観察されなかった。しかし、*DIP2*<sup>34</sup>、*gkt*<sup>G85</sup> との三重ヘテロ接合体にした場合、*crb* 及び *sdt* で表現型の浸透率の有意な増加が観察された (*gkt*<sup>G85</sup>/+; *crb*<sup>11A22</sup>/*DIP2*<sup>34</sup> 31.8%, n = 88; *sdt*<sup>EH681</sup>/+; *gkt*<sup>G85</sup>/+; *DIP2*<sup>34</sup>/+ 31.2%, n = 64)。この時、*DIP2*<sup>34</sup>、*gkt*<sup>G85</sup>、*crb*<sup>11A22</sup> の三重ヘテロ接合体のみで *DIP2* 変異体で観察されなかった正中線側ローブの過伸長が確認された (27.3%, n = 88) (図 52 C)。また、*DIP2*<sup>34</sup>、*sdt*<sup>EH681</sup> との二重ヘテロ接合体及び *DIP2*<sup>34</sup>、*gkt*<sup>G85</sup>、*sdt*<sup>EH681</sup> の三重ヘテロ接合体では投射異常の表現型は確認されなかった (図 53 B)。これらの結果は、*crb*、*sdt* は *DIP2*、*gkt* と協働してキノコ体の発生を制御している事を示唆していると共に、*crb* と *sdt* はキノコ体の発生において一部異なる機能を有している可能性を示唆している。

以上の *DIP2* の下流因子解析から以下の事が言える。

- ・ Gkt が *DIP2* の下流において同一経路でキノコ体の軸索枝を制御している。
- ・ *DIP2* の下流において *Crb* 及び *Sdt* が Gkt と協働してキノコ体の軸索枝を制御している。

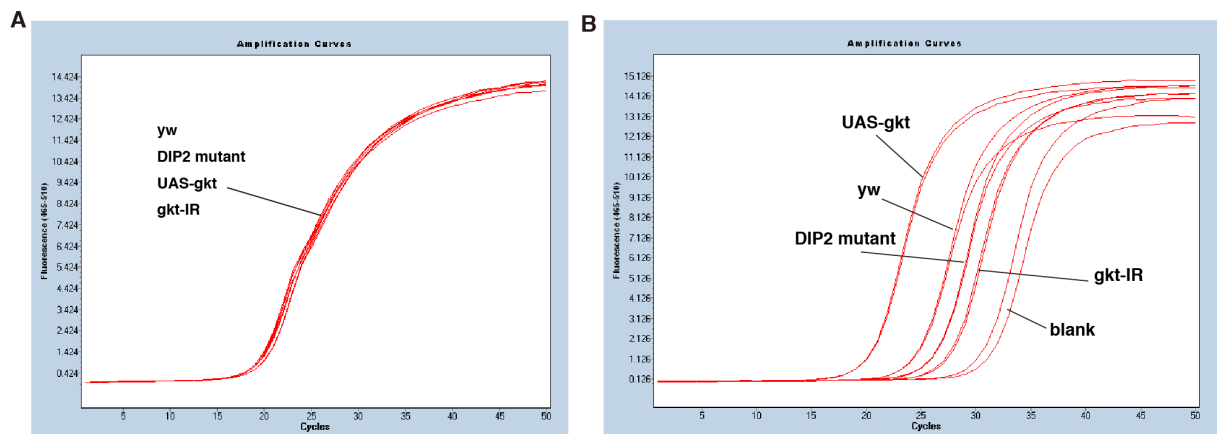


図 49：コントロール (*yw*)、*DIP2* 変異体(*DIP2 mutant*)、*gkt* 過剰発現 (*UAS-gkt*)、*gkt* ノックダウン (*gkt-IR*) の成虫脳を検体として用いたリアルタイム PCR。(A) がリファレンスとして用いた *Rp49*、(B) が *gkt* である。

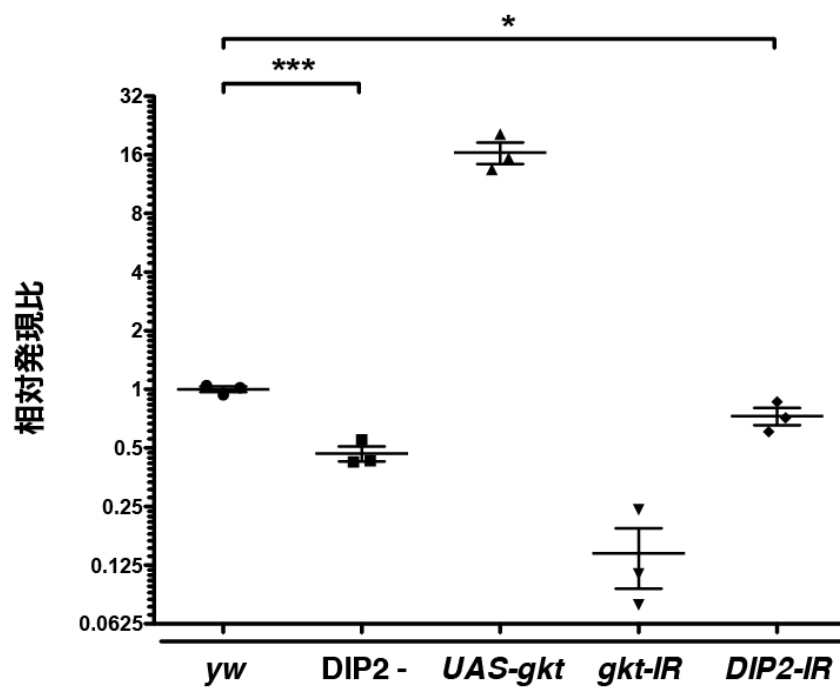


図 50：コントロール (*yw*) を 1 とした時の各系統の *gkt* mRNA 発現量比。コントロールと比べて、*DIP2* 変異体(*DIP2-*)及び *DIP2* ノックダウン(*DIP2-IR*)の *gkt* mRNA 発現量は有意に減少した。(\*\*\*) $P < 0.001$ 、\* $P < 0.05$ 、Mann-Whitney 検定)。



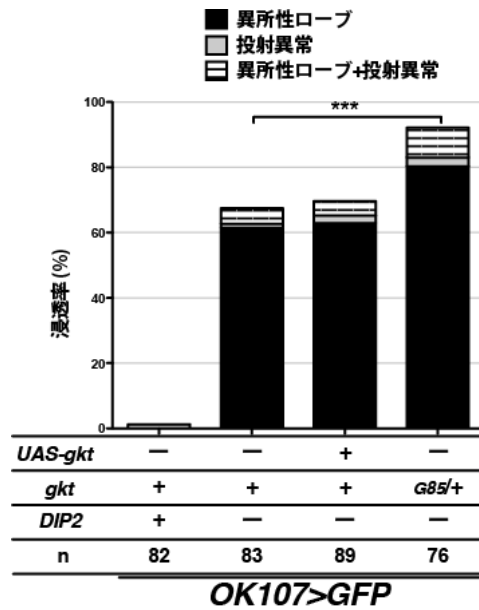


図 51: *DIP2* と *gkt* の遺伝学的相互作用の定量化。*DIP2* 変異体バックグラウンドで *gkt<sup>G85</sup>* をヘテロに持たせると表現型の浸透率が有意に増加したが、*OK107-Gal4* の制御下で *Gkt* を発現しても表現型はレスキューされなかった。(\*\*\*) $P < 0.001$ 、Fisher の正確確率検定)。

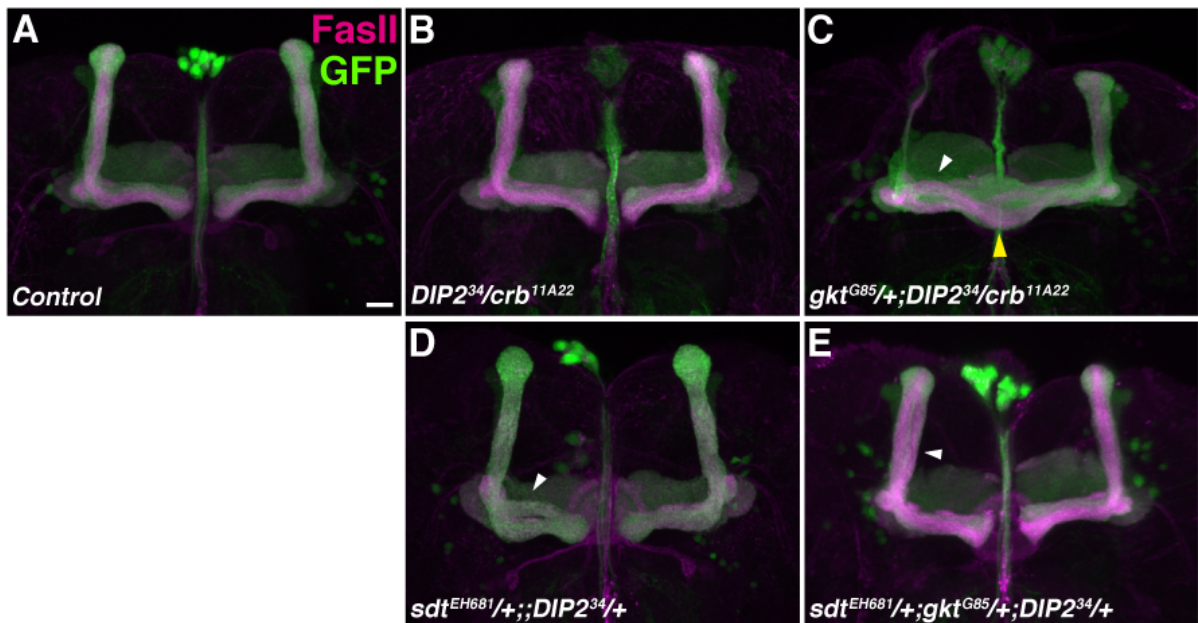


図 52: *crb* 及び *sdt* との遺伝学的相互作用。キノコ体は *OK107-Gal4* を用いて GFP を発現 (緑) させる事によって可視化し、 $\alpha/\beta$  ローブは抗 Fas II 抗体による染色 (マゼンタ) で可視化した。*crb* (B、C) 及び *sdt* (D、E) は *DIP2*、*gkt* と遺伝学的相互作用が認められた。*DIP2* 変異体と同様の異所性ローブ (白矢頭) や投射異常が観察される他、*crb* のみローブ構造の過伸長 (黄矢頭) も観察された。スケールバーは  $20 \mu\text{m}$ 。

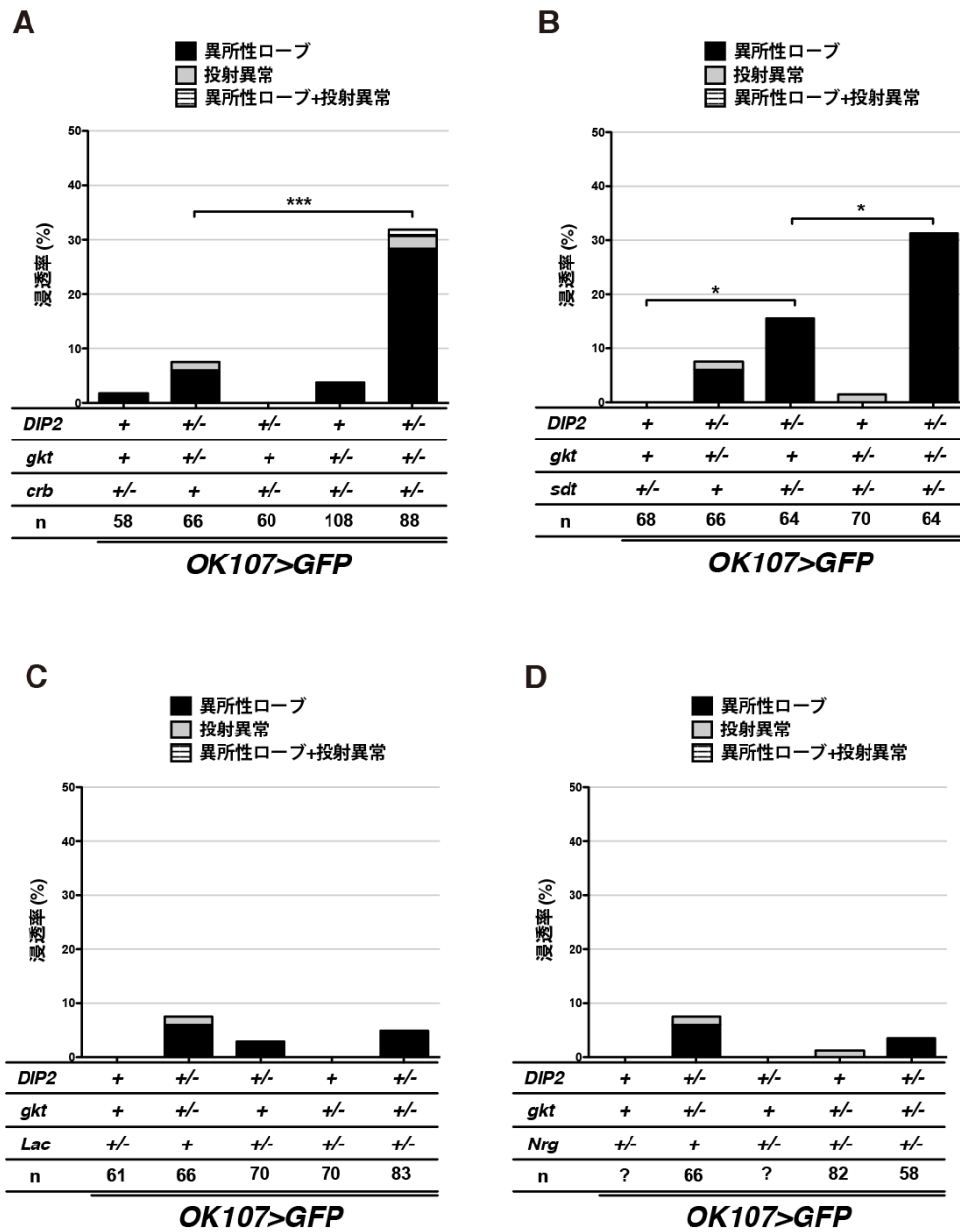


図 53 : *DIP2*、*gkt* と *gkt* の既知の相互作用因子との遺伝学的相互作用の定量化。Gkt の既知の相互作用因子の内、*crb* 及び *sdt* だけが *DIP2*、*gkt* とトリプルヘテロ接合にする事によって表現型浸透率の有意な増加が観察された。 (\*\* $P < 0.001$ 、\* $P < 0.05$ 、Fisher の正確確率検定)。

#### 4.10 既知の軸索分岐・誘導関連因子群との遺伝学的相互作用の検討

4.7 より、キノコ体の軸索枝制御においては DIP2 と disco には相互作用が存在しない事が明らかとなった。また、4.5 より DIP2 の AMP ドメインが軸索枝制御に必須である可能性が示唆されている。AMP ドメインは酵素活性を有していると考えられている為、DIP2 が実行因子となって軸索枝の分岐や投射を直接制御しているとは考え難く、何らかの実行因子を間接的に制御していると考えられる。DIP2 による軸索枝制御機構の実行因子を探索する為、既知の軸索枝制御関連因子群と DIP2 の相互作用を検討した。

Down Syndrome Cell Adhesion Molecule 1 (Dscam1) は Ig ドメインを持つ細胞接着分子である (Schmucker et al., 2000)。選択的スプライシングによって理論上 38,016 通りのアイソフォームを持つと考えられており、この分子的な多様性が特異的な神経結合形成において重要である事が多くの研究によって示唆されている (He et al., 2014; Hutchinson et al., 2014; Wang et al., 2004; Wojtowicz et al., 2004; Zhan et al., 2004)。キノコ体においては、*Dscam1* 変異体クローンを形成すると *DIP2* 変異体の単一細胞クローンで観察された様な軸索枝の過剰形成 (図 35) を引き起こす事が報告されている (Wang et al., 2002)。Dscam1 をキノコ体特異的にノックダウンすると高い浸透率で形態異常が観察される (100%, n = 30) が、*DIP2* 変異体とは異なり、背側及び正中線側へ投射せず分岐点でローブ構造が凝集している個体も多く観察された (図 54)。また、*DIP2* 変異体で観察された様な異所性ローブの表現型は全く観察されなかった。次に、DIP2 と Dscam1 が同一経路で協調的にキノコ体の軸索枝を制御しているか明らかにする為、免疫組織染色及び遺伝学的相互作用の有無の検討を行った。まず、*DIP2* 及び *Dscam1* の発現量を上下させた場合の抗 Dscam1 抗体及び抗 DIP2 抗体のシグナルの変化の有無を確認した。*DIP2* 変異体の 1 細胞クローンと *Dscam1* 変異体の 1 細胞クローンが同様の表現型を示す事から、DIP2 を抑制した場合に Dscam1 シグナルの減

少もしくは *Dscam1* を抑制した場合に *DIP2* シグナルの減少が確認されると予想していたが、有意な変化は検出されなかった (図 55 A, B)。次に、遺伝学的相互作用を確認した (図 56)。  
*Dscam1* の機能欠失型アリルである *Dscam1<sup>l</sup>* と *DIP2<sup>34</sup>* の二重ヘテロ接合体ではキノコ体の形態異常は観察されなかった。また、*DIP2* 変異体バックグラウンドで *Dscam1<sup>l</sup>* のヘテロ接合を持たせても *DIP2* 変異体の表現型の浸透率の有意な変化は観察されなかった (*Dscam1/+; DIP2<sup>34/M101352</sup>* 67.5%, n = 114)。*Dscam1<sup>l</sup>* のホモ接合体は致死である。これらの結果から、*Dscam1* と *DIP2* は異なる経路で軸索枝を制御していると考えられる。

