

論文 / 著書情報
Article / Book Information

題目(和文)	ショウジョウバエ視神経前駆細胞の成虫複眼への移植
Title(English)	Transplantation of Drosophila photoreceptor precursor cells into the adult compound eye
著者(和文)	岩永りく
Author(English)	Riku Iwanaga
出典(和文)	学位:博士(理学), 学位授与機関:東京工業大学, 報告番号:甲第12661号, 授与年月日:2024年3月26日, 学位の種別:課程博士, 審査員:鈴木 崇之,相澤 康則,白木 伸明,立花 和則,藤田 尚信
Citation(English)	Degree:Doctor (Science), Conferring organization: Tokyo Institute of Technology, Report number:甲第12661号, Conferred date:2024/3/26, Degree Type:Course doctor, Examiner:,,,,
学位種別(和文)	博士論文
Type(English)	Doctoral Thesis

令和5年度 博士論文

ショウジョウバエ視神経前駆細胞の
成虫複眼への移植

東京工業大学

生命理工学院 生命理工学系 生命理工学コース

岩永 りく

指導教員 鈴木 崇之 准教授

目次

要旨.....	3
Abstract	5
1. 序論.....	6
1-1. 視覚の再生と移植.....	6
1-2. 神経細胞における細胞骨格の役割.....	7
1-3. 神経細胞における細胞接着因子.....	8
1-3-1. N-cadherin	8
1-3-2. Neurexin	9
1-4. シナプス構成因子と形成メカニズム.....	9
1-5. ショウジョウバエ視覚系の構造.....	10
1-6. ショウジョウバエを用いた移植.....	11
1-7. アクチン関連因子: Twinstar.....	11
1-8. 細胞接着因子: N-cadherin.....	12
1-9. 細胞接着因子: Neurexin-1	12
2. 材料と手法.....	13
2-1. ショウジョウバエの餌の組成.....	13
2-2. ショウジョウバエの飼育.....	13
2-3. 脳の観察	13
2-4. 免疫染色	13
2-5. 視神経前駆細胞の網膜への移植.....	14
2-6. 顕微鏡と画像解析.....	15
2-7. CRISPR/Cas9 によるノックイン体の作製.....	15
2-8. ショウジョウバエの遺伝型.....	16

3. 結果.....	18
3-1. 移植方法の改良による軸索伸長.....	18
3-2. 移植細胞での <i>Ncad</i> と <i>Tsr</i> の過剰発現により軸索伸長は促進される.....	19
3-3. アクチンの再編成と安定化は軸索伸長において重要である.....	20
3-4. <i>Lamina</i> へ伸長した軸索において前シナプス構造は形成されている.....	21
3-5. <i>Nrx-1</i> はシナプス形成だけでなく、軸索伸長も促進する.....	22
3-6. 移植細胞は <i>Lamina</i> を越えて <i>Medulla</i> まで軸索伸長する.....	23
補足. コントロールにおける <i>Brp</i> の発現パターン.....	24
4. 考察.....	25
4-1. 移植細胞の選抜方法の改良による軸索伸長.....	25
4-2. <i>Ncad</i> と <i>tsr</i> の過剰発現による軸索伸長促進.....	26
4-3. <i>Tsr</i> の活性型/不活性型の軸索伸長における機能.....	27
4-4. <i>Nrx-1</i> の過剰発現による軸索伸長促進.....	28
4-5. <i>Lamina</i> へ伸長した軸索におけるシナプス形成 (<i>Ncad/tsr</i> の過剰発現).....	28
4-6. <i>Lamina</i> へ伸長した軸索におけるシナプス形成 (<i>Nrx-1</i> の過剰発現).....	29
4-7. 形成された前シナプスの解析.....	29
4-8. 今後の展望.....	30
5. 参考文献.....	32
謝辞.....	43

要旨

視覚は、視細胞から伸びた軸索を介して光刺激が脳へと伝達することによって形成されている。そのため、軸索が損傷すると視覚は喪失する。視覚を再獲得するためには、視細胞が新たに軸索を脳へと長く伸ばすとともに、脳においてシナプスを形成し、再び網膜と脳の間で神経回路を再形成する必要がある。しかし、神経細胞の再生能力が低いことや、瘢痕形成など物理的障壁の形成などにより、軸索の再生は困難である。そこで近年では iPS 細胞の発見などにより移植による再生が注目されている。これまでに視覚において、移植による神経回路の形成が研究されているが、軸索の正確な投射制御には至っていない。移植による視神経再生を実現するために、ショウジョウバエを用いて研究を行った。ショウジョウバエの視覚系は哺乳類と比較すると単純な構造ではあるが、軸索伸長を阻害する障壁も少なく、網膜の *Retina*、脳内の神経節である *Lamina*、*Medulla* と精密な層構造を取っている。またショウジョウバエには遺伝子を容易に操作できるツールが揃っており、これまでも軸索誘導や伸長について解析が行われ、関連分子についても多数報告されている。このようにショウジョウバエは移植に用いるモデル生物として適しており、当研究室において、ショウジョウバエの視神経前駆細胞を用いた移植法が確立されている。しかし、脳である *Lamina* への軸索伸長はほとんど確認できていない。

ショウジョウバエを用いた移植では、まず三令幼虫から *eye disc* を取り出し、分解し、培養した。培養した視神経前駆細胞をショウジョウバエ成虫の複眼に移植し、移植から 3 日後に固定し、アガロースセクション法を用いて、移植した細胞を観察した。また、三令幼虫の段階で、視神経前駆細胞特異的に目的のタンパク質を過剰発現させることによって、目的のタンパク質を過剰発現した移植細胞を作製した。

ショウジョウバエを用いた移植において、これまでに脳である *Lamina* への軸索伸長が確認されていないことから、移植細胞の選抜方法を視細胞かつ神経細胞である細胞を標識する方法に変更した。その結果、移植細胞の *Lamina* への軸索伸長を確認できた。本研究では、細胞接着因子であり *Retina* 内での軸索伸長促進することが分かっている *N-cadherin (Ncad)* と、アクチンの脱重合を促進する *Cofilin1* のショウジョウバエホモログである *Twinstar (Tsr)* に注目した。*Cofilin1* はマウスの損傷した坐骨神経において、アクチンターオーバーを促進し、損傷した神経の軸索伸長（再生）を誘導することが明らかになっている。*Ncad* と *tsr* を過剰発現した細胞を移植した結果、*Lamina* への軸索伸長が促進された。そこで、*Lamina* へ伸長した軸索におけるシナプスの形成を確認したところ、移植から 3 日後には前シナプス構造の形成は確認できなかったものの、移植から 6 日後に *Lamina* において前シナプス構造の形成を確認できた。前シナプスの形成を確認するまでに比較的長い期間を要したことから、シナプス形成を誘導することが明らかになっている *Neurexin-1 (Nrx-1)* に注目した。*Nrx-1* を過剰発現した細胞を

移植したところ、移植から 3 日後にシナプスの形成が確認された。この結果から前シナプス形成までの期間が短縮し *Nrx-1* による前シナプス形成促進を示されただけでなく、*Nrx-1* の軸索伸長への関与も示唆された。*Ncad* や *tsr*、*Nrx-1* を導入することによって、*Retina* を超えて脳への移植細胞の軸索投射を実現し、ショウジョウバエ視細胞の最も遠い標的組織である *Medulla* までの投射を確認した。

移植した視細胞前駆細胞において *tsr* を発現させるだけでは、*Lamina* への顕著な軸索伸長促進は見られなかったものの、細胞接着因子である *Ncad* と組み合わせることによって、*Retina* を超えて *Lamina* への軸索伸長が促進された。*Ncad* は *Catenins* を介してアクチンと結合していることが分かっている。*tsr* の過剰発現によって誘発されたアクチンターンオーバーの促進と共に、*Ncad* や *Catenins* を介して周辺組織と安定して接着できるようになったことで *Lamina* への軸索伸長を誘導できたと考えられる。シナプス形成を誘導するために導入した *Nrx-1* であったが、軸索伸長への関与が示唆された。*Nrx-1* による軸索伸長促進は、*Nrx-1* によって誘導されたシナプスによって軸索が安定化したために引き起こされたと考えられる。これまで脳への安定した軸索投射はほとんど確認されておらず、本研究によって得られた知見は移植による再生を実現するための手がかりとなることが期待される。

Abstract

Vision is formed by the transmission of light stimuli to the brain through axons extending from photoreceptor cells. The damage to these axons leads to loss of vision. To reacquire vision, photoreceptor cells need to reestablish the neural circuitry connecting the retina to the brain by extending novel elongated axons and forming synapses in the brain. Despite research on neural circuit regeneration through transplantation, achieving precise axon projection remains challenging. To achieve optic nerve regeneration through transplantation, we utilized the model organism *Drosophila*. In the *Drosophila* visual system, photoreceptor cells extend axons that project directly to the optic lobe. While the structural complexity is notably simpler than that of mammalian systems, this model presents fewer barriers to axon outgrowth and displays a precise layered organization. We have established a transplantation method for *Drosophila* utilizing photoreceptor precursor cells extracted from the eye disc. However, little axonal elongation of transplanted cells into the brain, the lamina, has been observed.

In *Drosophila* transplantation, eye discs are initially extracted from third instar larvae, dissociated, and cultured. The cultured cells are then transplanted into adult flies. In addition, transplanted cells overexpressing candidate genes were generated by overexpressing these genes specifically in photoreceptor precursor cells at the third instar larval stage. In this study, we demonstrated that transplanted cells extended axons from the retina to the lamina by modifying the selection process of transplanted cells. Moreover, we focused on N-cadherin (*Ncad*), a cell adhesion factor, and Twinstar (*Tsr*), which has been shown to promote actin reorganization and induce axon elongation in damaged nerves. Overexpression of *Ncad* and *tsr* in cells selected through this process facilitates axon elongation. Presynapse formation in the elongated axons in the lamina was confirmed 6 days after transplantation. To increase the efficiency of presynapse formation in axons extending into the lamina, we attempted to transplant cells overexpressing *Neurexin-1* (*Nrx-1*), identified as a synaptic organizer, in addition to *Ncad* and *tsr*. The introduction of *Nrx-1* led to a significant reduction in the time required for presynapse formation, shortening it to 3 days, suggesting that *Nrx-1* not only promotes presynapse formation but is also involved in axon elongation. By introducing *Ncad*, *tsr*, and *Nrx-1*, we not only successfully achieved axonal projection of transplanted cells to the brain beyond the retina, but also confirmed the projection of transplanted cells into the deeper ganglion, the medulla.

In conclusion, these results suggest that overexpression of *Ncad*, *tsr*, and *Nrx-1* is associated with the promotion of axon elongation in transplantation. These factors emerge as effective contributors to the regeneration of neural circuits through transplantation.

1. 序論

視覚は外部の情報を得るための重要な感覚である。視覚形成は網膜の視細胞が光刺激を受け取ることによって始まる (図 1A)。網膜は層構造を取っており、哺乳類では、まず初めに、色や形を認識する錐体細胞や、明暗を認識する桿体細胞といった視細胞によって、光刺激を受容している。視細胞において、光刺激が電気信号へと変換され、水平細胞や双極細胞、アマクリン細胞といった介在ニューロンを介して、網膜神経節細胞 (Retinal ganglion cells : RGCs) に伝達される (図 1B)。RGCs の軸索は脳の視覚中枢へと投射し、脳へと視覚情報を伝達している (図 1A)。そのため、RGCs が病気やケガによって損傷した場合、視覚情報が伝達されなくなり、視覚を失う。視覚を再獲得するためには、視細胞が新たに軸索を長く伸ばすとともに、脳においてシナプスを形成し、再び網膜と脳の間で神経回路を再形成する必要がある。本研究では、移植による神経回路の再生を実現するために、視細胞から直接軸索を伸長しているショウジョウバエを用いて (図 1C)、軸索細胞接着因子や細胞骨格分子に注目し、研究を行った。

1-1. 視覚の再生と移植

哺乳類において、RGCs は発生段階初期では再生できるものの、後期になると再生することは難しい (MacLaren & Taylor, 1997)。RGCs の再生について長年研究が行われており、末梢神経 (Peripheral Nervous System : PNS) の断片によって軸索の再生が誘導され、シナプスも形成されたことが分かっている (Laha, Stafford, & Huberman, 2017)。しかし、神経の再生には他にも障壁がある。1つ目は、ミエリンからの阻害物質の分泌である。一部の神経細胞において、神経の伝達速度を速めるミエリンと呼ばれる構造が形成されており、再生可能な PNS ではシュワン細胞によって形成され、再生が難しい中枢神経系 (Central Nervous System : CNS) ではオリゴデンドロサイトによって形成されている。オリゴデンドロサイトが Nogo、myelin-associated glycoprotein や oligodendrocyte-myelin glycoprotein といった神経の再生を阻害する物質を分泌していることが明らかになっており、*in vitro* における研究によってこのタンパク質を中和することによって軸索の再生することが明らかになっているが、これらをロックアウトした個体における軸索再生は不確かである (Yiu & He, 2006)。2つ目は、グリア瘢痕の形成である。神経が損傷した場合、グリア細胞の一つであるアストロサイトが再生の妨げとなるグリア瘢痕を形成することが知られており、また、アストロサイトは神経の伸長を妨げるプロテオグリカンを産生することが分かっている (Silver & Miller, 2004)。また、損傷時には炎症反応が起こり、再生を妨げていることが知られている。しかし、グリア瘢痕や炎症が再生を促進する場合も見つかっており、再生とその阻害は非常に複雑な関係にある (Laha et al., 2017)。

このように神経の再生には障壁があること、そして近年では iPS 細胞の発見により、*in vitro* での目的の細胞・組織の作製が可能になったことから、移植による再生が注目されている。これまでに RGCs の移植の成功が報告されており、移植した細胞が宿主生物と統合したと共に光に対して反応することが確認されている (MacLaren et al., 2006; Venugopalan et al., 2016)。しかし、予備実験において 1 ケース脳への投射が見られたものの、正確な投射制御は実現できていない (Venugopalan et al., 2016)。また、iPS 細胞由来の RGCs の移植についても行われており、移植した RGCs は電気生理学的機能を有していたことが確認されているが、軸索伸長は optic nerve head にとどまっておらず、脳への伸長には至っていない (Oswald, Kegeles, Minelli, Volchkov, & Baranov, 2021; Vratsha et al., 2022)。移植による神経回路の再生を実現するためには、軸索伸長において周辺組織に接着する細胞接着因子や軸索の伸長方向を制御する軸索誘導分子、アクチンやチューブリンといった細胞骨格分子、そして神経において情報伝達を担うシナプスの形成を誘導する分子が必要であると考えられる。

1-2. 神経細胞における細胞骨格の役割

細胞骨格は細胞の形状保持や細胞運動性において必要である。その細胞骨格を構成する主要なタンパク質の一つがアクチンである。単量体のアクチン (G-Actin) が重合することによって、アクチンフィラメントが形成されている。アクチンフィラメントには+端と-端があり、+端において G-Actin の重合が起りやすいことが分かっている。また、G-Actin の濃度によって重合と脱重合の起りやすさは異なり、G-Actin の濃度が低い場合は両端において脱重合反応が起りやすくなるためアクチンフィラメントは短縮し、G-Actin の濃度が高い場合には両端において重合反応が起りアクチンフィラメントは伸長する。またアクチンの特徴的な性質として、定常状態において、+端では重合反応が起りやすく、-端では脱重合反応が起りやすくなるため、アクチンフィラメントの全長は変わらないまま、+端方向への伸長が可能になる (Lappalainen, Kotila, Jégou, & Romet-Lemonne, 2022) (図 2A)。また、アクチンフィラメントはこのようなターンオーバーと Myosin II により、先端 (伸長方向) から細胞体側へと逆行性移動 (retrograde actin flow) していることが分かっている (Medeiros, Burnette, & Forscher, 2006)。アクチンの脱重合に関与する代表的なタンパク質として ADF/Cofilin ファミリーが知られており、ADF/Cofilin ファミリーは ADF (actin depolymerizing factor) や Cofilin1, Cofilin2 から成る。ADF/Cofilin はアクチンに結合しており、一端におけるアクチンの脱重合の促進やアクチンフィラメントの切断活性により、アクチンフィラメントの解体に寄与していることが明らかになっている (Maciver & Hussey, 2002)。これまでの研究によって、Cofilin は上皮細胞においてアクチンのターンオーバーを促進し (Carlier et al., 1997)、retrograde actin flow を亢進するこ

とが分かっている (Delorme et al., 2007)。

軸索の先端には成長円錐と呼ばれる構造が存在し、成長円錐は軸索の伸長やガイダンスにおいて重要な役割を果たしている (Lowery & Vactor, 2009)。成長円錐は主に微小管などが局在している中心部、細い突起である *Filopodia*、ベール状の突起である *Lamellipodia* に分かれている (図 2B)。*Filopodia* は束状のアクチンフィラメントによって形成されており、*Lamellipodia* は網目状のアクチンフィラメントによって形成されている。成長円錐先端での、アクチンターオーバーやミオシン II による retrograde actin flow の駆動力と、隣接した細胞や細胞外基質との接着を組み合わせることによって細胞膜が伸長方向へと押し出され、その結果として成長円錐が前進し、軸索伸長が起きていると考えられている (Dent & Gertler, 2003; Lowery & Vactor, 2009; Suter & Forscher, 1998; Vitriol & Zheng, 2012) (図 2C)。軸索伸長において重要な役割を果たしている成長円錐の *Filopodia* には、アクチンの脱重合を促進する *Cofilin* が局在しており、この ADF/*Cofilin* は発生における神経突起形成を制御していることがこれまでの研究によって明らかになっている (Flynn et al., 2012; Hylton, Heebner, Grillo, & Swulius, 2022)。また、マウスの損傷した坐骨神経において *Cofilin1* を過剰発現させることによって軸索伸長が誘導され、*Cofilin1* が神経再生を促進することが明らかになっている (Tedeschi et al., 2019)。

1-3. 神経細胞における細胞接着因子

神経の形態形成や適切な接続形成において、細胞接着因子は非常に重要な役割を果たしている。神経に関連する細胞接着因子として、自己認識によって軸索ガイダンスを制御する DSCAM (Schmucker & Chen, 2009)、軸索ガイダンスに関与する *Cadherins* や *Ephrin/Eph* (Kania & Klein, 2016; Takeichi, 2007)、シナプス形成に関与する *NCAM* (Togashi, Sakisaka, & Takai, 2009)、シナプス形成や神経伝達に関与する *SynCAM* (Biederer et al., 2002) やシナプス形成を誘導する *Neurexin/Neurologin* (Südhof, 2008)などが知られている。本研究では *N-cadherin* と *Neurexin* に注目した。

1-3-1. *N-cadherin*

Cadherin はカルシウム依存的な細胞間接着因子として発見された (S. C. Suzuki & Takeichi, 2008)。*Cadherins* は脊椎動物において 100 種類以上同定されており、古典的カドヘリン、デスモソームカドヘリン、プロトカドヘリン、*Flamingo/CELSRs* や *FAT* などがカドヘリンスーパーファミリーに分類されている。本研究で注目した、主に神経に発現する *N-cadherin* (*Ncad*) はカドヘリンスーパーファミリーのうち古典的カドヘリンに分類される (Takeichi, 2007)。*Ncad* は一回膜貫通型タンパク質であり、脊椎動物では細胞外に 5 つの繰り返し *cadherin domain* を持ち、細胞内に *juxtamembrane domain*

と catenin-binding domain を持っており、ホモフィリックに結合している (S. C. Suzuki & Takeichi, 2008)。また、Ncad は Catenins を介してアクチンフィラメントと結合していることが明らかになっている (Noordstra, Morris, & Yap, 2023; S. C. Suzuki & Takeichi, 2008)。脊椎動物において、Ncad は神経発生初期から発現していることが分かっている (Hatta & Takeichi, 1986)。ゼブラフィッシュの Ncad 変異体では、網膜の層構造や神経管の形成において形態異常が確認されており (Erdmann, Kirsch, Rathjen, & Moré, 2003; Lele et al., 2002)、RGCs の軸索誘導に関与していることも明らかになっている (Masai et al., 2003)。このように Ncad は、神経間の相互作用や神経突起の伸長において、重要な役割を果たしていることが示唆されている。

1-3-2. Neurexin

シナプス形成誘導因子の一つである Neurexin は、一回膜貫通型タンパク質であり、細胞外に LNS (Laminin-Neurexin-Sex hormone-binding) ドメインと上皮成長因子様ドメインを持ち、細胞内に PDZ ドメインを持つ (Südhof, 2008)。Neurexins は前シナプスに局在しており、哺乳類において Neurexins は Nrnx1, Nrnx2, Nrnx3 の 3 つの遺伝子にコードされると共に、3 つのプロモーター α , β , (γ) により α -neurexins や β -neurexins など多数のアイソフォームを持つ。Neurexins は、Neuroligins (Gomez, Traunmüller, & Scheiffele, 2021; Südhof, 2008)、Cerebellin (Uemura et al., 2010)、Dystroglycan (Sugita et al., 2001)、LRRTMs (de Wit et al., 2009; Ko, Fuccillo, Malenka, & Südhof, 2009; Siddiqui, Pancaroglu, Kang, Rooyackers, & Craig, 2010)、Latrophilin (Boucard, Ko, & Südhof, 2012) や Calsyntenin (Pettem et al., 2013) と結合していることが明らかになっており、この中でも Neurexins - Neuroligins について最も研究が進められている。Neuroligins は後シナプスに局在しており、 β -Neurexin と結合する分子として発見された (Ichtchenko et al., 1995)。Neurexin は Neuroligin をリクルートし、後シナプスの形成を誘導することが明らかになっている (Chih, Gollan, & Scheiffele, 2006; Graf, Zhang, Jin, Linhoff, & Craig, 2004)。また、Neuroligin が Neurexin をリクルートし、前シナプスの形成を誘導することも明らかになっている (Dean et al., 2003; Scheiffele, Fan, Choh, Fetter, & Serafini, 2000)。このようにシナプス形成を誘導することが示されている Neurexins - Neuroligins であるが、Nlgs (Nlg1-3) のトリプルノックアウトマウスにおいてシナプス数はほぼ正常であることが分かっており (Südhof, 2008; Varoqueaux et al., 2006)、シナプス形成には Neurexins - Neuroligins だけでなく、他の因子も関与している可能性が考えられる。

1-4. シナプス構成因子と形成メカニズム

神経細胞から他の細胞へのシグナル伝達は神経伝達物質を介して行われており、この情報伝達が行われている接続部分はシナプスと呼ばれている。シナプスでは、前シナプスから神経伝達物質がシナプス間隙へと放出され、後シナプスへとシグナル伝達

が行われている (図 3A)。前シナプスにはシナプス小胞が存在し、シナプス小胞が Ca^{2+} の流入により前終末と融合することによって神経伝達物質が放出されている。前シナプスの末端には比較的電子密度が高い活性帯という構造が確認されており、神経伝達物質の放出に関与していることが分かっている (Burns & Augustine, 1995)。活性帯は生物種や組織によって形態が異なり、ショウジョウバエでは T-bar と呼ばれている (Zhai & Bellen, 2004)。

脊椎動物において活性帯の構成タンパク質として、足場タンパク質である Piccolo や Bassoon (Gundelfinger, Reissner, & Garner, 2016)、RIMs (Rab3-interacting molecule)、Munc-13、ELKS/CAST や Liprin- α が同定されている (Südhof, 2012)。活性帯構成タンパク質について、ショウジョウバエや *C.elegans* でも研究が進んでいる。脊椎動物 ELKS/CAST のショウジョウバエホモログとして Bruchpilot (Brp) が同定されており、Brp は T-bar の形成とシナプスの成熟に重要であることが明らかになっている (Fouquet et al., 2009; Kittel et al., 2006; Wagh et al., 2006)。また足場タンパク質である DSyd-1 や Syd-2 / DLiprin- α が見つかっている (Kaufmann, DeProto, Ranjan, Wan, & Van Vactor, 2002; Oswald et al., 2010)。また、前シナプスへの Ca^{2+} の流入を調節する電位依存性カルシウムチャネルとして Cacophony (Cac) が同定されている (Kawasaki, Zou, Xu, & Ordway, 2004) (図 3B)。

