

論文内容の要旨

論文題目 ショウジョウバエ視神経軸索投射に必要な眼柄の形成を

制御する分子機構

(Molecular mechanisms that control the morphogenesis of the *Drosophila* optic stalk)

氏名 村上 智史

1. 序論

グリア細胞は神経系発生過程において神経軸索の投射経路を形成するなど重要な働きを持つが、移動過程などグリア細胞の挙動を制御する分子機構はほとんど明らかとなっていない。本研究では、グリア細胞挙動の研究モデルとしてショウジョウバエ視覚系の眼柄構造形成過程の解析を行った。眼柄はグリア細胞によって形成される円筒構造であり、視神経軸索は眼柄を通して脳の視蓋へと投射する（図 1A）。本研究ではまず眼柄構造の形態を調べた。その後眼柄の発生過程を解析し、眼柄形成過程でグリア細胞がどのように挙動するのかを調べた。さらに眼柄形成に関与する遺伝子の同定・解析を行い、グリア細胞が円筒構造を形成する過程に働く分子機構の解明を目指した。

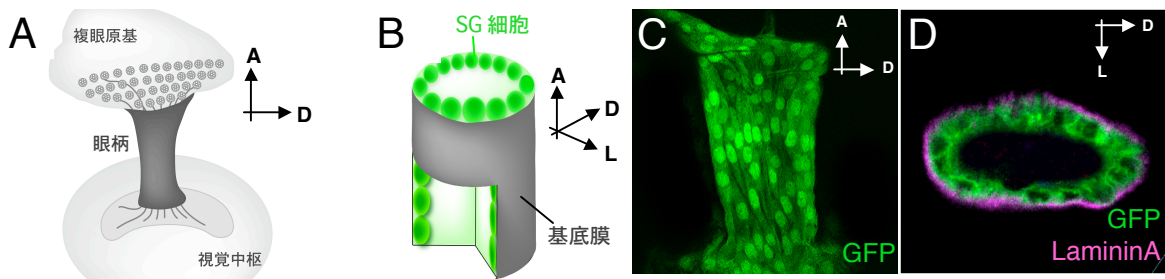


図 1. (A) 発生過程のショウジョウバエ視覚系の模式図。側方から見た図。A:前方、D:背側、L:側方。三令幼虫期に複眼原基において視神経細胞（グレー）の分化が起こる。視神経軸索は複眼原基と視覚中枢をつないでいる眼柄（ダークグレー）を通して視覚中枢に投射する。(B) 眼柄構造の模式図。眼柄はグリア細胞（緑、SG細胞）が単細胞層の円筒状に配列することにより形成され、基底膜（グレー）によって覆われている。(C) 側方から見た眼柄。GFP(緑)によりSG細胞を特異的に可視化している（図Dも同様）。SG細胞は前後方向に伸びた形態を持ち、互いに密に接しつつ円筒構造を形成している。(D) 眼柄の横断面。SG細胞は基底膜（マゼンタ、LamininA抗体により染色）で覆われた単細胞層を形成している。前方より観察。図下が側方。

2.眼柄構造とその形成過程

ショウジョウバエ視覚系発生過程において、複眼原基から視覚中枢前駆領域に向かって視神経軸索が伸びる。このとき視神経軸索は眼柄と呼ばれる構造を通る。眼柄にはグリア細胞が存在することが分かっているが、眼柄の構造についてはほとんど知見がない。本研究ではまず眼柄を形成しているグリア細胞（SG 細胞）特異的な Gal4 エンハンサートラップシステムを用いて眼柄構造を詳しく調べた。その結果、SG 細胞は前後軸に沿って平行に伸びた突起を持ち、互いに密着しつつ配列し単細胞層からなる円筒状の構造を形成していることがわかった（図 1B-D）。眼柄外側表面には基底膜が見られる。つづいて眼柄の形成過程を調べたところ、視神経軸索の投射が始まる以前に、SG 細胞は基底膜で覆われた円筒構造を形成していることがわかった。その後視神経軸索が投射してくるまでの間に SG 細胞の増加が見られ、それに伴って眼柄の拡張が起こる。SG 細胞において細胞分裂マーカーの発現が確認されたことなどから、眼柄は SG 細胞の細胞増殖によって拡張すると考えられる。眼柄は視神経軸索の投射中すなわち三令後期の間も拡張を続けるが、視神経軸索投射が起こらない *sine oculis* 変異体においても正常な円筒構造を持った眼柄構造が見られた。グリア細胞の発生過程の多くは神経軸索との相互作用によって進むことが知られており、眼柄の形成過程においても SG 細胞が視神経軸索に沿ってその周りを円筒状に覆うという機構が考えられる。しかしながら以上の結果は、SG 細胞による眼柄形成過程は視神経軸索に依存せず、しかも視神経軸索の投射に先立って起こることを示している（図 2A）。