*Wnt5* は *Wnt* 分泌型シグナルファミリーの一員であり、当研究室等の研究によって Planar Cellular Polarity (PCP) 経路を介してキノコ体の軸索形成を制御している事が明らかとなった (図 57) (Ng, 2012; Shimizu et al., 2011)。*Wnt5* や PCP 経路の因子の機能欠失変異体では  $\alpha/\beta$  ローブの投射異常や細径化、凝集等が観察され (図 58)、単一細胞レベルでは  $\alpha/\beta$  ニューロンの軸索枝の形成不全や投射異常が生じる。この表現型が *DIP2* 変異体の単一細胞レベルで観察された軸索枝過剰形成の表現型と真逆である事から、*DIP2* と *Wnt5/PCP* 経路が同一経路において逆向きに働いていると考え、これらの遺伝学的相互作用の検討を行った (図 59)。*Wnt5* の機能欠失型アリルである *Wnt5<sup>400</sup>* 及び *Wnt5<sup>D7</sup>* のヘミ接合体ではそれぞれ 35.9% (n = 103)、57.7% (n = 104) の割合で表現型が観察されたが、*DIP2<sup>34</sup>* をヘテロ接合で持たせるとこれらの表現型の浸透率が有意に低下した (*Wnt5<sup>400</sup>/Y; DIP2<sup>34</sup>/+* 12.3%, n = 114、*Wnt5<sup>D7</sup>/Y; DIP2<sup>34</sup>/+* 19.3%, n = 114)。しかし、*DIP2* 変異体のホモ接合を導入すると浸透率が増加しただけでなく、*Wnt5* 変異体及び *DIP2* 変異体単体だけでは観察されなかったローブが短くなる表現型も観察されるようになった (*Wnt5<sup>D7</sup>/Y; DIP2<sup>34</sup>/DIP2<sup>M101352</sup>* 86.3%, n = 51)。  
次に、*Wnt5* の下流因子である *dishevelled* の部分機能欠失変異体であり、PCP 経路特異的に表現型を示す *dsh<sup>l</sup>* を用いて *DIP2* との遺伝学的相互作用の検討を行った。その結果、*Wnt5*

と同様に DIP2 のヘテロ変異を持ち込む事によって *dsh<sup>l</sup>* の表現型を抑制する事が出来た (*dsh<sup>l</sup>/Y* 71.4%, n = 84, *dsh<sup>l</sup>/Y; DIP2<sup>34</sup>/+* 51.7%, n = 89)。

これらの結果から、Wnt5/PCP 経路と DIP2 の関係性について 3 通りの可能性が考えられる。(1) DIP2 が Wnt5/PCP 経路の上流に位置する可能性、(2) DIP2 が Wnt5/PCP 経路の下流因子として機能している可能性、(3) DIP2 と Wnt5/PCP 経路が平行してキノコ体の発生を制御している可能性である。これらの可能性について順に検討する。まず、(1) が正しいならば、*Wnt5* の機能欠失変異体バックグラウンドで DIP2 の発現量を変化させても *Wnt5* 変異体だけの時と比べて表現型の浸透率は変化しない筈である。しかし、実際は *DIP2<sup>34</sup>* をヘテロ接合で持たせる事によって、*Wnt5* 変異体の表現型の浸透率は有意に減少している。よって、(1) の可能性は低いと考えられる。次に、(2) の可能性が正しいならば、*Wnt5* と DIP2 は同一経路内で逆方向に機能していると考えられる。つまり、*Wnt5* が間接的に DIP2 の発現を抑制しており、*Wnt5* の機能欠失変異体では DIP2 の発現量が上昇している筈である。この可能性を確かめる為、キノコ体特異的に *Wnt5* をノックダウンし抗 DIP2 抗体を用いて免疫組織染色を行った。しかし、DIP2 シグナルの有意な変化は観察されなかった (図 55 A, C)。以上の結果より、Wnt5/PCP 経路と DIP2 は同一経路内の上流・下流の関係性にあるのではなく、並行してキノコ体の形態形成に関与していると考えられる。

その他の既知の軸索制御因子群と *DIP2<sup>34</sup>* の二重ヘテロ接合体を観察したが、*DIP2* 変異体と同様の表現型の浸透率の有意な増加を観察する事は出来なかった。

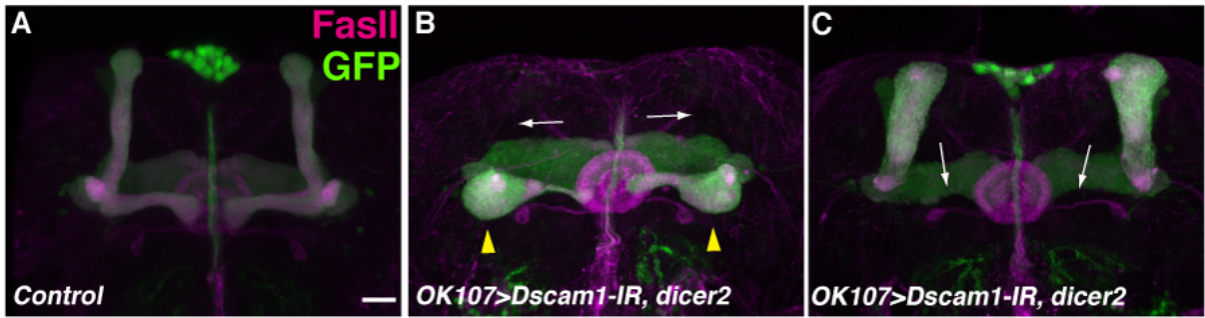


図 54：キノコ体特異的な *Dscam1* の機能抑制。キノコ体は *OK107-Gal4* を用いて GFP を発現（緑）させる事によって可視化し、 $\alpha/\beta$  ロープは抗 Fas II 抗体による染色（マゼンタ）で可視化した。コントロール（A）と比べて *Dscam1* をノックダウン（B、C）すると投射異常（白矢印）や分岐点での軸索の凝集（黄矢頭）が観察された。スケールバーは  $20\mu\text{m}$ 。

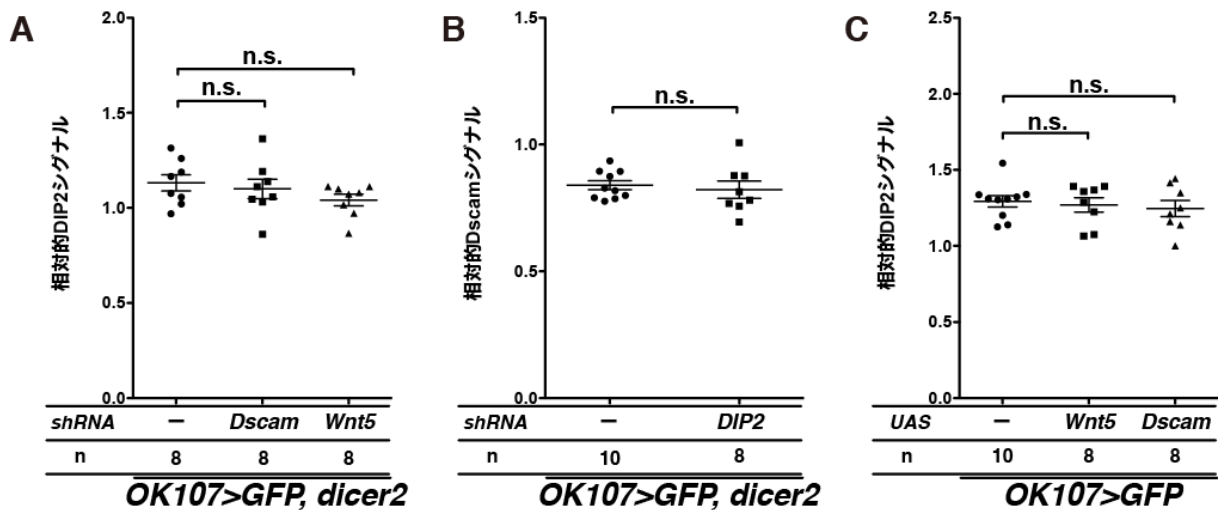


図 55：(A) 蛹化 24 時間後における *Dscam1*、*Wnt5* ノックダウン時の抗 DIP2 抗体のシグナルの定量化。DIP2 シグナルの有意な変化は観察されなかった。(B) 蛹化 24 時間後における *DIP2* ノックダウン時の抗 *Dscam1* 抗体のシグナルの定量化。*Dscam1* シグナルの有意な変化は観察されなかった。(C) 蛹化 24 時間後における *Wnt5*、*Dscam1* 過剰発現時の抗 DIP2 抗体のシグナルの定量化。DIP2 シグナルの有意な変化は観察されなかった。

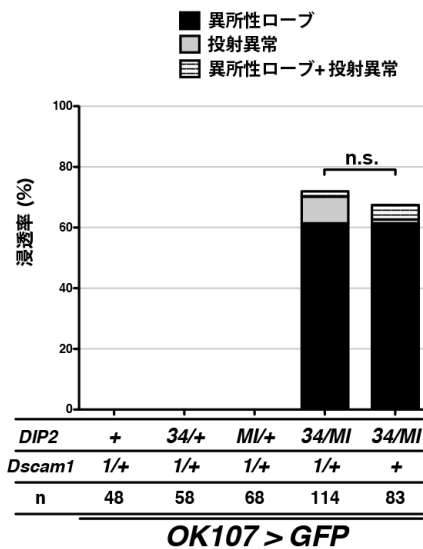


図 56 : *DIP2* と *Dscam1* の遺伝学的相互作用の定量化。*DIP2* 変異体バックグラウンドで *Dscam1* の変異体をヘテロにしても表現型の有意な上昇は観察されなかった。

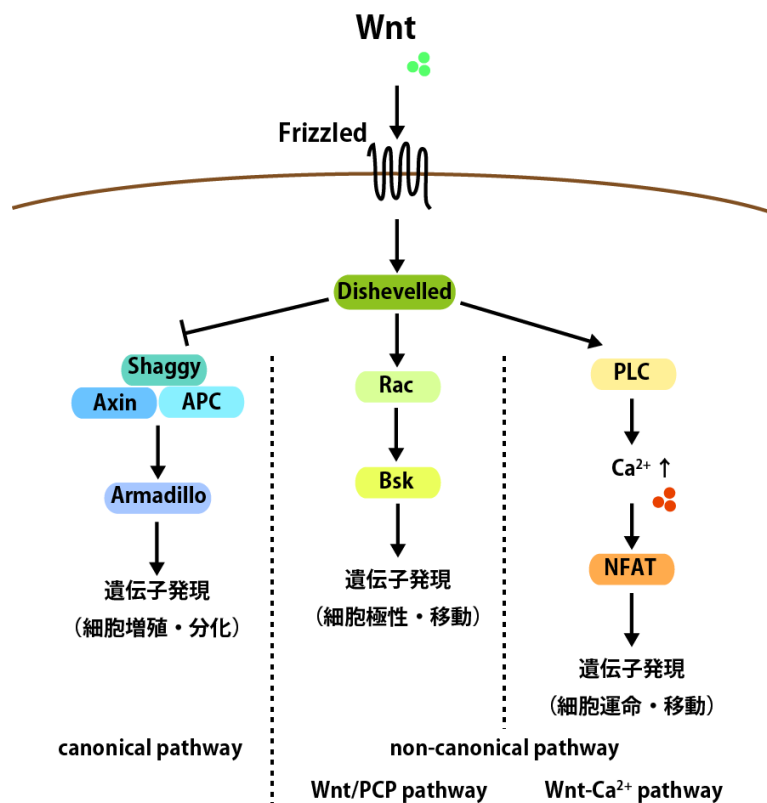


図 57 : Wnt を介したシグナル経路。レセプターである Frizzled によって受容された Wnt シグナルは Dishevelled を介して古典経路 (canonical pathway) と非古典経路 (non-canonical pathway) に分けられる (Niehrs, 2012)。そして、非古典経路は更に Wnt/PCP 経路と Wnt-Ca<sup>2+</sup> 経路に分けられる。キノコ体では *Wnt5* の下流で Wnt/PCP 経路が機能して軸索形成を制御している事が示唆されている。

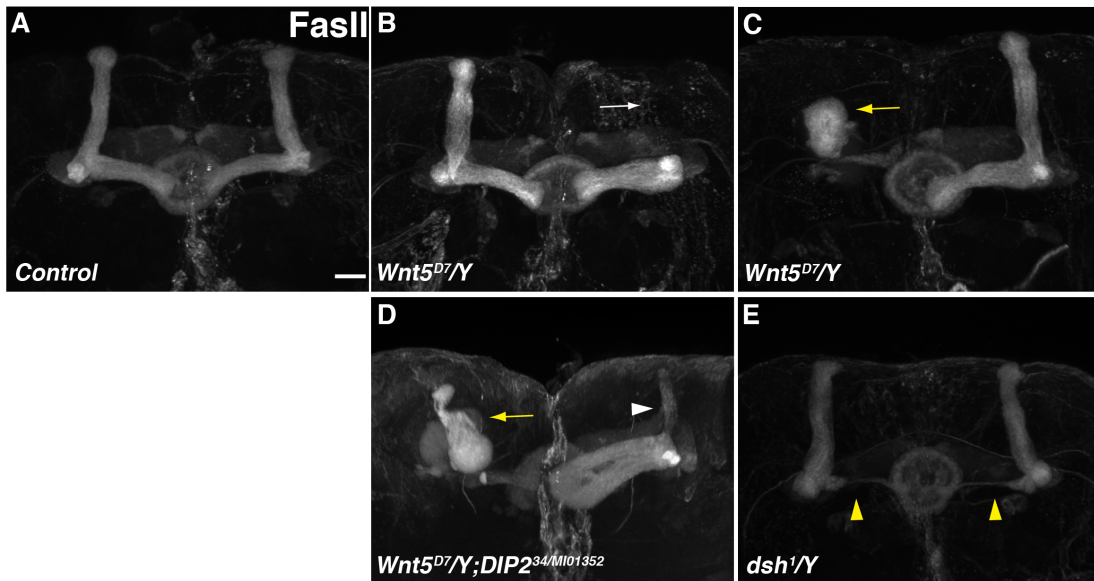


図 58 : *Wnt5* 変異体及び *dsh* 変異体のキノコ体。キノコ体は *OK107-Gal4* を用いて GFP を発現 (緑) させる事によって可視化し、 $\alpha/\beta$  ローブは抗 Fas II 抗体による染色 (マゼンタ) で可視化した。(B-C) *Wnt5* 変異体では欠失 (白矢印) やローブ構造の脳後背部への凝集 (黄矢印) が観察された。(D) *Wnt5*・*DIP2* のダブルミュータントではローブの短縮 (白矢頭) が観察された。(E) *dsh* 変異体ではローブの細径化 (黄矢頭) が観察された。スケールバーは  $20\mu\text{m}$ 。

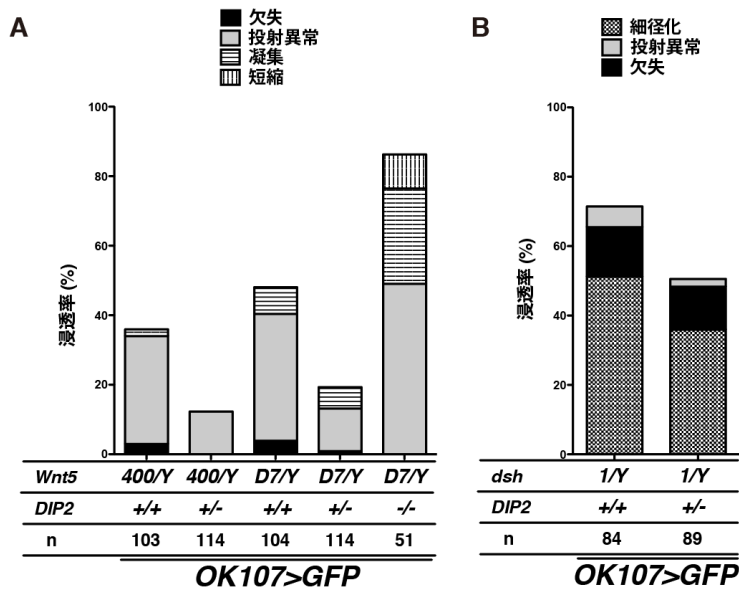


図 59 : (A) *DIP2* と *Wnt5* の遺伝学的相互作用の定量化。*Wnt5* 変異体バックグラウンドで *DIP2* の変異をヘテロに持たせると *Wnt5* 変異体の表現型の浸透率が有意に減少したが、*DIP2* 変異をホモに持たせると浸透率が増加し、*Wnt5* 変異体及び *DIP2* 変異体単体では観察されなかった表現型も観察されるようになった。(B) *DIP2* と *dsh* の遺伝学的相互作用の定量化。PCP 経路特異的に影響を与える *dsh*<sup>1</sup> 変異体バックグラウンドで *DIP2* の変異をヘテロに持たせると *dsh*<sup>1</sup> 変異体の表現型の浸透率が有意に減少した。(\* $P < 0.05$ 、\*\*\* $P < 0.001$ 、Fisher の正確確率検定)。



