

平成 29 年 6 月 14 日現在

機関番号：12608

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26440119

研究課題名(和文) 視神経軸索投射における分子機能発現の時間的條件

研究課題名(英文) Temporal control of molecular function in axon wiring of the visual system

研究代表者

羽毛田 聡子(鈴木聡子)(Hakeda-Suzuki, Satoko)

東京工業大学・生命理工学院・研究員

研究者番号：90631482

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：ショウジョウバエの遺伝学的手法を用いて、蛹期の時期に応じて視神経における遺伝子の発現を制御し、成虫における視神経軸索の組織染色により遺伝子の発現時期が投射に与える影響を解析した。その結果、脱リン酸化酵素であるLAR、Ptp69Dは蛹期25%から50%の間に必要であることが判明した。また、膜たんぱく質であるGolden goal (Gogo)とFlamingo (Fmi)の強制発現系は蛹化後24時間で発現を開始した場合に異常投射を起こしたが、それ以降では起こらなかった。これらの結果は視神経の軸索投射において遺伝子の機能が限局した時期にのみ必要であることを示唆している。

研究成果の概要(英文)：To know the temporal requirement of the molecules involved in axon wiring of *Drosophila* visual system, we genetically manipulated the gene expression during pupal stage and observed the projection pattern of the axons in the adult. We found that the receptor tyrosine phosphatases LAR and Ptp69D play a critical role from 25% to 50% after puparium formation (APF). We also tested the temporal effect of overexpression of two transmembrane proteins, Golden goal and Flamingo, which is known to cause the R7 photoreceptor axons to terminate at the wrong layer. The effect was observed when the protein was expressed at 24hours APF but not later. These results indicate that the protein function is required only at very limited range of time during pupal stage for proper wiring of visual system axons.

研究分野：神経発生生物学

キーワード：軸索投射 遺伝子発現 視神経 ショウジョウバエ

1. 研究開始当初の背景

ショウジョウバエの光受容器官である複眼には約 800 個の個眼があり、各々に 8 種類の視細胞 R1-R8 がある。このうち R7 と R8 はメダラという脳の領域に等間隔で侵入し、2 層の美しい投射パターンを形成する。しかし、ショウジョウバエの視神経の一見単純な投射においても、タイミングよく的確に軸索の伸長する方向やスピードを操作しなければならない。

視神経の発生において R8 は R7 より先に分化し、R8 の軸索はメダラに先に到達し、そこで伸長が一時停止する。後から来る R7 の軸索は蛹期初期に R8 を追い越し先にメダラに侵入し、最終的に M6 層に到達する。R8 は蛹期中期に再び伸長し、R7 より浅い M3 層に最終的に到達する。膜タンパク質である Flamingo (Fmi) と Golden goal (Gogo) は、Gogo 単独の働きにより R8 の軸索を一過的に M1 層にとどめ、その後 Gogo と Fmi が協調して R8 の軸索を最終標的である M3 層に導いていることが予想されている。(Hakeda-Suzuki et al. Nature Neuroscience (2011))。さらに、受容体型脱リン酸化酵素 Lar と Ptp69D は機能を重複して軸索投射の相互作用を制御している可能性があることがわかってきた。このように、蛹期に綿密に計画された過程を経て R7 および R8 はメダラの特定層に投射すると考えられるが、その分子機構を蛹期の時間軸に沿って解析した研究は驚くほど少ない。本研究では、限られた数の分子で幾千もの神経が固有の投射層を認識している多様性・特異性が、今までブラックボックスであった蛹期において、時間軸により決定される機構を解明する

2. 研究の目的

本研究ではショウジョウバエの視神経の軸索投射において、ダイナミックな変化を起こす蛹期において、分子が機能する時間的な条件、さらにそのタイミングを決定する機構を解明することを目標とする。視神経の軸索の蛹期の発生過程では、神経は伸びたり止まったり綿密に計画されたプログラムに従って伸長している。そこで、ショウジョウバエの軸索投射に関わっていることが知られている、リン酸化酵素 Lar と Ptp69D および膜たんぱく質 Gogo、Fmi について、遺伝子の「発現」のオン・オフのタイミングだけでは説明することのできない、実際に分子の「機能」が必要となる時間的な条件、あるいは機能が発現する時期にどれだけ柔軟性があるかということを示ウジョウバエの視神経を用いて明らかにする。

3. 研究の方法

(1) ショウジョウバエの豊富な遺伝学的手法を用いて、蛹期の時期に応じて視神経における遺伝子の発現を制御できるシステムを構築して、以下の分子が機能する時期を限局する。

1) Lar と Ptp69D の発現時期

2) Gogo と Fmi の R7 強制共発現の時期

そして、蛹または成虫における視神経軸索の組織染色により、遺伝子の発現時期を調節することにより生じる表現型の変化を観察する。

(2) 軸索の伸長速度を遺伝学的にコントロールし、軸索が M1 層に到達する時期を変化させることによって生じる表現型を観察する。

4. 研究成果

(1) RNAi を用いた Lar と Ptp69D のコンディショナルノックアウト

脱リン酸化酵素の Lar と Ptp69D はショウジョウバエの軸索投射に必要な分子である。これらの 2 つの脱リン酸化酵素の二重 RNAi では、R8 はほぼ正常に、R7 はメダラの表層の M1 層で停止する。この表現型が、Lar と Ptp69D の機能発現のタイミングによるものなのかを検証するために、温度依存的に RNAi の発現を制御できる系を用いて調べた。2 重 RNAi 株に対して Lar と Ptp69D のレベルを蛹期開始後 25% で回復させると R7 の投射は完全に回復した。これに対し、50% や 75% で回復させた系統では R7 の投射は完全に回復することはなく、特に後部側の軸索が M1 層で止まる傾向が見られた。一方、蛹開始後に 2 重 RNAi を用いて活性を抑える実験では、蛹開始後 12% では一部の神経が 2 重 RNAi と同様に M1 層で止まっていた。25% ではその割合が減少し、50% ではほぼすべての軸索が正常に投射することが分かった。この結果から Lar と Ptp69D が R7 において蛹期 25% から 50% の間に重要な役割を果たしていると考えられる。

