

論文内容の要旨

論文題目

非典型カドヘリンタンパク質 Fat はショウジョウバエ視覚中枢において
Hippo シグナル制御を通して神経幹細胞領域の完全性を維持する

**Atypical Cadherin Fat Maintains Integrity of Neuronal Stem Cell
Field by Regulating Hippo Signal in *Drosophila* Optic Lobe**

氏名 河盛 治彦

序

動物の神経組織はその発生過程において、さまざまな種類の神経細胞およびグリア細胞が神経幹細胞より生み出され、それらが複雑ながらも秩序だった構造を形成するが、その制御機構については未だ明らかになっていないことが多い。ショウジョウバエ視覚中枢を構成するラミナおよびメダラ神経細胞は同一の神経上皮 (Neuroepithelium, NE) 細胞に由来し、それぞれ異なった分化メカニズムによって生み出される。本系は神経細胞の多様性および秩序立ったパターン形成をもたらす分子機構を研究する上で有用なモデルとなっている。非典型カドヘリンタンパク質 Fat (Ft) は成虫原基における腫瘍抑制因子として発見され、組織の増殖および平面細胞極性の形成に寄与していることが明らかにされている。近年、Fat の下流経路として Hippo シグナルの存在が報告され、本シグナル系も発生過程における組織の増殖、生存、分化などに関わっていることが知られている。本研究では、ショウジョウバエ視覚中枢の発生、特に NE 細胞からメダラ神経細胞方向への分化における Fat/Hippo シグナルの役割を明らかにすることによって、神経発生の制御機構に関する新しい見方を提供することを目的とした。

結果

Fat は視覚中枢の神経上皮領域において発現し、その機能欠失変異は視覚中枢の形成異常を引き起こす

視覚中枢を構成する神経細胞の多くは 3 齢幼虫期においてその多くが分化する。視覚中枢の NE 細胞が Hedgehog を受容するとラミナ神経細胞へと分化する。他方で NE 領域の内側より神経芽細胞 (Neuroblast, NB) へと逐次的に分化が進行する。NB は非対称分裂によって神経節母細胞を生み出し、それらが最終的に成熟メダラ神経細胞へと分化する。NE 細胞は NB への分化の際、一過性にプロニューラル遺伝子である *lethal of scute* (*l(l)sc*) を発現し、一列の円弧状の発現パターンを示す。これを「分化の波」と呼ぶこととする。私は 3 齢幼虫期の視覚中枢における *ft* 遺伝子の発現パターンを *in situ* ハイブリダイゼーションにより観察した。その結果、*ft* 遺伝子が神経上皮領域で強く発現していることが確認された。

続いて、*ft* 遺伝子の機能喪失変異体における視覚中枢の表現型の観察を行った。その結果、野生型と比較して *ft* 変異体では顕著な NE 領域の肥大化しており、NB 領域はより内側へと追いやられているのが観察された。また、*ft* 変異体では NE 細胞が異常な凝集を引き起こして、メダラ神経領域への浸潤し、メダラ領域のバレル状構造が乱されていた。

Fat/Hippo シグナルは神経芽細胞への分化を正に制御する

上記の結果から、*ft* は視覚中枢領域の正常な発生に必要であると考えられる。*Ft* の具体的な役割を明らかにすることを目的として、モザイク解析により *Ft* および Hippo シグナルの構成因子の変異体クローンを誘導し、クローン内での NB 分化が受ける影響についての観察を実施した。神経上皮領域で *ft* 機能喪失変異体クローンを誘導したところ、その中で NB 分化が遅延することが観察された。このことから、*Ft* が NB への正常な分化の進行に必要であると考えられる。

過去の報告から、*Ft* はミオシンタンパク質である Dach5 (D) を抑制することによってリン酸化酵素 Warts (Wts) を安定化する。Wts は転写共役因子である Yorkie (Yki) をリン酸化してその転写活性化機能を阻害する。*wts* 機能喪失変異体または恒常活性型 *yki* 発現クローンにおいても *ft* 変異体クローン同様 NB 分化の遅れが観察された。他方で、*dft2* 重機能喪失変異体クローンでは *ft* の表現型が抑圧され逆に野生型よりも NB 分化の早い進行が観察された。これらから、*Ft* は外部からの入力を受け、Hippo シグナルの活性化を通して NB 分化の進行を制御していると考えられる。