#### 4.11 ショウジョウバエの JNK ホモログである Basket による DIP2 の発現制御

ショウジョウバエの JNK ホモログである Basket (Bsk) は、キノコ体の形態形成において  $\gamma$  ニューロンの刈り込みや  $\alpha/\beta$  ニューロンの維持や投射等に関与している事が報告されている (Bornstein et al., 2015; Coffey, 2014; Rallis et al., 2010)。OK107-Gal4 を用いてキノコ体特異的に Bsk のドミナントネガティブ型 (Bsk.DN) や *bsk-IR* を発現させて Bsk の機能を抑制した場合に観察される表現型 (図 60 A) が DIP2 を過剰発現させた場合に観察される表現型 (図 60 B) と酷似していることから、Bsk と DIP2 が同一経路内でキノコ体の形態形成を制御していると考え、遺伝学的相互作用の確認及び免疫組織染色を行った。

まず、OK107-Gal4 を用いて Bsk.DN と DIP2 を共発現させると片方のみを発現させたときと比べて表現型が増強し、過剰投射したローブ構造が正中線上に溜まる表現型が観察された (100%, n = 44) (図 60 C, 図 61)。また、*c739-Gal4* を用いて Bsk.DN を発現させると過剰投射の表現型は観察されず、投射異常の表現型のみが観察された (54.1%, n = 74) (図 62)。一方、DIP2 を過剰発現しても表現型は殆ど観察されない (図 33 C)。しかし、Bsk.DN と DIP2 を共発現させると Bsk DN の表現型の浸透率が有意に増加した (84.0%, n = 75) (図 63)。*7B-Gal4* を用いても同様の結果を得る事が出来た (*7B>Bsk.DN* 70.4%, n = 54; *7B>DIP2* 3.41%, n = 88; *7B>Bsk.DN, DIP2* 88.9%, n = 36)。これらの結果より、もし DIP2 と Bsk が同一経路内で機能しているならば、それぞれ逆方向に作用している可能性が強く示唆された。

次にこれらの因子が同一経路内で作用しているか調べる為、免疫組織染色を行った。OK107-Gal4 を用いてキノコ体特異的に DIP2 の抑制や過剰発現を行っても、蛹化 24 時間後のキノコ体ではリン酸化 JNK (pJNK) のシグナルに有意な変化は検出されなかった (図 64 A, B)。一方、Bsk.DN を用いてキノコ体特異的に Bsk の機能を阻害すると DIP2 シグナルの有意な減少が観察された (図 65)。この DIP2 シグナルの減少は、*bsk-IR* を用いた場合

(図 66) や異なる Gal4 系統を用いて Bsk を阻害した場合でも観察された。一方、UAS-Bsk を用いて Bsk を過剰発現させても DIP2 シグナルの有意な増加は観察されなかった (図 64 C)。DIP2 の増加が認められなかったのは、Bsk は puckered (puc) を初め様々な下流因子によってネガティブフィードバックを受けている事が原因と考えられる。事実、Bsk を過剰発現させても pJNK シグナルの有意な増加は観察されなかった (図 64 A)。また、puc は蛹化 24 時間後では発現していない事が報告 (Bornstein et al., 2015) されており、キノコ体ニューロンにおいては異なる因子がネガティブフィードバックを担っていると考えられる。これらの結果は、Bsk は DIP2 の上流に位置し間接的に転写を制御している事を示している。

次に、Bsk の下流で転写因子として機能する事が知られている AP1 が Bsk-DIP2 経路に関与しているか検討した。まず、遺伝学的相互作用を確認した (図 67)。7B-Gal4 を用いて AP1 の構成因子である Jun-related antigen (Jra) と kayak (kay) のドミナントネガティブ型 (Jbz, Fbz) をそれぞれ強制発現しても表現型は殆ど観察されなかった (7B>Jbz 2.27% n = 88、7B>Fbz 0% n = 88)。この時、DIP2 も共発現すると Bsk.DN を強制発現させた場合と同様の表現型の浸透率の有意な増加が観察された (7B>Jbz, DIP2 22.7% n = 82、7B>Fbz, DIP2 12.5% n = 80)。次に、免疫組織染色を行ったが、AP1 の各因子のドミナントネガティブをキノコ体特異的に強制発現させても蛹化後 24 時間では DIP2 シグナルの有意な減少は観察されなかった (図 68)。これらの結果は、AP1 は Bsk-DIP2 経路と相互作用を有するが、AP1 が直接的に DIP2 の発現を制御していない事を意味している。

最近の研究によって、キノコ体において Bsk が細胞接着因子である Fas II の発現を負に制御し、 $\gamma$ ニューロンの刈り込みに関与している事が明らかとなった (Bornstein et al., 2015)。DIP2 が Fas II の上流に位置するか確かめる為、MARCM 法を用いてクローン内でのみ DIP2 を過剰発現させた所、クローン内での Fas II シグナルの上昇が観察された (図 69)。また、c739-Gal4 を用いて  $\alpha/\beta$  ローブ特異的に Fas II を過剰発現させると、Bsk.DN を

強制発現させた時と同様の表現型 (図 63) が得られる事が報告されている (Fushima and Tsujimura, 2007)。これらの結果は、 $\alpha/\beta$  ローブにおいても Bsk が Fas II の発現を制御し  $\alpha/\beta$  ニューロンの投射方向を制御している事、この制御が DIP2 を介している可能性が高い事を示唆している。

以上の Bsk の解析から以下の事が言える。

- ・ キノコ体特異的に Bsk を抑制すると DIP2 を過剰発現した場合と同様に投射異常や軸索枝の過伸展が引き起こされる。
- ・ Bsk は DIP2 の上流に存在しており、正の方向に発現制御を行っている。
- ・ AP1 は Bsk-DIP2 経路と相互作用を有するが、DIP2 の発現制御には関与していない。
- ・ Bsk-DIP2 経路の下流に Fas II が存在する可能性が高い。

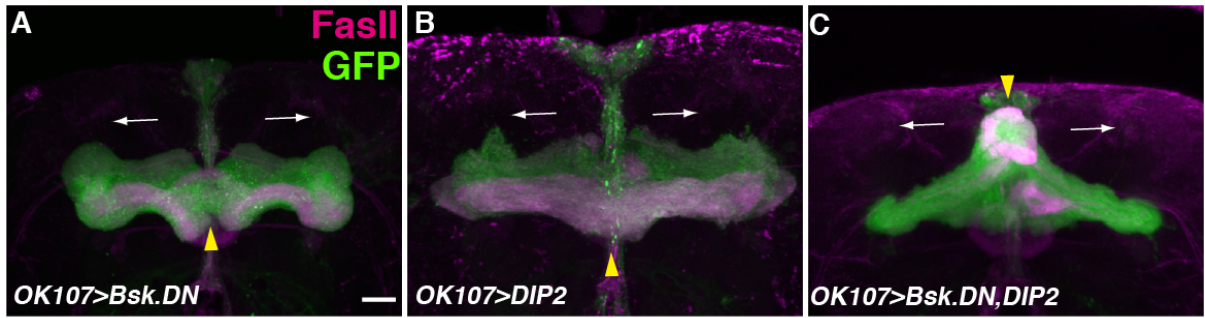


図 60: Bsk 機能抑制時と DIP2 過剰発現時の表現型。キノコ体は *OK107-Gal4* を用いて GFP を発現(緑)させる事によって可視化し、 $\alpha/\beta$  ロープは抗 Fas II 抗体による染色 (マゼンタ) で可視化した。(A) *OK107-Gal4* を用いてキノコ体特異的に Bsk のドミナントネガティブ型 (Bsk.DN) を発現すると、投射異常 (白矢印) 及び正中線側ローブの過伸長 (黄矢頭) が観察された。(B) DIP2 を過剰発現させると同様の表現型が観察された。(C) Bsk.DN と DIP2 を共発現させると過伸長した正中線側のローブが正中線上に蓄積する表現型が観察された。スケールバーは  $20\ \mu\text{m}$ 。

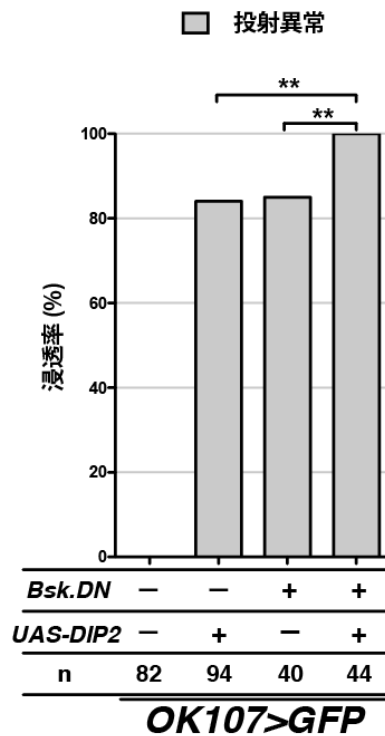


図 61: *OK107-Gal4* を用いた *DIP2* と *bsk* の遺伝学的相互作用の定量化。Bsk.DN と DIP2 を共発現すると、それぞれ片方を発現した場合より投射異常の浸透率が有意に増加した。(\*\* $P < 0.01$ 、Fisher の正確確率検定)。

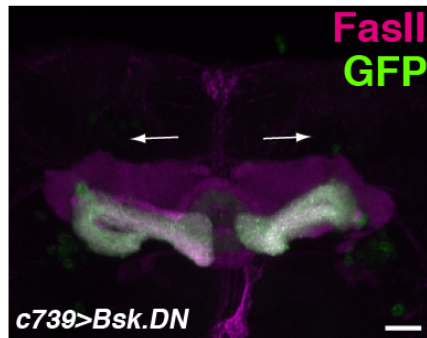


図 62: *c739-Gal4* を用いてキノコ体  $\alpha/\beta$  ロープ (緑) 特異的に Bsk を抑制すると正中線側ローブの過伸長は観察されず、投射異常のみが観察された。スケールバーは 20  $\mu\text{m}$ 。

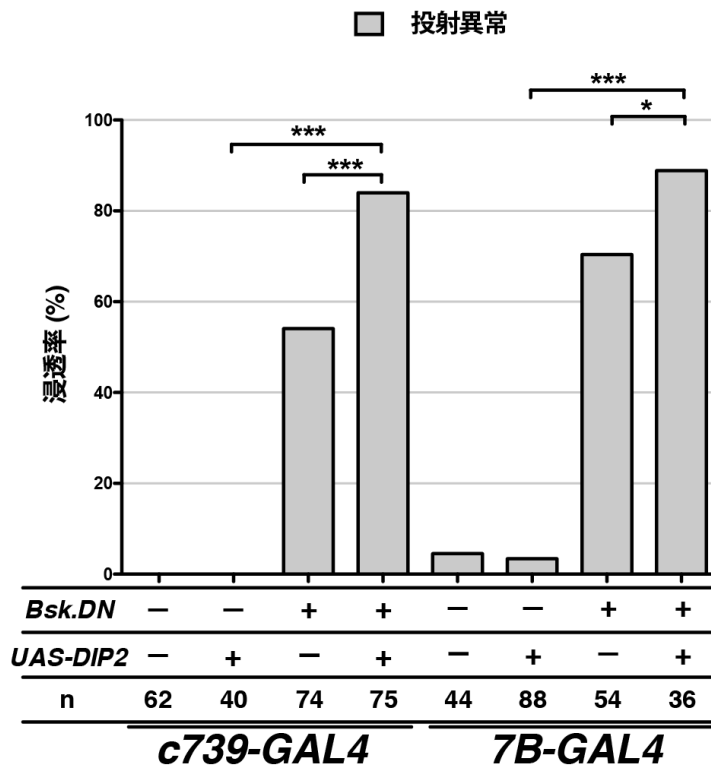


図 63: *c739-Gal4* 及び *7B-Gal4* を用いた *DIP2* と *bsk* の遺伝学的相互作用の定量化。DIP2 を強制発現してもほとんど表現型は観察されないが、Bsk.DN と DIP2 を共発現すると Bsk.DN だけを発現した場合よりも投射異常の浸透率が有意に増加した。(\* $P < 0.05$ 、\*\*\* $P < 0.001$ 、Fisher の正確確率検定)。

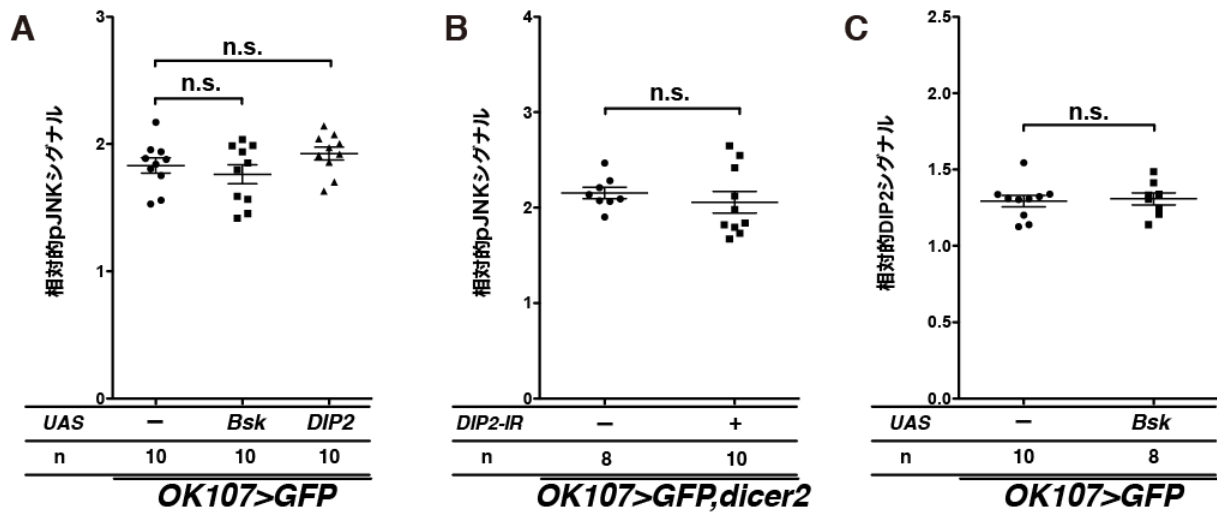


図 64：(A) 蛹化 24 時間後における DIP2 及び Bsk 過剰発現時の抗 pJNK 抗体のシグナルの定量化。どちらも pJNK シグナルの有意な変化は観察されなかった。(B) 蛹化 24 時間後における DIP2 ノックダウン時の抗 pJNK 抗体のシグナルの定量化。pJNK シグナルの有意な変化は観察されなかった。(C) 蛹化 24 時間後における Bsk 過剰発現時の抗 DIP2 抗体のシグナルの定量化。DIP2 シグナルの有意な増加は観察されなかった。

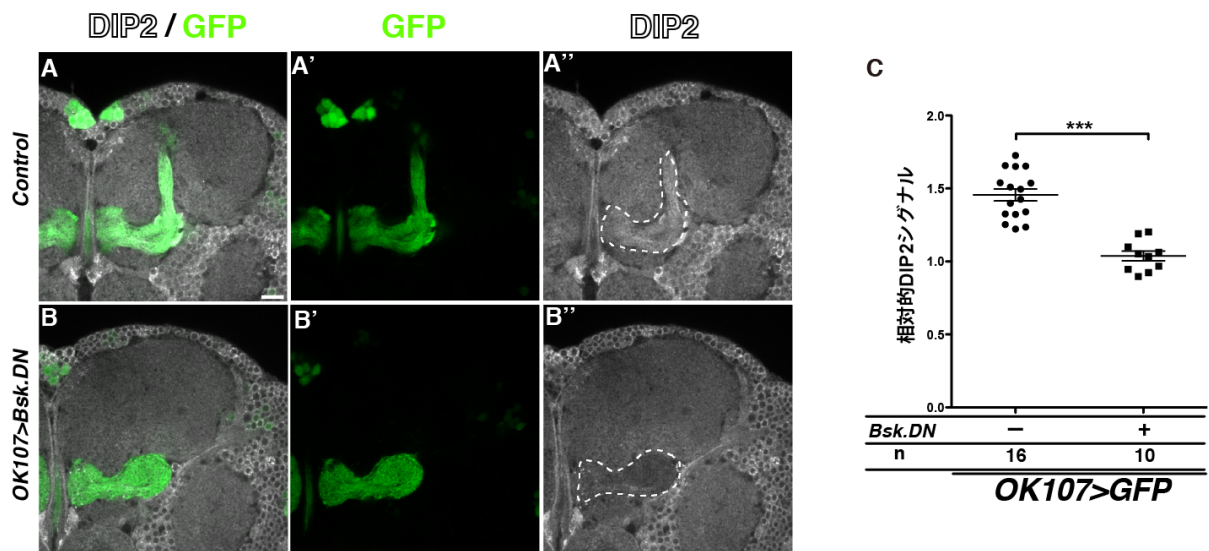


図 65：蛹化 24 時間後におけるコントロール (A-A'') と Bsk.DN 発現個体 (B-B'') の抗 DIP2 抗体シグナル (白)。キノコ体は *OK107-Gal4* を用いて GFP を発現 (緑) させる事によって可視化した。(A'、C') の点線部はキノコ体領域を示す。(C) キノコ体内の DIP2 シグナルの定量化。Bsk を抑制すると DIP2 シグナルが有意に減少した。(\*\*\*) $P < 0.001$ 、Unpaired t 検定)。スケールバーは 20  $\mu\text{m}$ 。