(2) Gogo と Fmi の強制共発現時期による M3 層への誤投射

ショウジョウバエの視神経の内、R7 は R8 より先にメダラに侵入し、最終的には R8 層の投射先である M3 層より深い M6 層に投射する。R7 に Gogo と Fmi を強制的に幼虫期から成虫期まで継続的に同時に強く強制発現すると、本来 R8 の投射する M3 層に誤投射する。そこで、Gogo と Fmi の協調的な M3 層への投射機能がどの時期で必要となるのかを、Gal80ts を用いて分子の発現を蛹化後の各ステージで開始することにより調べることを計画していた。しかし、Gogo と Fmi の発現を Gal80ts を

用いて調節する方法は形態異常が起こるため解析が難しいことが判明した。そこで、Flippase を用いて視神経において Gal4 の発現を誘導できる GMR-FSF-Gal4 により Gogo と Fmi を発現させた。その結果 Gogo と Fmi を蛹化後 24 時間で発現開始させた場合は M3 層に投射する軸索が見られたが、それ以降では M3 層に投射する軸索はほとんど見られなかった。

(3) 分子が機能する時期の解析

ショウジョウバエの視神経は後部側から分化し、軸索はメダラ前部側に投射し、蛹化後約 10 時間で分化が完了する。そこで、リボソームタンパク質に変異が入ると細胞の成長速度が遅くなることを利用して、温度依存的に視神経のみでタンパク質合成速度を調節できる系を作成した。リボソームタンパク質活性の最も低くなる 25 °C では、視葉がほぼ消失していた。視葉が消失した原因は視神経が正しい時期に目標点まで到達しなかったことにより、細胞死が引き起こされたと考えられる。20 °C では、リボソームタンパク質の活性はある程度回復していると考えられるが、複眼後部の神経投射が乱れ、本来取るべき経路をとらずに投射していた。これは、視葉の回転が始まる時期に関係した表現型であると考えている。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表](計 9 件)

- (1) Satoko Hakeda-Suzuki, Hiroki Takechi, Takashi Suzuki
“Two Receptor Tyrosine Phosphatases Dictate the Depth of Final Axonal Stabilizing Layer in the Drosophila Visual System” 第 39 回日本分子生物学会年会 パシフィコ横浜 2016 年 11 月
- (2) Satoko Hakeda-Suzuki, Hiroki Takechi, Takashi Suzuki (発表者) “Two Receptor Tyrosine Phosphatases Dictate the Depth of Final Axonal Stabilizing Layer in the Drosophila Visual System” Neurofly 2016 ギリシャクレタ島 2016 年 9 月
- (3) Satoko Hakeda-Suzuki, Hiroki Takechi, Takashi Suzuki
“Two Receptor Tyrosine Phosphatases Dictate the Depth of Final Axonal Stabilizing Layer in the Drosophila Visual System” The 12th Japanese Drosophila Research Conference 立教大学 2016 年 9 月
- (4) Satoko Hakeda-Suzuki, Hiroki Takechi, Takashi Suzuki
“The two receptor tyrosine phosphatases Lar and Ptp69D create a safety net in Drosophila photoreceptor axon wiring” The 39th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society パシフィコ横浜 2016 年 7 月
- (5) Satoko Hakeda-Suzuki, Hiroki Takechi, Takashi Suzuki
“A combinatorial role of the two receptor tyrosine phosphatases in the Drosophila photoreceptor targeting” 24th European Drosophila Research Conference Heidelberg, September 2015
- (6) Satoko Hakeda-Suzuki, Hiroki Takechi, Takashi Suzuki
“A role of the two receptor tyrosine phosphatases, Lar and Ptp69D, in the photoreceptor axon targeting” The 38th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society 神戸国際会議場 2015 年 7 月
- (7) Satoko Hakeda-Suzuki, Fu Kusakawa, Takashi Suzuki
“A combinational role of the two protein tyrosine phosphatases, Lar and Ptp69D, in the photoreceptor axon targeting” The 48th Annual Meeting of the Japanese Society of Developmental Biologist つくば国際会議場 2015 年 6 月
- (8) Satoko Hakeda-Suzuki, Fu Kusakawa, Takashi Suzuki
“A combinational role of the two protein tyrosine phosphatases, Lar and Ptp69D, in the photoreceptor axon targeting” 第 37 回日本分子生物学会年会 パシフィコ横浜 2014 年 11 月
- (9) Satoko Hakeda-Suzuki, Fu Kusakawa, Takashi Suzuki
“A combinational role of the two protein tyrosine phosphatases, Lar and Ptp69D, in the photoreceptor axon targeting” The 11th Japanese Drosophila Research Conference Kanazawa Theatre, June 2014

6 . 研究組織

(1)研究代表者

羽毛田 聡子 (HAKEDA Satoko)

東京工業大学・生命理工学院・研究員

研究者番号: 90631482