活性帯の形成メカニズムについても研究が進められており、活性帯の形成について、*C.elegans* やショウジョウバエ神経筋接合部において研究が進んでいる。DSyd-1 は活性帯形成の初期から活性帯に局在し (Oswald et al., 2010)、Syd-2 / DLiprin- α を活性帯にリクルートすると共に、活性帯の主要な構成タンパク質である Brp をリクルートすることが明らかになっている (Dai et al., 2006)。また、ショウジョウバエの視覚において、長時間の自然光の暴露により活性帯が可逆的に解体されることが明らかになっており、活性帯構成タンパク質の中でも、Brp は解体され、DSyd-1 や Cac は解体されないことが明らかになっている (Sugie et al., 2015)。

1-5. ショウジョウバエ視覚系の構造

本研究ではショウジョウバエの視覚系を用いて実験を行った。ショウジョウバエの複眼は~750個の ommatidia (個眼) によって構成されており、視覚中枢である optic lobe へと接続している (図 4A)。Ommatidia は、視細胞の他に cone cell、pigment cell や bristle などにより形成されており、光刺激を受容する rhabdomere を中心に視細胞の細胞体が位置し、視細胞の周りを cone cell、pigment cell や bristle が取り囲む構造をとっている (図 4B)。視細胞は 8 種類 (R1-R8) あり、それぞれ異なるロドプシン (Rhodopsin :Rh) を発現している。R1-R6 は Rh1 を発現し、物体の動きの検知に関与している。R7 は紫外線感受性の Rh3/Rh4 を、R8 は青色光感受性の Rh5 もしくは緑色

感受性の Rh6 を発現しており、R7-R8 は色覚に関与している。ショウジョウバエの視覚中枢である optic lobe は層構造をとっており、網膜である Retina、脳内の神経節である Lamina、Medulla、Lobula、Lobula plate に分かれている。R1-R6 は、Retina から Lamina へと軸索を投射し、Lamina において Lamina ニューロンに接続している。R7、R8 は Retina から Lamina を通過し、Medulla に投射している。Medulla は M1-M10 層に分かれており、R7 は Medulla の M6 層に軸索を投射し、R8 は Medulla の M3 層に軸索を投射している (Fischbach & Dittrich, 1989) (図 4A)。

ショウジョウバエの複眼は、三令幼虫の成虫原基である eye disc から形成される。eye disc では、morphogenetic furrow と呼ばれる形態形成溝が posterior から anterior へ移動することによって細胞が分化している (図 5)。Morphogenetic furrow の通過により、proneural 遺伝子 *Atonal* が *Sensless* の発現を誘導し (Frankfort, Nolo, Zhang, Bellen, & Mardon, 2001)、まず視細胞 R8 の分化が誘導される。R8 への分化後、R2/5、R3/4、R1/6 への分化が進み、最後に R7 と順番に分化している (Tomlinson & Ready, 1987)。神経特異的に発現する *elav* や転写因子 *glass* は、morphogenetic furrow が通過した細胞において発現が確認されている (Moses & Rubin, 1991; Warren & Kumar, 2023)。

1-6. ショウジョウバエを用いた移植

移植による視神経の再生を実現するために、ショウジョウバエを用いて研究を行った。ショウジョウバエを用いるメリットは、視覚系の構造だけではない。これまでにショウジョウバエ視覚系において軸索誘導や伸長について解析が行われており、関連する分子について多数報告されている (Hakeda-Suzuki, Takechi, Kawamura, & Suzuki, 2017; Takechi et al., 2021; Zang, Chaudhari, & Bashaw, 2021)。また、遺伝子を容易に操作できるツールがショウジョウバエでは揃っていることから、様々な遺伝子について検討することが可能であり、移植に用いるモデル生物として適していると言える。これまでの研究によって、ショウジョウバエの視神経前駆細胞を含む eye disc を分解・培養し、培養した神経前駆細胞をショウジョウバエ成虫の Retina に移植する方法が確立されている (T. Suzuki, Oochi, Hakeda-Suzuki, & Suzuki, 2018) (図 6A)。また細胞接着因子である *N-cadherin* (*Ncad*) を過剰発現させた細胞を移植したところ、軸索伸長が促進されることが明らかになっているが、網膜である Retina を越えて脳である Lamina までの軸索伸長はほとんど確認されていない (T. Suzuki et al., 2018)。本研究では、アクチン関連因子と細胞接着因子に注目した。

1-7. アクチン関連因子: Twinstar

Twinstar (Tsr) は、細胞骨格であるアクチンの脱重合に関与する ADF/Cofilin のホモログである。哺乳類において Cofilin は 3 種類同定されているが、ショウジョウバエに

においては Tsr のみである (Gunsalus et al., 1995)。Tsr は卵巣の発生や卵形成に関与しており、ショウジョウバエにおいても細胞運動において重要な役割を果たしていることが示唆されている (J. Chen et al., 2001)。Tsr 変異体では、Retina の短縮やショウジョウバエの記憶中枢であるキノコ体ニューロンの増殖や軸索伸長の阻害が引き起こされることが分かっている (Ng & Luo, 2004; Pham, Yu, & Laski, 2008)。また、細胞が適切に整列するために必要な平面内細胞極性に異常が見られ、ommatidia や翅の毛の配向性など形態形成において異常が確認されている (Blair et al., 2006)。Tsr は、適切な形態形成において重要な役割を果たしていることが明らかになっている。

1-8. 細胞接着因子: N-cadherin

Cadherins はショウジョウバエにおいても同定されている。古典的な Cadherins として、主に上皮組織において発現している E-cadherin (Ecad) と神経系において発現している N-cadherin (Ncad) が見つかり、Ncad は脊椎動物の Cadherin や Ecad と比較して、細胞外に多くの繰り返し extracellular domain を持っていることが明らかになっている (Iwai et al., 1997; Oda, Uemura, Harada, Iwai, & Takeichi, 1994)。Ncad は胚の段階から発現しており (Iwai et al., 1997)、脳全体に分布すると共に、シナプスにも局在していることが明らかになっており、Ncad の発現が低下したハエの脳内構造は乱れ生じることが確認されている (Iwai et al., 2002)。また、Ncad の発現により視神経の適切な投射が制御されていることが明らかになっており、Ncad が適切な神経回路の形成に関与していることが示唆されている (Takeichi, 2007; Trush et al., 2019)。Ncad が軸索の安定化に寄与していることも示唆されている (Mehmet Neset Özel, Langen, Hassan, & Hiesinger, 2015)。

1-9. 細胞接着因子: Neurexin-1

移植による神経回路の再生において、軸索を伸長するだけでなく、シナプスを形成する必要がある。そこで、本研究ではシナプスの形成を誘導する因子として、Neurexin-1 (Nrx-1) に注目した。シナプス誘導因子である Nrx-1 は、 α -neurexin のショウジョウバエホモログであり、哺乳類と同様にシナプスの形成を制御していることが明らかになっている (Li, Ashley, Budnik, & Bhat, 2007; Zeng et al., 2007)。また、Nrx-1 は光伝達において重要なロドプシンの成熟や、微小管の安定化に関与していることが報告されている (Banerjee & Riordan, 2018; Tian et al., 2013)。

2. 材料と手法

2-1. ショウジョウバエの餌の組成

水 1 L あたり、大豆 15 g、寒天 10 g、コーンミール 100 g、酵母 30 g、モルト 30 g、グルコース 50 g を入れ、90°C で 1 時間煮詰めた。最後にエタノール 5 mL、プロピオン酸 2 mL、ニパギン 2.5 g を入れ、これらをバイアル及びボトルに分注した。

2-2. ショウジョウバエの飼育

ショウジョウバエは、餌を底に 2 cm 敷いたバイアル又はボトルで飼育した。実験に使用したショウジョウバエは温度 25°C、湿度 60% に設定されたインキュベータ内で飼育した。ショウジョウバエのストックの保管は温度 18°C、湿度 60% で行った。

2-3. 脳の観察

二酸化炭素によって眠らせたショウジョウバエを 0.1%PBT 溶液 (0.1% Triton X-100 + PBS) 内でピンセットを用いて解剖し、脳のみを取り出した。取り出した脳を固定液 (4% Paraformaldehyde + 0.1% PBT) に移し、25°C のインキュベータ内でニューテータを用いて 50 分間固定した。0.1%PBT 溶液に移し替え、25°C で 30 分間洗浄後、1 次抗体溶液 (1 次抗体 + 0.1%PBT 溶液) に移し替え、4°C のインキュベータ内でニューテータを用いて一晩インキュベートした。0.1%PBT 溶液により 25°C で 1 時間洗浄し、2 次抗体溶液 (2 次抗体 + 0.1%PBT 溶液) に移し替え、25°C で 50 分間インキュベートした。0.1%PBT 溶液に移し替え、25°C で 2 時間洗浄し、PBS 溶液で洗浄後、ベクターシールドに移し替え、4°C で保存した。観察する際は、背側を下向きにしてスライドガラス上に並べ、カバーガラスで覆い、正立共焦点顕微鏡で観察を行った。

2-4. 免疫染色

本実験において使用した抗体、使用濃度、時間を以下に示す。

抗体	使用濃度	温度・時間
【1 次抗体】		
mAb24B10 (DSHB)	1:50	4°C, 一晩
4C5 (rhodopsin 1) (DSHB)	1:50	4°C, 一晩

【2次抗体】		
Alexa Fluor 488 goat anti-mouse IgG (invitrogen)	1:400	25°C, 50 min or 1 h
Alexa Fluor 568 goat anti-mouse IgG (invitrogen)	1:400	25°C, 50 min or 1 h
Alexa Fluor 633 goat anti-mouse IgG (invitrogen)	1:400	25°C, 50 min or 1 h

2-5. 視神経前駆細胞の網膜への移植

三令幼虫からの複眼原基の抽出

70%エタノールにより使用する器具を消毒後、PBS により三令幼虫に付着した餌などの不純物を洗浄した。その後、PBS 中で解剖し、抽出した複眼原基を 1.5 mL チューブに回収した。これ以降の手順はクリーンベンチ内で行った。

初代培養

1.5mL チューブ内の PBS を取り除き、Neuro-culture 溶液 (Schneiders medium (Gibco), 20 (v/v)% FBS, 0.02 (v/v)% Insulin (SIGMA), pH 6.7~6.8) 100 μ l を加え、洗浄した。Neuro-culture 溶液を取り除き、Dispersion 溶液 (1xHBSS, 1.5 (v/v)% Penicilin/streptomycin, 0.005 (w/v)% N-phenylthiourea, 0.1(w/v)% collagenase (Worthington), 0.5 (w/v)% dispase (Roche)) 100 μ l を加え、40 回程度ホモジナイザーによって複眼原基をすりつぶし、遮光下において 37°C、4 分間静置した。Neuro-culture 溶液 200 μ l を加え、Dispersion 溶液による反応を停止させると同時に、ピペッティングにより細胞を分解した。3000 rpm で 5 分間遠心し、上澄みを取り除き、再び Neuro-culture 溶液 35 μ l を加え、ピペッティングにより沈殿した細胞塊をほぐした。チャンバー (図 6B) の穴の中心に、細胞塊を含む Neuro-culture 溶液を移した。Concanavalin A (Wako) によりコーティングしたカバースリップの縁にワセリンを塗り、チェンバーの上に被せた。湿度が保たれた遮光ケース内 (25°C) で、カバースリップを下にした状態で 1.5 時間、カバースリップを上にした状態で 2.5 時間培養した。

成虫の網膜への移植

移植には、ガラスキャピラリー (0.75 mm I.D. 1 mm O.D. NARISHIGE) をプーラー (NARISHIGE) により 61°C で 1 回引き後、研磨機によって先端を 15° に削ったものをガラスマイクロピペットとして用いた。正立型蛍光顕微鏡 (Axio Plan2, ZEISS) 下で、Mineral oil (Sigma) を充填した油圧式マイクロインジェクター (NARISHIGE) を用いて、カバースリップに付着し RFP を発現している細胞塊 (図 6C) をガラスマイクロピペットにより吸引した。吸引した細胞を、パラフィルムによって頭部が固定された生後 1

日以内の成虫（図 6D,E）のショウジョウバエの網膜内に刺し、細胞塊を移植した（図 6F）。また、Retina の乾燥を防ぐためにガラスキャピラリーによる細胞の移植後、刺した部分にワセリンを塗った（図 6G）。

アガロースセクション法による移植細胞の観察

移植後 25°C で飼育したショウジョウバエを、二酸化炭素によって眠らせた状態で 0.1%PBT 溶液に浸したのち、口吻・翅・脚をピンセットにより取り除いた。口吻・翅・脚が取り除かれたハエを固定液に入れ、4°C のインキュベータ内でニューテータを使用し、一晩固定を行った。固定後、0.1%PBT 溶液により 25°C で 30 分間洗浄後、PBS 溶液に移し替えた。移し替えたハエを 6%低温ゲル化寒天（nacalai tesque）内に包埋し、4°C で凝固させた。リニアスライサーを用いて、包埋したハエをアガロースセクション法により、80 μm の切片にした（図 7A,B）。切片を 1 次抗体溶液に移し、4°C のインキュベータ内でニューテータを用いて一晩インキュベートした。0.1%PBT 溶液により 25°C で 30 分間洗浄後、2 次抗体溶液に移し替え、25°C で 1 時間インキュベートした。0.1%PBT 溶液により 25°C で 30 分間洗浄後、PBS 溶液で洗浄し、ベクターシールドに移し替え、4°C で保存した。

2-6. 顕微鏡と画像解析

顕微鏡は共焦点顕微鏡システム（ニコン製スキャナー: C2+または A1、顕微鏡: Ni-E、防振台）を使用し、20 倍もしくは 40 倍の対物レンズにより撮影した。画像解析には NIS-Elements AR Analysis、Imaris または Adobe Photoshop を使用した。軸索数、シナプス数の解析は、統計ソフト R（R Core Team (2023). *_R: A Language and Environment for Statistical Computing*, R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria）を用いてフィッシャーの正確確率検定を行った。

2-7. CRISPR/Cas9 によるノックイン体の作製

CRISPR/Cas9 システムとゲノムの修復機構を利用して、ノックイン体を作製した。目的遺伝子の stop コドンの前後の配列周辺において PAM 配列（G-(20bp)-GG）を探し、pBFv-U6.2 (Kondo and Ueda, 2013) に挿入できるようにフォワードプライマー、リバースプライマーを設計した。gDNA の作製では、サーマルサイクラーを用いて設計したオリゴヌクレオチドをアニーリングし、そのアニーリング断片とプラスミド pBFv-U6.2 を制限酵素 Bpi I により切断した。Ligation high Ver.2 (TOYOBO) を用いて精製したアニーリング断片とプラスミドを結合させることによって gDNA を作製した。また、FRT-stop-FRT-GFP-loxP-miniwhite-loxP を目的遺伝子の C 末端にノックインするためのプラスミドを作製した。FRT-stop-FRT-GFP-loxP-miniwhite-loxP を有したプラスミドを

制限酵素により切断し、目的遺伝子の stop コドンの前後約 700 bp を PCR により増幅し、この断片を Ligation high Ver.2 (TOYOBO)を用いてライゲーションにより挿入した。このプラスミドを大腸菌 (stable 3) に形質転換し、LB 寒天培地 (LB Broth with agar (Lenox) 0.875 g、MilliQ 25 mL、アンピシリンナトリウム 50 µl) において 37°C で一晩培養した。培養した大腸菌を LB 液体培地 (LB Broth with agar (Lenox)0.875 g、MilliQ 25 mL、アンピシリンナトリウム 50 µl) に植菌し、37°C で一晩培養した。培養した大腸菌から Plasmid Mini Kit により、プラスミドを精製した。精製したプラスミドのショウジョウバエへのインジェクションを wellgenetics (台湾) に委託した。インジェクションしたショウジョウバエをバランサーと掛け合わせるにより、系統化を行った。その後、KOD Fx Neo (TOYOBO) を用いて系統化したショウジョウバエの DNA 抽出を行い、PCR により遺伝子導入した領域を増幅し、シーケンス解析を行うことにより、ノックインの成否を確認した。

以下に使用したプライマーを示す。

CTTCGTGTATCTGTGGCTTTGCGA	gDNA (Brp) F
AAACTCGCAAAGCCACAGATACAC	gDNA (Brp) R
TATAGCTAGCCAAGGACATCGAGGAAAAGGA	Brp (pre) F
TATAGCTAGCGAAAAAGCTCTTCAAGAAGCCA	Brp (pre) R
TATAGGTACCACAGTGCCCTCCCAAAGC	Brp (post) F
TATAGGTACCGGTCCAAAGCAGCACTCAAT	Brp (post) R

(F: フォワードプライマー、R: リバープライマー)

2-8. ショウジョウバエの遺伝型

図番号	遺伝型
図 6C	UAS-FLP; GMR-FsF-Gal4, UAS-myr-RFP/+; <i>elav</i> -Gal4/+
図 7C,D	w
図 8A	GMR-myr-RFP
図 8B	UAS-FLP/UAS-FLP or Y; GMR-FsF-Gal4, UAS-myr-RFP/+; <i>elav</i> -Gal4/+
図 9A	w
図 9B	UAS-FLP/UAS-FLP or Y; GMR-FsF-Gal4, UAS-myr-RFP/+; <i>elav</i> -Gal4/+

☒ 11A	UAS-FLP/UAS-FLP or Y; GMR-FsF-Gal4, UAS-myr-RFP/UAS- <i>Ncad</i> ; <i>elav-Gal4</i> /(MKRS)
☒ 11B,C	UAS-FLP/UAS-FLP or Y; GMR-FsF-Gal4, UAS-myr-RFP/+; <i>elav-Gal4</i> /UAS- <i>tsr</i>
☒ 11D	UAS-FLP/UAS-FLP or Y; GMR-FsF-Gal4, UAS-myr-RFP/UAS- <i>Ncad</i> ; <i>elav-Gal4</i> /UAS- <i>tsr</i>
☒ 14A	UAS-FLP/UAS-FLP or Y; GMR-FsF-Gal4, UAS-myr-RFP/ UAS- <i>Ncad</i> ; <i>elav-Gal4</i> /UAS- <i>tsr.S3A</i>
☒ 14B	UAS-FLP/UAS-FLP or Y; GMR-FsF-Gal4, UAS-myr-RFP/ UAS- <i>Ncad</i> ; <i>elav-Gal4</i> / UAS- <i>tsr.S3E</i>
☒ 16C	<i>ey3.5</i> -FLP/+; BrpFsFGFP/+; +/+
☒ 17A-C	UAS-FLP/UAS-FLP or Y; GMR-FsF-Gal4, UAS-myr-RFP/UAS- <i>Ncad</i> ; <i>elav-Gal4</i> /UAS- <i>tsr</i> ; BrpFsFGFP
☒ 18A,B	UAS-FLP/UAS-FLP or Y; GMR-FsF-Gal4, UAS-myr-RFP/UAS- <i>Ncad</i> , UAS- <i>Nrx-1</i> -SAM; <i>elav-Gal4</i> /UAS- <i>tsr</i> ; BrpFsFGFP
☒ 18C,D ☒ 20A,B	UAS-FLP/UAS-FLP or Y; GMR-FsF-Gal4, UAS-myr-RFP/ UAS- <i>Nrx-1</i> -SAM; <i>elav-Gal4</i> / BrpFsFGFP
☒ 18E,F ☒ 20C,D	UAS-FLP/UAS-FLP or Y; GMR-FsF-Gal4, UAS-myr-RFP/UAS- <i>Nrx-1</i> -SAM; <i>elav-Gal4</i> /UAS- <i>tsr</i> ; BrpFsFGFP
☒ 22A	w
☒ 22B,C	UAS-FLP/UAS-FLP or Y; GMR-FsF-Gal4, UAS-myr-RFP/UAS- <i>Ncad</i> ; <i>elav-Gal4</i> /UAS- <i>tsr</i>
☒ 23A,B	UAS-FLP/UAS-FLP or Y; GMR-FsF-Gal4, UAS-myr-RFP/+; <i>elav-Gal4</i> /BrpFsFGFP

3. 結果

3-1. 移植方法の改良による軸索伸長

移植する細胞を選別するために、これまでは GMR-myr-RFP が用いられていた (T. Suzuki et al., 2018)。GMR (Glass Multimer Reporter) は、転写因子 Glass の結合部位であり、ショウジョウバエ Rh1 のプロモーターに由来する配列である (Ellis, O'Neill, & Rubin, 1993; Hay, Wolff, & Rubin, 1994)。GMR の転写因子である Glass は、神経細胞である視細胞だけでなく、非神経細胞である眼の cone cells や pigment cells においても発現が確認されており、非神経細胞の分化促進に関与していることが明らかになっている (Ellis et al., 1993; Morrison, Chen, Cook, Brown, & Treisman, 2018; Moses & Rubin, 1991)。このことから GMR-myr-RFP による標識では、移植した細胞内に非神経細胞も含まれていたと考えられる。従来の標識方法では移植細胞における視細胞の割合が低く、軸索の束状化が非神経細胞によって妨げられていたために、移植細胞の軸索伸長は Retina にとどまっていたと考えた。

ショウジョウバエ用いた移植では、まず初めに三令幼虫から eye disc を取り出し、分解・培養した後、培養した細胞を成虫へと移植する (図 6A)。本研究では、アガロースセクション法より切片を作成し、Retina、Lamina、Medulla を観察した (図 7C,D)。ショウジョウバエの視覚系では、複眼の一部である Retina から視細胞が軸索を伸ばし、脳内の神経節である Lamina、Medulla へと軸索を投射している。本研究では成虫の Retina に細胞を移植したことから、移植した細胞は Lamina もしくは Medulla に軸索を投射することが期待された。視覚を構成する細胞のうち神経細胞である視細胞のみをラベルするために、神経特異的に発現する *elav-Gal4*、UAS-FLP、GMR-FRT-stop-FRT-Gal4 と UAS-myr-RFP を組み合わせ、移植細胞を標識した (以下 *elav-FLP GMR-FsF-Gal4* と省略)。*elav-Gal4* と GMR-FRT-stop-FRT-Gal4 を組み合わせることで、神経細胞のみを標識するだけでなく、移植細胞における RFP の発現を強め、細胞を可視化しやすいようにした。

eye disc において、*elav-FLP GMR-FsF-Gal4* によって標識された細胞を確認したところ、GMR-myr-RFP を用いた場合と比較して、ラベルされた視細胞は減少した (図 8A,B)。GMR-myr-RFP を用いて標識された細胞を移植した場合、軸索伸長は Retina にとどまっており、Lamina への軸索投射は確認されていなかった (T. Suzuki et al., 2018)。*elav-FLP GMR-FsF-Gal4* を用いて標識した細胞を移植した結果、Retina において移植細胞が観察されたとともに、移植したハエのうち 18.9% の個体において lamina への軸索伸長が確認された (図 9A,B)。移植する細胞の中の視細胞の割合が高まったために Lamina の伸長が確認されたと考えられる。

3-2. 移植細胞での *Ncad* と *Tsr* の過剰発現により軸索伸長は促進される

elav-FLP GMR-FsF-Gal4 により標識した細胞の *Lamina* への軸索到達率を向上させるため、細胞接着因子もしくは細胞骨格分子を過剰発現させた細胞の移植を試みた。本研究では、UAS 配列の下流の遺伝子の発現を誘導する *Gal4/UAS* システム (Brand & Perrimon, 1993) を用いて、三令幼虫の *eye disc* において目的の遺伝子を過剰発現させることで、目的の遺伝子を過剰発現した移植細胞を作製した (図 10)。