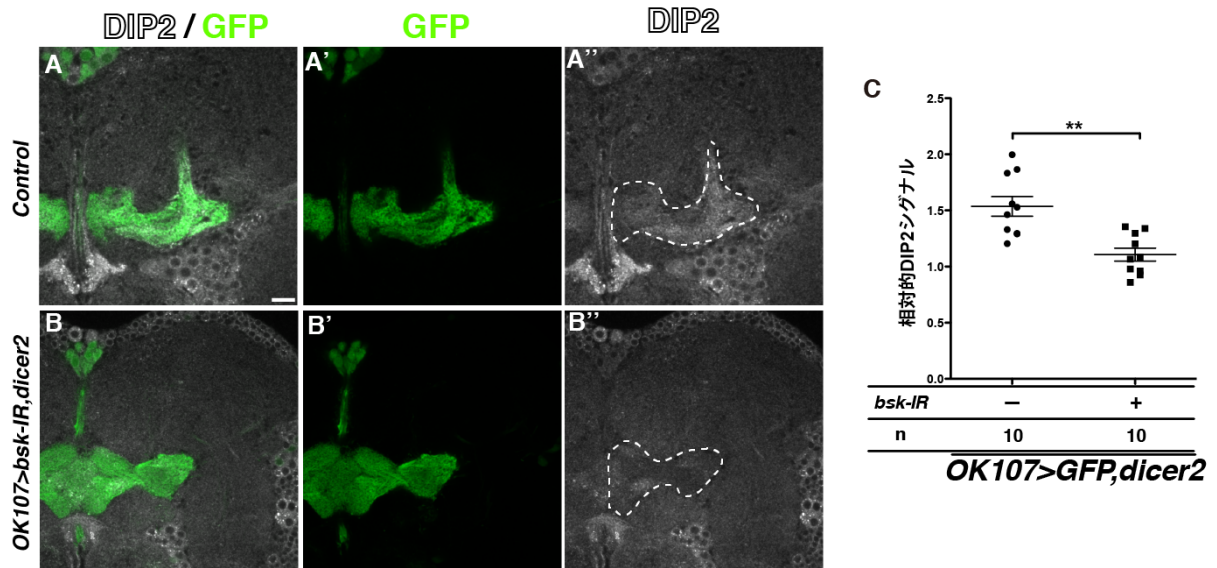


図 66：蛹化 24 時間後におけるコントロール (A-A'') と *bsk* ノックダウン個体 (B-B'') の抗 DIP2 抗体シグナル (白)。キノコ体は *OK107-Gal4* を用いて GFP を発現 (緑) させる事によって可視化した。(A'', C'') の点線部はキノコ体領域を示す。(C) キノコ体内の DIP2 シグナルの定量化。RNAi を用いて *Bsk* を抑制しても DIP2 シグナルが有意に減少した。(\*\* $P < 0.01$ 、Unpaired t 検定)。スケールバーは  $20 \mu\text{m}$ 。

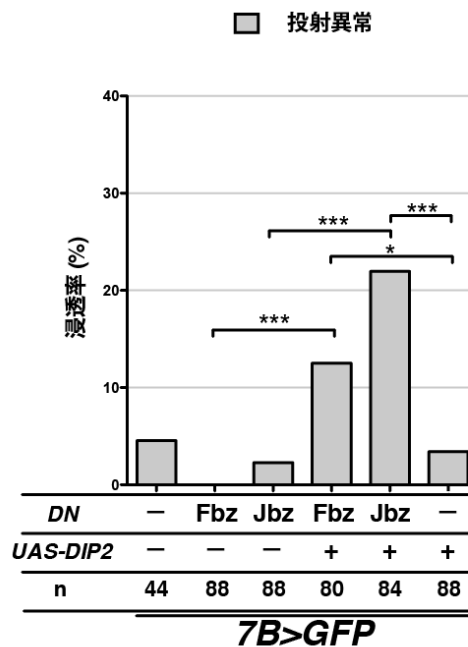


図 67：7B-Gal4 を用いた *DIP2* と *AP1* の遺伝学的相互作用の定量化。*AP1* のドミナントネガティブ型 (Fbz, Jbz) と *DIP2* を共発現させると表現型の有意な増加が観察された (\* $P < 0.05$ 、\*\*\* $P < 0.001$ 、Fisher の正確確率検定)。



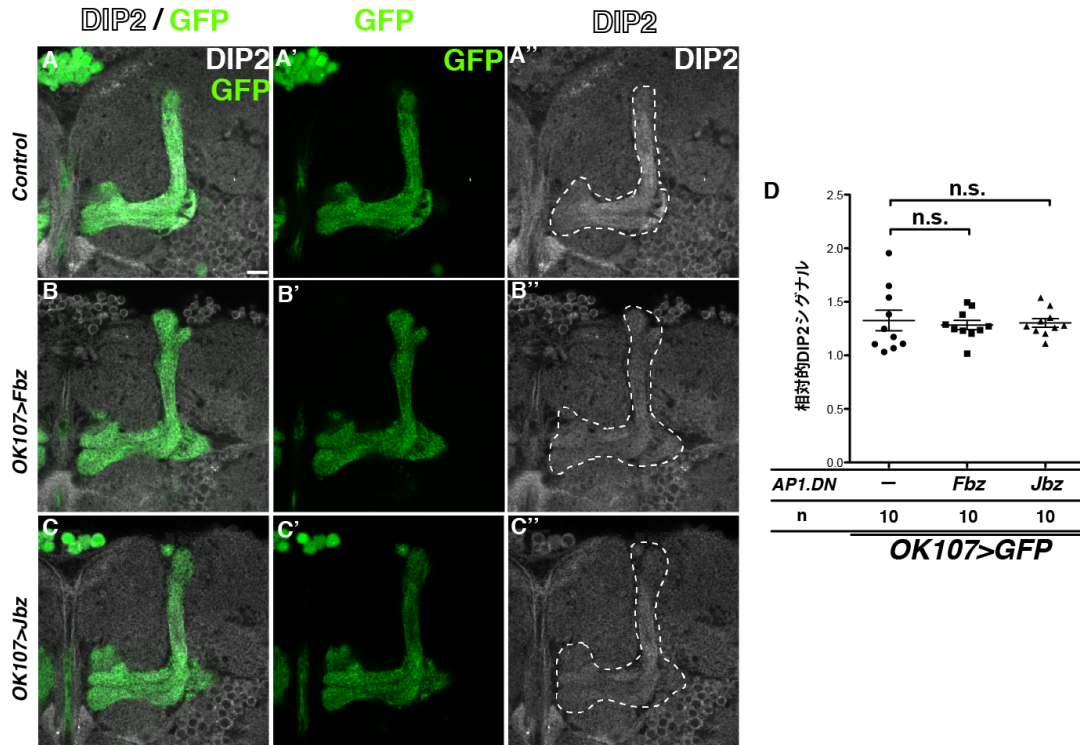


図 68: 蛹化 24 時間後におけるコントロール(A-A''), *kay*.DN 発現個体(B-B''), *Jra*.DN 発現個体(C-C'') の抗 DIP2 抗体シグナル (白)。キノコ体は *OK107-Gal4* を用いて GFP を発現 (緑) させる事によって可視化した。(A'', B'', C'') の点線部はキノコ体領域を示す。(D) キノコ体内の DIP2 シグナルの定量化。AP1 のドミナントネガティブ型を発現させても DIP2 シグナルの有意な変化は観察されなかった。スケールバーは 20  $\mu$ m。

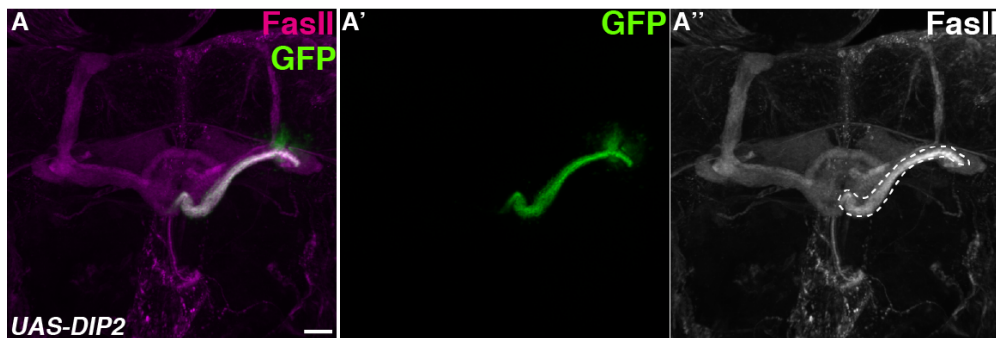


図 69: MARCM 法を用いた DIP2 過剰発現クローンの作製。 $\alpha/\beta$  ローブは抗 Fas II 抗体を用いてマゼンタ (A) または白 (A'') で示した。DIP2 が過剰発現しているクローンは緑で示した。(A'') の点線部はクローン領域を示す。DIP2 過剰発現クローンでは、Fas II シグナルの上昇が確認された。スケールバーは 20  $\mu$ m。



#### 4.12 (補遺) キノコ体以外の神経組織における DIP2 の影響

4.2 で示した、発生中の脳における DIP2 の広範囲な発現 (図 18 A) より、DIP2 はキノコ体だけでなく様々な神経組織の発生に関与している可能性が示唆される。キノコ体以外の組織における DIP2 の影響を調べる為、楕円体 (ellipsoid body) における DIP2 の機能を検討した。楕円体は中心複合体 (central complex) の一部であり、歩行制御や視覚記憶に関与している事が報告されている (Pan et al., 2009; Strauss and Heisenberg, 1993)。野生型の楕円体の軸索はドーナツ状の構造を形成する (図 70 A) が、*DIP2* 変異体ではドーナツ状構造の腹側に切れ込みが入っている楕円体が観察された (100%, n = 30) (図 70 B)。楕円体ニューロンの軸索投射に異常が生じるとこの様な表現型を示す事が報告されている (Whited et al., 2007)。次に、*elav-Gal4* を用いてレスキュー実験を行った所、*DIP2* 変異体で観察された表現型の浸透率が有意に回復した (図 71)。また、4.5 と同様に各ドメインを欠損した *DIP2* を用いてレスキュー実験を行った所、キノコ体と同様に DMAP1-binding ドメインを欠損した *DIP2* では表現型がレスキューされ、AMP ドメインを 1 つでも欠損している *DIP2* では表現型のレスキューが観察されなかった (*elav>DIP2; DIP2<sup>34/M101352</sup> 0% n = 32*, *elav>DIP2 ΔDMAP1; DIP2<sup>34/M101352</sup> 0% n = 25*, *elav>DIP2 ΔAMP1; DIP2<sup>34/M101352</sup> 91.7% n = 24*, *elav>DIP2 ΔAMP2; DIP2<sup>34/M101352</sup> 100% n = 24*)。

これらの結果は、DIP2 はキノコ体だけでなく他の神経組織の軸索投射に関与しており、その機能において AMP ドメインが重要である事を意味している。

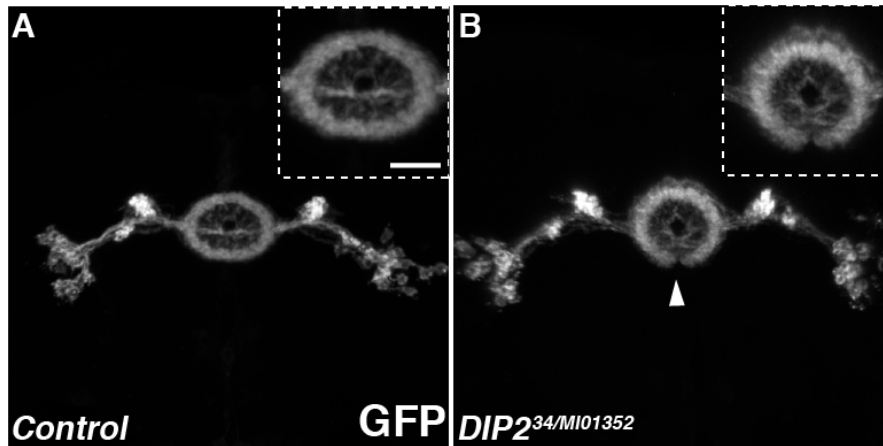


図 70：DIP2 変異体の楕円体。楕円体は *E1-Gal4* を用いて GFP を発現（白）させる事によって可視化した。コントロール（A）と比べて、DIP2 変異体（B）では軸索部の腹側に切れ込み（白矢頭）が入っている。点線部は軸索部の拡大図。スケールバーは 20  $\mu$ m。

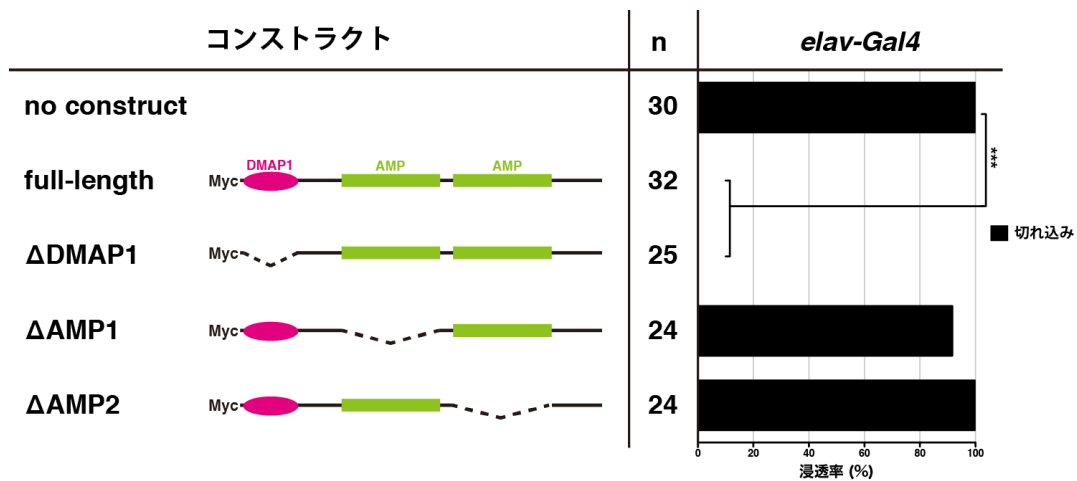


図 71：各ドメインを欠損した DIP2 コンストラクトを用いたレスキュー実験。キノコ体の表現型と同様に、full-length の DIP2 及び DMAP1-binding ドメインを欠損した DIP2 は DIP2 変異体の表現型を完全にレスキューしたが、AMP ドメインを欠損した DIP2 は表現型をレスキューする事は出来なかった。（\*\*\* $P < 0.001$ 、Fisher の正確確率検定）。

#### 4.13 (補遺) キノコ体ニューロン軸索部への DIP2 の局在の必要性

野生型の DIP2 をキノコ体特異的に強制発現すると、キノコ体全体で発現が観察される (図 72 A)。しかし、ドメイン間のリンカー配列を欠損した DIP2 (*DIP2Δlinker*) を過剰発現した所、どの *DIP2Δlinker* もカリックスと細胞体のみで局在し、軸索によって構成されているペダングル及びローブ構造において発現が観察されなかった (図 72 B)。軸索部における DIP2 の発現の必要性を検討する為、*DIP2Δlinker* を用いてレスキュー実験を行った。その結果、全ての *DIP2Δlinker* で *DIP2* 変異体の表現型のレスキューを行う事が出来なかった (*c739>mcd8, DIP2 Δ linker1; DIP2<sup>34/M101352</sup> 68.1% n=72*、*c739>mcd8, DIP2 Δ linker2; DIP2<sup>34/M101352</sup> 60.0% n = 80*、*c739>mcd8, DIP2 Δ linker3; DIP2<sup>34/M101352</sup> 60.0% n = 80*) (図 73) 。これらの結果は、リンカー配列が欠損した事によって正常な立体構造をとる事が不可能となり *DIP2* が機能出来ていない可能性を排除する事は出来ないが、*DIP2* が軸索に局在する事が正常な機能を発揮する為に重要である可能性を示唆している。

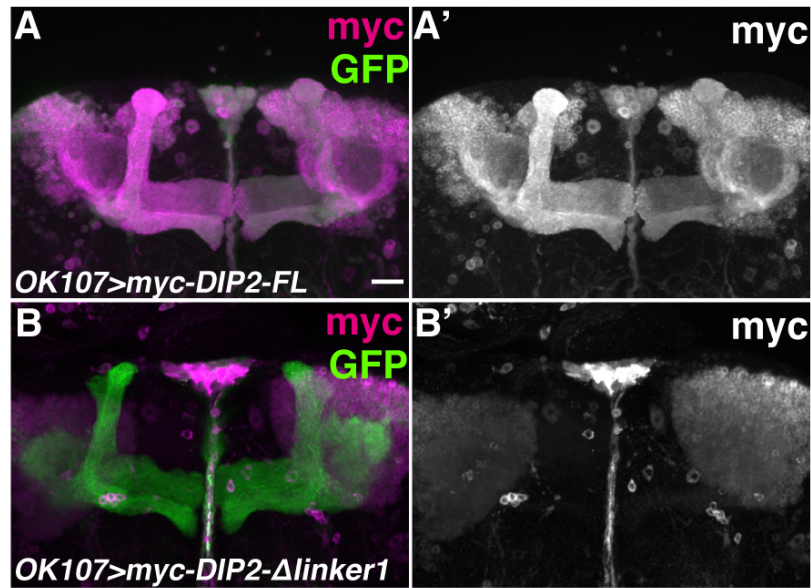


図 72：リンカー配列を欠損した DIP2 の局在。キノコ体は *OK107-Gal4* を用いて GFP を発現（緑）させる事によって可視化し、DIP2 の局在は抗 myc 抗体による染色でマゼンタ (A、A') または白 (B、B') で示した。野生型の DIP2 (A-A') をキノコ体で過剰発現すると DIP2 はキノコ体全体に局在したが、リンカー配列を欠損した DIP2 (B-B') はキノコ体のカリックス及び細胞体のみ局在した。スケールバーは 20  $\mu$ m。

