

論文内容の要旨

論文題目 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)

氏名 新田 陽平

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。

軸索が分岐を形成する機構は2種類に大別される(図1)。1つは主枝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、側枝形成(collateral formation)と呼ばれ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る。従来の研究

は *in vitro* における側枝形成の分子機構に焦点が当てられており、BDNF等によって分枝形成が誘導され、シグナルを受容した軸索では局所的に細胞骨格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。一方、軸索分岐に関しては、哺乳類

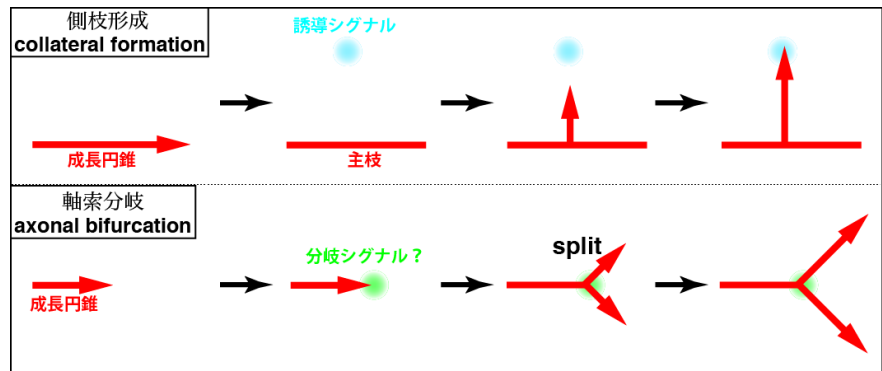


図1: 軸索枝の形成機構

では cGMP シグナルが、ショウジョウバエのキノコ体ニューロンでは Dscam と呼ばれる膜貫通タンパクが軸索枝形成に関係すると考えられているが、具体的な細胞内分子機構については全く解明されておらず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。

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、片側約 2000 個のケニオン細胞と呼ばれるニューロンから構成され、 γ 、 α'/β' 、 α/β の 3 つのサブタイプに大別される (図 2)。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、樹状突起は細胞体の前方でカリックスと呼ばれる構造体を形成する。軸索はペダングル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)。成虫の γ ニューロンは軸索分岐を起こさず、正中線側のみに軸索を投射し γ ロープを形成する。 α'/β' 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 α' ロープ、正中線側に β' ロープを形成する。 α/β ニューロンも α'/β' 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 α ロープ、正中線側に β ロープを形成する。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 α/β 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。そこで本研究では、この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た。

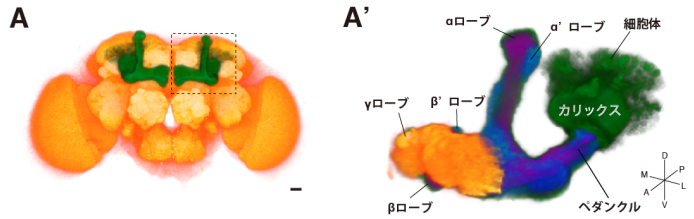


図 2: キノコ体の構造。(A) ショウジョウバエ成虫脳 (オレンジ) とキノコ体 (緑)。(A') 点線部の拡大図。スケールバーは 20 μ m。

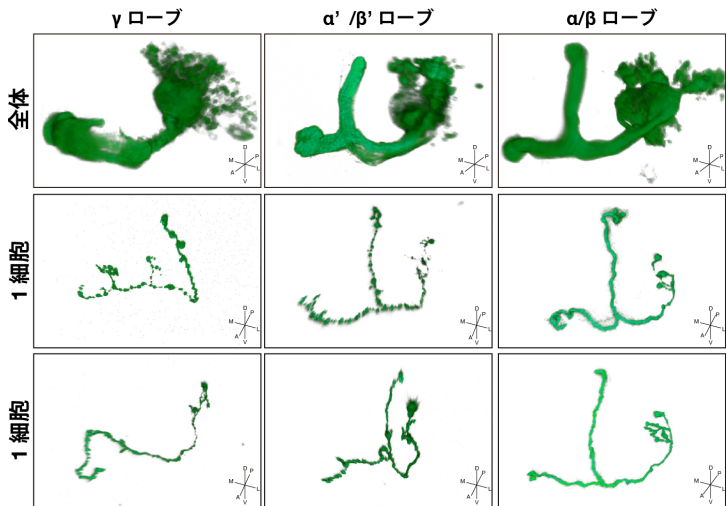


図 3: 各ロープ及びニューロンの構造。

まず、キノコ体の軸索分岐に関与する新規因子を探索する為、RNAi スクリーニングを行い DISCO Interacting Protein 2 (DIP2)を同定した。DIP2 は線虫からヒトまで幅広い生物種で保存されており、N 末端側に 1 つの DNA Methyltransferase-Associated Protein 1-binding ドメイン (DMAPI1-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とっていると考えられている (図 4)。DMAPI1-binding ドメインは転写抑制活性を有する DMAPI と結合する為に必要であり、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。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