これまでの研究によって細胞接着因子である *Ncad* を過剰発現させた細胞の移植により、*Retina* において軸索伸長が促進されることが明らかになっている (T. Suzuki et al., 2018)。そこで、*elav-FLP GMR-FsF-Gal4* により標識した細胞において *Ncad* を過剰発現させることによって *Lamina* への到達率の増加を試みた。*Ncad* を過剰発現させた細胞を移植した結果、39.3%のハエにおいて *Lamina* への軸索伸長が見られたものの、コントロールと比較して有意差が認められなかった (図 11A,E、図 12A)。

そこで *Lamina* への軸索伸長をさらに促進するために、*Twinstar (Tsr)* に注目した。*Tsr* は *ADF/Cofilin* のハエホモログであり、アクチンダイナミクスに関与するタンパク質の一つで、アクチンの脱重合・切断に関与している。これまでの研究において、マウスの損傷した神経細胞において *Tsr* のマウスホモログである *Cofilin1* の過剰発現により神経の再生が促進されることが明らかになっている (Tedeschi et al., 2019)。そこで、*tsr* を過剰発現させた細胞の移植を試みた。*Tsr* のみを過剰発現させた細胞を移植した結果、30.8%のハエにおいて *Lamina* への軸索伸長が見られたが、コントロールと比較して有意差が認められなかった (図 11B,E、図 12A)。なお、*Tsr* を過剰発現させることによって1ケースにおいて *Lamina* を越えて *Medulla* の M2-3 層への軸索伸長が見られた (図 11C)。

Ncad もしくは *Tsr* の過剰発現により *Lamina* への軸索伸長が促進されると考えていたが、コントロールと比較して有意な差は見られなかった (図 12A)。そこで周辺組織との接着を促進する *Ncad* とアクチンの脱重合・切断により駆動力を生む *Tsr* を組み合わせることによって軸索伸長が促進されるのではないかと考え、*Ncad* と *Tsr* を過剰発現した細胞の移植を試みた。*Ncad* と *Tsr* を過剰発現させた細胞を移植した結果、73.1%のハエにおいて *Lamina* への軸索が確認された (図 11D)。コントロールや *Ncad* 単体と比較すると、*Ncad* と *tsr* の過剰発現によって有意に軸索伸長が促進されたことが分かった (図 12A) (Controlは 18.9%)。

一個体あたりの *Lamina* へ伸長した軸索数についても比較した。コントロールでは、10 本以上の *Lamina* への軸索伸長は見られなかったが、*Ncad* もしくは *Tsr* を発現させることによって、10 本以上軸索を *lamina* へ伸長した個体が確認された。そして *Ncad* と *Tsr* を過剰発現させることによって移植した個体のうち約 40%の個体で 5 本以上 *Lamina* へ軸索伸長しており、*Lamina* へ伸長した軸索数の増加も見られた (図 12B)。

これらの結果から、細胞接着因子である *Ncad* とアクチンの再編成を促進する *Tsr* を

組み合わせることによって、Retina を越えて lamina への軸索伸長が促進されることが示唆された。

3-3. アクチンの再編成と安定化は軸索伸長において重要である

Cofilin は 3 番目のセリン残基がリン酸化されることによって不活性化され、脱リン酸化されることによって活性化する (Agnew, Minamide, & Bamburg, 1995; Moriyama, Iida, & Yahara, 1996)。Cofilin のリン酸化・脱リン酸化には LIM-kinase (LIMK) や Testicular Protein Kinase 1 (TESK1)、Slingshot (SSH)、Chronophin (CIN) が関わっており、LIMK や TSK1 によるリン酸化によって不活性化され (Arber et al., 1998; Toshima et al., 2001; Yang et al., 1998)、SSH や CIN により脱リン酸化されることによって活性化されることが分かっている (Gohla, Birkenfeld, & Bokoch, 2005; Niwa, Nagata-ohashi, Takeichi, Mizuno, & Uemura, 2002)。ADF/Cofilin のハエホモログである Tsr においても、DLIMK や Center divider (Cdi) によってリン酸化された Tsr は不活性になり、SSH によって脱リン酸化された Tsr は活性を持つ (Matthews & Crews, 1999; Niwa et al., 2002; Ohashi, Hosoya, Takahashi, Hing, & Mizuno, 2000; Siudeja, Grzeschik, Rana, de Jong, & Sibon, 2012) (図 13A)。活性型 Tsr はアクチンフィラメントに結合、脱重合を促進し、不活性型 Tsr はアクチンに結合できず、アクチンフィラメントの安定化に寄与する (図 13B)。そこで、移植した細胞の Lamina への軸索伸長において、活性型 Tsr によって軸索伸長は促進されるのか、反対に不活性型 Tsr によって軸索伸長が抑制されるのか調べるため、Tsr の活性型／不活性型を過剰発現させた細胞を移植した。

ハエの他の神経系であるキノコ体では、活性型の Tsr (Tsr.S3A) は Tsr 欠損を野生型と同程度レスキューすることができ (Ng & Luo, 2004; Sudarsanam, Yaniv, Meltzer, & Schuldiner, 2020)、マウスにおいては活性型 Cofilin1 が野生型と比較して同程度軸索伸長を促進することが明らかになっている (Tedeschi et al., 2019)。活性型を模した *tsr.S3A* と *Ncad* を過剰発現させた細胞を移植した結果、52%のハエにおいて Lamina への軸索伸長が確認された (図 14A)。活性型 Tsr とは反対に、不活性型 Tsr は Tsr 欠損を十分にレスキューできないことがハエで知られている (Ng & Luo, 2004; Sudarsanam et al., 2020)。しかし不活性型を模した *tsr.S3E* と *Ncad* を過剰発現させた細胞を移植した場合においても、50%のハエにおいて Lamina への軸索伸長が見られた (図 14B)。

Ncad と活性型 Tsr の軸索到達率 (52%) と *Ncad* と不活性型 Tsr の軸索到達率 (50%) は、*Ncad* のみの過剰発現と比較すると有意な差はないものの、コントロールと比較すると有意な差があることから、活性型もしくは不活性型に関わらず、*Ncad* と活性型／不活性型 Tsr の過剰発現は軸索伸長を促進する傾向があるといえる (図 15A)。しかし、最も軸索伸長を促進する傾向があるのは *Ncad* と野生型 Tsr を過剰発現させたときであり、伸長した軸索数についても活性型／不活性型 Tsr を過剰発現した時よりも 10 本以

上の割合が高かった (図 15B)。

移植において、活性型 *Tsr* もしくは不活性型 *Tsr* と *Ncad* の組み合わせは野生型 *Tsr* と *Ncad* のときと同程度の軸索伸長を起こさなかったことに加えて、*Lamina* に到達した軸索数には差が見られた。これらの結果から、*Tsr* のリン酸化と脱リン酸化状態が可逆的に変化することが軸索伸長の促進に重要である可能性が示された。

3-4. *Lamina* へ伸長した軸索において前シナプス構造は形成されている

神経回路を再生させるためには、軸索伸長した後に、シナプスが形成されなければならない。移植細胞から *Lamina* へと伸長した軸索においてシナプスが形成されているかどうか調べるため、前シナプスの指標として *Brp* を用いた。*Brp* は前シナプスに存在する活性帯の構成タンパク質の一つである (図 16A)。これまでに FRT 配列を標的とする組換え酵素 FLP により FRT 配列で挟まれた領域の組換えを誘導することができる FLP-FRT システム (Golic & Lindquist, 1989) を用いて、細胞特異的に *Brp* を標識する STaR 法が確立されており (図 16B)、STaR 法を用いて標識された *Brp* は、電子顕微鏡によって観察される T-bar の数や分布とおおよそ一致していることが分かっている (Y. Chen et al., 2014)。近年では、シナプスの構築・解体のマーカーとして *Brp* が用いられており、シナプス形成に関与する因子の同定に繋がっていることから、*Brp* は前シナプス形成の指標として適している (Araki et al., 2020; Osaka et al., 2022; Sugie et al., 2015)。*Lamina* においても、内在性の *Brp* を点状に観察することができる (図 16C)。そこで FLP-FRT システムを用いて移植細胞特異的に *Brp* をラベルすることによって、*Lamina* まで伸長した軸索における前シナプス形成について移植から 3 日後に観察した。

伸長した軸索における前シナプスの形成を観察するため、GFP-fused *Brp* (*Brp*-GFP) を移植細胞特異的に発現させ、移植を行った。*Ncad* と *Tsr* を過剰発現すると共に *Brp*-GFP を発現した細胞を移植した結果、3 日後には *Lamina* へと伸長した軸索全体に *Brp*-GFP シグナルが確認された。しかし、3 日後において点状のシグナルは確認されず、GFP シグナルは移植細胞の細胞膜マーカーである RFP シグナルと一致しており、伸長した軸索において、前シナプスの形成は十分に誘導されていなかった (図 17A)。移植から固定までの期間が短かったために前シナプス形成が誘導されなかったのではないかと考え、次に移植から固定までの期間を 6 日後に伸ばし実験を行った。6 日後に観察した結果、3 日後と同様に軸索全体に *Brp*-GFP シグナルが確認された個体もあつた一方で、*Lamina* までの軸索伸長が見られた個体のうち 2 個体において *Lamina* で RFP シグナルと一致しない点状の GFP シグナルが見られ、前シナプス構造の形成が確認された (図 17B,C, n = 2/5)。

以上のことから *Ncad* と *tsr* を過剰発現させることによって軸索伸長は促進されるものの、前シナプスの形成に至るまでに 6 日間という比較的長い期間が必要であること

分かった。

3-5. *Nrx-1* はシナプス形成だけでなく、軸索伸長も促進する

Lamina へ伸長した軸索におけるシナプス形成効率を上げるために、*Ncad* と *tsr* に加えて、*Neurexin-1* (*Nrx-1*) を発現させた細胞の移植を試みた。*Neurexins* は前シナプスに局在する細胞接着因子の一つであり、シナプス形成を誘導することが知られている (Gomez et al., 2021)。ショウジョウバエ *Nrx-1* についても、シナプスの形成において必要なことが明らかになっており、胚から成虫まで幅広く発現していることが分かっている (Li et al., 2007; Zeng et al., 2007)。

Ncad と *tsr*、*Nrx-1* を過剰発現すると共に *Brp* をラベルする細胞を移植し、3 日後に観察した。その結果、69.6%の個体において Lamina までの軸索伸長が確認された (図 18A)。そして、Lamina において点状の *Brp*-GFP シグナルが見られ、移植した個体のうち 26.1%において前シナプス構造の形成を確認できた (図 18B、図 19A,C、n = 6/23)。*Ncad* と *tsr* を過剰発現させた場合と比較して、前シナプス構造の形成促進の傾向は見られるものの、有意差が見られなかったことから、*Nrx-1* のみ過剰発現させた細胞の移植を行った (図 19C)。*Nrx-1* のみ過剰発現させた細胞を移植した結果、65%の個体において Lamina への軸索伸長が確認され、移植した個体のうち 30%において前シナプス構造の形成を確認できた (図 18C,D、図 19A,C、n = 6/20)。

Nrx-1 のみ過剰発現した細胞の移植において、Lamina への到達率は 65%とコントロールと比較して有意差も見られ (図 19B)、*Nrx-1* がシナプス形成効率を上げるだけでなく、軸索伸長に関与している可能性が示唆された。そこで、細胞骨格の再編成を促す *Tsr* と細胞接着分子である *Nrx-1* を組み合わせることによってラミナへの軸索到達率が向上するのではないかと考え、*tsr* と *Nrx-1* を過剰発現させた細胞の移植を試みた。*tsr* と *Nrx-1* を過剰発現した細胞の移植により、移植したハエのうち 76.2%において Lamina への軸索伸長が確認され、最も高い割合を示した (図 18E、図 19B)。そして、移植した個体のうち 52.4%において点状の *Brp*-GFP シグナルが見られ、前シナプス構造の形成を確認できた (図 18F、図 19A,C、n = 11/21)。また一個体あたりの伸長した軸索数をみると、*Nrx-1* のみの過剰発現において 10 本以上の割合が最も高かった (図 19D)。

Nrx-1 を導入することによって、前シナプス構造の形成までの期間が短縮された。また、前シナプスの形成を誘導するために導入した *Nrx-1* であったが、*Nrx-1* を追加したすべての組合せで軸索伸長と前シナプス形成の両方を促進する傾向が見られた。特に *Nrx-1* のみの過剰発現においても Lamina への軸索伸長が確認され、*Nrx-1* の軸索伸長への関与が示唆された。

3-6. 移植細胞は Lamina を越えて Medulla まで軸索伸長する

Ncad や *tsr*、*Nrx-1* の導入により、移植細胞の Retina を越えて脳である Lamina への軸索伸長を確認できただけでなく、視細胞の最終標的組織である Medulla への軸索伸長も確認することができた。*tsr* のみを過剰発現させた場合において、1 ケース Lamina を越えて Medulla の M2-M4 層への軸索伸長が確認された (図 11C、図 21A,B)。*Nrx-1* のみを過剰発現させた場合、Lamina への軸索伸長と前シナプス構造の形成が確認されたと共に、1 ケース Medulla への軸索伸長が確認され、伸長した軸索において前シナプス構造の形成が確認された (図 18C,D、図 20A,B、図 21A,B)。また、*tsr* と *Nrx-1* の過剰発現させた場合には、Lamina まで軸索伸長したサンプルのうち 4 ケースにおいて Medulla への軸索伸長が確認され、最も軸索伸長したものは M6 層まで到達し、Medulla へ軸索伸長した個体の半数において前シナプス構造の形成が確認された (図 20C,D、図 21A,B)。また、活性型/不活性型 *tsr* と *Ncad* を過剰発現させた場合や *Ncad*、*tsr* と *Nrx-1* を過剰発現させた場合においても Lamina を越えて Medulla までの軸索伸長が 1 ケース確認された (図 21B)。*Ncad* と *tsr* を過剰発現させた場合においては、Medulla への伸長は確認できなかった (図 21B)。

Medulla への伸長が確認されたことから移植細胞の細胞種について明らかにするため、視細胞のうち R1-R6 特異的に発現するロドプシンである Rh1 の抗体を用いて染色を行った (図 22A)。*Ncad* と *tsr* を過剰発現した細胞を移植した個体を Rh1 抗体により染色した結果、Retina において Rh1 により染色された細胞はほとんど確認されなかった (図 22B,C)。R7 もしくは R8 は Medulla に投射していることから、染色結果も踏まえると、Lamina もしくは Medulla に軸索を伸長した移植細胞は、R7 もしくは R8 であると推測される。しかし、ロドプシンは蛹期後期に発現している (Earl & Britt, 2006)。今回の実験では、三令幼虫から取り出した細胞を移植から 3 日後 (72 時間後) に観察していることから、ロドプシンの発現時期と重なっている。よって、ロドプシンの発現レベルが低い時期に染色を行ったことで Rh1 が検出されなかった可能性が考えられる。今後、移植から固定までの期間を伸ばして更なる検証を行う必要がある。

Medulla への到達率は低いものの、*Ncad* や *tsr*、*Nrx-1* を導入することによってショウジョウバエ視細胞の標的組織である Medulla への伸長を確認することができた。*Ncad*、*tsr*、*Nrx-1* 間に相関は見られなかったものの、*Nrx-1* の過剰発現によって Medulla への軸索伸長促進の傾向が見られた。特に *Nrx-1* と *tsr* を過剰発現した細胞を移植した場合において、Medulla への軸索伸長が最も多く確認された。しかし、これらの因子によって Medulla への軸索伸長が誘導されたメカニズムについては不明であり、今後の課題である。これらの結果から、*Nrx-1* がシナプス形成のみならず、Medulla への軸索伸長においても関与している可能性が示唆された。

補足. コントロールにおける Brp の発現パターン

Ncad、*tsr* や *Nrx-1* を過剰発現した細胞を移植した場合における Brp の発現パターンのみを観察していたことから、導入遺伝子がない場合における Brp の発現パターンを観察した。*elav-FLP GMR-FsF-Gal4* で標識し、Brp-FsF-GFP によって Brp を標識した細胞を移植した結果、Lamina へ伸長した軸索全体に Brp-GFP シグナルが確認された (図 23A)。また、点状の Brp-GFP シグナルも確認され、前シナプスの形成が確認された (図 23B)。

Ncad と *tsr* を過剰発現した場合、移植から 3 日後に前シナプスの形成は確認できなかった (図 17A)。しかし、導入遺伝子がない場合では、移植から 3 日後に前シナプスの形成が確認された。これらの結果から、*Ncad*、*Tsr* や *Nrx-1* による軸索伸長促進によって、シナプス形成が抑制される可能性が示唆された。

4. 考察

本研究では、移植細胞の標識に用いるドライバーを従来の GMR-myRFP から視細胞かつ神経細胞を標識する *elav-FLP GMR-FsF-Gal4* に変更することにより Retina から Lamina への軸索伸長を確認したと共に、*Ncad* と *tsr* の過剰発現によって軸索伸長が促進されることを示した。そして、*Ncad* と *tsr* を過剰発現させた場合に、Lamina へと伸長した軸索における前シナプス構造の形成を移植から 6 日後に確認できた。シナプス形成を誘導する *Nrx-1* を導入することによって、前シナプス形成までの期間が 3 日に短縮され、*Nrx-1* によって前シナプス形成が促進された。シナプス形成を促進するために導入した *Nrx-1* であったが、*Nrx-1* のみを過剰発現させた細胞においても Lamina への軸索伸長が確認され、*Nrx-1* の軸索伸長への関与も示唆された。また、*Ncad* や *Tsr*、*Nrx-1* を過剰発現させることによって、移植細胞の Retina を越えて脳への軸索投射を促進することができ、ショウジョウバエ視細胞の最も遠い標的組織である Medulla までの投射も確認された。一方で、*Ncad* と *tsr* を過剰発現させた場合には移植から 3 日後には前シナプスの形成は確認されなかったが、導入遺伝子がない場合は移植から 3 日後に前シナプスの形成が確認され、軸索伸長促進によってシナプス形成が抑制されることが示唆された。本研究によって、*Ncad* や *Tsr*、*Nrx-1* の移植における軸索伸長促進へ関与が示唆され、移植による神経回路の再生において有効な因子であることが分かった。

4-1. 移植細胞の選抜方法の改良による軸索伸長

ショウジョウバエでは、Lamina はカートリッジと呼ばれるカラム構造をとっており、視細胞 R1-R8 のうち R1-R6 は Retina から Lamina へと軸索を投射している。1つの個眼から伸びた R1-R6 の軸索は Lamina に到達するまでは束になっているが、Lamina に到達する前には分かれ、それぞれ異なる Lamina カートリッジへと投射している (Clandinin & Zipursky, 2000)。Retina と Lamina の間には、Lamina ニューロンなどの細胞体が存在し、物理的な障壁が存在する (図 4A)。ショウジョウバエの視細胞の投射様式からも予想されるように、Retina から Lamina へ軸索を到達させるためには、Retina と Lamina 間の物理的障壁を超えるために軸索が束になり、必要があると考えられる。移植細胞の標識方法を変更したことによって、移植した細胞塊に含まれる非神経細胞が減り、視細胞の割合が高まったことによって軸索が束状になりやすくなったと考えられる。その結果、軸索が Retina と Lamina 間の物理的障壁を越え、Lamina への軸索伸長が確認できたと考えられる。これらの結果から、移植する細胞塊に含まれる視細胞の割合が脳への軸索伸長率に影響していることが示唆された。

4-2. *Ncad* と *tsr* の過剰発現による軸索伸長促進

アクチンターオーバーや Myosin II による retrograde actin flow の駆動力と、隣接した細胞や細胞外基質との接着が組み合わさり、細胞膜が伸長方向へと押し出され成長円錐が前進することによって、軸索伸長が引き起こされていると考えられている (Dent & Gertler, 2003; Lowery & Vactor, 2009; Suter & Forscher, 1998; Vitriol & Zheng, 2012)。ADF/Cofilin はアクチンターオーバーと retrograde actin flow において重要な役割を果たしており、神経突起の形成に関与していることが分かっている (Flynn et al., 2012; Tedeschi et al., 2019)。これまでの研究によって、アクチンの脱重合・切断を促進する Cofilin1 がマウスの CNS において損傷した軸索の伸長を促進することが明らかになってきたことから (Tedeschi et al., 2019)、アクチンの再編成を引き起こす *tsr* の導入によって、Retina を越えて Lamina への軸索伸長を試みた。しかし、ショウジョウバエの視神経前駆細胞において ADF/Cofilin のショウジョウバエホモログである *tsr* を移植細胞において発現させるだけでは、Retina を超えた Lamina への顕著な軸索伸長促進は見られず、これまでの研究結果と一致しなかった。移植では、体外で調整した細胞が、すでに発生を終えた体内において軸索伸長する必要がある。Tsr といったアクチンターオーバーを促進し、retrograde actin flow を増加させる因子を発現させるだけでは、軸索が周囲の組織と十分に接着ができなかったために、伸長した軸索が十分に安定しなかったと考えられる。その結果、移植した環境に適応できず、Tsr のみでは Lamina への軸索伸長が促進されなかったと考えられる。

tsr と共発現させることによって軸索伸長を促進した *Ncad* は、filopodial dynamics を介して成長円錐の安定化に寄与している (Mehmet Neset Özel et al., 2015)。Cadherins の cytoplasmic domain には β -catenin が結合し、 β -catenin は α -catenin を介してアクチンフィラメントに結合しており、この Catenin を介した Cadherins のアクチンフィラメントとの結合により細胞接着が強化されていることが分かっている (Noordstra et al., 2023; S. C. Suzuki & Takeichi, 2008)。また、*in vitro* において、*Ncad* のアクチンフィラメントとの結合が軸索伸長促進に関与していることが示唆されている (Bard et al., 2008)。*Ncad* のみを過剰発現した細胞を移植した場合では、コントロールと比較して、Lamina へ伸長した個体の割合について有意な差は見られなかったことから、*Ncad* による細胞接着のみでは Retina から Lamina への軸索伸長は不十分であることが示された。これらのことから、*tsr* の過剰発現によって誘導されたアクチンターオーバーの促進を介して retrograde actin flow が増加することで発生した駆動力と、*Ncad* による catenin を介した周辺環境との安定した接着が組み合わさることによって、細胞膜が伸長方向へと押し出され、成長円錐が前進したと考えられる (図 24)。その結果、Retina を超えた Lamina への軸索伸長を誘導できたと考えられる。

4-3. Tsr の活性型/不活性型の軸索伸長における機能

Ncad と活性型/不活性型 *tsr* の過剰発現した場合について、*Ncad* のみ過剰発現した場合と Lamina へ伸長した個体数を比較したところ、有意差は見られなかった。しかし、コントロールと比較したところ、有意差が見られ、Tsr は活性/不活性に関わらず軸索伸長を促進する傾向があることが分かった。これまでの研究において、活性型 Cofilin が野生型と比較して同程度軸索伸長を促進していることが分かっていること (Endo et al., 2003; Tedeschi et al., 2019)、そして本研究の結果をまとめると活性型 Tsr は軸索伸長において重要な役割を持っていることが改めて示唆された。しかし、活性型 Tsr の過剰発現によって、大幅な軸索伸長促進は見られなかった。哺乳類の上皮細胞において、活性型 Cofilin は retrograde actin flow を亢進するものの、細胞の前縁における細胞膜の突出と縮退のバランスが崩れ、細胞膜の突出が抑えられていることが分かっている (Delorme et al., 2007)。遊走細胞の前縁は、retrograde actin flow が増加している Lamellipodia と、その後ろの retrograde actin flow が遅く周辺組織と接着し安定している Lamella に分かれている (Ponti, Machacek, Gupton, Waterman-Storer, & Danuser, 2004)。活性型 Cofilin を過剰発現した場合、Lamellipodia と Lamella の境界が曖昧になり、Lamella でも retrograde actin flow が増加し、Lamella が不安定になっていることが分かっている (Delorme et al., 2007)。*tsr:S3A* の過剰発現によって軸索伸長の更なる促進が見られなかった理由として、成長円錐の広い範囲で retrograde actin flow が増加し、アクチンフィラメントが不安定になったことが原因ではないかと考えられる。