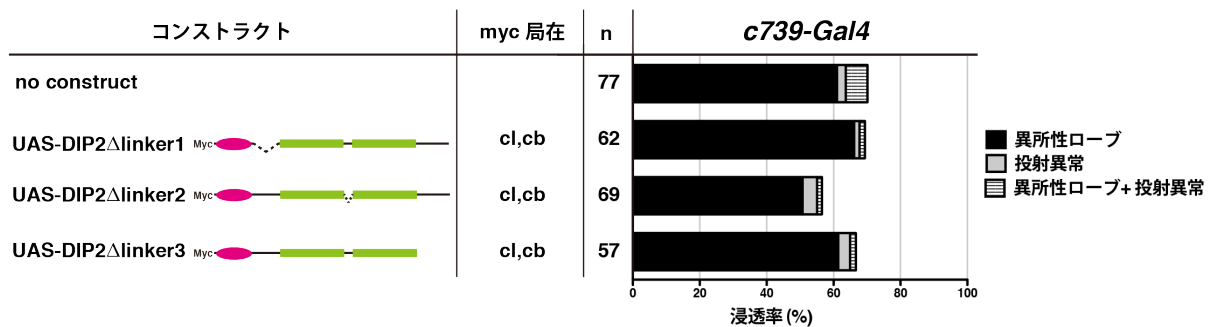


図 73：各リンカー配列を欠損した DIP2 コンストラクトを用いたレスキュー実験。どのコンストラクトも *DIP2* 変異体の表現型を回復する事は出来なかった。myc 局在は各コンストラクトを発現した時の myc シグナルの局在を意味している。cl、cb はそれぞれローブ構造、ペダングル、カリックス、細胞体を意味している。

## 5. 考察

本研究では、ショウジョウバエのキノコ体をモデルとして、軸索枝の形成と投射を制御する因子として *DIP2* を同定し機能解析を行った。キノコ体をモデルとした神経発生研究は古くから行われており、刈りこみ (Hoopfer et al., 2008; Watts et al., 2003; Yu and Schuldiner, 2014) や軸索投射・誘導 (Shin and DiAntonio, 2011; Whited et al., 2007)、時期特異的分化 (Liu et al., 2015; Sokol et al., 2012; Zhu et al., 2006) などが解明されてきた。しかし、キノコ体の特徴的な形状を決定づける機構である軸索分岐に関する論文は1報しか報告されていない。2002年に膜貫通タンパクである *Dscam1* に変異が生じると過剰な軸索分岐が起こる事が報告 (Wang et al., 2002) されているが、それ以降 *Dscam1* の研究を含めキノコ体の軸索分岐形成を研究した論文は発表されてこなかった。また、ショウジョウバエに限らず軸索分岐に関する研究は殆どなされておらず、cGMP シグナルが関与しているという報告が2報なされているだけである (Schmidt et al., 2009; Ter-Avetisyan et al., 2014)。本研究における *DIP2* 変異体の解析によって、*DIP2* が AMP-synthetase ドメインを介して過剰な軸索枝の抑制と軸索枝の投射制御を行っている事が明らかとなり、*DIP2* の下流の因子として *gkt* が同定された。また、頂端極性因子である *crb* と *sdt* が *DIP2* 及び *gkt* と協働して軸索分岐を制御する事を見出した。軸索枝の制御機構にこれらの因子が関与する事は報告されておらず、全く新しい知見といえる。

その他に、(1) c-Jun N-terminal kinase のショウジョウバエホモログである *Basket* が *DIP2* の発現を制御しており *DIP2* の機能獲得型変異と遺伝学的相互作用を有する事、(2) *DIP2* が Wnt/PCP 経路の一部の因子と遺伝学的相互作用を有する事を明らかにした。

## 5.1 神経系における DIP2 の機能解析

DIP2 は神経発生に必要な転写因子である Disco の結合因子として同定され、線虫からヒトまで幅広く保存されており、多くの生物種において発生中の神経系で強く発現している事が報告 (Mukhopadhyay et al., 2002; Zhang et al., 2015b) され、神経発生に重要な役割を持つことが示唆されてきた。また、ヒトでは DIP2 の異常が神経疾患に関係する可能性が示唆 (De Jager et al., 2014; Kong et al., 2015; Winnepeninckx et al., 2007) されており、神経機能において何らかの重要な役割を有すると考えられている。しかしながら、DIP2 の機能を解析した論文は極めて少なく、神経系における機能は全く報告されてこなかった。本研究によって、DIP2 が過剰な軸索分岐を抑制し、軸索枝の投射パターンを適切に制御する事が明らかとなった。

*in vitro* において哺乳類の DIP2 ホモログである DIP2A が Follistatin-like 1 (FSTL1) のレセプターとして機能し、Akt のリン酸化を制御している事が報告されている (Ouchi et al., 2010; Tanaka et al., 2010)。しかし、以下の理由によりショウジョウバエの DIP2 はキノコ体において、このような機能を有していないと考えられる。(1) ショウジョウバエには FSTL1 のホモログが存在しない。(2) ショウジョウバエの DIP2 には膜貫通ドメインが存在しない為、レセプターとして機能することが出来ない。(3) キノコ体特異的に Akt をノックダウンしても *DIP2* 変異体や *DIP2* ノックダウン時と同様の表現型を得ることが出来なかった。(4) *DIP2A* を欠損すると Akt の活性化が阻害されるが、Akt は軸索枝形成を促進する事が報告 (Markus et al., 2002) されており、*DIP2* 変異体で観察された軸索枝の過剰形成という表現型と正反対である。

また、本研究では *disco* との相互作用を確認する事ができなかった (4.7 参照)。Disco は核に、DIP2 は核以外に局在しているので酵母ツーハイブリッド法で確認されたような直

接的な結合をしている可能性は非常に考えにくい。しかし、*disco* 変異体では *DIP2* 変異体と同様の投射異常を観察する事が出来たので、*DIP2* の生物学的機能に間接的に *Disco* が関与しているかもしれない。

*disco* は哺乳類では保存されていないので、本研究で発見した *DIP2* による *Gkt* を介した軸索枝制御経路が哺乳類の *DIP2* 及び軸索分岐形成機構にも敷衍出来ると期待する。

## 5.2 DIP2 と Gkt 間の相互作用

ドメインを欠損させた DIP2 を用いたレスキュー実験より、DIP2 の AMP-synthetase ドメインがキノコ体の軸索枝制御において重要である事が明らかとなった (4.5 参照)。AMP-synthetase ドメインは酵素活性を持つと考えられており、ショウジョウバエにおいて AMP-synthetase ドメインを持つ遺伝子の殆どが脂肪酸代謝関連酵素である。これらの脂肪酸代謝関連酵素がキノコ体の形態形成に与える役割を調べる為、キノコ体特異的にこれらの遺伝子を抑制した。その結果、一部の遺伝子ではキノコ体の形態形成に異常が観察され、中には *DIP2* 変異体の様な異所性ローブの表現型を示す遺伝子も同定された (図 74)。神経発生において、脂肪酸が重要な機能を持つ事は以前から示唆されていた (Crawford, 1993; Innis, 2007)。近年の研究によって脂肪酸の詳細な機能が解析され、神経幹細胞の分化・増殖 (Owada, 2008) や回路形成 (Igarashi et al., 2015; Zhang et al., 2009)、樹状突起の arbor の形成 (Furuta et al., 2012)、シナプス形成 (Liu et al., 2014; Liu et al., 2011) など神経発生のあらゆる側面に脂肪酸が関与している事が明らかとなっており、DIP2 も脂肪酸を基質として代謝し軸索分岐を制御している可能性が考えられる。

DIP2 の下流因子としてホスホリパーゼ D (PLD) スーパーファミリーの一員である Gkt を同定した (4.8, 4.9 参照)。PLD スーパーファミリータンパク質は HKD モチーフを持ち、基質のホスホジエステル結合を加水分解する活性を有することが知られている。そのメンバーはホスファチジルコリン (PC) を基質とする PLD 及びホスファチジルセリン合成酵素、カルジオリピン及び核酸を基質とする Zucchini (PLD6)、核酸を基質とする Tdp1 等多岐にわたっている (Frohman, 2015; Gottlin et al., 1998; Interthal et al., 2001; Stuckey and Dixon, 1999)。しかし、核酸やカルジオリピンを基質とする PLD スーパーファミリータンパク質は核内もしくはミトコンドリア表面に局在する事が報告されており、細胞質に局在し核内



での発現や特定の細胞内小器官への偏りが無い事が報告 (Dunlop et al., 2004) されている。Gkt は脂質を基質としている可能性が示唆される。PLD スーパーファミリーのメンバーである PLD1 及び PLD2 は脂肪酸の代謝産物である Acyl-CoA によって活性を制御されると同時に、Acyl-CoA が自身の基質であるホスファチジルコリン (PC) に代謝される事が報告されている (Wang and Oram, 2005)。また、PLD1 及び PLD2 は PA を介して自身の発現を活性化している事が知られている (Kang et al., 2011a)。

(1) DIP2 が脂肪酸を代謝している可能性、(2) *gkt* は脂質の代謝産物を基質としている可能性を勘案すると、DIP2 による *gkt* 制御機構は以下の様な仮説が考えられる (図 75)。まず、DIP2 が AMP-synthetase ドメインを介して脂肪酸を代謝する。この代謝産物が *gkt* を活性化させると同時に、Gkt の基質となる PC を供給する。Gkt は自身の発現を活性化し発現量が増加する。*DIP2* 変異体で *gkt* を強制発現させても表現型が回復しなかったのは、*DIP2* の欠損によって Gkt の基質となる PC が供給されなかった為と考えられる。この仮説を確かめる為には、*DIP2* の基質及び代謝産物の同定、この代謝産物が Gkt に及ぼす影響の検討などを行う必要がある。

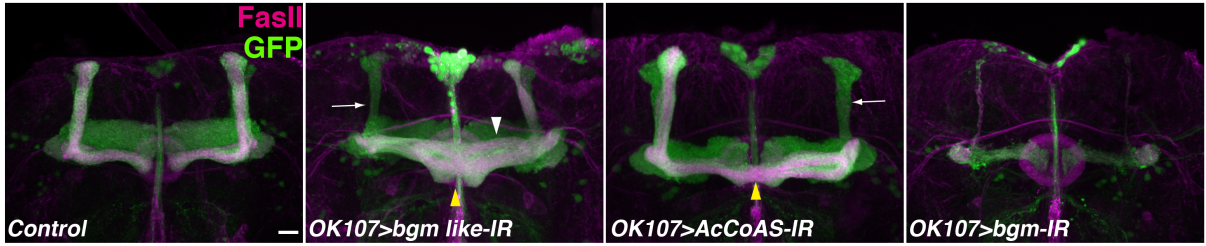


図 74: コントロール (A) と比べて、AMP ドメインを有する脂肪酸代謝関連因子をノックダウン (B-D) すると異所性ローブ (白矢頭) や投射異常 (白矢印)、軸索伸長 (黄矢頭)、細胞数の大幅な減少 (D) が観察された。スケールバーは  $20\ \mu\text{m}$ 。

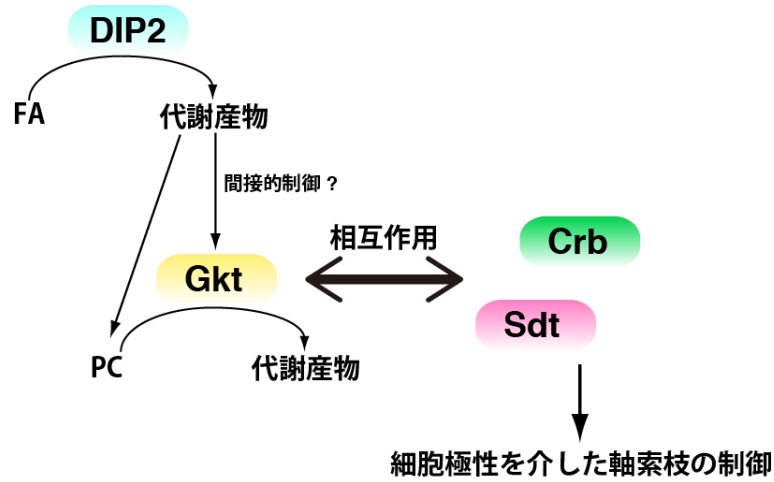


図 75: DIP2 による Gkt の発現制御仮説。DIP2 が脂肪酸 (FA) を基質として代謝し、その代謝産物が Gkt の基質となると同時に、Gkt の発現を間接的に制御する。そして、Gkt が Crb 及び Sdt と相互作用し、細胞極性を介した軸索枝の制御を行っていると考えられる。

### 5.3 ローブレベルの表現型と単一細胞レベルの表現型の乖離

本研究では *DIP2* 変異体の表現型に対し、ローブレベルでの分類と単一細胞レベルでの分類を同時に行い、ローブで観察された表現型の原因を単一ニューロンレベルに落としこむ事が出来た (図 28)。しかし、幾つかの不明瞭な点が存在する。ここでは、それらに対して考察を加える。

ローブレベルでは野生型と分類 ( $n = 29$ ) されたにも関わらず、単一細胞レベルでは半数以上で軸索枝の過剰形成が観察された。この表現型の不一致の原因として、(1) ローブレベルの表現型として表出するには更に高い割合で軸索枝の過剰形成が必要となる可能性、(2) 本来は異所性ローブが形成されているにも関わらず野生型と分類してしまった (= 偽陰性) 可能性 (図 76) が考えられる。キノコ体のローブ構造は約 2000 本のニューロンが凝集する事によって形成されており、ニューロン同士の相互作用によって表現型が表出にくい事も多い。また、単一細胞レベルでは全く異なる表現型でも、ローブレベルでは類似した表現型となってしまう事もある。真に正確な議論の為には、Photoactivatable-GFP (Caron et al., 2014) や色素注入によって常に単一細胞レベルで表現型を観察する事が理想である。

また、*DIP2* 変異体では  $\alpha'/\beta'$  ニューロン及び  $\alpha/\beta$  ニューロンにおいて異所性の軸索及び投射異常が観察された (4.3.3 参照) が、ローブレベルでは  $\alpha'/\beta'$  ローブでは形態異常が観察されなかった (4.3.2 参照)。その原因の 1 つとして  $\alpha'/\beta'$  ローブと  $\alpha/\beta$  ローブの密度の違いが挙げられる。 $\alpha'/\beta'$  ローブと  $\alpha/\beta$  ローブが占める体積は殆ど変わらないが、 $\alpha'/\beta'$  ローブは約 370 本の  $\alpha'/\beta'$  ニューロンから構成され、 $\alpha/\beta$  ローブは約 1000 本の  $\alpha/\beta$  ニューロンから

構成されている (Aso et al., 2009)。つまり、 $\alpha/\beta$  ローブは  $\alpha'/\beta'$  ローブより 3 倍密な構造を取っているといえる。従って、異所性軸索が形成されても  $\alpha/\beta$  ニューロンの方がより密な構造を取る為、ローブ構造として表出しやすい。一方、 $\alpha'/\beta'$  ニューロンで異所性軸索が形成されても密なローブ構造を形成しない為、異所性ローブとして認識されにくいと考えられる。

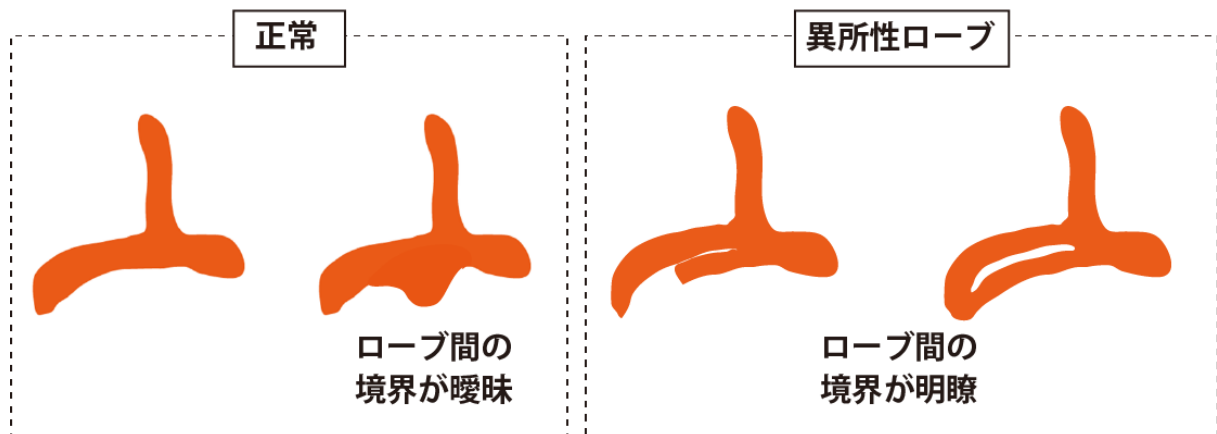


図 76：ローブレベルの表現型の分類における偽陰性の要因。

ローブ間の境界が明確であった場合のみ異所性ローブとカウントする為、実際に異所性ローブが存在していてもローブ間の境界が曖昧であった場合に野生型と分類されてしまう。

## 5.4 DIP2の機能獲得型変異

遺伝学的解析及び免疫組織染色によって、JNK ホモログである Bsk が DIP2 を正に制御していることが明らかとなった (4.11 参照)。しかし、Bsk を抑制すると DIP2 の発現量が減少する (図 67、図 68) にもかかわらず、Bsk を抑制した時に観察された表現型は DIP2 を過剰発現する事によって増強された (図 63、図 64)。この一見矛盾した結果は、Bsk と DIP2 及びその共通の下流因子 (X とする) の以下の様な関係性を示唆している (図 77)。Bsk は DIP2 を正に制御すると同時に X を正 (または負) に制御し、DIP2 は X を負 (または正) に制御している。つまり、Bsk と DIP2 は X に対して逆方向の発現制御をしており、DIP2 は JNK シグナル経路のバッファーとして作用している可能性が考えられる。JNK シグナル経路は Wingless や Wnt、FGF といった内在性シグナル分子以外にも酸化ストレスや浸透圧、機械的刺激などの外的要因によって制御を受ける事が知られている (Coffey, 2014; Danny N Dhanasekaran, 2008)。発生中に、これらの因子によって JNK シグナル経路が想定外の制御を受けてしまうと形態形成に異常が生じ、最悪の場合致死となってしまう。この可能性を防ぐ為、JNK シグナルの下流に JNK と逆方向の制御因子を置く事によって JNK シグナルの変動をある程度緩和する事が出来ると考えられる。