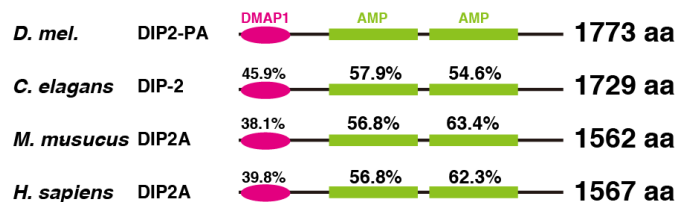


図 4: DIP2 の構造。マゼンタが DMAPI1-binding ドメイン、緑が AMP ドメインを示している。各ホモログのドメイン上の数値はショウジョウバエのドメインに対する同一性を表している。

く発現する事、マウスの DIP2 ホモログは成体において大脳皮質で発現する事、ヒト DIP2 に異常が生じると精神遅滞や学習障害が起きる事が報告されており、神経系の発達及び機能において重要な機能を有している事が強く示唆されている。しかし、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。

キノコ体の軸索分岐に於ける DIP2 の機能を解明する為、DIP2 機能欠失変異体を作成し成虫キノコ体の形態を観察した (図 5)。野生型のキノコ体 α/β ロープでは背側に 1 本の α ロープ、正中線側に 1 本の β ロープが存在する。しかし、DIP2 機能欠失変異体の α/β ロープでは、異所性のロープやロープの投射異常が観察された。この表現型は α/β ロープが形成され始める蛹化後 24 時間から既に観察された。次に、DIP2 変異体で観察された表現型を単一細胞レベルで解析する為、Mosaic Analysis with a Repressible Cell Marker (MARCM) 法を用いて DIP2 変異体バックグラウンドで α/β ニューロンを可視化した (図 6)。野生型の α/β ニューロンはロープ構造の根本で 1 回分岐し、 α ニューロンは背側へ β ニューロンは正中線側へ投射する。しかし、DIP2 変異体でラベルされた α/β ニューロンはロープ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。また、全て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。この表現型は DIP2 変異体の α'/β' ニューロンでも観察された。

次に、キノコ体の軸索分岐制御における DIP2 の各ドメインの必要性を検討する為、各ドメインを欠損した DIP2 を作製し DIP2 変異体表現型のレスキュー実験を行った。その結果、AMP ドメインを 1 つでも欠いた DIP2 では表現型をレスキューする事が出来なかった。これらの結果より、DIP2 は AMP 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と考えられる。また、AMP 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事、いくつかの脂肪酸代謝関連酵素をキノコ体特異的にノックダウンすると DIP2 変異体と類似した表現型を示す事から、DIP2 は代謝活性を有し、脂肪酸を基質としている可能性が示唆される。

DIP2 の下流因子を探索する為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。DIP2 をノックダウンした系統とノックダウンしていない系統を比較して、mRNA の発現量が有意に変化している遺伝子を候補遺伝子とした。これらの遺伝子群をキノコ体

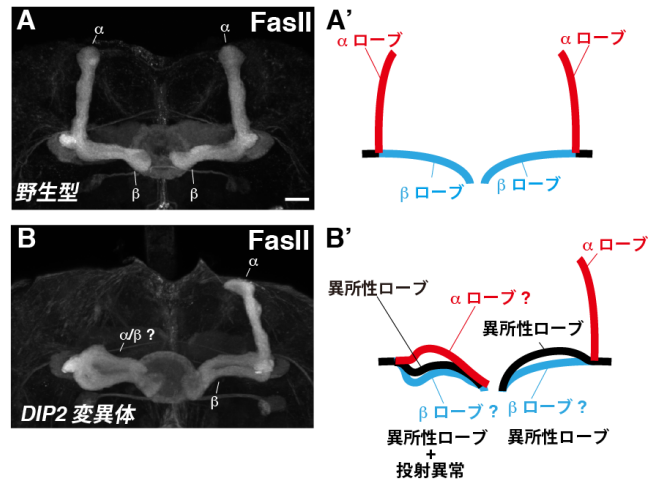


図 5: DIP2 変異体の α/β ロープ。野生型 (A) と比べ DIP2 変異体 (B) では異所性ロープ及び投射異常が観察された。(A') (B') は (A) (B) それぞれの模式図。スケールバーは 20 μm 。