それに対して、不活性型 Tsr は軸索伸長を促進するという結果と促進しないという結果が得られている (Ng & Luo, 2004; Sudarsanam et al., 2020)。今回実験を行った結果、*Ncad* と不活性型 Tsr の過剰発現がコントロールと比較して軸索伸長を促進する傾向が見られた。促進された理由として2つ考えられる。1つ目はアクチンの安定化である。コントロールにおいても軸索伸長が見られたことから移植細胞はもともと軸索伸長能力を持っていたと推測される。不活性型 Tsr の導入によりアクチンターンオーバーが促進されず、アクチンフィラメントの安定化に繋がったことで、軸索が縮退せずに Lamina まで伸長し、観察できるようになった可能性が考えられる。2つ目は、不活性型 Tsr と活性型 Tsr の存在比が変化した可能性である。Tsr (Cofilin) は、LIMK や SSH によってリン酸化・脱リン酸化されている (Van Troys et al., 2008)。今回の実験は内在性 Tsr 存在下で実験を行っており、不活性型 Tsr の過剰発現により内在性 Tsr の活性型と不活性型の存在比が変化したことによって、軸索伸長が促進された可能性も考えられ、不活性型 Tsr の軸索伸長への関与には議論の余地がある。

Ncad と活性型/不活性型 *tsr* の過剰発現により、コントロールと比較して軸索伸長の促進は見られたものの、到達した軸索数は減少したことから、軸索伸長において活性型/不活性型 Tsr のどちらか一方では不十分であることが示唆された。よって、Tsr のリン酸化・脱リン酸化状態が可逆的に変化することが軸索伸長において重要である

と考えられる。

4-4. *Nrx-1* の過剰発現による軸索伸長促進

シナプス形成を誘導するために導入した *Nrx-1* であったが、軸索伸長への関与が示唆された (図 25)。シナプス形成と軸索安定化の両面で機能していることが示されている分子として、Liprins、Syd-1 や受容体型プロテインチロシンホスファターゼである LAR など明らかになっており (Astigarraga, Hofmeyer, Farajian, & Treisman, 2010; Hakeda-Suzuki et al., 2017; Holbrook, Finley, Lyons, & Herman, 2012)、シナプス形成によって軸索の安定化が引き起こされることが示唆されている (M. Neset Özel et al., 2019)。*Nrx-1* が前シナプスの形成を促進するだけでなく、軸索伸長への関与が示唆された理由として、*Nrx-1* によって誘導されたシナプスが軸索の安定化を引き起こしたことで軸索の縮退が抑えられたと考えられる。また *Nrx-1* が軸索伸長に寄与した理由として、微小管の安定化が考えられる。これまでの研究によって、軸索伸長に微小管の安定化が重要であることが分かっている (Blanquie & Bradke, 2018)。*Nrx-1* は微小管関連因子である Futsch と遺伝子相互作用を持つこと、*Nrx-1* の発現レベルによって微小管の切断が引き起こされることが分かっている (Banerjee & Riordan, 2018)。コントロールにおいても Lamina への軸索伸長が見られたことから移植細胞は軸索伸長能を持っていたと考えられ、伸長した軸索の縮退が *Nrx-1* による微小管の安定化によって防がれたために、*Nrx-1* のみを過剰発現した細胞を移植した場合でも Lamina において軸索が確認されたと考えられる。

本研究では、*tsr* と *Nrx-1* を過剰発現した場合において最も軸索伸長が促進され、アクチンリングが関与しているのではないかと考えている。アクチンは成長円錐だけでなく軸索にも局在し、アクチンリングと呼ばれるリング状の周期的な構造をとるアクチンが存在していることが分かっている (Xu, Zhong, & Zhuang, 2013)。これまでの研究によって、アクチンリングが微小管の安定化に寄与していることが明らかになっている (Qu, Hahn, Webb, Pearce, & Prokop, 2017)。Tsr によるアクチンターオーバーの促進が伸長した軸索への新たなアクチンリングの形成に繋がり、その結果軸索の微小管が安定し、軸索伸長に繋がった可能性も考えられる。

4-5. Lamina へ伸長した軸索におけるシナプス形成 (*Ncad/tsr* の過剰発現)

Ncad と *tsr* を過剰発現した細胞を移植した結果、移植から 3 日後では前シナプスの形成は確認できなかったものの、移植から 6 日後に確認できた。Brp-GFP シグナルが確認された部分における RFP シグナル (移植細胞の膜マーカー) は弱かったが、これは軸索の成熟に伴い伸長した軸索が太くなったためであると考えている。神経変性が起こっている場合、デブリが確認される (Osaka et al., 2022)。今回観察された Brp-GFP

シグナルが神経変性によって引き起こされているものであるならば、RFP も同様なシグナルが確認されると考えられるが、そのような RFP シグナルは確認されなかった。このような結果から、前シナプス形成が起こった軸索は成熟に伴い太くなったために RFP シグナルが弱くなり、Brp-GFP シグナルのみが検出されたと考えられる。

Ncad と *tsr* の過剰発現を移植した場合、前シナプス形成に時間がかかった。*Ncad* はシナプスを安定化させるが、シナプス形成には必須ではないことが示されている (S. C. Suzuki & Takeichi, 2008)。前シナプス形成に時間がかかった理由として、*Ncad* はシナプス形成において安定化に寄与したものの、シナプス形成におけるトリガーとしては機能しなかったことが考えられる。また、シナプスを誘導する因子として、LRRTMs や GluD2 などいくつか同定されており (Connor & Siddiqui, 2023)、*Ncad* だけではシナプス形成を誘導するには不十分であった可能性が考えられる。

4-6. Lamina へ伸長した軸索におけるシナプス形成 (*Nrx-1* の過剰発現)

Nrx-1 の過剰発現によって前シナプス構造の形成が促進されたが、*Nrx-1* がシナプスの形成を誘導することは明らかになっている (Gomez et al., 2021)。これまでの研究と同様に、本研究においても *Nrx-1* の導入により前シナプス形成までの期間を半分に短縮することができ、*Nrx-1* が前シナプス形成を促進することを強調する結果となった。だが一方で、前シナプス形成が確認された個体は、移植した個体の半数程度にとどまっていた。また、軸索伸長を促進する因子の導入によって、シナプス形成が抑制されることが示唆された (図 23)。さらにシナプスの形成率を向上させるためには、シナプス関連分子の導入が考えられる。しかし、*Munc13-1* や RIM といった活性帯に存在しシナプス小胞のプライミングに関与する分子 (Südhof, 2012) が、軸索伸長を阻害していることが明らかになっている (Hilton et al., 2022)。また上で述べたようにシナプス形成が軸索の安定化を引き起こすことも示唆されている。そのため、シナプス関連分子の移植する段階での発現は軸索伸長の阻害に繋がる可能性もある。そのため、光依存的な遺伝子発現システム (de Mena & Rincon-Limas, 2020; Qian, Li, Zhou, Chen, & Yang, 2023) を用いて時間差で発現させるなどタイミング調節を考慮する必要がある。

4-7. 形成された前シナプスの解析

本研究では、前シナプスに局在する Brp を指標にシナプス形成について解析を行ったため、後シナプスが形成されているかは確認できていない。後シナプスの形成を確認する方法としては 2 つ考えられる。1 つ目は、GRASP (GFP Reconstitution Across Synaptic Partners) である (Feinberg et al., 2008)。GRASP は、GFP1-10 と GFP11 に分割された GFP (split-GFP) を用いる方法で、split-GFP は分割された状態では蛍光を発しない。前シナプス細胞と後シナプス細胞において GFP1-10 と GFP11 をそれぞれ発現させるこ

とで、細胞膜が近接した部分において蛍光シグナルを検出できる。このように GRASP では、前シナプスと後シナプスの近接性に基づいてシナプスを標識することができる。この方法を用いて、移植細胞とホスト（成虫ショウジョウバエ）においてそれぞれ発現させることによってシナプスを可視化し、解析を行う。2 つ目は、*trans-Tango* である (Talay et al., 2017)。*trans-Tango* では、前シナプス細胞においてリガンドを発現させ、後シナプス細胞において転写因子 QF を融合したレセプターを発現させる。受容体にリガンドが結合した後シナプス細胞では QF が切り離され、QUAS 配列に結合し、レポーター遺伝子の発現が誘導され、後シナプス細胞（2 次ニューロン）が可視化される。*trans-Tango* を用いて、移植細胞が接続している 2 次ニューロンを可視化し、シナプスを形成しているか確認を行う。しかし、GRASP や *trans-Tango* は近接性に基づいてシナプスや 2 次ニューロンを標識するため、形成されたシナプスが機能しているかまでは明らかにすることができない。想定される方法としては、電極を用いて電位を計測、もしくは神経活動依存的にシナプス数が増減しているか観察 (Sugie et al., 2015) などが考えられる。

4-8. 今後の展望

軸索伸長における活性型／不活性型 Tsr についての解析

本研究では、Tsr が活性型もしくは不活性型に可逆的に変化することが、軸索伸長において重要であることが示唆された。Tsr の可逆的な変化が重要であるということをさらに検証するために、実験を追加する必要があると考えている。①今回は内在性 Tsr 存在下で実験を行っており、活性型／不活性型 Tsr のどちらか一方のみ存在する条件下での実験は行っていない。そこで、*tssr* をノックアウトもしくはノックダウンした状態で活性型／不活性型 *tssr* を過剰発現させ、軸索伸長率について比較を行う。この実験により、活性型／不活性型 Tsr が軸索伸長促進に寄与しているかどうか、より詳細が明らかになると考えている。②本研究では、*Ncad* と活性型／不活性型 *tssr* のどちらか一方のみを過剰発現させた場合において、*Ncad* と野生型 *tssr* を過剰発現させた場合と比較して、同程度の軸索伸長促進は確認されなかった。Tsr が活性型もしくは不活性型に可逆的に変化することが軸索伸長において重要であるならば、活性型／不活性型 *tssr* の両方を過剰発現させることによって、野生型 *tssr* を過剰発現した場合と比較して、同程度軸索伸長が促進されると考えられる。③活性型／不活性型 Tsr はそれぞれ働いている場所が異なる可能性があり、また、軸索のアクチンリングなど成長円錐以外の軸索などにおいても Tsr が機能している可能性が考えられる。そこで、Tsr を蛍光タンパク質により標識し観察することで、活性型もしくは不活性型が異なる領域において機能しているなど、Tsr が可逆的に変化することが重要である理由が明らかになるのではないかと考えている。

移植細胞の詳細な解析

本研究では、移植した細胞の細胞種について解析を行うために、Rh1 抗体を用いて染色を行ったが Rh1 の発現は確認できず、細胞種の同定には至っていない。そこで他のロドプシン抗体 (Rh3-Rh6) も作製されていることから、それらを用いることで移植細胞における他のロドプシンの発現についても調べる。また、視細胞の分化途中では *sensless* や *ato* などが発現していることが分かっており (Frankfort et al., 2001)、これらの分子の発現について抗体染色などにより確認することで、移植した細胞が R1-R8 のうちの細胞に分化しているのか、またどの発生段階にあるのか明らかにすることができると考えている。この実験により分化が完了していないことが明らかになった場合は、その発生段階以降に発現している分子を発現させることにより、軸索伸長や軸索の安定化が促進されると考えられる。また、視神経前駆細胞の分化が分解・培養の前後で変化しているのか、また、軸索伸長した移植細胞と伸長しなかった移植細胞の遺伝子の発現パターンについて、シングルセル RNA-seq などを用いて網羅的な解析を行い、遺伝子の発現パターンについて比較・検討することにより、新たな軸索伸長因子の発見に繋がるのではないかと考えている。

移植した細胞が神経として機能しているか、本研究では評価できていない。ショウジョウバエの遺伝子とヒトの遺伝子は高い相同性を持つことが明らかになっていることから (Rubin et al., 2000)、近年ではショウジョウバエを用いてヒト疾患について研究が行われており緑内障を再現したショウジョウバエ (Carbone et al., 2009) や、*norpA* ノックダウンによる盲目のショウジョウバエ (Shortridge, 2012) が研究に用いられており、このようなショウジョウバエ成虫の網膜に細胞を移植し、ショウジョウバエの光走性を利用して行動実験を行うことによって、移植による視覚の回復について評価することができると考えている。

微小管関連因子

移植細胞において *Nrx-1* を過剰発現させることにより、軸索伸長が促進された。*Nrx-1* が微小管の安定化に関与していることが明らかになっており、移植細胞の軸索伸長において微小管の安定化が重要である可能性が示唆された。そこで TPPP のショウジョウバエホモログである Ringmaker (Mino et al., 2016) といった、微小管の安定化に寄与することが知られている分子を過剰発現させることによって、更なる軸索伸長促進を誘導できるのではないかと考えている。

移植細胞における *Ncad*、*tsr*、*Nrx-1* の過剰発現により、*Lamina* への軸索伸長と前シナプス構造の形成が促進されることを示した。今後、様々な遺伝子についてこのプラットフォームを用いて解析を行うことで、移植において適切な軸索伸長を誘導する因子のさらなる発見が期待される。

5. 参考文献

- Agnew, B. J., Minamide, L. S., & Bamburg, J. R. (1995). Reactivation of phosphorylated actin depolymerizing factor and identification of the regulatory site. *Journal of Biological Chemistry*, *270*(29), 17582–17587. <https://doi.org/10.1074/jbc.270.29.17582>
- Araki, T., Osaka, J., Kato, Y., Shimozone, M., Kawamura, H., Iwanaga, R., ... Suzuki, T. (2020). Systematic identification of genes regulating synaptic remodeling in the *Drosophila* visual system. *Genes and Genetic Systems*, *95*(3), 101–110. <https://doi.org/10.1266/ggs.19-00066>
- Arber, S., Barbayannis, F. A., Hanser, H., Schnelder, C., Stanyon, C. A., Bernardi, O., & Caroni, P. (1998). Regulation of actin dynamics through phosphorylation of cofilin by LIM-kinase. *Nature*, *393*, 805–809. <https://doi.org/10.1038/31729>
- Astigarraga, S., Hofmeyer, K., Farajian, R., & Treisman, J. E. (2010). Three *Drosophila* liprins interact to control synapse formation. *Journal of Neuroscience*, *30*(46), 15358–15368. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1862-10.2010>
- Banerjee, S., & Riordan, M. (2018). Coordinated Regulation of Axonal Microtubule Organization and Transport by *Drosophila* Neurexin and BMP Pathway. *Scientific Reports*, *8*, 17337. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-35618-7>
- Bard, L., Boscher, C., Lambert, M., Mège, R. M., Choquet, D., & Thoumine, O. (2008). A molecular clutch between the actin flow and N-cadherin adhesions drives growth cone migration. *Journal of Neuroscience*, *28*(23), 5879–5890. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5331-07.2008>
- Biederer, T., Sara, Y., Mozhayeva, M., Atasoy, D., Liu, X., Kavalali, E. T., & Südhof, T. C. (2002). SynCAM, a synaptic adhesion molecule that drives synapse assembly. *Science*, *297*(5586), 1525–1531. <https://doi.org/10.1126/science.1072356>
- Blair, A., Tomlinson, A., Pham, H., Gunsalus, K. C., Goldberg, M. L., & Laski, F. A. (2006). Twinstar, the *Drosophila* homolog of cofilin/ADF, is required for planar cell polarity patterning. *Development*, *133*(9), 1789–1797. <https://doi.org/10.1242/dev.02320>
- Blanquie, O., & Bradke, F. (2018). Cytoskeleton dynamics in axon regeneration. *Current Opinion in Neurobiology*, *51*, 60–69. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2018.02.024>
- Boucard, A. A., Ko, J., & Südhof, T. C. (2012). High affinity neurexin binding to cell adhesion G-protein-coupled receptor CIRL1/latrophilin-1 produces an intercellular adhesion complex. *Journal of Biological Chemistry*, *287*(12), 9399–9413. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.318659>
- Brand, A. H., & Perrimon, N. (1993). Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development*, *118*(2), 401–415.

<https://doi.org/10.1242/dev.118.2.401>

- Burns, M. E., & Augustine, G. J. (1995). Synaptic structure and function: Dynamic organization yields architectural precision. *Cell*, *83*(2), 187–194. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(95\)90160-4](https://doi.org/10.1016/0092-8674(95)90160-4)
- Carbone, M. A., Ayroles, J. F., Yamamoto, A., Morozova, T. V., West, S. A., Magwire, M. M., ... Anholt, R. R. H. (2009). Overexpression of myocilin in the *Drosophila* eye activates the unfolded protein response: Implications for glaucoma. *PLoS ONE*, *4*(1), e4216. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0004216>
- Carrier, M. F., Laurent, V., Santolini, J., Melki, R., Didry, D., Xia, G. X., ... Pantaloni, D. (1997). Actin depolymerizing factor (ADF/cofilin) enhances the rate of filament turnover: Implication in actin-based motility. *Journal of Cell Biology*, *136*(6), 1307–1322. <https://doi.org/10.1083/jcb.136.6.1307>
- Chen, J., Godt, D., Gunsalus, K., Kiss, I., Goldberg, M., & Laski, F. A. (2001). Cofilin/ADF is required for cell motility during *Drosophila* ovary development and oogenesis. *Nature Cell Biology*, *3*(2), 204–209. <https://doi.org/10.1038/35055120>
- Chen, Y., Akin, O., Nern, A., Tsui, C. Y. K., Pecot, M. Y., & Zipursky, S. L. (2014). Cell-type-specific labeling of synapses in vivo through synaptic tagging with recombination. *Neuron*, *81*(2), 280–293. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2013.12.021>
- Chih, B., Gollan, L., & Scheiffele, P. (2006). Alternative Splicing Controls Selective Trans-Synaptic Interactions of the Neuroligin-Neurexin Complex. *Neuron*, *51*(2), 171–178. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2006.06.005>
- Clandinin, T. R., & Zipursky, S. L. (2000). Afferent growth cone interactions control synaptic specificity in the *Drosophila* visual system. *Neuron*, *28*(2), 427–436. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(00\)00122-7](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)00122-7)
- Connor, S. A., & Siddiqui, T. J. (2023). Synapse organizers as molecular codes for synaptic plasticity. *Trends in Neurosciences*, *46*(11), 971–985. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2023.08.001>
- Dai, Y., Taru, H., Deken, S. L., Grill, B., Ackley, B., Nonet, M. L., & Jin, Y. (2006). SYD-2 Liprin- α organizes presynaptic active zone formation through ELKS. *Nature Neuroscience*, *9*, 1479–1487. <https://doi.org/10.1038/nn1808>
- de Mena, L., & Rincon-Limas, D. E. (2020). PhotoGal4: A Versatile Light-Dependent Switch for Spatiotemporal Control of Gene Expression in *Drosophila* Explants. *iScience*, *23*(7), 101308. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2020.101308>
- de Wit, J., Sylwestrak, E., O’Sullivan, M. L., Otto, S., Tiglio, K., Savas, J. N., ... Ghosh, A. (2009). LRRTM2 Interacts with Neurexin1 and Regulates Excitatory Synapse Formation. *Neuron*, *64*(6), 799–806. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2009.12.019>

- Dean, C., Scholl, F. G., Choih, J., DeMaria, S., Berger, J., Isacoff, E., & Scheiffele, P. (2003). Neurexin mediates the assembly of presynaptic terminals. *Nature Neuroscience*, *6*, 708–716. <https://doi.org/10.1038/nn1074>
- Delorme, V., Machacek, M., DerMardirossian, C., Anderson, K. L., Wittmann, T., Hanein, D., ... Bokoch, G. M. (2007). Cofilin Activity Downstream of Pak1 Regulates Cell Protrusion Efficiency by Organizing Lamellipodium and Lamella Actin Networks. *Developmental Cell*, *13*(5), 646–662. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2007.08.011>
- Dent, E. W., & Gertler, F. B. (2003). Cytoskeletal dynamics and transport in growth cone motility and guidance. *Neuron*, *40*(2), 209–227. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(03\)00633-0](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(03)00633-0)
- Earl, J. B., & Britt, S. G. (2006). Expression of *Drosophila* rhodopsins during photoreceptor cell differentiation: Insights into R7 and R8 cell subtype commitment. *Gene Expression Patterns*, *6*(7), 687–694. <https://doi.org/10.1016/j.modgep.2006.01.003>
- Ellis, M. C., O'Neill, E. M., & Rubin, G. M. (1993). Expression of *Drosophila* glass protein and evidence for negative regulation of its activity in non-neuronal cells by another DNA-binding protein. *Development*, *119*(3), 855–865. <https://doi.org/10.1242/dev.119.3.855>
- Endo, M., Ohashi, K., Sasaki, Y., Goshima, Y., Niwa, R., Uemura, T., & Mizuno, K. (2003). Control of Growth Cone Motility and Morphology by LIM Kinase and Slingshot via Phosphorylation and Dephosphorylation of Cofilin. *The Journal of Neuroscience*, *23*(7), 2527–2537. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.23-07-02527.2003>
- Erdmann, B., Kirsch, F. P., Rathjen, F. G., & Moré, M. I. (2003). N-cadherin is essential for retinal lamination in the zebrafish. *Developmental Dynamics*, *226*(3), 570–577. <https://doi.org/10.1002/dvdy.10266>
- Feinberg, E. H., VanHoven, M. K., Bendesky, A., Wang, G., Fetter, R. D., Shen, K., & Bargmann, C. I. (2008). GFP Reconstitution Across Synaptic Partners (GRASP) Defines Cell Contacts and Synapses in Living Nervous Systems. *Neuron*, *57*(3), 353–363. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2007.11.030>
- Fischbach, K. F., & Dittrich, A. P. M. (1989). The optic lobe of *Drosophila melanogaster*. I. A Golgi analysis of wild-type structure. *Cell and Tissue Research*, *258*, 441–475. <https://doi.org/10.1007/BF00218858>
- Flynn, K. C., Hellal, F., Neukirchen, D., Jacob, S., Tahirovic, S., Dupraz, S., ... Bradke, F. (2012). ADF/Cofilin-Mediated Actin Retrograde Flow Directs Neurite Formation in the Developing Brain. *Neuron*, *76*(6), 1091–1107. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.09.038>
- Fouquet, W., Oswald, D., Wichmann, C., Mertel, S., Depner, H., Dyba, M., ... Sigrist, S. J. (2009). Maturation of active zone assembly by *Drosophila* Bruchpilot. *Journal of Cell*