Bsk と DIP2 の下流に存在する因子 X の候補として Fas II が挙げられる。Fas II は細胞接着分子として知られ、軸索誘導 (Kristiansen et al., 2005; Zarin et al., 2014) やシナプス誘導 (Kohsaka et al., 2007)、記憶形成 (Cheng et al., 2001) に関与している事が報告されている。最近の報告によって、キノコ体の  $\gamma$  ロープにおいて Bsk の下流で軸索の刈り込みに関与している事が明らかとなった (Bornstein et al., 2015)。(1) この研究では Bsk を抑制すると Fas II シグナルが上昇した事、(2) 本研究では DIP2 を過剰発現すると Fas II シグナルが上昇した事 (図 73) から、Bsk は Fas II を負に制御して DIP2 は Fas II を正に制御していると考えら

れる (図 78)。

本研究によって Bsk が DIP2 の発現を制御する事、Fas II が下流因子として機能している可能性がある事が明らかとなったが、未解明の点は非常に多い。(1) Bsk の上流にはどのような因子が存在するのか。(2) DIP2 はどの様に Fas II を制御しているのか。(3) Fas II 以外の実行因子は存在するのか。(4) DIP2 の発現を Bsk を用いて間接的に抑制した時でも、*DIP2* 変異体や *DIP2* ノックダウンで確認された様な *gkt* の発現量減少は確認されるのか。

(5) *DIP2* 変異体でも Fas II シグナルは減少するのか。(6) もし *DIP2* 変異体で Fas II シグナルが減少するならば、*DIP2* 変異体で観察された表現型に Fas II が関与するのか。

これらの疑問点を解明するには更なる研究を要するが、最終的には *DIP2* の新しい機能が解明されるだけでなく、JNK シグナル経路による神経発生制御の全貌の解明に繋がる事が期待される。

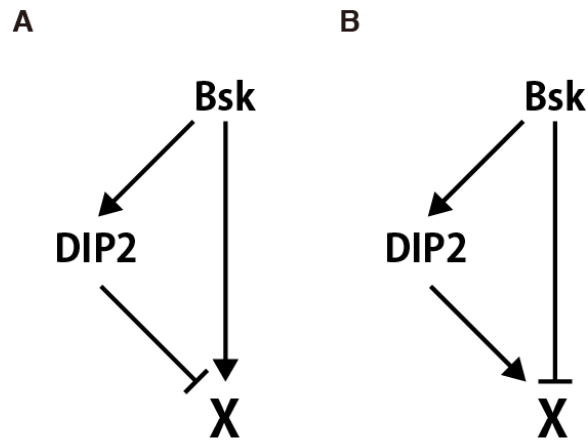


図 77：Bsk のシグナル経路における DIP2 の機能仮説。

(A)、(B) どちらも Bsk と DIP2 は共通の下流因子である X に対して逆方向の発現制御を行っていると考えられる。

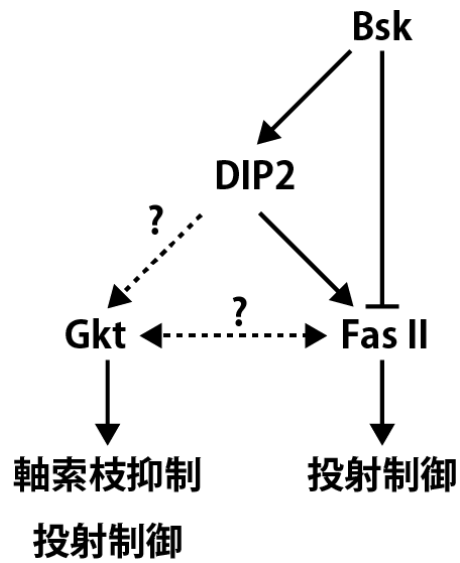


図 78：DIP2 及び Bsk による Fas II の制御。

Bsk は Fas II を負に制御し、DIP2 は Fas II を正に制御していると考えられる。Bsk を介して DIP2 の発現を抑制しても Gkt が減少するのか、Gkt と Fas II 間に相互作用が存在するのかは未解明である。



## 5.5 DIP2 と Wnt5 の遺伝学的相互作用

本研究によって、DIP2 は Wnt5 と強い遺伝学的相互作用を有する事が明らかとなった (4.10 参照)。しかし、*Wnt5* 変異体バックグラウンドで *DIP2* 変異をヘテロで持たせると表現型がレスキューされるが、*DIP2* 変異をホモにして DIP2 の発現量を更に減らすと表現型の浸透率が増え、新たな表現型が観察されるという結果が得られた (図 59 A)。本項目では、この一見矛盾した結果について考察を加える。

図 79 では DIP2 と Wnt5 の発現量と各々の表現型を対応させた。DIP2 も Wnt5 も過剰発現するとローブが過伸長する事から、 $\alpha/\beta$  ニューロンの伸長を制御している可能性が強く示唆される。しかし、*Wnt5* 及び *DIP2* 変異体単体ではローブが短縮する表現型は観察されず、両方の変異を導入する事で初めてローブ短縮の表現型が観察された。つまり、Wnt5 と DIP2 は  $\alpha/\beta$  ニューロンの伸長に関しては additive に働いている可能性が示唆される。

$\alpha/\beta$  ローブの投射パターンに着目すると、Wnt5 と DIP2 による投射制御機構として図 80 A の様なモデルが考えられる。このモデルでは、 $\alpha/\beta$  ニューロンの投射は 2 つの異なる経路 X と Y によって制御されており、Wnt5 は経路 X と Y を正に制御、DIP2 は経路 X を正に制御し、Y を負に制御している。また、経路 X は機能する為の閾値が低く、経路 Y は濃度依存的に機能している。図 80 B では、このモデルの各遺伝子型における経路 X、経路 Y の活性を図示した。*Wnt5* 変異体 (*Wnt5*<sup>-/-</sup>;*DIP2*<sup>+/+</sup>) では DIP2 が存在する為、経路 X は機能しているが経路 Y は野生型より低下している為、 $\alpha$  ニューロンの投射パターンはランダム寄りになってしまう。ここに DIP2 の変異をヘテロで導入 (*Wnt5*<sup>-/-</sup>;*DIP2*<sup>+/-</sup>) すると、*Wnt5* 変異体単体よりも経路 Y の低下が抑えられる為、 $\alpha$  ニューロンの投射パターンがレスキューされる。しかし、*Wnt5* と *DIP2* のダブルミュータント (*Wnt5*<sup>-/-</sup>;*DIP2*<sup>-/-</sup>) では経路 Y は抑制されなくなるが、経路 X が機能しなくなる為、 $\alpha$  ニューロンの投射パターンに変

異が生じ正中線側へと誤投射してしまう。また、Wnt5 や DIP2 過剰発現時は経路 Y が大幅に変動し、 $\alpha$ ニューロンの投射パターンに異常が生じる。つまり、経路 X が活性化しており、経路 Y の活性が適度であった場合のみ  $\alpha$ ニューロンが背側方向に投射できる。一方、 $\beta$ ニューロンは経路 X とは独立しており、経路 Y が低下した時のみ投射パターンに異常が生じる可能性が示唆される。

近年の研究によって、Wnt5 は PCP 経路と Drl 経路という異なる 2 つの経路によって  $\alpha$ ニューロンの投射を制御している可能性が示唆されている (Gombos et al., 2015; Reynaud et al., 2015)。今回、モデルによって提示された経路 X、Y がこの 2 つの経路に対応するのか、それとも新規の経路が存在するのか、更なる解析が必要である。

遺伝子型	Wnt5 発現量	DIP2 発現量	$\alpha$ ロープ 投射方向	$\beta$ ロープ 投射方向	ロープ 伸長	凝集 表現型	異所性ロープ 表現型
野生型	1	1	背側	正中線側	正常	なし	なし
Wnt5 過剰発現	+	1	主に正中線側	正中線側	過伸長	なし	なし
Wnt5 <sup>-/-</sup>	0	1	ランダム	正中線側	正常	有り	なし
Wnt5 <sup>-/-</sup> ;DIP2 <sup>+/-</sup>	0	0.5	主に背側	正中線側	正常	有り	なし
Wnt5 <sup>-/-</sup> ;DIP2 <sup>-/-</sup>	0	0	主に正中線側	正中線側	稀に短縮	有り	有り
DIP2 <sup>-/-</sup>	1	0	主に背側	主に正中線側	正常	なし	有り
DIP2 過剰発現	1	+	主に正中線側	正中線側	過伸長	なし	なし

図 79 : Wnt5 発現量及び DIP2 発現量と  $\alpha/\beta$  ロープの各表現型。凝集表現型、異所性ロープの表現型はそれぞれ Wnt5 変異体及び DIP2 変異体でしか確認されない事から、各々の遺伝子特異的な表現型と考えられる。発現量 + は過剰に発現している事を意味している。



図 80 : (A) 表現型から予想される Wnt5 及び DIP2 による  $\alpha/\beta$  ニューロンの投射制御モデル。X と Y の 2 つの経路によって  $\alpha/\beta$  ニューロンの投射パターンが制御されており、Wnt5 は経路 X と経路 Y を活性化させ、DIP2 は経路 X を活性化させるか経路 Y を抑制している。この時、経路 X は閾値が低く、経路 Y は濃度依存的である。(B) モデルから予想される各遺伝子型における経路 X、経路 Y のシグナル。+、- はそれぞれ野生型と比較して増加、減少している事を意味している。+、- が多いほど変動が大きい。

## 5.6 DIP2 による軸索分岐制御の分子機構

本研究によって DIP2 に変異が生じると過剰な軸索分岐が形成される事が明らかとなった (4.3.3 参照)。それでは、DIP2 は軸索分岐形成のどの段階で機能しているのだろうか。DIP2 変異体で確認された過剰な軸索分岐が (1) ペダングルでは形成されなかった事、(2) 野生型の分岐点から離れた位置では形成されなかった事から、 $\alpha\beta$  ニューロンの分岐点には分岐誘導シグナルが存在し、そのシグナルは一過性であり離れると分岐が形成されなくなる可能性を強く示唆している。つまり、DIP2 は分岐シグナルの受容に関与しており、シグナルの複数回受容を阻害する機構を担っていると考えられる。

DIP2 変異体で観察された異所性ローブの表現型は、正中線側への弱い選択性が確認された (図 20 B、図 28 B、図 34 B)。異所性ローブの方向性は主に分岐点の位置に依存していると考えられる。新生されたキノコ体ニューロンの軸索はペダングルやローブの中心を通過して伸長する為、軸索の投射パターンは古いキノコ体ニューロンによって制限される。その為、一回分岐して軸索枝が各々の方向へ伸長してから更に分岐が起きた場合、新たに形成された軸索枝が別の方向へ投射する事は非常に困難である。つまり、正中線側に異所性ローブが多いという事は正中線側でより異所性の分岐が多い事を意味しており、正中線側に伸びた軸索枝は生理的もしくは物理的に分岐シグナルに対して応答しやすい可能性を更に示唆している。

トランスクリプトーム解析及び遺伝学的相互作用によって、DIP2 は Gkt を介して頂端極性決定因子である Crb 及び Sdt と相互作用を有する事、及び Wnt/PCP 経路の複数の因子と相互作用を有する事が判明した (4.9、4.10 参照)。複数の研究 (Courbard et al., 2009; Djiane et al., 2005) によって、頂端極性決定因子が PCP 経路と協同して細胞全体の極性を制御して

いる事が明らかとなっている。キノコ体ニューロンにおいては Wnt5 や PCP 経路の因子がリガンドと受容体として軸索伸長や誘導に関与している事が報告されている (Gombos et al., 2015; Reynaud et al., 2015)。それでは、これらの細胞極性因子はどの様にして分岐シグナルの受容を制御するのだろうか。

脳の後背部から伸長してきたキノコ体ニューロンの成長円錐は、脳の前端部に存在する分岐点に到着すると、そこに存在する分岐シグナル (X) を成長円錐表面に位置するレセプター (Y) によって受容して、軸索分岐を開始すると考えられる。成長円錐が X を受容し続けると軸索分岐を繰り返してしまう為、何らかの方法で X を遮断する必要がある。この時に、細胞極性因子が成長円錐に作用して Y の局在を変えてしまうのではないだろうか (図 81)。このモデルでは、成長円錐が X を受容すると DIP2 及び Gkt を介して細胞極性因子群が制御され、成長円錐内の極性が変化する。その結果、X のレセプターである Y が成長円錐表面からなくなり、成長円錐が X に反応しなくなり、軸索分岐が 1 回しか生じなくなるのではないだろうか。哺乳類において成長円錐が Wnt を受容すると、PCP 因子と頂端極性因子の相互作用により Wnt の受容体である Frizzled3 がエンドサイトーシスによって成長円錐表面から取り除かれ、Wnt シグナル受容が一時的に阻害される事が報告されている (Onishi et al., 2013)。また、軸索が分岐した後の各々の軸索枝の投射制御も、成長円錐内の細胞極性によって制御されている可能性が示唆されている (Shimizu et al., 2011; Zou, 2012)。

DIP2、Gkt、Sdt の三重ヘテロ接合体と DIP2、Gkt、Crb の三重ヘテロ接合体の間で一部の表現型の違いが観察された (図 53)。Sdt は Crb と複合体を形成した場合のみに機能する一方、Crb は細胞骨格制御に関与する Moesin を初め複数の因子と相互作用を持つ事が知られている (Bulgakova and Knust, 2009)。その為、Crb のみが相互作用をする因子が観察さ

れる表現型の違いの原因となっているのかもしれない。

キノコ体ニューロンの分岐を誘導すると考えられる因子XやそのレセプターYは全く同定されていない。Xの候補としてはWnt5、Yの候補としてはWnt5のレセプターであるFrizzled (Fz)が挙げられる。Wnt5はキノコ体の発生中に分岐点に局在する事が報告されている他、Wnt5やFzの変異体では軸索分岐の欠損が報告されている (Shimizu et al., 2011)。しかし、(1) どちらの因子も軸索分岐欠損の浸透率が約20%前後と高くない事、(2) Dscam1と言った既知の因子もキノコ体ニューロンの分岐に関与している事 (Wang et al., 2002) から、Wnt5だけでなく複数の因子が協働する事によってキノコ体ニューロンの軸索分岐の誘導シグナルとして作用しているのかもしれない。