3. *Fak56* は眼柄形態形成に関与する

次に眼柄形成に働く遺伝子の探索を行った。眼柄構造は視神経軸索投射以前に形成されることから、眼柄構造異常は視神経軸索投射異常を引き起こすと予測される。そこで視神経軸索投射に異常を示す変異体のスクリーニングを行い、視神経軸索が束状化異常を示す変異体 *Fak56^{CG1}* を同定した。この変異体では *Fak56* 遺伝子の翻訳開始点を含む約 1,263bp のゲノム領域が欠損している。基底膜マーカーを用いて眼柄形態を調べた結果、*Fak56* 変異体において眼柄形態の異常が見られることがわかった。野生型眼柄は長さや直径の比が約 2.5 : 1 の円筒であるが、*Fak56* 変異体においては長さが直径と等しいかあるいは短い眼柄が約 80%の個体で観察された。*Fak56* はほ乳類タンパク FAK (Focal adhesion kinase) と高い相同性をもつタンパクをコードしている。FAK は細胞増殖や細胞移動などの過程で重要な働きを持つ FCs において働くことが知られている。FCs は膜貫通型受容体 Ingetrin を中心とするタンパク複合体であり、細胞外マトリックスと細胞骨格をつなぐ位置に形成される（図 2B）。細胞の移動過程では FCs 自体の形成・分解の制御や、FCs を介した細胞骨格制御機構などが重要となるが、FAK はこれらの機構において中心的な働きを持つ。FAK の生体内における機能については知見が少なく、ショウジョウバエにおける *Fak56* の機能欠失体の表現型もこれまで報告されていない。

4. *Fak56* は SG 細胞において働く。

Gal4/UAS システムを用いて、*Fak56* がどの細胞で働いているのかを調べた。NP4702-Gal4

やNP2109-Gal4をドライバーとしてSG細胞特異的に外来 *Fak56* を発現させた結果、*Fak56* 変異体の眼柄異常が回復し、視神経軸索の束状化異常も正常化した。一方、視神経軸索特異的に発現する GMR-Gal4 では回復しなかった。これらのことは、*Fak56* は視神経軸索ではなく SG 細胞で働いていることを示す。すなわち *Fak56* は SG 細胞で働くことによって、視神経軸索の束状化を制御していることが示された。また、NP4702-Gal4 を用いて野生型の SG 細胞において *Fak56* を過剰に発現させたところ、野生型よりも眼柄が細くなることが分かった。この結果は、*Fak56* の量あるいは活性化レベルが眼柄の形態を決定する分子機構において重要な意味を持つことを示唆する。

次に、SG 細胞のどのような挙動を *Fak56* が制御しているのかを調べた。*Fak56* 変異体において、SG 細胞は眼柄拡張過程で野生型と同程度の増殖を示したことから、*Fak56* が SG 細胞の増殖に関与しているとは考えにくい。そこで変異体における SG 細胞の分布を a-Tubulin 抗体や *omblacZ* などの SG 細胞特異的なマーカーを用いて調べた。野生型において SG 細胞は複眼原基と視蓋の間に局限しているが、*Fak56* 変異体においては大部分の SG 細胞が視蓋表面に異所的に存在している様子が観察された。この SG 細胞の分布異常は、NP4702 や NP2109 を用いた外来性 *Fak56* の発現により回復する。したがって *Fak56* は SG 細胞が円筒を形成する過程に必要であることが分かる。ほ乳類 FAK は細胞移動制御に働くことから、眼柄形成過程において SG 細胞が実際に移動するのかどうかを *flip-out* 法を用いた lineage 解析法により調べた。その結果 SG 細胞が前後軸に沿って分布する様子が観察され、眼柄形成過程において SG 細胞が方向性をもった移動を行っていることが示された。*Fak56* についてはほ乳類 FAK と同様に FCs に局在し、Integrin を介した分子機構において働くという知見が培養細胞や過剰発現系を用いた実験により報告されている。したがって *Fak56* は、FCs を介した分子機構で働くことにより SG 細胞の移動過程を制御している可能性が考えられる。