- Biology*, 186(1), 129–145. <https://doi.org/10.1083/jcb.200812150>
- Frankfort, B. J., Nolo, R., Zhang, Z., Bellen, H., & Mardon, G. (2001). Senseless repression of rough is required for R8 photoreceptor differentiation in the developing *Drosophila* eye. *Neuron*, 32(3), 403–414. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(01\)00480-9](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(01)00480-9)
- Gohla, A., Birkenfeld, J., & Bokoch, G. M. (2005). Chronophin, a novel HAD-type serine protein phosphatase, regulates cofilin-dependent actin dynamics. *Nature Cell Biology*, 7, 21–29. <https://doi.org/10.1038/ncb1201>
- Golic, K. G., & Lindquist, S. (1989). The FLP recombinase of yeast catalyzes site-specific recombination in the *drosophila* genome. *Cell*, 59(3), 499–509. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(89\)90033-0](https://doi.org/10.1016/0092-8674(89)90033-0)
- Gomez, A. M., Traunmüller, L., & Scheiffele, P. (2021). Neurexins: molecular codes for shaping neuronal synapses. *Nature Reviews Neuroscience*, 22, 137–151. <https://doi.org/10.1038/s41583-020-00415-7>
- Graf, E. R., Zhang, X., Jin, S. X., Linhoff, M. W., & Craig, A. M. (2004). Neurexins induce differentiation of GABA and glutamate postsynaptic specializations via neuroligins. *Cell*, 119(7), 1013–1026. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2004.11.035>
- Gundelfinger, E. D., Reissner, C., & Garner, C. C. (2016). Role of Bassoon and Piccolo in Assembly and Molecular Organization of the Active Zone. *Frontiers in Synaptic Neuroscience*, 7, 19. <https://doi.org/10.3389/fnsyn.2015.00019>
- Gunsalus, K. C., Bonaccorsi, S., Williams, E., Verni, F., Gatti, M., & Goldberg, M. L. (1995). Mutations in twinstar, a *Drosophila* gene encoding a cofilin/ADF homologue, result in defects in centrosome migration and cytokinesis. *Journal of Cell Biology*, 131(5), 1243–1259. <https://doi.org/10.1083/jcb.131.5.1243>
- Hakeda-Suzuki, S., Takechi, H., Kawamura, H., & Suzuki, T. (2017). Two receptor tyrosine phosphatases dictate the depth of axonal stabilizing layer in the visual system. *eLife*, 6:e31812. <https://doi.org/10.7554/eLife.31812>
- Hatta, K., & Takeichi, M. (1986). Expression of N-cadherin adhesion molecules associated with early morphogenetic events in chick development. *Nature*, 320, 447–449. <https://doi.org/10.1038/320447a0>
- Hay, B. A., Wolff, T., & Rubin, G. M. (1994). Expression of baculovirus P35 prevents cell death in *Drosophila*. *Development*, 120(8), 2121–2129. <https://doi.org/10.1242/dev.120.8.2121>
- Hilton, B. J., Husch, A., Schaffran, B., Lin, T. chen, Burnside, E. R., Dupraz, S., ... Bradke, F. (2022). An active vesicle priming machinery suppresses axon regeneration upon adult CNS injury. *Neuron*, 110(1), 51-69.e7. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2021.10.007>
- Holbrook, S., Finley, J. K., Lyons, E. L., & Herman, T. G. (2012). Loss of syd-1 from R7

- neurons disrupts two distinct phases of presynaptic development. *Journal of Neuroscience*, 32(50), 18101–18111. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1350-12.2012>
- Hylton, R. K., Heebner, J. E., Grillo, M. A., & Swulius, M. T. (2022). Cofilactin filaments regulate filopodial structure and dynamics in neuronal growth cones. *Nature Communications*, 13, 2439. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-30116-x>
- Ichtchenko, K., Hata, Y., Nguyen, T., Ullrich, B., Missler, M., Moomaw, C., & Südhof, T. C. (1995). Neuroligin 1: A splice site-specific ligand for β -neurexins. *Cell*, 81(3), 435–443. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(95\)90396-8](https://doi.org/10.1016/0092-8674(95)90396-8)
- Iwai, Y., Hirota, Y., Ozaki, K., Okano, H., Takeichi, M., & Uemura, T. (2002). DN-cadherin is required for spatial arrangement of nerve terminals and ultrastructural organization of synapses. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 19(3), 375–388. <https://doi.org/10.1006/mcne.2001.1081>
- Iwai, Y., Usui, T., Hirano, S., Steward, R., Takeichi, M., & Uemura, T. (1997). Axon patterning requires DN-cadherin, a novel neuronal adhesion receptor, in the *Drosophila* embryonic CNS. *Neuron*, 19(1), 77–89. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(00\)80349-9](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)80349-9)
- Kania, A., & Klein, R. (2016). Mechanisms of ephrin-Eph signalling in development, physiology and disease. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 17, 240–256. <https://doi.org/10.1038/nrm.2015.16>
- Kaufmann, N., DeProto, J., Ranjan, R., Wan, H., & Van Vactor, D. (2002). *Drosophila* liprin- α and the receptor phosphatase Dlar control synapse morphogenesis. *Neuron*, 34(1), 27–38. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(02\)00643-8](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(02)00643-8)
- Kawasaki, F., Zou, B., Xu, X., & Ordway, R. W. (2004). Active Zone Localization of Presynaptic Calcium Channels Encoded by the cacophony Locus of *Drosophila*. *Journal of Neuroscience*, 24(1), 282–285. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3553-03.2004>
- Kittel, R. J., Wichmann, C., Rasse, T. M., Fouquet, W., Schmidt, M., Schmid, A., ... Sigrist, S. J. (2006). Bruchpilot Promotes Active Zone Assembly, Ca²⁺ Channel Clustering, and Vesicle Release. *Science*, 312, 1051–1054. <https://doi.org/10.1126/science.1126308>
- Ko, J., Fuccillo, M. V., Malenka, R. C., & Südhof, T. C. (2009). LRRTM2 Functions as a Neurexin Ligand in Promoting Excitatory Synapse Formation. *Neuron*, 64(6), 791–798. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2009.12.012>
- Laha, B., Stafford, B. K., & Huberman, A. D. (2017). Regenerating optic pathways from the eye to the brain. *Science*, 356(6342), 1031–1034. <https://doi.org/10.1126/science.aal5060>
- Lappalainen, P., Kotila, T., Jégou, A., & Romet-Lemonne, G. (2022). Biochemical and mechanical regulation of actin dynamics. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 23, 836–852. <https://doi.org/10.1038/s41580-022-00508-4>
- Lele, Z., Folchert, A., Concha, M., Rauch, G. J., Geisler, R., Rosa, F., ... Bally-Cuif, L. (2002).

- Parachute/ n-cadherin is required for morphogenesis and maintained integrity of the zebrafish neural tube. *Development*, 129(14), 3281–3294.
<https://doi.org/10.1242/dev.129.14.3281>
- Li, J., Ashley, J., Budnik, V., & Bhat, M. A. (2007). Crucial Role of *Drosophila* Neurexin in Proper Active Zone Apposition to Postsynaptic Densities, Synaptic Growth, and Synaptic Transmission. *Neuron*, 55(5), 741–755. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2007.08.002>
- Lowery, L. A., & Vactor, D. Van. (2009). The trip of the tip: Understanding the growth cone machinery. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 10, 332–343.
<https://doi.org/10.1038/nrm2679>
- Maciver, S. K., & Hussey, P. J. (2002). Protein family review The ADF / cofilin family : actin-remodeling proteins. *Genome Biology*, 3, reviews3007.1. <https://doi.org/10.1186/gb-2002-3-5-reviews3007>
- MacLaren, R. E., Pearson, R. A., MacNeil, A., Douglas, R. H., Salt, T. E., Akimoto, M., ... Ali, R. R. (2006). Retinal repair by transplantation of photoreceptor precursors. *Nature*, 444, 203–207. <https://doi.org/10.1038/nature05161>
- MacLaren, R. E., & Taylor, J. S. H. (1997). Regeneration in the developing optic nerve: Correlating observations in the opossum to other mammalian systems. *Progress in Neurobiology*, 53(3), 381–398.
- Masai, I., Lele, Z., Yamaguchi, M., Komori, A., Nakata, A., Nishiwaki, Y., ... Okamoto, H. (2003). N-cadherin mediates retinal lamination, maintenance of forebrain compartments and patterning of retinal neurites. *Development*, 130(11), 2479–2494.
<https://doi.org/10.1242/dev.00465>
- Matthews, B. B., & Crews, S. T. (1999). *Drosophila* center divider gene is expressed in CNS midline cells and encodes a developmentally regulated protein kinase orthologous to human TESK1. *DNA and Cell Biology*, 18(6), 435–448.
<https://doi.org/10.1089/104454999315150>
- Medeiros, N. A., Burnette, D. T., & Forscher, P. (2006). Myosin II functions in actin-bundle turnover in neuronal growth cones. *Nature Cell Biology*, 8, 216–226.
<https://doi.org/10.1038/ncb1367>
- Mino, R. E., Rogers, S. L., Risinger, A. L., Rohena, C., Banerjee, S., & Bhat, M. A. (2016). *Drosophila* Ringmaker regulates microtubule stabilization and axonal extension during embryonic development. *Journal of Cell Science*, 129(17), 3282–3294.
<https://doi.org/10.1242/jcs.187294>
- Moriyama, K., Iida, K., & Yahara, I. (1996). Phosphorylation of Ser-3 of cofilin regulates its essential function on actin. *Genes to Cells*, 1(1), 73–86. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2443.1996.05005.x>

- Morrison, C. A., Chen, H., Cook, T., Brown, S., & Treisman, J. E. (2018). Glass promotes the differentiation of neuronal and non-neuronal cell types in the *Drosophila* eye. *PLoS Genetics*, *14*(1), e1007173. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1007173>
- Moses, K., & Rubin, G. M. (1991). glass encodes a site-specific DNA-binding protein that is regulated in response to positional signals in the developing *Drosophila* eye. *Genes and Development*, *5*(4), 583–593. <https://doi.org/10.1101/gad.5.4.583>
- Ng, J., & Luo, L. (2004). Rho GTPases regulate axon growth through convergent and divergent signaling pathways. *Neuron*, *44*(5), 779–793. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2004.11.014>
- Niwa, R., Nagata-ohashi, K., Takeichi, M., Mizuno, K., & Uemura, T. (2002). Control of Actin Reorganization by Slingshot , a Family of Phosphatases that Dephosphorylate ADF / Cofilin. *Cell*, *108*(2), 233–246. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(01\)00638-9](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(01)00638-9)
- Noordstra, I., Morris, R. G., & Yap, A. S. (2023). Cadherins and the cortex: A matter of time? *Current Opinion in Cell Biology*, *80*, 102154. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2023.102154>
- Oda, H., Uemura, T., Harada, Y., Iwai, Y., & Takeichi, M. (1994). A *drosophila* homolog of cadherin associated with Armadillo and essential for embryonic cell-cell adhesion. *Developmental Biology*, Vol. 165, pp. 716–726. <https://doi.org/10.1006/dbio.1994.1287>
- Ohashi, K., Hosoya, T., Takahashi, K., Hing, H., & Mizuno, K. (2000). A *Drosophila* homolog of LIM-kinase phosphorylates cofilin and induces actin cytoskeletal reorganization. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *276*(3), 1178–1185. <https://doi.org/10.1006/bbrc.2000.3599>
- Osaka, J., Yasuda, H., Watanuki, Y., Kato, Y., Nitta, Y., Sugie, A., ... Suzuki, T. (2022). Identification of genes regulating stimulus-dependent synaptic assembly in *Drosophila* using an automated synapse quantification system. *Genes and Genetic Systems*, *97*(6), 297–309. <https://doi.org/10.1266/ggs.22-00114>
- Oswald, J., Kegeles, E., Minelli, T., Volchkov, P., & Baranov, P. (2021). Transplantation of miPSC/mESC-derived retinal ganglion cells into healthy and glaucomatous retinas. *Molecular Therapy - Methods and Clinical Development*, *21*, 180–198. <https://doi.org/10.1016/j.omtm.2021.03.004>
- Owald, D., Fouquet, W., Schmidt, M., Wichmann, C., Mertel, S., Depner, H., ... Sigrist, S. J. (2010). A Syd-1 homologue regulates pre- and postsynaptic maturation in *Drosophila*. *Journal of Cell Biology*, *188*(4), 565–579. <https://doi.org/10.1083/jcb.200908055>
- Özel, M., Neset, Kulkarni, A., Hasan, A., Brummer, J., Moldenhauer, M., Daumann, I. M., ... Hiesinger, P. R. (2019). Serial Synapse Formation through Filopodial Competition for Synaptic Seeding Factors. *Developmental Cell*, *50*(4), 447-461.e8. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2019.06.014>
- Özel, Mehmet Neset, Langen, M., Hassan, B. A., & Hiesinger, P. R. (2015). Filopodial

- dynamics and growth cone stabilization in *Drosophila* visual circuit development. *eLife*, 4:e10721. <https://doi.org/10.7554/eLife.10721>
- Pettem, K. L., Yokomaku, D., Luo, L., Linhoff, M. W., Prasad, T., Connor, S. A., ... Craig, A. M. (2013). The Specific α -Neurexin Interactor Calsyntenin-3 Promotes Excitatory and Inhibitory Synapse Development. *Neuron*, 80(1), 113–128. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2013.07.016>
- Pham, H., Yu, H., & Laski, F. A. (2008). Cofilin/ADF is required for retinal elongation and morphogenesis of the *Drosophila* rhabdomere. *Developmental Biology*, 318(1), 82–91. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2008.03.006>
- Ponti, A., Machacek, M., Gupton, S. L., Waterman-Storer, C. M., & Danuser, G. (2004). Two distinct actin networks drive the protrusion of migrating cells. *Science*, 305(5691), 1782–1786. <https://doi.org/10.1126/science.1100533>
- Qian, Y., Li, T., Zhou, S., Chen, X., & Yang, Y. (2023). A Single-Component Optogenetic Gal4-UAS System Allows Stringent Control of Gene Expression in Zebrafish and *Drosophila*. *ACS Synthetic Biology*, 12(3), 664–671. <https://doi.org/10.1021/acssynbio.2c00410>
- Qu, Y., Hahn, I., Webb, S. E. D., Pearce, S. P., & Prokop, A. (2017). Periodic actin structures in neuronal axons are required to maintain microtubules. *Molecular Biology of the Cell*, 28(2), 296–308. <https://doi.org/10.1091/mbc.E16-10-0727>
- Rubin, G. M., Yandell, M. D., Wortman, J. R., Gabor Miklos, G. L., Nelson, C. R., Hariharan, I. K., ... Lewis, S. (2000). Comparative genomics of the eukaryotes. *Science*, 287(5461), 2204–2215. <https://doi.org/10.1126/science.287.5461.2204>
- Scheiffele, P., Fan, J., Choih, J., Fetter, R., & Serafini, T. (2000). Neuroligin expressed in nonneuronal cells triggers presynaptic development in contacting axons. *Cell*, 101(6), 657–669. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80877-6](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80877-6)
- Schmucker, D., & Chen, B. (2009). Dscam and DSCAM: Complex genes in simple animals, complex animals yet simple genes. *Genes and Development*, 23, 147–156. <https://doi.org/10.1101/gad.1752909>
- Shortridge, R. D. (2012). Impact of studies of the *Drosophila* norpA mutation on understanding phototransduction. *Journal of Neurogenetics*, 26(2), 123–131. <https://doi.org/10.3109/01677063.2011.647142>
- Siddiqui, T. J., Pancaroglu, R., Kang, Y., Rooyackers, A., & Craig, A. M. (2010). LRRTMs and neuroligins bind neurexins with a differential code to cooperate in glutamate synapse development. *Journal of Neuroscience*, 30(22), 7495–7506. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0470-10.2010>
- Silver, J., & Miller, J. H. (2004). Regeneration beyond the glial scar. *Nature Reviews*

- Neuroscience*, 5, 146–156. <https://doi.org/10.1038/nrn1326>
- Siudeja, K., Grzeschik, N. A., Rana, A., de Jong, J., & Sibon, O. C. M. (2012). Cofilin/Twinstar phosphorylation levels increase in response to impaired coenzyme A metabolism. *PLoS ONE*, 7(8), e43145. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0043145>
- Sudarsanam, S., Yaniv, S., Meltzer, H., & Schuldiner, O. (2020). Cofilin regulates axon growth and branching of *Drosophila* γ -neurons. *Journal of Cell Science*, 133(8), jcs232595. <https://doi.org/10.1242/jcs.232595>
- Südhof, T. C. (2008). Neuroligins and neuexins link synaptic function to cognitive disease. *Nature*, 455, 903–911. <https://doi.org/10.1038/nature07456>
- Südhof, T. C. (2012). The presynaptic active zone. *Neuron*, 75(1), 11–25. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.06.012>
- Sugie, A., Hakeda-Suzuki, S., Suzuki, E., Silies, M., Shimozone, M., Möhl, C., ... Tavosanis, G. (2015). Molecular Remodeling of the Presynaptic Active Zone of *Drosophila* Photoreceptors via Activity-Dependent Feedback. *Neuron*, 86(3), 711–725. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2015.03.046>
- Sugita, S., Saito, F., Tang, J., Satz, J., Campbell, K., & Südhof, T. C. (2001). A stoichiometric complex of neuexins and dystroglycan in brain. *Journal of Cell Biology*, 154(2), 435–446. <https://doi.org/10.1083/jcb.200105003>
- Suter, D. M., & Forscher, P. (1998). An emerging link between cytoskeletal dynamics and cell adhesion molecules in growth cone guidance. *Current Opinion in Neurobiology*, 8, 106–116. [https://doi.org/10.1016/S0959-4388\(98\)80014-7](https://doi.org/10.1016/S0959-4388(98)80014-7)
- Suzuki, S. C., & Takeichi, M. (2008). Cadherins in neuronal morphogenesis and function. *Development Growth and Differentiation*, 50, S119–S130. <https://doi.org/10.1111/j.1440-169X.2008.01002.x>
- Suzuki, T., Oochi, K., Hakeda-Suzuki, S., & Suzuki, T. (2018). Transplantation of photoreceptor precursor cells into the retina of an adult *Drosophila*. *Development Growth and Differentiation*, 60(7), 442–453. <https://doi.org/10.1111/dgd.12545>
- Takechi, H., Hakeda-Suzuki, S., Nitta, Y., Ishiwata, Y., Iwanaga, R., Sato, M., ... Suzuki, T. (2021). Glial insulin regulates cooperative or antagonistic golden goal/flamingo interactions during photoreceptor axon guidance. *eLife*, 10:e66718. <https://doi.org/10.7554/eLife.66718>
- Takeichi, M. (2007). The cadherin superfamily in neuronal connections and interactions. *Nature Reviews Neuroscience*, 8, 11–20. <https://doi.org/10.1038/nrn2043>
- Talay, M., Richman, E. B., Snell, N. J., Hartmann, G. G., Fisher, J. D., Sorkaç, A., ... Barnea, G. (2017). Transsynaptic Mapping of Second-Order Taste Neurons in Flies by trans-Tango. *Neuron*, 96(4), 783–795.e4. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2017.10.011>

- Tedeschi, A., Dupraz, S., Curcio, M., Laskowski, C. J., Schaffran, B., Flynn, K. C., ... Bradke, F. (2019). ADF/Cofilin-Mediated Actin Turnover Promotes Axon Regeneration in the Adult CNS. *Neuron*, *103*(6), 1073-1085.e6. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2019.07.007>
- Tian, Y., Li, T., Sun, M., Wan, D., Li, Q., Li, P., ... Xie, W. (2013). Neurexin Regulates Visual Function via Mediating Retinoid Transport to Promote Rhodopsin Maturation. *Neuron*, *77*(2), 311–322. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.11.012>
- Togashi, H., Sakisaka, T., & Takai, Y. (2009). Cell adhesion molecules in the central nervous system. *Cell Adhesion and Migration*, *3*(1), 29–35. <https://doi.org/10.4161/cam.3.1.6773>
- Tomlinson, A., & Ready, D. F. (1987). Neuronal differentiation in the *Drosophila* ommatidium. *Developmental Biology*, *120*(2), 366–376. [https://doi.org/10.1016/0012-1606\(87\)90239-9](https://doi.org/10.1016/0012-1606(87)90239-9)
- Toshima, J., Toshima, J. Y., Amano, T., Yang, N., Narumiya, S., & Mizuno, K. (2001). Cofilin phosphorylation by protein kinase testicular protein kinase 1 and its role in integrin-mediated actin reorganization and focal adhesion formation. *Molecular Biology of the Cell*, *12*(4), 1131–1145. <https://doi.org/10.1091/mbc.12.4.1131>
- Trush, O., Liu, C., Han, X., Nakai, Y., Takayama, R., Murakawa, H., ... Suzuki, T. (2019). N-Cadherin Orchestrates Self-Organization of Neurons within a Columnar Unit in the *Drosophila* Medulla. *Journal of Neuroscience*, *39*(30), 5861–5880. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3107-18.2019>
- Uemura, T., Lee, S. J., Yasumura, M., Takeuchi, T., Yoshida, T., Ra, M., ... Mishina, M. (2010). Trans-synaptic interaction of GluR δ 2 and neurexin through Cbln1 mediates synapse formation in the cerebellum. *Cell*, *141*(6), 1068–1079. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.04.035>
- Van Troys, M., Huyck, L., Leyman, S., Dhaese, S., Vandekerckhove, J., & Ampe, C. (2008). Ins and outs of ADF/cofilin activity and regulation. *European Journal of Cell Biology*, *87*(8–9), 649–667. <https://doi.org/10.1016/j.ejcb.2008.04.001>
- Varoqueaux, F., Aramuni, G., Rawson, R. L., Mohrmann, R., Missler, M., Gottmann, K., ... Brose, N. (2006). Neuroligins Determine Synapse Maturation and Function. *Neuron*, *51*(6), 741–754. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2006.09.003>
- Venugopalan, P., Wang, Y., Nguyen, T., Huang, A., Muller, K. J., & Goldberg, J. L. (2016). Transplanted neurons integrate into adult retinas and respond to light. *Nature Communications*, *7*, 10472. <https://doi.org/10.1038/ncomms10472>
- Vitriol, E. A., & Zheng, J. Q. (2012). Growth Cone Travel in Space and Time: The Cellular Ensemble of Cytoskeleton, Adhesion, and Membrane. *Neuron*, *73*(6), 1068–1081. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.03.005>
- Vrathasha, V., Nikonov, S., Bell, B. A., He, J., Bungatavula, Y., Uyhazi, K. E., & Murthy Chavali, V. R. (2022). Transplanted human induced pluripotent stem cells- derived retinal

- ganglion cells embed within mouse retinas and are electrophysiologically functional. *iScience*, 25(11), 105308. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2022.105308>
- Wagh, D. A., Rasse, T. M., Asan, E., Hofbauer, A., Schwenkert, I., Dürrebeck, H., ... Buchner, E. (2006). Bruchpilot, a protein with homology to ELKS/CAST, is required for structural integrity and function of synaptic active zones in *Drosophila*. *Neuron*, 49(6), 833–844. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2006.02.008>
- Warren, J., & Kumar, J. P. (2023). Patterning of the *Drosophila* retina by the morphogenetic furrow. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 11, 1151348. <https://doi.org/10.3389/fcell.2023.1151348>
- Xu, K., Zhong, G., & Zhuang, X. (2013). Actin, spectrin, and associated proteins form a periodic cytoskeletal structure in axons. *Science*, 339(6118), 452–456. <https://doi.org/10.1126/science.1232251>
- Yang, N., Higuchi, O., Ohashi, K., Nagata, K., Wada, A., Kangawa, K., ... Mizuno, K. (1998). Cofilin phosphorylation by LIM-kinase 1 and its role in Rac-mediated actin reorganization. *Nature*, 393, 809–812. <https://doi.org/10.1038/31735>
- Yiu, G., & He, Z. (2006). Glial inhibition of CNS axon regeneration. *Nature Reviews Neuroscience*, 7, 617–627. <https://doi.org/10.1038/nrn1956>
- Zang, Y., Chaudhari, K., & Bashaw, G. J. (2021). New insights into the molecular mechanisms of axon guidance receptor regulation and signaling. *Current Topics in Developmental Biology*, 142, 147–196. <https://doi.org/10.1016/bs.ctdb.2020.11.008>
- Zeng, X., Sun, M., Liu, L., Chen, F., Wei, L., & Xie, W. (2007). Neurexin-1 is required for synapse formation and larvae associative learning in *Drosophila*. *FEBS Letters*, 581(13), 2509–2516. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2007.04.068>
- Zhai, R. G., & Bellen, H. J. (2004). The architecture of the active zone in the presynaptic nerve terminal. *Physiology*, 19(5), 262–270. <https://doi.org/10.1152/physiol.00014.2004>

謝辞

本研究は、東京工業大学大学院の鈴木崇之研究室の皆様をはじめ、多くの方々のご指導とご協力のもと行うことができました。この場をお借りして、深く感謝申し上げます。

実験を行うにあたり、多くの系統をストックセンター（BDSC）から提供していただきました。

鈴木研究室の鈴木（羽毛田）聡子博士には研究手法等、多大な時間を当てて頂きました。心より感謝いたします。卒業生の矢作風紗さんには、本研究において実験の一部を協力していただきました。

そして、指導教員である鈴木崇之准教授には、ご多忙の中にも関わらず、研究手法から論文の書き方に至るまで、ご指導頂きました。6年間、大変お世話になりました。深く感謝申し上げます。