本研究によって明らかにされたDIP2の軸索枝制御が、これらの因子の解明に繋がりキノコ体の特徴的な形態を創り出す分子機構の全容が解明される事を期待したい。

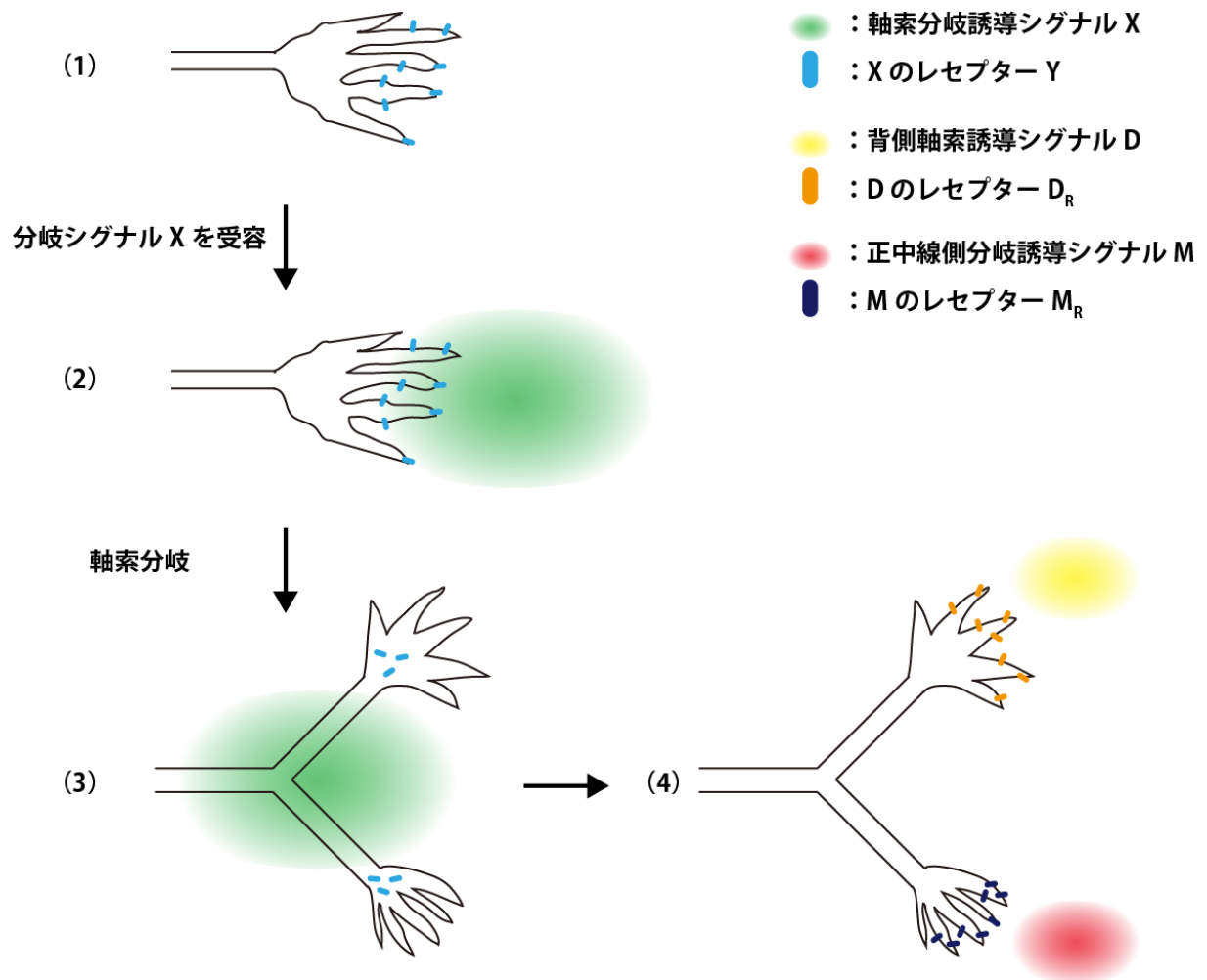


図 81 : DIP2 による軸索分岐制御モデル。(1) 分岐点に向けて伸長中の成長円錐表面では分岐シグナル X を受け取る為を受容体 Y が発現していると考えられる。(2) 分岐点に到着すると成長円錐は X を受容する。(3) DIP2 と Gkt を介した細胞極性因子によって、Y は X のシグナルを受け取ることができなくなる。(4) また、極性の変化によって、分岐した 2 本の成長円錐表面には異なるレセプターが配置され、レセプターに応じた投射パターンを示す。

## 6. 結論

本研究では、ショウジョウバエキノコ体をモデルとして、分子遺伝学を用いて機能未知因子である DISCO Interacting Protein 2 (DIP2) が軸索枝形成において果たす役割を解析した。以下に本研究で得られた結果を示す。

(1) RNAi スクリーニングによって、キノコ体軸索枝制御に関係する候補遺伝子として DIP2 を同定した。

(2) 抗 DIP2 抗体を作成し免疫組織染色を行った所、DIP2 が発生期のキノコ体のみならず中枢脳で広範囲に発現している事が明らかとなった。また、培養細胞を用いた系によって DIP2 は細胞核に局在せずに細胞膜と細胞質に局在する事が明らかとなった。

(3) imprecise excision によって DIP2 の機能欠失変異体を作成し、変異体解析を行った。その結果、DIP2 変異体ではキノコ体  $\alpha/\beta$  ロープにおいて異所性ローブやローブの投射異常が観察された。MARCM 法を用いて単一細胞レベルで解析した結果、 $\alpha/\beta$  ニューロンの軸索枝の過剰形成及び投射異常が観察された。以上の結果から、DIP2 はキノコ体ニューロンの過剰な軸索枝の抑制及び軸索枝の投射方向を制御している事が明らかとなった。 $\alpha/\beta$  ニューロンだけでなく  $\alpha'/\beta'$  ニューロンにおいても、この機能を有している事が判明した。また、DIP2 変異体では楕円体においても形態異常が観察された事から、キノコ体だけでなく広範囲な神経組織の発生現象に関与している可能性が示唆された。

(4) 野生型やドメイン欠損型の *UAS-DIP2* 系統を作成してレスキュー実験を行った所、



AMP-synthetase ドメインを 1 つでも欠いた DIP2 では変異体の表現型を回復する事は出来なかった。この結果より、DIP2 はキノコ体ニューロンで機能し、タンデムに並んでいる 2 つの AMP-synthetase ドメインの両方が軸索枝制御において重要である事が明らかとなった。AMP-synthetase ドメインを有する遺伝子の大半が脂肪酸代謝酵素である為、DIP2 は脂肪酸の代謝活性を有している可能性が示唆される。また、リンカー配列を欠損した DIP2 は軸索に局在する事が出来ず変異体表現型をレスキュー出来ない事から、DIP2 が軸索に局在する事がその機能において重要である可能性が示唆された。

(5) MARCM 法を用いた解析によって、単一細胞でのみ DIP2 の機能を完全に欠失させても過剰な軸索枝の表現型が観察された事、野生型の DIP2 を発現させる事によってこの表現型がレスキューされた事から、少なくとも過剰軸索枝の抑制に関して DIP2 は細胞自律的に機能している事が明らかとなった。

(6) マイクロアレイ解析を用いて、DIP2 の下流因子の候補として *Glaikit (Gkt)* を同定した。リアルタイム RT-PCR 解析によって *DIP2* 変異体で *gkt* mRNA の発現量が有意に低下した事、*gkt* をノックダウンすると *DIP2* 変異体と同様の表現型が得られた事、*DIP2* 変異体と *gkt* 変異体及び *crumbs (crb)* 変異体、*stardust (sdt)* 変異体間に強い遺伝学的相互作用が認められた事から、Gkt が DIP2 の下流で機能し、Crb や Sdt と協調的に機能している事を示唆している。

(7) 既知の軸索枝制御因子との遺伝学的相互作用の検討を行った。その結果、DIP2 と Wnt5/PCP 経路内のいくつかの因子の間に遺伝学相互作用が認められた。しかし、各々の発現量の変動は見られなかった事から、DIP2 と Wnt5/PCP 経路は平行して軸索枝制御に関

与していると考えられる。

(8) JNK ホモログである Basket (Bsk) と DIP2 の間に遺伝学的相互作用が認められた。また、Bsk を抑制すると DIP2 タンパクの発現量が低下する事が明らかとなった。これらの結果は、Bsk と DIP2 が同一経路でキノコ体ニューロンの投射制御に関与している事を示しており、*gkt* 以外の下流因子が存在する可能性を強く示唆している。

以上の結果は、キノコ体ニューロンの軸索枝制御において DIP2 と *gkt* が協調的に働いている事を示している。DIP2 は *Gkt* を介して *Crb* 及び *Sdt* と相互作用をする事によって細胞極性を制御して、軸索分岐及び軸索枝の投射を制御していると考えられる。また、本研究は、多くの生物種の神経系で発現している DIP2 の神経系における機能を初めて明らかにしたものである。

## 7. 謝辞

本研究を行う機会と恵まれた研究環境を提供し、論文製作にあたり多岐にわたる指導を下さった多羽田哲也教授に深く感謝いたします。

多羽田研究室のメンバー及びOB・OGに心から感謝します。八杉徹雄博士、山崎大介先生、廣井誠先生には研究に対する考え方・姿勢を教えていただきました。特に八杉徹雄博士は基礎技術全般、山崎大介先生は分子生物学・生化学実験を快く指導して下さいました。長谷川恵理博士、小木曾由梨博士、河盛治彦博士、杉江淳博士、阿部崇志博士、清水一道博士は研究テーマが近い事もあり、在籍時も卒業後も研究内容に対して熱心に議論して下さい多くアドバイスをいただきました。大坪真樹博士には修士過程におけるスクリーニング、博士課程における分子生物学実験でお世話になりました。前山有子さんにはシステムの維持でお世話になりました。高久礼子さん、滝下仁美さん、中林麻衣さんにはショウジョウバエ飼料を作製していただきました。真下圭諸里さん、河野真美子さん、高野かおりさん、滝下仁美さんには事務手続き等で大変お世話になりました。

程久美子先生、西賢二博士にはマイクロアレイ解析を教えていただきました。木村周平博士には培養細胞の扱い方、生化学実験を教えていただきました。

本研究を行うにあたり、ショウジョウバエ系統及び1次抗体を快く分与していただいた下記の博士、機関に深く感謝いたします(敬称略)。

ショウジョウバエ系統：David Bilder、Tzumin Lee、Liqun Luo、Jasprien N. Noordermeer、Guy Tear、John B. Tomas、Bloomington Drosophila Stock Center、KYOTO Stock Center (DGRC)、The National Institute of Genetics、Vienna Drosophila Resource Center

1次抗体：Lawrence Zipursky、Developmental Studies Hybridoma Bank

## 8. 引用文献

- Abe, T., Yamazaki, D., Murakami, S., Hiroi, M., Nitta, Y., Maeyama, Y. and Tabata, T.** (2014). The NAV2 homolog Sickie regulates F-actin-mediated axonal growth in *Drosophila* mushroom body neurons via the non-canonical Rac-Cofilin pathway. *Development* **141**, 4716–4728.
- Adachi-Yamada, T., Nakamura, M., Irie, K., Tomoyasu, Y., Sano, Y., Mori, E., Goto, S., Ueno, N., Nishida, Y. and Matsumoto, K.** (1999). p38 Mitogen-Activated Protein Kinase Can Be Involved in Transforming Growth Factor  $\beta$  Superfamily Signal Transduction in *Drosophila* Wing Morphogenesis. *Mol. Cell. Biol.* **19**, 2322–2329.
- Aso, Y., Grübel, 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.
- Aso, Y., Hattori, D., Yu, Y., Johnston, R. M., Iyer, N. A., Ngo, T.-T. B., Dionne, H., Abbott, L. F., Axel, R., Tanimoto, H., et al.** (2014a). The neuronal architecture of the mushroom body provides a logic for associative learning. *Elife* **3**, e04577.
- Aso, Y., Sitaraman, D., Ichinose, T., Kaun, K. R., Vogt, K., Belliart-Guérin, G., Plaçais, P.-Y., Robie, A. A., Yamagata, N., Schnaitmann, C., et al.** (2014b). Mushroom body output neurons encode valence and guide memory-based action selection in *Drosophila*. *eLife Sciences* **4**, e04580.
- Awasaki, T., Saito, M., Sone, M., Suzuki, E., Sakai, R., Ito, K. and Hama, C.** (2000). The *Drosophila* trio plays an essential role in patterning of axons by regulating their directional extension. *Neuron* **26**, 119–131.
- Axelrod, J. D., Miller, J. R., Shulman, J. M., Moon, R. T. and Perrimon, N.** (1998). Differential recruitment of Dishevelled provides signaling specificity in the planar cell polarity and Wingless signaling pathways. *Gene. Dev.* **12**, 2610–2622.
- Bornstein, B., Zahavi, E. E., Fuchs, O. and Perlson, E.** (2015). Developmental Axon Pruning Requires Destabilization of Cell Adhesion by JNK Signaling. *Neuron* **88**, 926–940.

- Boutros, M., Paricio, N., Strutt, D. I. and Mlodzik, M.** (1998). Dishevelled Activates JNK and Discriminates between JNK Pathways in Planar Polarity and *wingless* Signaling. *Cell* **94**, 109–118.
- 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.
- Bulgakova, N. A. and Knust, E.** (2009). The Crumbs complex: from epithelial-cell polarity to retinal degeneration. *J. Cell Sci.* **122**, 2587–2596.
- Caron, S. J. C., Ruta, V., Abbott, L. F. and Axel, R.** (2014). Random convergence of olfactory inputs in the *Drosophila* mushroom body. *Nature* **497**, 113–117.
- Cheng, Y., Endo, K., Wu, K., Rodan, A. R., Heberlein, U. and Davis, R. L.** (2001). *Drosophila fasciclinII* is required for the formation of odor memories and for normal sensitivity to alcohol. *Cell* **105**, 757–768.
- Coffey, E. T.** (2014). Nuclear and cytosolic JNK signalling in neurons. *Nat. Rev. Neurosci.* **15**, 285–299.
- Connolly, J. B., Roberts, I. J., Armstrong, J. D., Kaiser, K., Forte, M., Tully, T. and O'Kane, C. J.** (1996). Associative learning disrupted by impaired Gs signaling in *Drosophila* mushroom bodies. *Science* **274**, 2104–2107.
- Courbard, J.-R., Djiane, A., Wu, J. and Mlodzik, M.** (2009). The apical/basal-polarity determinant Scribble cooperates with the PCP core factor Stbm/Vang and functions as one of its effectors. *Dev. Biol.* **333**, 67–77.
- Crawford, M. A.** (1993). The role of essential fatty acids in neural development: implications for perinatal nutrition. *Am. J. Clin. Nutr.* **57**, 703S–709S– discussion 709S–710S.
- Crittenden, J. R., Skoulakis, E. M., Han, K. A., Kalderon, D. and Davis, R. L.** (1998). Tripartite mushroom body architecture revealed by antigenic markers. *Learn. Mem.* **5**, 38–51.
- Danny N Dhanasekaran, E. P. R.** (2008). JNK Signaling in Apoptosis. *Oncogene* **27**, 6245–6251.
- De Jager, P. L., Srivastava, G., Lunnon, K., Burgess, J., Yu, L., Keenan, B. T., Ernst, J., Brodeur, W., Gabriel, S., Younkin, C., et al.** (2014).

- Alzheimer's disease: early alterations in brain DNA methylation at ANK1, BIN1, RHBDF2 and other loci. *Nat. Neurosci.* **17**, 1156–1163.
- Dietzl, G., Chen, D., Schnorrer, F., Su, K.-C., Barinova, Y., Fellner, M., Gasser, B., Kinsey, K., Oppel, S., Scheiblaue, S., et al.** (2007). A genome-wide transgenic RNAi library for conditional gene inactivation in *Drosophila*. *Nature* **448**, 151–156.
- Djiane, A., Yogev, S. and Mlodzik, M.** (2005). The Apical Determinants aPKC and dPatj Regulate Frizzled-Dependent Planar Cell Polarity in the *Drosophila* Eye. *Cell* **121**, 621–631.
- Dunlop, J., Morin, X., Corominas, M., Serras, F. and Tear, G.** (2004). *glaikit* Is Essential for the Formation of Epithelial Polarity and Neuronal Development. *Curr. Biol.* **14**, 2039–2045.
- Eberl, D. F. and Hilliker, A. J.** (1988). Characterization of X-linked recessive lethal mutations affecting embryonic morphogenesis in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* **118**, 109–120.
- Eresh, S., Riese, J., Jackson, D. B., Bohmann, D. and Bienz, M.** (1997). A CREB-binding site as a target for decapentaplegic signalling during *Drosophila* endoderm induction. *The EMBO Journal* **16**, 2014–2022.
- Ferveur, J. F., Störtkuhl, K. F., Stocker, R. F. and Greenspan, R. J.** (1995). Genetic feminization of brain structures and changed sexual orientation in male *Drosophila*. *Science* **267**, 902–905.
- Fradkin, L. G., van Schie, M., Wouda, R. R., de Jong, A., Kamphorst, J. T., Radjkoemar-Bansraj, M. and Noordermeer, J. N.** (2004). The *Drosophila* Wnt5 protein mediates selective axon fasciculation in the embryonic central nervous system. *Dev. Biol.* **272**, 362–375.
- Frohman, M. A.** (2015). The phospholipase D superfamily as therapeutic targets. *Trends in Pharmacological Sciences* **36**, 137–144.
- Furuta, D., Yamane, M., Tsujiuchi, T., Moriyama, R. and Fukushima, N.** (2012). Lysophosphatidic acid induces neurite branch formation through LPA3. *Mol. Cell. Neurosci.* **50**, 21–34.

- Fushima, K. and Tsujimura, H.** (2007). Precise control of fasciclin II expression is required for adult mushroom body development in *Drosophila*. *Develop. Growth Differ.* **49**, 215–227.
- Golic, K. G. and Lindquist, S.** (1989). The FLP recombinase of yeast catalyzes site-specific recombination in the *drosophila* genome. *Cell* **59**, 499–509.
- Gombos, R., Migh, E., Antal, O., Mukherjee, A., Jenny, A. and Mihály, J.** (2015). The Formin DAAM Functions as Molecular Effector of the Planar Cell Polarity Pathway during Axonal Development in *Drosophila*. *J. Neurosci.* **35**, 10154–10167.
- Gottlin, E. B., Rudolph, A. E., Zhao, Y., Matthews, H. R. and Dixon, J. E.** (1998). Catalytic mechanism of the phospholipase D superfamily proceeds via a covalent phosphohistidine intermediate. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **95**, 9202–9207.
- Hatten, M. E. and Heintz, N.** (1995). Mechanisms of neural patterning and specification in the developing cerebellum. *Annu. Rev. Neurosci.* **18**, 385–408.
- Hayashi, S., Ito, K., Sado, Y., Taniguchi, M., Akimoto, A., Takeuchi, H., Aigaki, T., Matsuzaki, F., Nakagoshi, H., Tanimura, T., et al.** (2002). GETDB, a database compiling expression patterns and molecular locations of a collection of Gal4 enhancer traps. *genesis* **34**, 58–61.
- He, H., Kise, Y., Izadifar, A., Urwyler, O., Ayaz, D., Parthasarthy, A., Yan, B., Erfurth, M.-L., Dascenco, D. and Schmucker, D.** (2014). Cell-intrinsic requirement of Dscam1 isoform diversity for axon collateral formation. *Science* **344**, 1182–1186.
- Hirokawa, T., Boon-Chieng, S. and Mitaku, S.** (1998). SOSUI: classification and secondary structure prediction system for membrane proteins. *Bioinformatics* **14**, 378–379.
- Hoopfer, E. D., Penton, A., Watts, R. J. and Luo, L.** (2008). Genomic Analysis of *Drosophila* Neuronal Remodeling: A Role for the RNA-Binding Protein Boule as a Negative Regulator of Axon Pruning. *J. Neurosci.* **28**, 6092–6103.