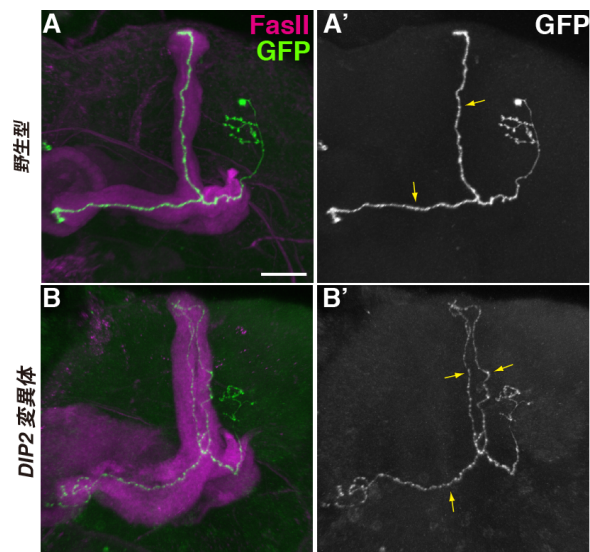


図 6: DIP2 変異体の α/β ニューロン。野生型 (A) と比べ DIP2 変異体 (B) では過剰な軸索枝が観察された。(A') (B') の黄色い矢印は軸索枝を示す。スケールバーは 20 μm 。

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 *DIP2* の下流因子として同定した。*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いる。(1) *DIP2* 変異体でも *gkt* mRNA の有意な低下が確認された事、(2) キノコ体特異的に *gkt* をノックダウンすると *DIP2* 変異体と同様の表現型を示す事、(3) *DIP2* と *Gkt* に遺伝学的相互作用が確認出来た事から *Gkt* は *DIP2* の下流因子として同一経路でキノコ体の軸索枝を制御しているといえる。

Gkt は上皮細胞において既知の細胞極性関連遺伝子群と相互作用をする事が知られている。キノコ体の軸索枝制御においても *Gkt* がこれらの因子と共同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。その結果、頂底極性を制御している *crumbs* (*crb*) 及び *stardust* (*sdt*) が *DIP2* 及び *gkt* と遺伝学的相互作用を示す事が明らかとなった。

以上の結果より、*DIP2* による軸索枝制御は以下の様な分子機構が考えられる

(図 7)。まず、*DIP2* が脂肪酸を代謝し、代謝産物が *gkt* の発現を間接的に促進させると共に *Gkt* の基質となる。次に、この *Gkt* が極性制御因子である *Crab* 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する。この細胞極性がキノコ体ニューロン表面に存在すると考えられる未知の誘導・分岐シグナルのレセプターの局在を制御して、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。事実、他の細胞極性関連因子がキノコ体軸索枝の

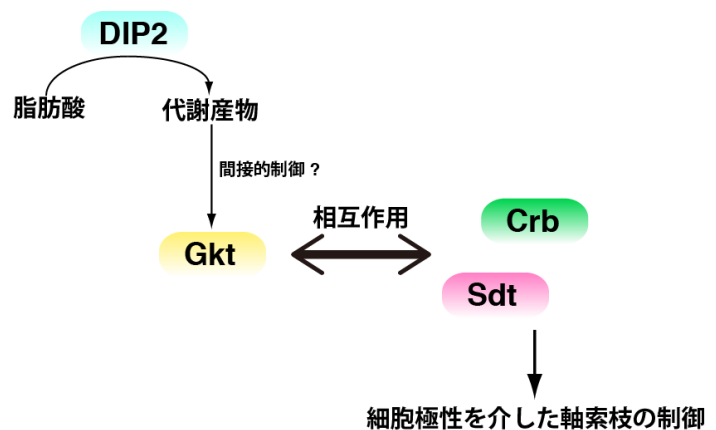


図 7: *DIP2* による軸索枝制御の模式図。 *DIP2* によって代謝された脂肪酸が *Gkt* の発現を活性化させる。 *Gkt* が *Crab* 及び *Sdt* と相互作用しキノコ体ニューロンの細胞極性を制御し、誘導・分岐シグナルのレセプターを適切に局在させる。

投射を制御しているという報告がなされており、*DIP2* もそれらの因子群と遺伝学的相互作用を示した。

本研究によって、神経系における *DIP2* の機能が初めて解明され、軸索枝形成や投射方向を制御している事が明らかとなった。*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。