ありがとうございました。

岩永りく

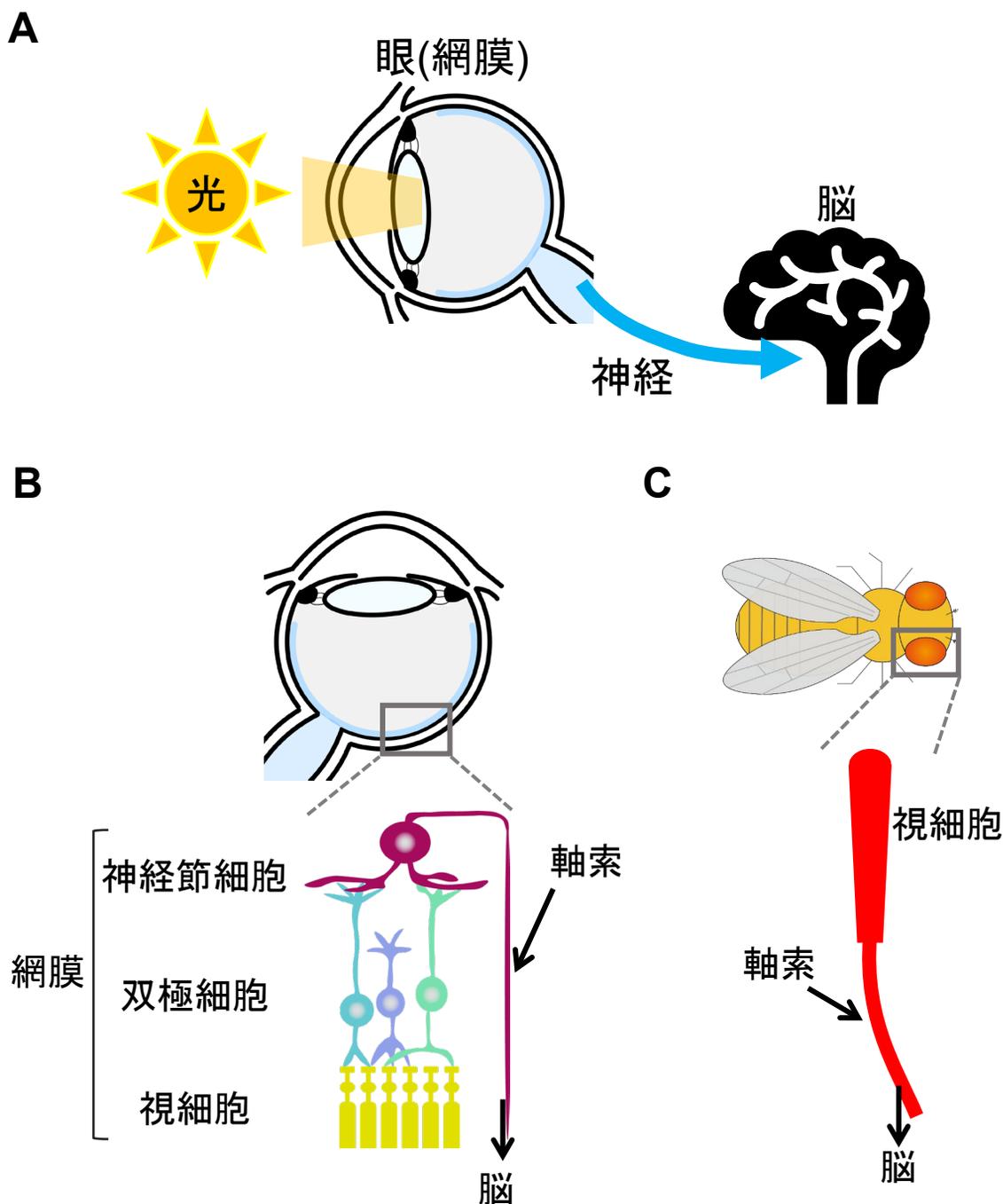


図1. 視覚形成と網膜の構造比較

(A)視覚形成の模式図。網膜において受容された光刺激は、神経を介して脳へと伝達されている。(B)哺乳類の網膜の構造。視細胞において受容された光刺激は電気信号へと変換され、双極細胞などを介して神経節細胞へと伝達される。神経節細胞は軸索を長く伸ばし、脳へと接続している。(C)ショウジョウバエの視細胞の構造。視細胞から直接軸索が伸びており、脳へと直接投射している。

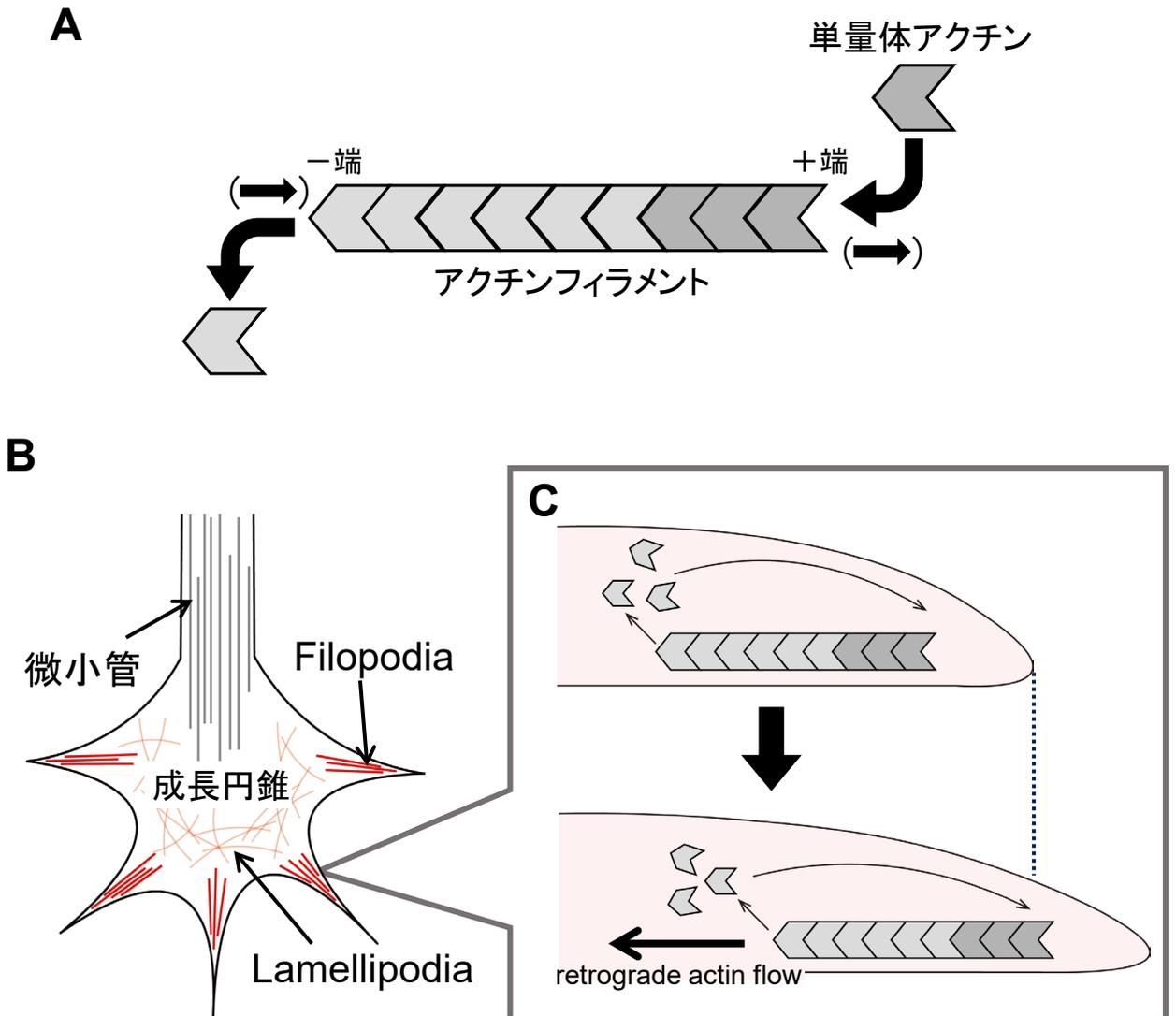


図2. アクチンフィラメントと成長円錐

(A) アクチンフィラメントの模式図。単量体アクチン(濃灰色)が重合することによって形成される。+端において重合が起こりやすく、一端では脱重合が起こりやすい。(B,C) 成長円錐の模式図。(B) 成長円錐にはアクチン(赤)が、中心部には微小管(灰色)が局在している。(C) 成長円錐の先端ではアクチンターンオーバーによるretrograde actin flowによって細胞膜が押し出され、軸索伸長が引き起こされる。

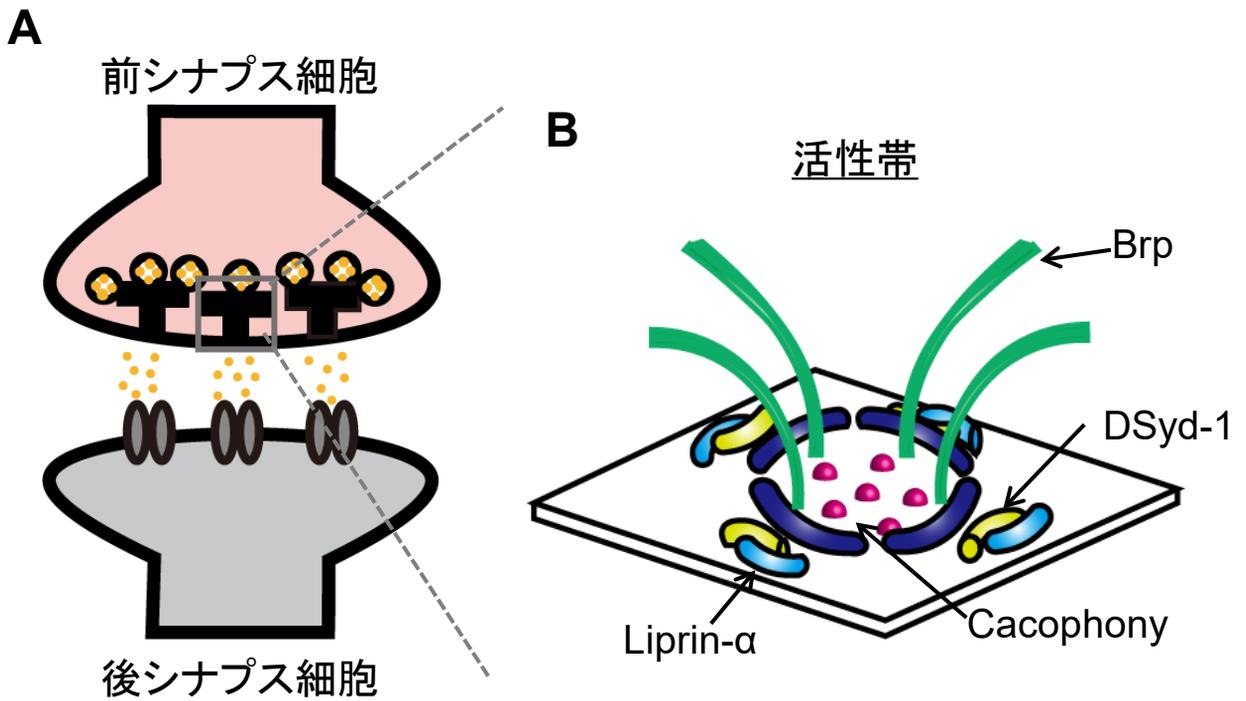


図3. シナプスの構造

(A) シナプスの模式図。前シナプス(赤)から神経伝達物質(オレンジ)が放出され、後シナプス(灰色)へと伝達されている。(B) 活性帯の模式図。活性帯は前シナプスに局在している。活性帯は、Brp(緑)、DSyd-1(黄)、Cacophony(赤)やLiprin-α(水色)などのタンパク質によって構成されている。

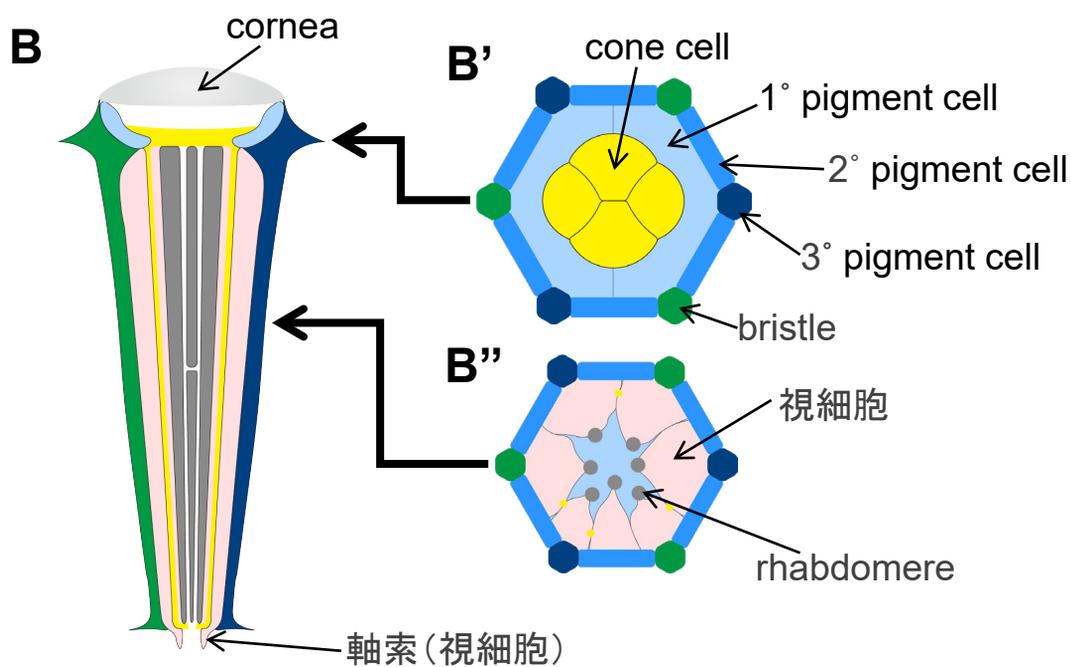
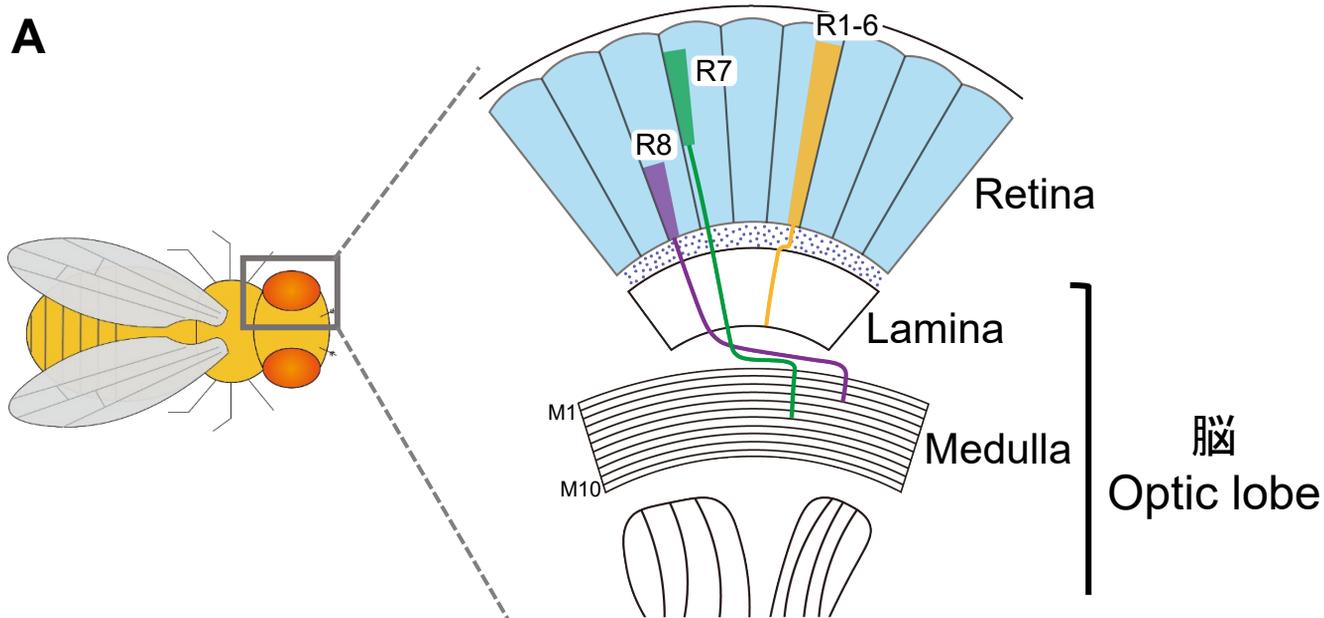


図4. ショウジョウバエ視覚系の構造

(A) ショウジョウバエ視覚系の構造。網膜であるRetina、脳内の神経節であるLamina、Medullaと層構造をとっている。(B-B'') ショウジョウバエommatidiaの構造。表層にcornea (灰色)があり、光刺激を受容する rhabdomere (濃灰色)やR cell (薄赤色) の周りに cone cell (黄色)、pigment cell (青)やbristle (緑)が位置している。(B', B'') Bにおける断面図。

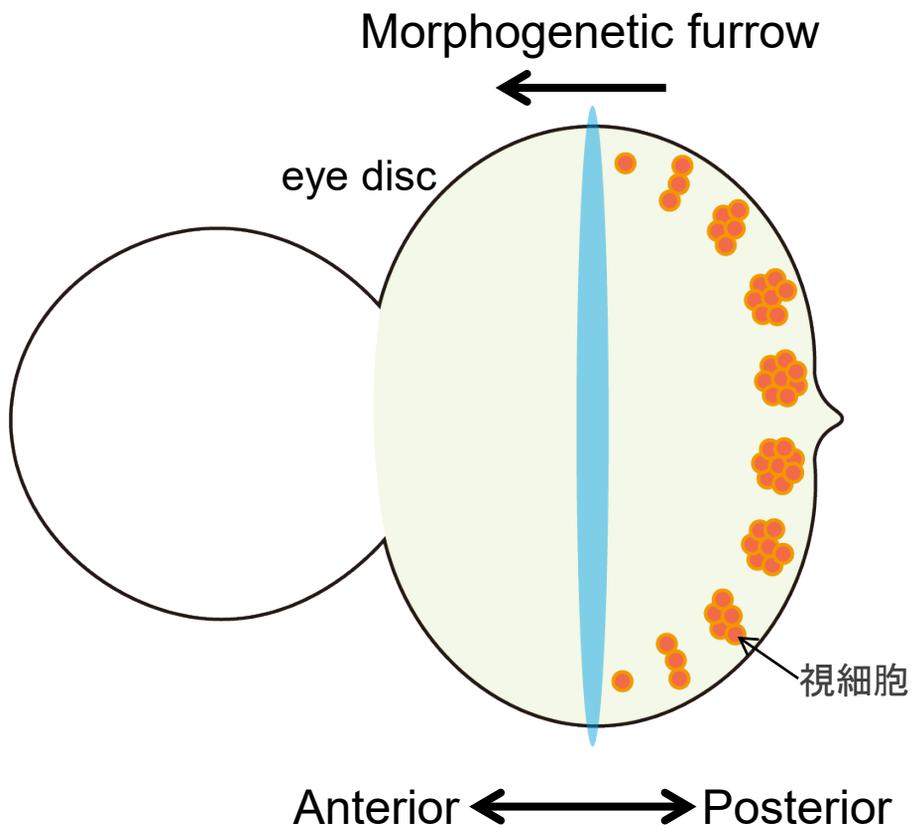


図5. eye discにおける視細胞の分化

ショウジョウバエeye discの模式図。ショウジョウバエの複眼は成虫原基 (eye disc) より形成される。視細胞 (オレンジ) の分化は、Morphogenetic furrow (青) と呼ばれる溝が Posterior から Anterior へとの通過することにより誘導される。

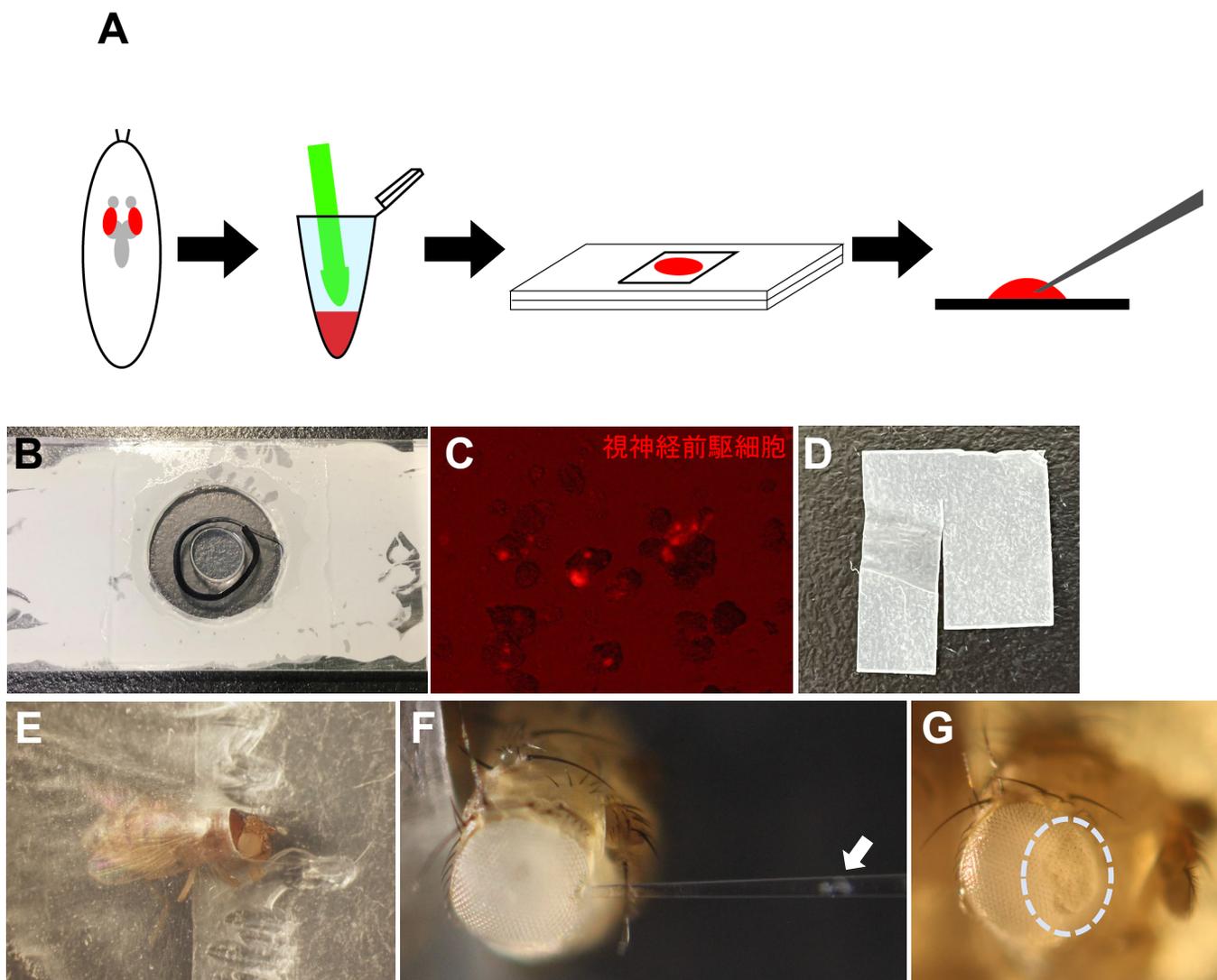
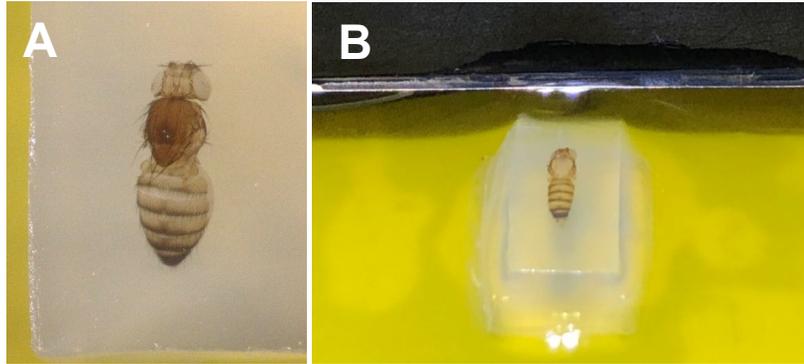