Fat/Hippo シグナルは神経上皮細胞の正常な形態維持に寄与する

ft 機能喪失変異体では NE 細胞の異常な凝集が観察された。そこで、Fat/Hippo シグナル構成因子の変異体クローンの NE の形態を観察した。*ft* あるいは *wts* の機能喪失変異体クローン、または恒常活性型 *yki* 発現クローンにおいては NE の異常な凝集が観察された。それらでは神経上皮の頂端側どうしを向かい合わせており、野生型における単層構造と異なって内部のメダラ領域への浸潤がみられた。他方、*dft2* 重機能喪失変異体クローンでは野生型との違いは観察されなかった。これらの結果から Fat/Hippo シグナルは NE 領域の単層シート構造の維持に必要であると考えられる。

続いて Fat/Hippo と相互作用する因子の探索を実施した。Rho ファミリーGFPase タンパク質は様々な細胞現象に関与することが知られており本項の NE 細胞の形態制御にも関わっている可能性がある。そこで、上記ファミリーの代表的な 3 つの因子 *Rac1*、*Rho1* および *Cdc42* の優性阻害変異体を *ft* 機能喪失変異体クローン内で発現させたところ、*Rho1* および *Cdc42* では表現型に変化が見られなかった一方で、*Rac1* のケースでは *ft* 遺伝子変異による NE の形態異常の表現型がある程度抑圧された。この結果より、NE の形態制御に関して Rac シグナルが Fat/Hippo シグナルと並行にあるいはその下流で機能していると考えられる。

Dachsous は視覚中枢の前後領域間の秩序だった神経芽細胞分化を制御する

これまでの報告から、異なるカドヘリンタンパク質である Dachsous (Ds) は Ft のリガンドの 1 つの候補であると考えられている。そこで、視覚中枢における *ds* の発現パターンを観察したところ、視覚中枢の後方の NE および一部の NB で強く発現しており、前後軸方向に発現勾配を形成しているのが観察された。これは NE 領域では一様な発現パターンを示す *ft* とは対照的である。*ds* の機能喪失変異体の視覚中枢を観察したところ、*ds* 発現領域および *ds* の発現境界領域において NB 分化の遅れが観察された。他方で、視覚中枢前方領域はほとんど影響を受けなかった。次に、*ds* 変異体下で *ds* の全長、細胞外ドメインおよび細胞内ドメインのそれぞれを発現させて復帰実験を行ったところ、*ds* の全長および細胞外ドメインの場合のみ野生型並みのレベルに復帰が見られた。これらの結果から、視覚中枢において Ds は主にリガンドとして機能しており、Ds 発現領域と非発現領域における NB 分化が協調的に進行するような働きを担っていると考えられる。

dachsous の発現は Wg/Dpp シグナル依存性である

上記の *ds* の偏った発現パターンを制御する分子機構の解析を実施した。視覚中枢では後方より分泌性タンパク質である Wingless (Wg) および Decapentaplegic (Dpp) が発現し

ており、視覚中枢のオーガナイザーとして機能していると考えられる。そこで、Wg/Dpp シグナルと *ds* の発現との関係を調べた。Wg 下流の *armadillo* の恒常活性型体の発現、あるいは Wg シグナル抑制因子の *Axin* の機能喪失変異体クローンでは *ds* の細胞非自律的な発現上昇が観察された。また、Dpp 受容体をコードする *thickveins* の恒常活性型の発現クローン内では *ds* の細胞自律的な発現上昇が観察された。一方、Dpp シグナルの伝達に必要な因子をコードする *medea* の変異体では *ds* の細胞自律的な発現現象が観察された。このことから、*ds* の発現は Wg/Dpp シグナルによって正の制御を受けていると考えられる。

結論

本研究から、Fat/Hippo シグナルがショウジョウバエ視覚中枢 NE 領域において機能しており、NE から NB への分化を正に制御していることが分かった。また、上記シグナルは NE 領域の形態的安定性の維持にも寄与していた。これらより静的な Fat/Hippo シグナルは神経発生の場合としての NE 領域の完全性を維持することにより、動的な神経細胞分化という現象の秩序だった進行を制御していると考えられる（下図参照）。また、Fat/Hippo シグナルの入力の制御については Wg/Dpp シグナル依存性であり、このことは分泌性タンパク質による拡散シグナルが細胞間接着によるシグナル伝達といった 1 細胞レベルでのシグナルに変換される 1 つの分子機構を示している。