- Hutchinson, K. M., Vonhoff, F. and Duch, C.** (2014). Dscam1 is required for normal dendrite growth and branching but not for dendritic spacing in *Drosophila* motoneurons. *J. Neurosci.* **34**, 1924–1931.
- Igarashi, M., Santos, R. A. and Cohen-Cory, S.** (2015). Impact of Maternal n-3 Polyunsaturated Fatty Acid Deficiency on Dendritic Arbor Morphology and Connectivity of Developing *Xenopus laevis* Central Neurons *In Vivo*. *J. Neurosci.* **35**, 6079–6092.
- Innis, S. M.** (2007). Dietary (n-3) fatty acids and brain development. *J. Nutr.* **137**, 855–859.
- Interthal, H., Pouliot, J. J. and Champoux, J. J.** (2001). The tyrosyl-DNA phosphodiesterase Tdp1 is a member of the phospholipase D superfamily. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **98**, 12009–12014.
- 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.
- Joiner, W. J., Crocker, A., White, B. H. and Sehgal, A.** (2006). Sleep in *Drosophila* is regulated by adult mushroom bodies. *Nature* **441**, 757–760.
- Kalil, K. and Dent, E. W.** (2014). Branch management: mechanisms of axon branching in the developing vertebrate CNS. *Nat. Rev. Neurosci.* **15**, 7–18.
- Kang, D. W., Choi, K. Y. and Min, D. S.** (2011a). Phospholipase D Meets Wnt Signaling: A New Target for Cancer Therapy. *Cancer Research* **71**, 293–297.
- Kang, D. W., Park, M. H., Lee, Y. J., Kim, H. S., Lindsley, C. W., Alex Brown, H. and Min, D. S.** (2011b). Autoregulation of phospholipase D activity is coupled to selective induction of phospholipase D1 expression to promote invasion of breast cancer cells. *Int. J. Cancer* **128**, 805–816.
- Keene, A. C. and Waddell, S.** (2007). *Drosophila* olfactory memory: single genes to complex neural circuits. *Nat. Rev. Neurosci.* **8**, 341–354.
- Kohsaka, H., Takasu, E. and Nose, A.** (2007). In vivo induction of postsynaptic molecular assembly by the cell adhesion molecule Fasciclin2. *J. Cell Biol.* **179**, 1289–1300.



- Kong, R., Shao, S., Wang, J., Zhang, X., Guo, S., Zou, L., Zhong, R., Lou, J., Zhou, J., Zhang, J., et al.** (2015). Genetic variant in DIP2A gene is associated with developmental dyslexia in Chinese population. *Am. J. Med. Genet. B Neuropsychiatr. Genet.*
- Kristiansen, L. V., Velasquez, E., Romani, S., Baars, S., Berezin, V., Bock, E., Hortsch, M. and Garcia-Alonso, L.** (2005). Genetic analysis of an overlapping functional requirement for L1- and NCAM-type proteins during sensory axon guidance in *Drosophila*. *Mol. Cell. Neurosci.* **28**, 141–152.
- Krogh, A., Larsson, B., Heijne, von, G. and Sonnhammer, E. L. L.** (2001). Predicting transmembrane protein topology with a hidden markov model: application to complete genomes. *J. Mol. Biol.* **305**, 567–580.
- Kunes, S.** (1996). Hedgehog, transmitted along retinal axons, triggers neurogenesis in the developing visual centers of the *Drosophila* brain. *Cell* **86**, 411–422.
- 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.
- Lee, K. J., Freeman, M. and Steller, H.** (1991). Expression of the *disconnected* gene during development of *Drosophila melanogaster*. *The EMBO Journal* **10**, 817–826.
- 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.
- 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.
- Lewis, T. L., Courchet, J. and Polleux, F.** (2013). Cell biology in neuroscience: Cellular and molecular mechanisms underlying axon formation, growth, and branching. *J. Cell Biol.* **202**, 837–848.
- Li, C. and Chalfie, M.** (1990). Organogenesis in *C. elegans*: Positioning of neurons and muscles in the egg-laying system. *Neuron* **4**, 681–695.

- Lin, S. and Lee, T.** (2011). Generating neuronal diversity in the Drosophilacentral nervous system. *Dev. Dyn.* **241**, 57–68.
- Liu, Z., Huang, Y., Hu, W., Huang, S., Wang, Q., Han, J. and Zhang, Y. Q.** (2014). dAcsl, the Drosophila ortholog of acyl-CoA synthetase long-chain family member 3 and 4, inhibits synapse growth by attenuating bone morphogenetic protein signaling via endocytic recycling. *J. Neurosci.* **34**, 2785–2796.
- Liu, Z., Huang, Y., Zhang, Y., Chen, D. and Zhang, Y. Q.** (2011). Drosophila Acyl-CoA synthetase long-chain family member 4 regulates axonal transport of synaptic vesicles and is required for synaptic development and transmission. *J. Neurosci.* **31**, 2052–2063.
- Liu, Z., Yang, C.-P., Sugino, K., Fu, C.-C., Liu, L.-Y., Yao, X., Lee, L. P. and Lee, T.** (2015). Opposing intrinsic temporal gradients guide neural stem cell production of varied neuronal fates. *Science* **350**, 317–320.
- 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. *Gene. Dev.* **8**, 1787–1802.
- Markus, A., Zhong, J. and Snider, W. D.** (2002). Raf and akt mediate distinct aspects of sensory axon growth. *Neuron* **35**, 65–76.
- McGuire, S. E., Le, P. T. and Davis, R. L.** (2001). The role of *Drosophila* mushroom body signaling in olfactory memory. *Science* **293**, 1330–1333.
- Metaxakis, A.** (2005). Minos as a Genetic and Genomic Tool in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* **171**, 571–581.
- Mukhopadhyay, M., Pelka, P., DeSousa, D., Kablar, B., Schindler, A., Rudnicki, M. A. and Campos, A. R.** (2002). Cloning, genomic organization and expression pattern of a novel *Drosophila* gene, the *disco-interacting protein 2 (dip2)*, and its murine homolog. *Gene* **293**, 59–65.
- Ng, J.** (2012). Wnt/PCP proteins regulate stereotyped axon branch extension in *Drosophila*. *Development* **139**, 165–177.
- Niehrs, C.** (2012). The complex world of WNT receptor signalling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **13**, 767–779.

- O'Brochta, D. A., Gomez, S. P. and Handler, A. M.** (1991). P element excision in *Drosophila melanogaster* and related drosophilids. *Mol. Gen. Genet.* **225**, 387–394.
- O'Hare, K. and Rubin, G. M.** (1983). Structures of P transposable elements and their sites of insertion and excision in the *Drosophila melanogaster* genome. *Cell* **34**, 25–35.
- Onishi, K., Shafer, B., Lo, C., Tissir, F., Goffinet, A. M. and Zou, Y.** (2013). Antagonistic Functions of Dishevelleds Regulate Frizzled3 Endocytosis via Filopodia Tips in Wnt-Mediated Growth Cone Guidance. *J. Neurosci.* **33**, 19071–19085.
- Ouchi, N., Asaumi, Y., Ohashi, K., Higuchi, A., Sono-Romanelli, S., Oshima, Y. and Walsh, K.** (2010). DIP2A Functions as a FSTL1 Receptor. *J. Biol. Chem.* **285**, 7127–7134.
- Owada, Y.** (2008). Fatty acid binding protein: localization and functional significance in the brain. *Tohoku J. Exp. Med.* **214**, 213–220.
- Pan, Y., Zhou, Y., Guo, C., Gong, H., Gong, Z. and Liu, L.** (2009). Differential roles of the fan-shaped body and the ellipsoid body in *Drosophila* visual pattern memory. *Learn. Mem.* **16**, 289–295.
- Poelmans, G., Engelen, J. J. M., Van Lent-Albrechts, J., Smeets, H. J., Schoenmakers, E., Franke, B., Buitelaar, J. K., Wuisman-Frerker, M., Erens, W., Steyaert, J., et al.** (2009). Identification of novel dyslexia candidate genes through the analysis of a chromosomal deletion. *Am. J. Med. Genet.* **150B**, 140–147.
- Rallis, A., Moore, C. and Ng, J.** (2010). Signal strength and signal duration define two distinct aspects of JNK-regulated axon stability. *Dev. Biol.* **339**, 65–77.
- Reynaud, E., Lahaye, L. L., Boulanger, A., Petrova, I. M., Marquilly, C., Flandre, A., Martiane, T., Privat, M., Noordermeer, J. N., Fradkin, L. G., et al.** (2015). Guidance of *Drosophila* Mushroom Body Axons Depends upon DRL-Wnt Receptor Cleavage in the Brain Dorsomedial Lineage Precursors. *Cell Rep.* **0**, 1293–1304.

- Rountree, M. R., Bachman, K. E. and Baylin, S. B.** (2000). DNMT1 binds HDAC2 and a new co-repressor, DMAP1, to form a complex at replication foci. *Nat. Genet.* **25**, 269–277.
- Schmidt, H. and Rathjen, F. G.** (2010). Signalling mechanisms regulating axonal branching in vivo. *Bioessays* **32**, 977–985.
- Schmidt, H., Stonkute, A., Jüttner, R., Koesling, D., Friebe, A. and Rathjen, F. G.** (2009). C-type natriuretic peptide (CNP) is a bifurcation factor for sensory neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **106**, 16847–16852.
- Schmucker, D., Clemens, J. C., Shu, H., Worby, C. A. and Xiao, J.** (2000). *Drosophila* Dscam Is an Axon Guidance Receptor Exhibiting Extraordinary Molecular Diversity. *Cell* **101**, 671–684.
- Schröder, J.** (1989). Protein sequence homology between plant 4-coumarate:CoA ligase and firefly luciferase. *Nucleic Acids Res.* **17**, 460–460.
- Shimizu, K., Sato, M. and Tabata, T.** (2011). The Wnt5/Planar Cell Polarity Pathway Regulates Axonal Development of the *Drosophila* Mushroom Body Neuron. *J. Neurosci.* **31**, 4944–4954.
- Shin, J. E. and DiAntonio, A.** (2011). Highwire Regulates Guidance of Sister Axons in the *Drosophila* Mushroom Body. *J. Neurosci.* **31**, 17689–17700.
- Sokol, Y.-C. W. C.-H. C. A. M. N., Chen, C.-H., Mercer, A. and Sokol, N. S.** (2012). let-7-Complex MicroRNAs Regulate the Temporal Identity of *Drosophila* Mushroom Body Neurons via chinmo. *Developmental Cell* **23**, 202–209.
- Steller, H., Fischbach, K. F. and Rubin, G. M.** (1987). Disconnected: a locus required for neuronal pathway formation in the visual system of *Drosophila*. *Cell* **50**, 1139–1153.
- Strauss, R. and Heisenberg, M.** (1993). A higher control center of locomotor behavior in the *Drosophila* brain. *J. Neurosci.* **13**, 1852–1861.
- Struhl, G. and Basler, K.** (1993). Organizing activity of wingless protein in *Drosophila*. *Cell* **72**, 527–540.
- Stuckey, J. A. and Dixon, J. E.** (1999). Crystal structure of a phospholipase D family member. *Nat. Struct. Biol.* **6**, 278–284.

- Tanaka, M., Murakami, K., Ozaki, S., Imura, Y., Tong, X.-P., Watanabe, T., Sawaki, T., Kawanami, T., Kawabata, D., Fujii, T., et al.** (2010). DIP2 disco-interacting protein 2 homolog A (*Drosophila*) is a candidate receptor for follistatin-related protein/follistatin-like 1--analysis of their binding with TGF- $\beta$  superfamily proteins. *FEBS J.* **277**, 4278–4289.
- Tearle, R. and Nüsslein-Volhard, C.** (1987). *Tübingen mutants and stocklist*. Dros. Inf. Serv.
- Ter-Avetisyan, G., Rathjen, F. G. and Schmidt, H.** (2014). Bifurcation of Axons from Cranial Sensory Neurons Is Disabled in the Absence of Npr2-Induced cGMP Signaling. *J. Neurosci.* **34**, 737–747.
- Venken, K. J. T., Schulze, K. L., Haelterman, N. A., Pan, H., He, Y., Evans-Holm, M., Carlson, J. W., Levis, R. W., Spradling, A. C., Hoskins, R. A., et al.** (2011). MiMIC: a highly versatile transposon insertion resource for engineering *Drosophila melanogaster* genes. *Nat. Meth.* **8**, 737–743.
- Wang, J., Ma, X., Yang, J. S., Zheng, X., Zugates, C. T., Lee, C.-H. J. and Lee, T.** (2004). Transmembrane/Juxtamembrane Domain-Dependent Dscam Distribution and Function during Mushroom Body Neuronal Morphogenesis. *Neuron* **43**, 663–672.
- Wang, J., Zugates, C. T., Liang, I. H., Lee, C. and Lee, T.** (2002). *Drosophila* Dscam Is Required for Divergent Segregation of Sister Branches and Suppresses Ectopic Bifurcation of Axons. *Neuron* **33**, 559–571.
- Wang, Y. and Oram, J. F.** (2005). Unsaturated fatty acids phosphorylate and destabilize ABCA1 through a phospholipase D2 pathway. *J. Biol. Chem.* **280**, 35896–35903.
- Watts, R. J., Hoopfer, E. D. and Luo, L.** (2003). Axon pruning during *Drosophila* metamorphosis: evidence for local degeneration and requirement of the ubiquitin-proteasome system. *Neuron* **38**, 871–885.
- Whited, J. L., Robichaux, M. B., Yang, J. C. and Garrity, P. A.** (2007). Ptpmeg is required for the proper establishment and maintenance of axon projections in the central brain of *Drosophila*. *Development* **134**, 43–53.
- Winnepenninckx, B., Debacker, K., Ramsay, J., Smeets, D., Smits, A., FitzPatrick, D. R. and Kooy, R. F.** (2007). CGG-repeat expansion in the

*DIP2B* gene is associated with the fragile site FRA12A on chromosome 12q13.1. *Am. J. Hum. Genet.* **80**, 221–231.

- Wojtowicz, W. M., Flanagan, J. J., Millard, S. S., Zipursky, S. L. and Clemens, J. C.** (2004). Alternative splicing of *Drosophila* Dscam generates axon guidance receptors that exhibit isoform-specific homophilic binding. *Cell* **118**, 619–633.
- Xu, T. and Rubin, G. M.** (1993). Analysis of genetic mosaics in developing and adult *Drosophila* tissues. *Development* **117**, 1223–1237.
- Yang, M. Y., Armstrong, J. D., Vilinsky, I., Strausfeld, N. J. and Kaiser, K.** (1995). Subdivision of the *Drosophila* mushroom bodies by enhancer-trap expression patterns. *Neuron* **15**, 45–54.
- Yoshikawa, S., McKinnon, R. D., Kokel, M. and Thomas, J. B.** (2003). Wnt-mediated axon guidance via the *Drosophila* Derailed receptor. *Nature* **422**, 583–588.
- Yu, F. and Schuldiner, O.** (2014). Axon and dendrite pruning in *Drosophila*. *Current Opinion in Neurobiology* **27**, 192–198.
- Zarin, A. A., Asadzadeh, J., Hokamp, K., McCartney, D., Yang, L., Bashaw, G. J. and Labrador, J.-P.** (2014). A transcription factor network coordinates attraction, repulsion, and adhesion combinatorially to control motor axon pathway selection. *Neuron* **81**, 1297–1311.
- Zhan, X. L., Clemens, J. C., Neves, G., Hattori, D. and Flanagan, J. J.** (2004). Analysis of Dscam Diversity in Regulating Axon Guidance in *Drosophila* Mushroom Bodies. *Neuron* **43**, 673–686.
- Zhang, L., Jia, R., Palange, N. J., Satheka, A. C., Togo, J., An, Y., Humphrey, M., Ban, L., Ji, Y., Jin, H., et al.** (2015a). Large Genomic Fragment Deletions and Insertions in Mouse Using CRISPR/Cas9. *PLOS ONE* **10**, e0120396.
- Zhang, L., Mabwi, H. A., Palange, N. J., Jia, R., Ma, J., Bah, F. B., Sah, R. K., Li, D., Wang, D., Bah, F. B. M., et al.** (2015b). Expression Patterns and Potential Biological Roles of Dip2a. *PLOS ONE* **10**, e0143284.
- Zhang, Y., Chen, D. and Wang, Z.** (2009). Analyses of mental dysfunction-related ACS14 in *Drosophila* reveal its requirement for

Dpp/BMP production and visual wiring in the brain. *Hum. Mol. Genet.* **18**, 3894–3905.

**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.

**Zhu, S., Perez, R., Pan, M. and Lee, T.** (2005). Requirement of Cul3 for axonal arborization and dendritic elaboration in *Drosophila* mushroom body neurons. *J. Neurosci.* **25**, 4189–4197.

**Zou, Y.** (2012). Does planar cell polarity signaling steer growth cones? *Curr. Top. Dev. Biol.* **101**, 141–160.