図6. ショウジョウバエを用いた移植方法と改良

(A) ショウジョウバエを用いた移植の手順の模式図。三令幼虫からeye discを取り出し、dispaseとcollagenaseを加え、ホモジェナイズする。25°Cで4時間培養後、キャピラリーで細胞を吸引し、成虫に移植。(B) 細胞を培養するチェンバー。(C) 培養した視神経前駆細胞 (赤)。(D) カットし、伸ばしたパラフィルム。(E) ショウジョウバエ成虫の固定。切った部分にショウジョウバエを挟み、固定した。(F) 成虫複眼への移植。キャピラリーを複眼に刺し、吸引した細胞 (白色矢印) を移植した。(G) 刺傷部へのワセリンの塗布。移植後の刺傷部 (点線) の乾燥を防ぐためにワセリンを塗った。



明視野

共焦点顕微鏡

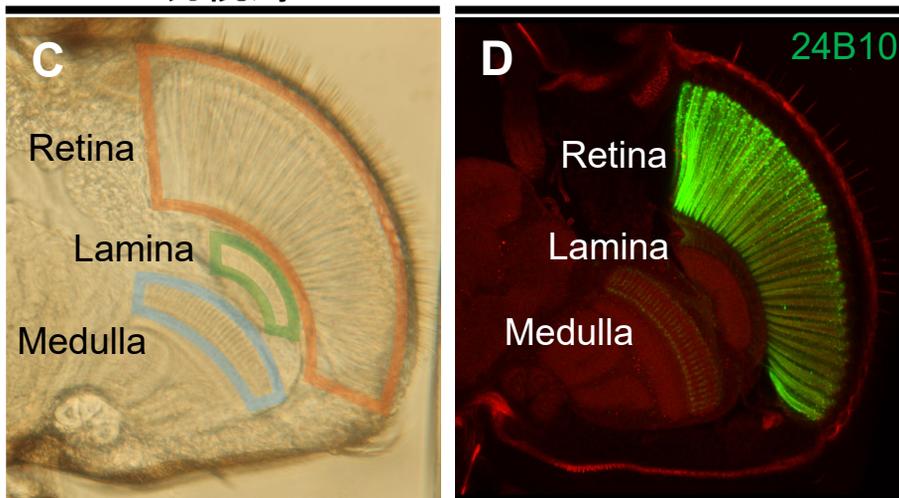


図7. アガロースセクション法によるショウジョウバエ頭部の観察

(A) ゲルによる包埋。パラホルムアルデヒドによって固定したハエをゲルで包埋した。(B) リニアスライサーによる頭部の切片の作製。(C) 明視野における成虫頭部切片の観察。Retina (オレンジ)、Lamina (緑色)、Medulla (水色)を示している。(D) 共焦点顕微鏡による成虫頭部切片の観察。視細胞を24B10 (緑色)で染色した。Retina、Lamina、Medullaを観察することが可能である。

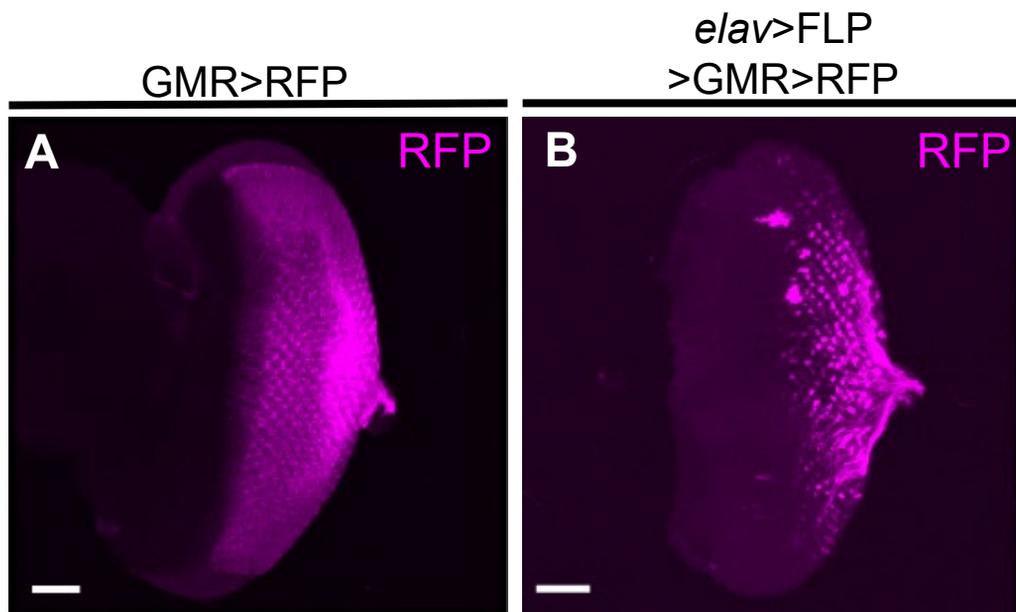


図8. 視細胞のRFPによる標識

(A) GMR-*myr*-RFPによって標識した三令幼虫のeye disc。RFP (マゼンタ) を発現する細胞は、発生途中の視細胞を示している。(B) *e/av*-Gal4, UAS-FLP, GMR-FRT-stop-FRT-Gal4, UAS-*myr*-RFP (*e/av*-FLP, GMR-FsF-Gal4) によって標識した三令幼虫のeye disc。RFP (マゼンタ) を発現する細胞は、発生途中の神経細胞と視細胞を示している。スケールバー: 50 μ m

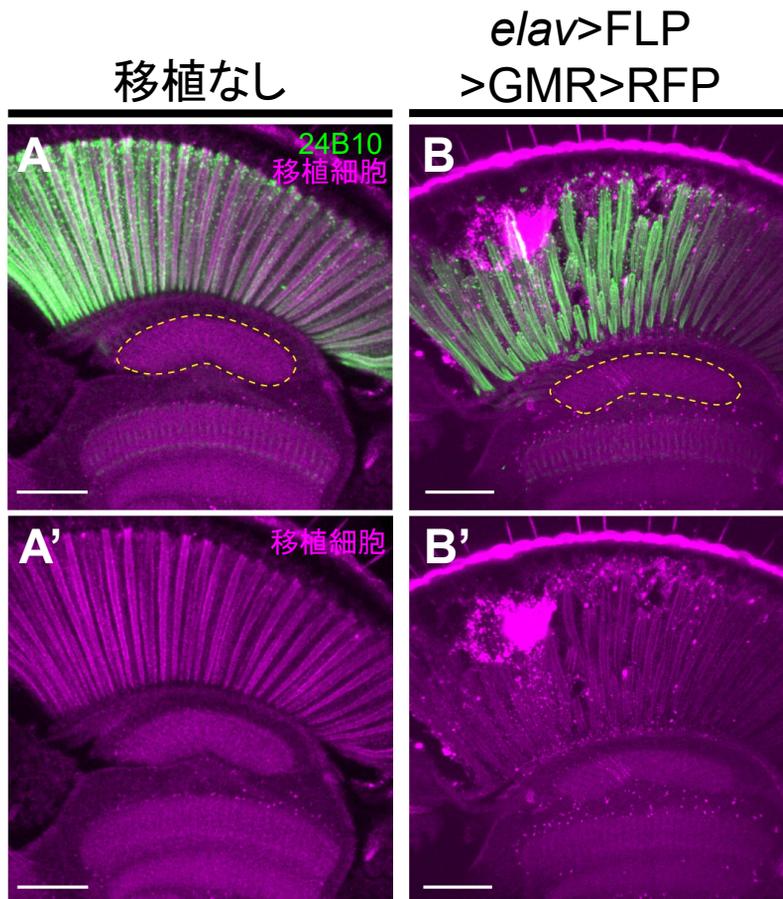


図9. 細胞選抜法の改良による軸索伸長

(A,B) 視細胞をmAb24B10 (緑) で染色した。破線 (黄) はLaminaの領域を示す。(A) 移植していない成虫頭部の切片。(B) *elav*-FLP, GMR-FsF-Gal4で標識した細胞の移植。移植した細胞 (マゼンタ) はRetinaで確認でき、18.9%の個体においてLaminaへと軸索伸長した (n = 37)。スケールバー: 50 μ m

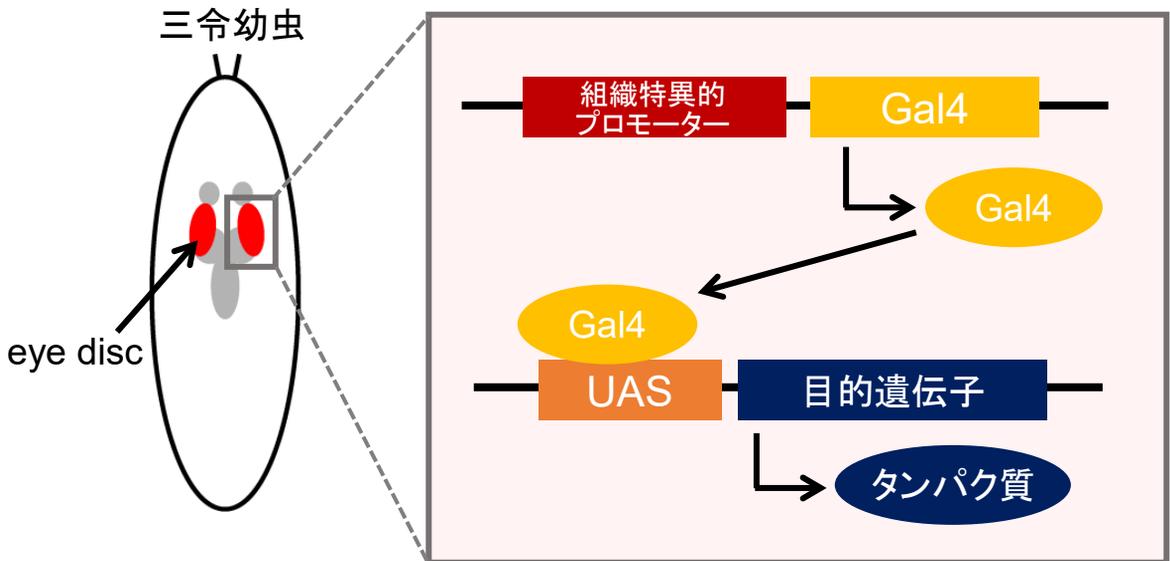


図10. Gal4/UASシステムによる遺伝子発現

Gal4/UASシステムを用いた遺伝子発現の模式図。三令幼虫のeye disc（赤）において、Gal4/UASシステムを用いて目的遺伝子を過剰発現することによって、目的遺伝子を過剰発現した移植細胞を作製した。Gal4/UASシステムでは、転写因子であるGal4（黄）が、標的配列であるUAS（オレンジ）の下流に導入した遺伝子（紺）の発現を誘導する。Gal4の発現を特定のプロモーター（濃赤）によって制御することによって、組織特異的な発現が可能である。

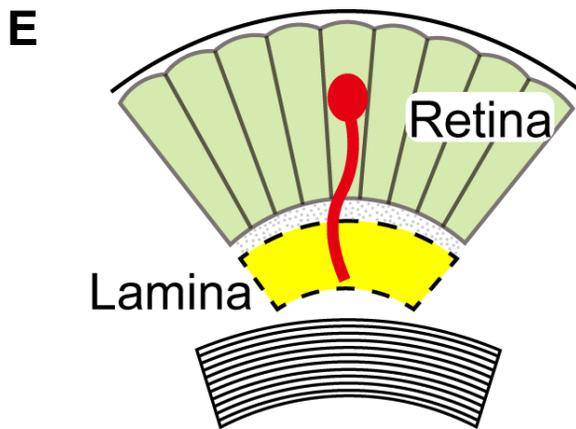
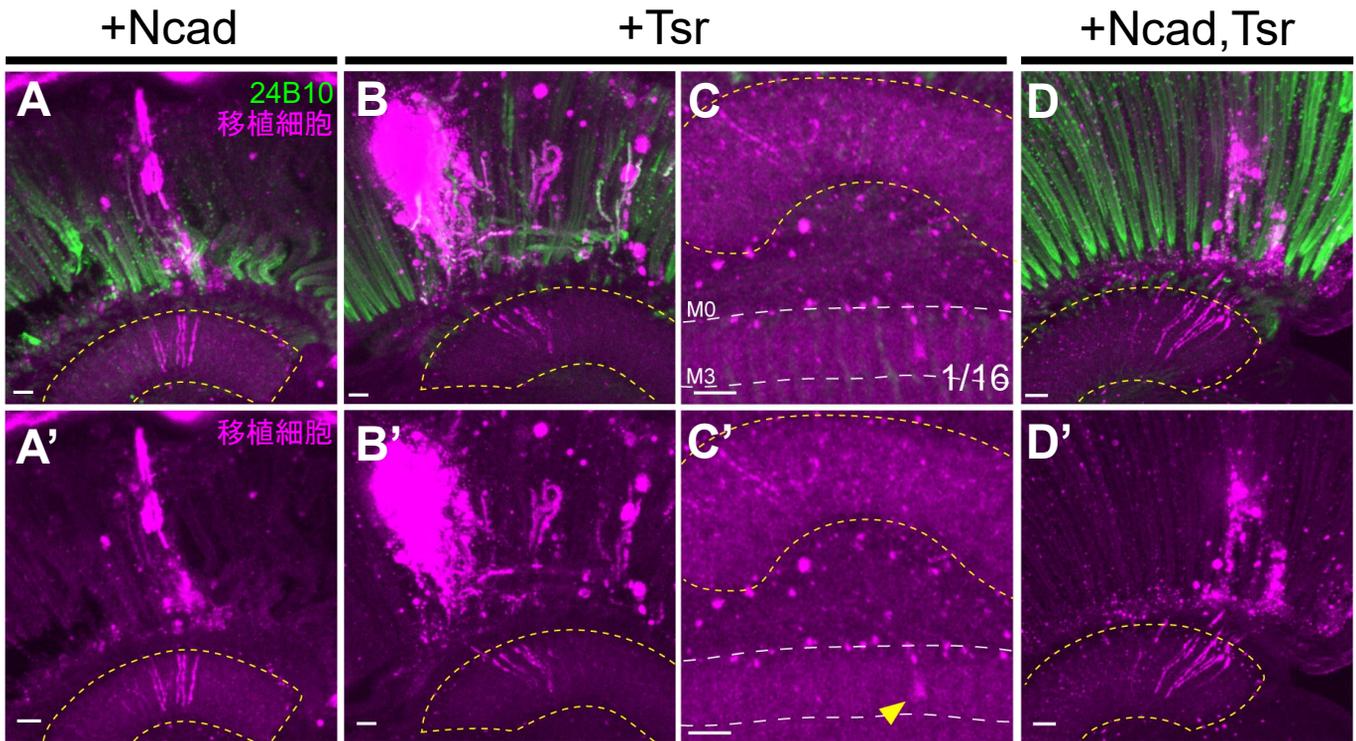


図11. *Ncad*もしくは*tsr*を過剰発現させた細胞の移植

(A-D) 移植細胞はRFP (マゼンタ) で標識、視細胞をmAb24B10 (緑) で染色した。破線 (黄) はLaminaを示す。(A,A') *Ncad*を過剰発現した細胞は、移植した個体の39.3%においてLaminaへ軸索伸長した ($n = 28$)。 (B,B') *tsr*を過剰発現した細胞は、移植した個体の30.8%においてLaminaへ軸索伸長した ($n = 39$)。 (C,C') *tsr*を過剰発現したの細胞の移植においてLaminaまで軸索伸長したサンプルのうち、1ケース Medullaへの軸索伸長が見られた。黄色い矢頭は伸長した軸索、破線 (白) はMedullaの層を示す。(D,D') *Ncad*と*tsr*を過剰発現した細胞は、移植した個体の73.1%においてLaminaへ軸索伸長した ($n = 26$)。 (E) Laminaへと軸索伸長した移植細胞の模式図。Retinaを超えてLamina (黄色) に軸索が到達した。スケールバー: 10 μ m

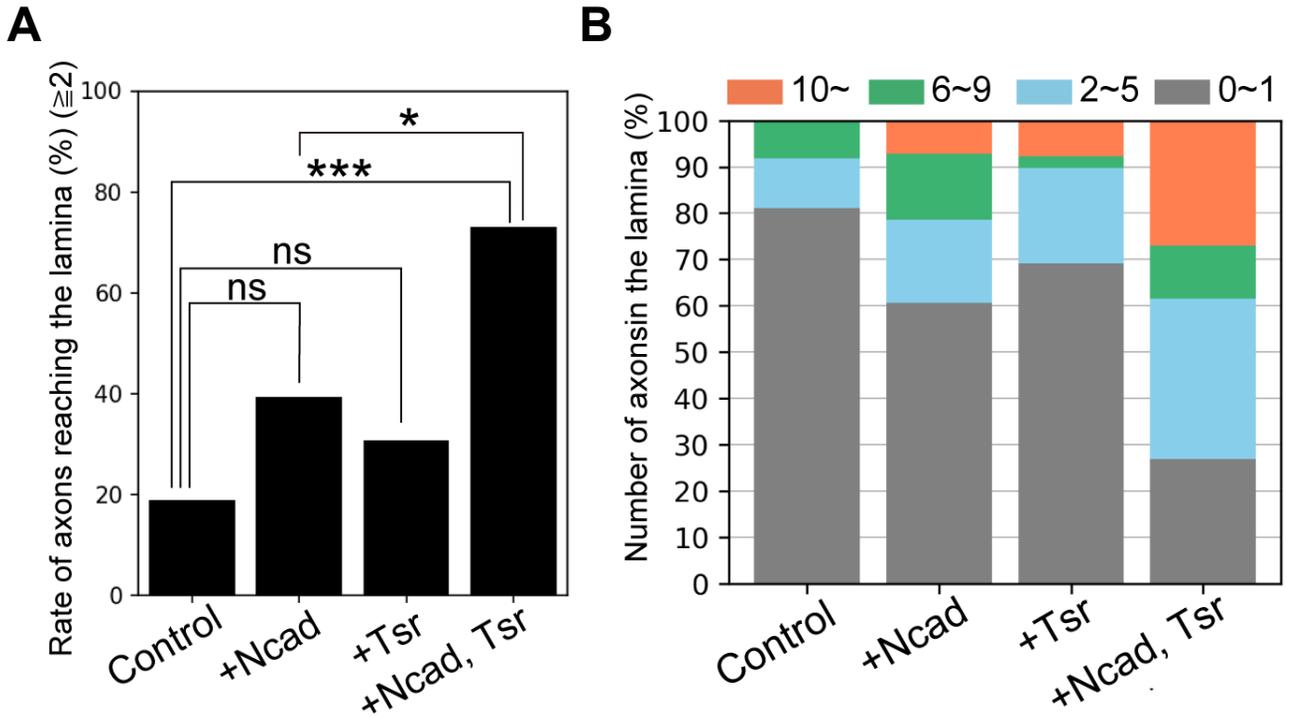


図12. 移植した細胞の軸索伸長比較 (Ncad、Tsr)

(A) Laminaへ軸索伸長した個体の割合。コントロールやNcad単独と比較して、Ncadとtsrの過剰発現において有意差が見られた。(B) Laminaへ伸長した軸索数の割合。軸索数を4つに分類した:0~1 axon (灰色), 2~5 axons (青), 6~9 axons (緑), 10~axons (オレンジ)。コントロールでは10 axons以上伸長した個体は確認できず、Ncadとtsrを過剰発現した細胞を移植した個体の約40%が5本以上Laminaへ軸索伸長した。

n.s. $P \geq 0.05$, *** $P < 0.001$

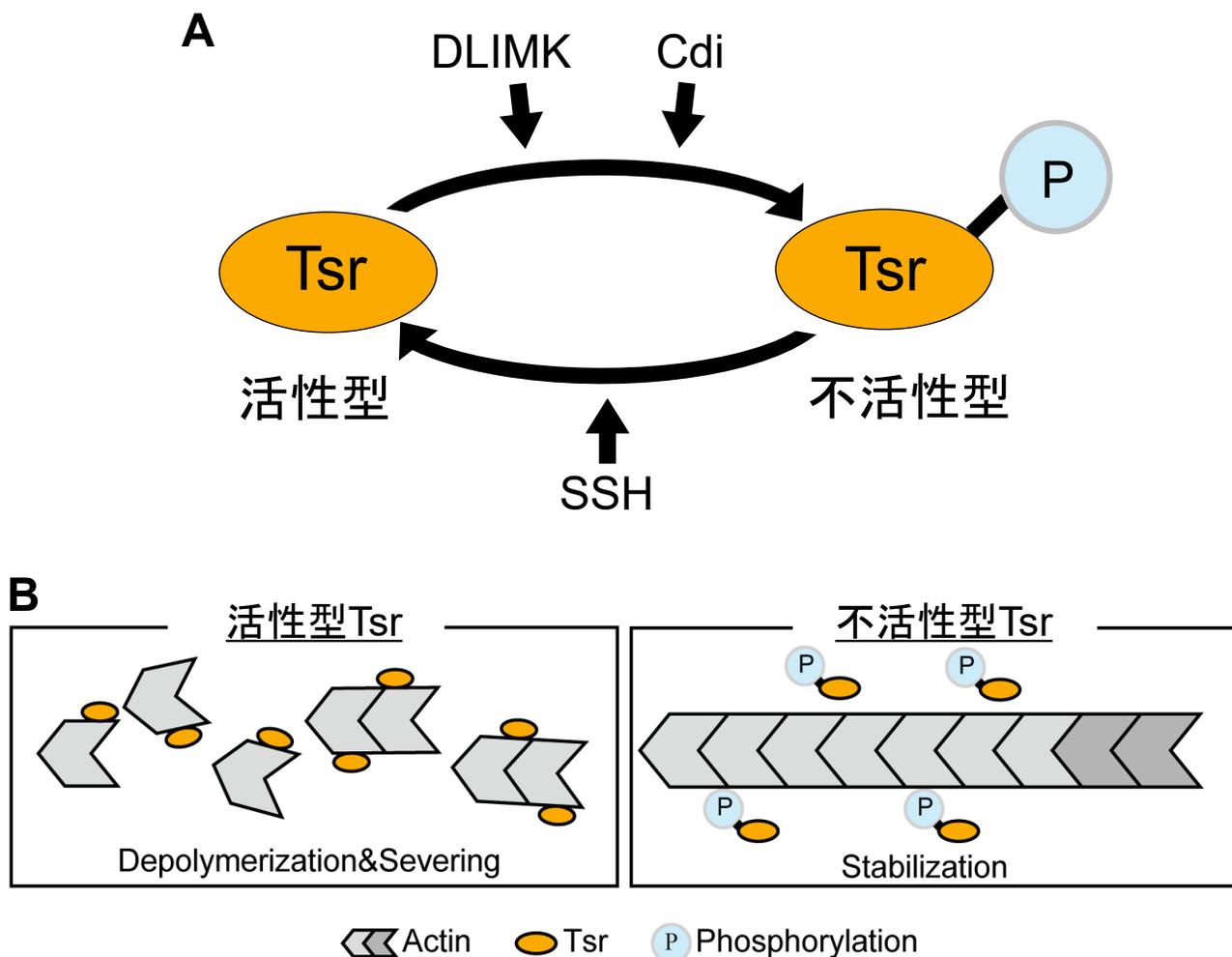


図13. 活性型Tsrと不活性型Tsrの機能

(A) TsrはDLIMKやCdiによってリン酸化されることで不活性化され、SSHによって脱リン酸化されることによって活性化される。(B) 活性型／不活性型Tsrの模式図。活性型Tsrはアクチンの脱重合・切断を促進し、不活性型Tsrはアクチンの安定化に寄与する。