5. *CdGAPr* は眼柄形態形成に関与し、*Fak56* と遺伝学的に相互作用する。

眼柄形成を支える分子機構についてさらに知見を得るために、Gal4 エンハンサートラップシステムのスクリーニングを行った。その結果 SG 細胞特異的に発現する NP3053 系統を同定した。NP3053 は、Rho family-GTPase 活性を制御する GAP ドメインをコードする遺伝子 *CdGAPr* (*CG10538*) の第一イントロンに挿入がある。これまでに *CdGAPr* の機能欠失体に関する報告はなされていない。NP3053 における *CdGAPr* 転写産物の量を RT-PCR 法により定量したところホモ体において発現量が野生型の 1/6 に減少していたことから、NP3053 は *CdGAPr* の機能欠失体であることが分かった。そこでこの *CdGAPr* 変異体 (*CdGAPr*^{NP3053}) における眼柄形成を調べたところ、*Fak56* 変異体と同様の眼柄形態異常と視神経軸索束状化異常が見られることが分かった。*CdGAPr* を含む領域を欠く deficiency 系統や *CdGAPr* の 5' 上流 6pb に挿入のある系統 *CdGAPr*^{EY13451} と *CdGAPr*^{NP3053} とのトランスヘテロ体においても同様の表現型がみられたことから、*CdGAPr* は眼柄形態形成に関与すると考えられる。さらに *Fak56* と *CdGAPr* 変異体のトランスヘテロ体において眼柄形成異常が観察されたことから、*Fak56* と *CdGAPr* は強い遺伝学的相互作用を示すことがわ

かった。*CdGAPr*はほ乳類CdGAPと相同性の高いGAPドメインをコードしている。*CdGAP*についてはフォーカルコンタクトに局在するという報告があり、*Fak56*と*CdGAPr*がフォーカルコンタクトを介した分子機構において協調的に働くことによりSG細胞の移動過程を制御している可能性を示唆する。*Fak56*や*CdGAPr*についてはこれまでに機能欠失体の解析報告がなく、本研究が初めての報告となる。

6.SG細胞におけるFCsの存在がSG細胞の移動と眼柄形成に必要である。

FCsが実際にSG細胞で必要とされ眼柄形態形成を制御しているかどうかを、FCsの主要構成因子に対するRNA干渉を行うことにより調べた。RNA干渉法によりβPS-IntegrinあるいはTalin遺伝子の機能をSG細胞特異的に機能阻害したところ、SG細胞は眼柄の一部に凝集したまま円筒状に配列しなかった。そしてその結果起こる眼柄形成異常により視神経軸索伸長が眼柄の途中で妨げられてしまう様子が観察された。これらの結果は、FCsを介した分子機構によってSG細胞の移動過程が制御されていること、そして眼柄の正常な形成が視神経軸索投射に重要であることを示す。

結論

本研究では、ショウジョウバエ視覚系発生過程において眼柄の形態形成はSG細胞の挙動によって決まり視神経軸索に依存しないことを明らかにした。そして眼柄形成異常が脱束状化などの視神経投射異常を引き起こすことを示した。さらに眼柄形成に関与する遺伝子を同定し、FCsを介した分子機構がSG細胞自律的な機構として働き眼柄の形態形成を制御していることを示した。

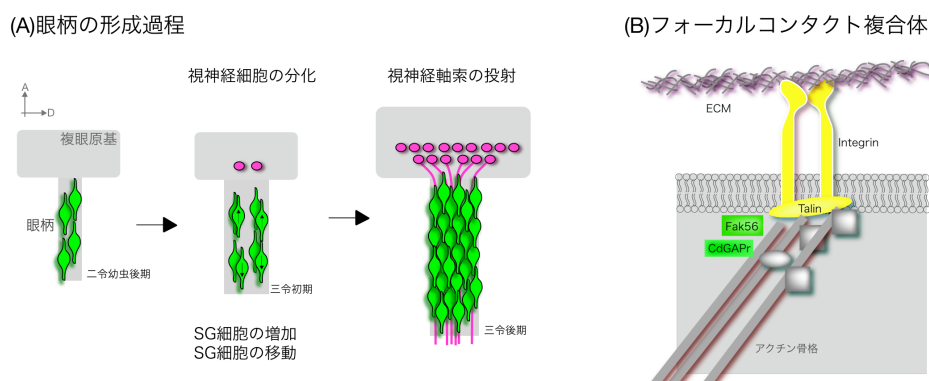


図2：眼柄形成の細胞・分子機構モデル

(A) 眼柄の形態形成はSG細胞の挙動によって決まり視神経軸索に依存しない。眼柄拡張過程においてSG細胞(緑)は増殖したのち前後軸に沿って移動し、一定の形態を持った円筒構造を形成する。視神経軸索(マゼンタ)はこの円筒構造を通して脳の視覚中枢に投射する。SG細胞の移動過程はフォーカルコンタクト(FCs)を介した分子機構によって制御される。(B) フォーカルコンタクト(FCs)の模式図。Integrinは細胞表面において細胞外マトリックス(ECM)と結合し、細胞内においてはTalinなどを介して細胞骨格と結合する。*Fak56*はFCsに局在し細胞骨格再構成やFCsの形成・分解などの分子過程に働くと考えられている。*CdGAPr*も*Fak56*と同様な機能を果たすことが予測される。