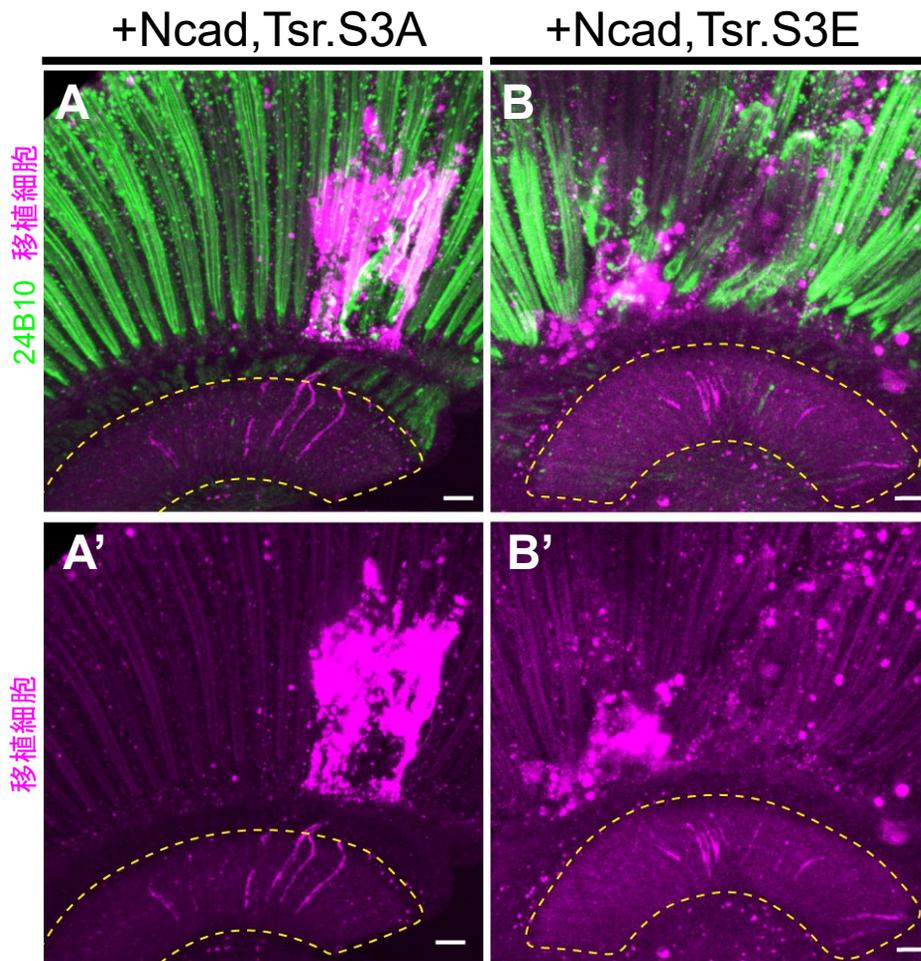


図14. *Ncad*と活性型/不活性型 *tsr*を過剰発現させた細胞の移植

(A,B) 移植細胞はRFP (マゼンタ) で標識、視細胞をmAb24B10 (緑) で染色した。破線 (黄) はLaminaを示す。(A,A') *Ncad*と*tsr.S3A*を過剰発現した細胞は、移植した個体の52%においてLaminaへ軸索伸長した ($n = 25$)。(B,B') *Ncad*と*tsr.S3E*を過剰発現した細胞は、移植した個体の50%においてLaminaへ軸索伸長した ($n = 22$)。スケールバー: 10 μm

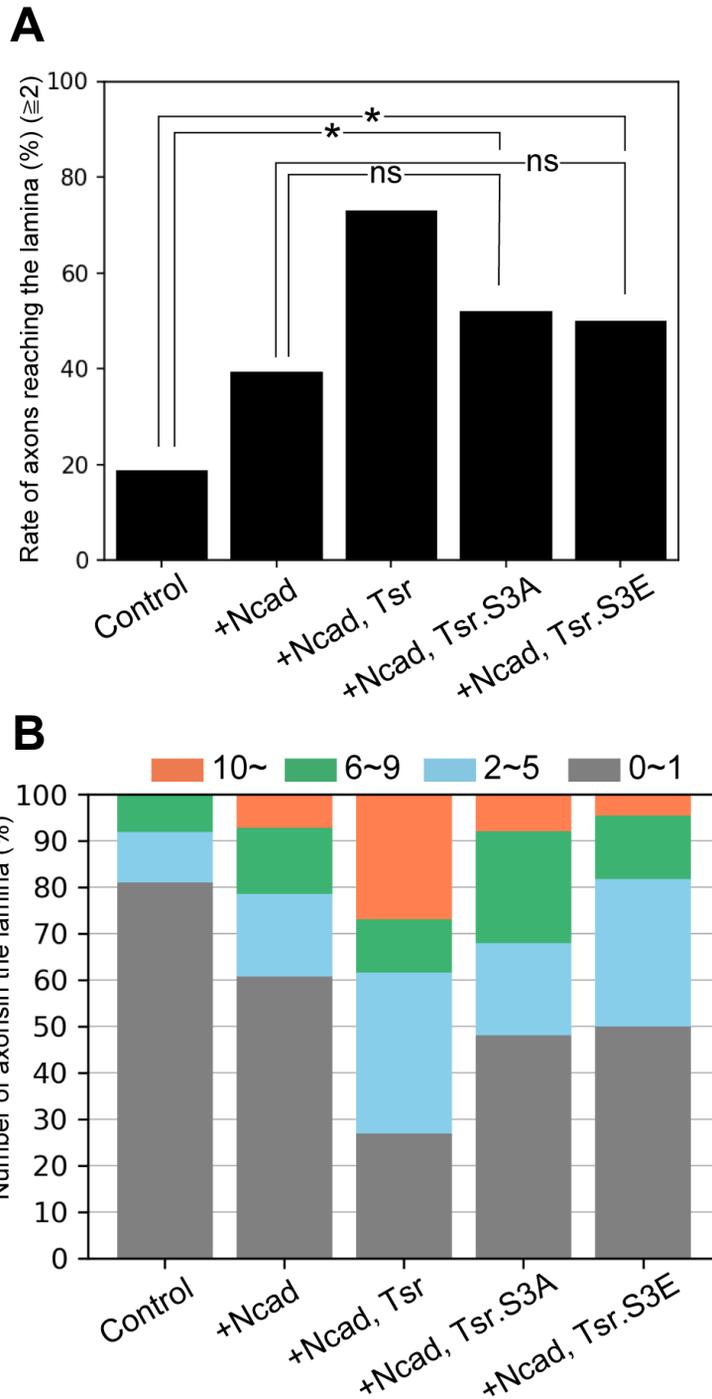


図15. 移植した細胞の軸索伸長比較(活性型/不活性型 Tsr)

(A) Laminaへ軸索伸長した個体の割合。コントロールと比較して、*Ncad*と*tsr.S3A*もしくは*tsr.S3E*の過剰発現において有意差が見られた。*Ncad*単独の過剰発現と比較して、有意差は見られなかった。(B) Laminaへ伸長した軸索数の割合。軸索数を4つに分類した: 0~1 axon (灰色), 2~5 axons (青), 6~9 axons (緑), 10~axons (オレンジ)。活性型/不活性型 *tsr*を発現させた場合は1個体あたりの軸索伸長数に減少傾向が見られた。n.s. $P \geq 0.05$, * $P < 0.05$

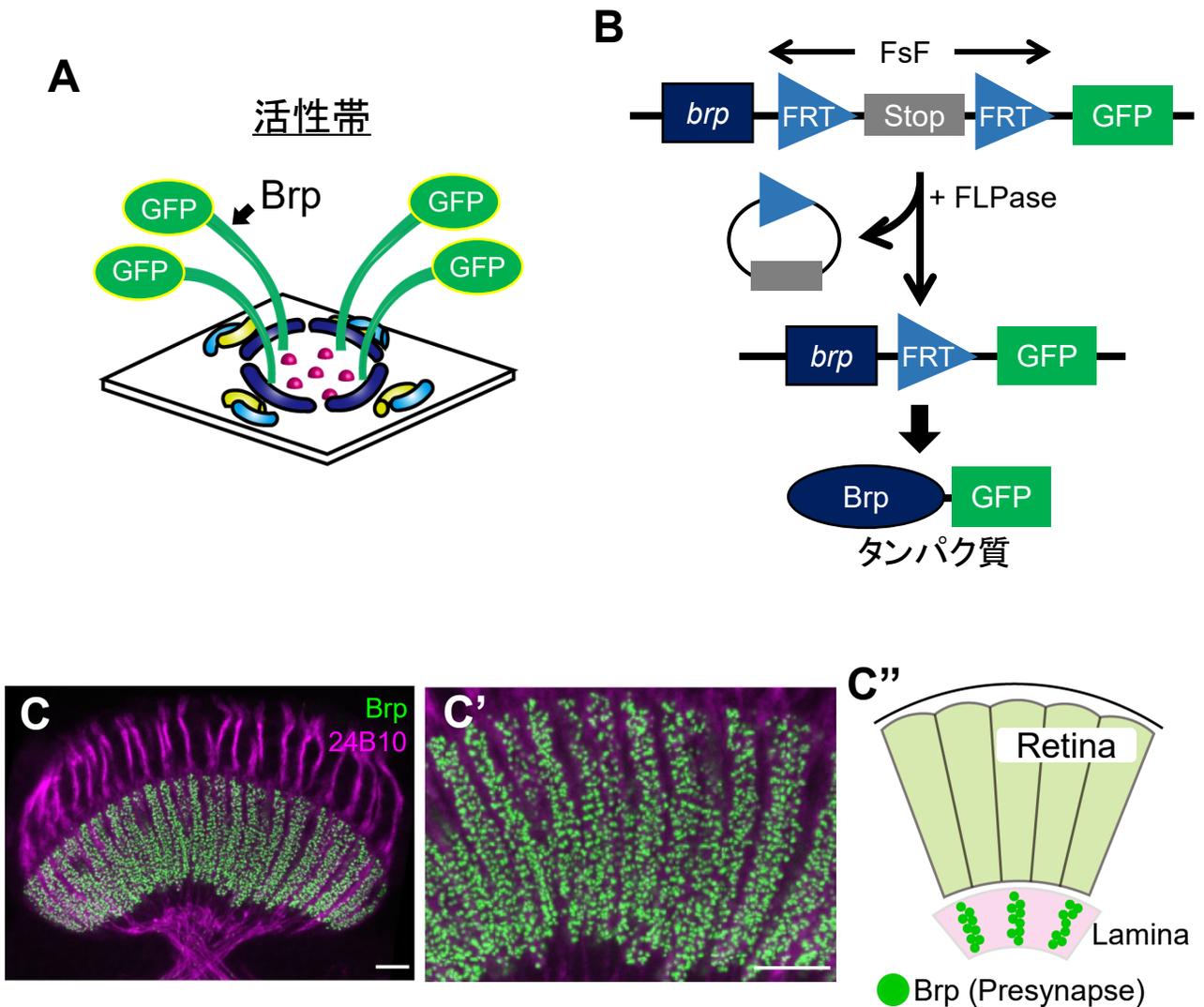


図16. Brpの標識によるシナプスの可視化

(A) 活性帯の模式図。前シナプスの活性帯構成タンパク質BrpをGFPにより標識することによってシナプスを可視化することができる。(B) FLP-FRTシステムの模式図。FRT配列に挟まれたStopコドンは組換え酵素FLPによって取り除かれる。そのため、FLPが発現する細胞特異的にGFPによる標識が可能である。(C) 成虫のLaminaにおける内在性Brpの局在。視細胞特異的に標識したBrp(緑)は点状に観察される。視細胞はmAb24B10 (マゼンタ) で染色した。(C') (C) を拡大した画像。(C'') Laminaにおけるシナプスの模式図。スケールバー: 10 μ m

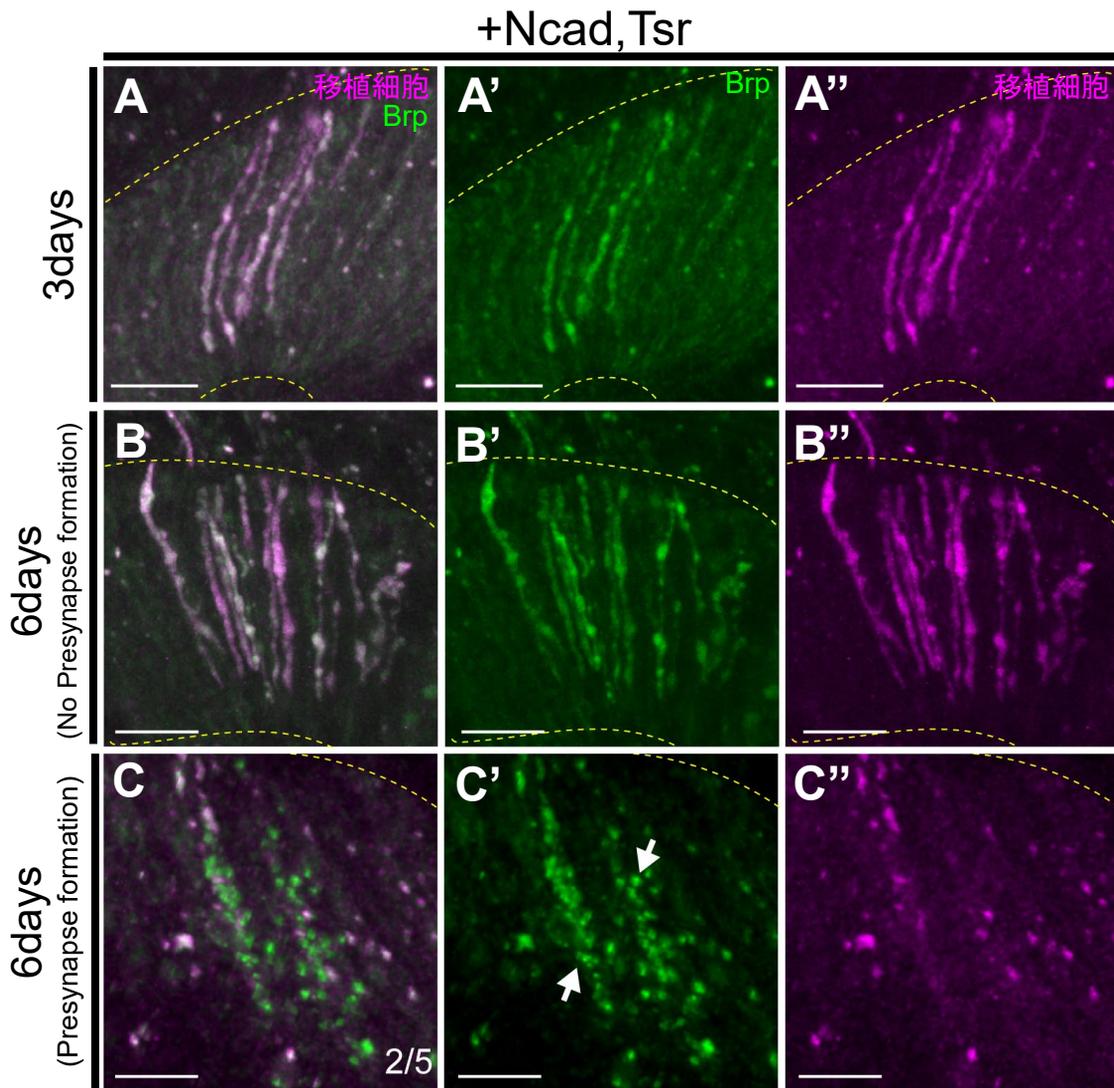
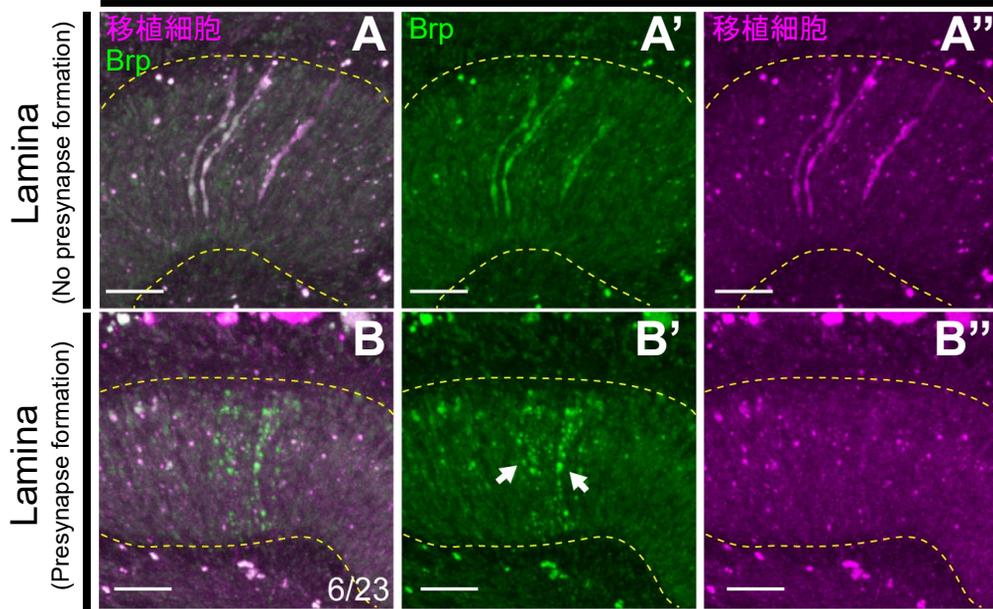


図17. 伸長した軸索における前シナプス構造の形成

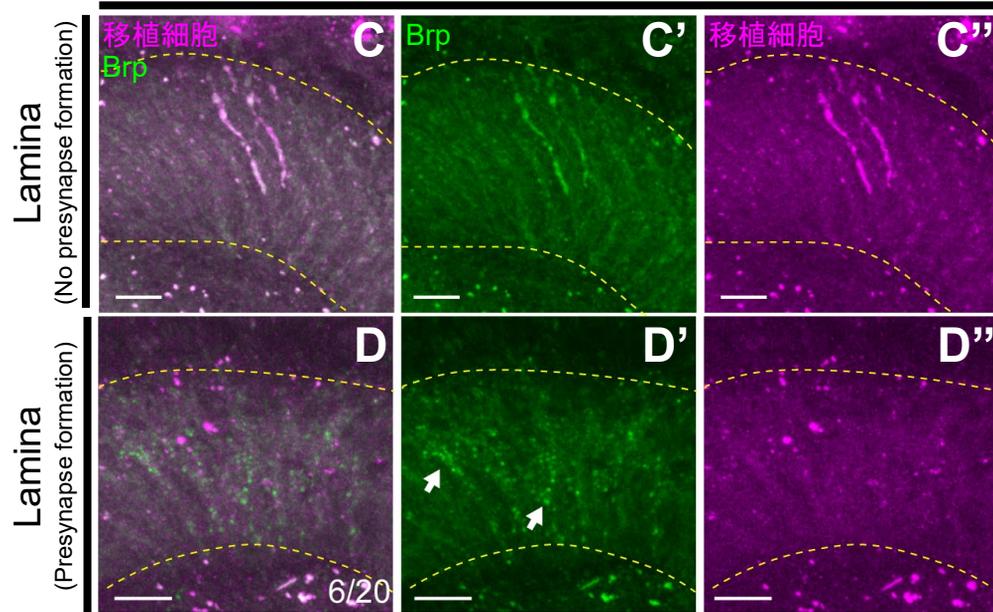
(A-C) *Ncad*と*Tsr*を過剰発現した移植細胞はRFP (マゼンタ) で標識、Brp (緑) はGFPで標識した。破線 (黄) はLaminaの領域を示す。(A-A'') BrpをGFPで標識し、*Ncad*と*Tsr*を過剰発現した細胞は、移植3日後にLaminaへ軸索が伸長したと共に、軸索全体にBrpシグナルが確認された ($n = 10/16$)。しかし、点状のシグナルは確認されなかった。(B-B'') 移植から6日後、Laminaへ軸索伸長したと共に、軸索全体にBrpシグナルが確認された ($n = 5/7$)。 (C-C'') Laminaへ伸長した個体のうち2個体において点状のBrpシグナルが確認された。

スケールバー: 10 μm

+Ncad, Tsr, NrX-1



+NrX-1



+Tsr, NrX-1

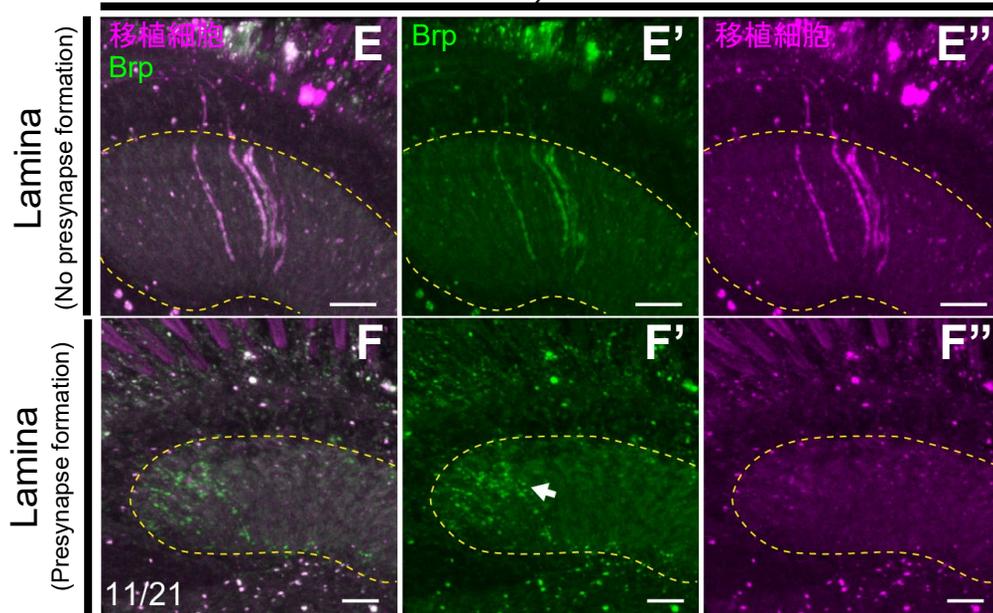


図18. *Nrx-1*を過剰発現した細胞の移植

(A-F) 移植細胞はRFP (マゼンタ) で標識、Brp (緑) はGFPで標識した。破線 (黄) は Laminaの領域を示す。矢印 (白) は明瞭な前シナプスを示す。(A-A'') BrpをGFPで標識し、*Ncad*, *tsr*, *Nrx-1*を過剰発現した細胞は、移植3日後に69.6%のハエでLaminaに軸索伸長した ($n = 23$)。伸長した軸索全体にBrpシグナルが確認された。(B-B'') 移植した個体のうち26.1%において、伸長した軸索に点状のBrpシグナルが確認された ($n = 6/23$)。 (C-C'') BrpをGFPで標識し、*Nrx-1*のみを過剰発現した細胞は、移植3日後に65%のハエでLaminaに軸索伸長した ($n = 20$)。伸長した軸索全体にBrpシグナルが確認された。(D-D'') 移植したハエのうち30%において、伸長した軸索に点状のBrpシグナルが確認された ($n = 6/20$)。 (E-E'') BrpをGFPで標識、*tsr*, *Nrx-1*を過剰発現した細胞は、移植3日後に76.2%のハエでLaminaに軸索伸長した ($n = 21$)。伸長した軸索全体にBrpシグナルが確認された。(F-F'') 移植したハエのうち52.4%において、伸長した軸索に点状のBrpシグナルが確認された ($n = 11/21$)。スケールバー: 10 μm

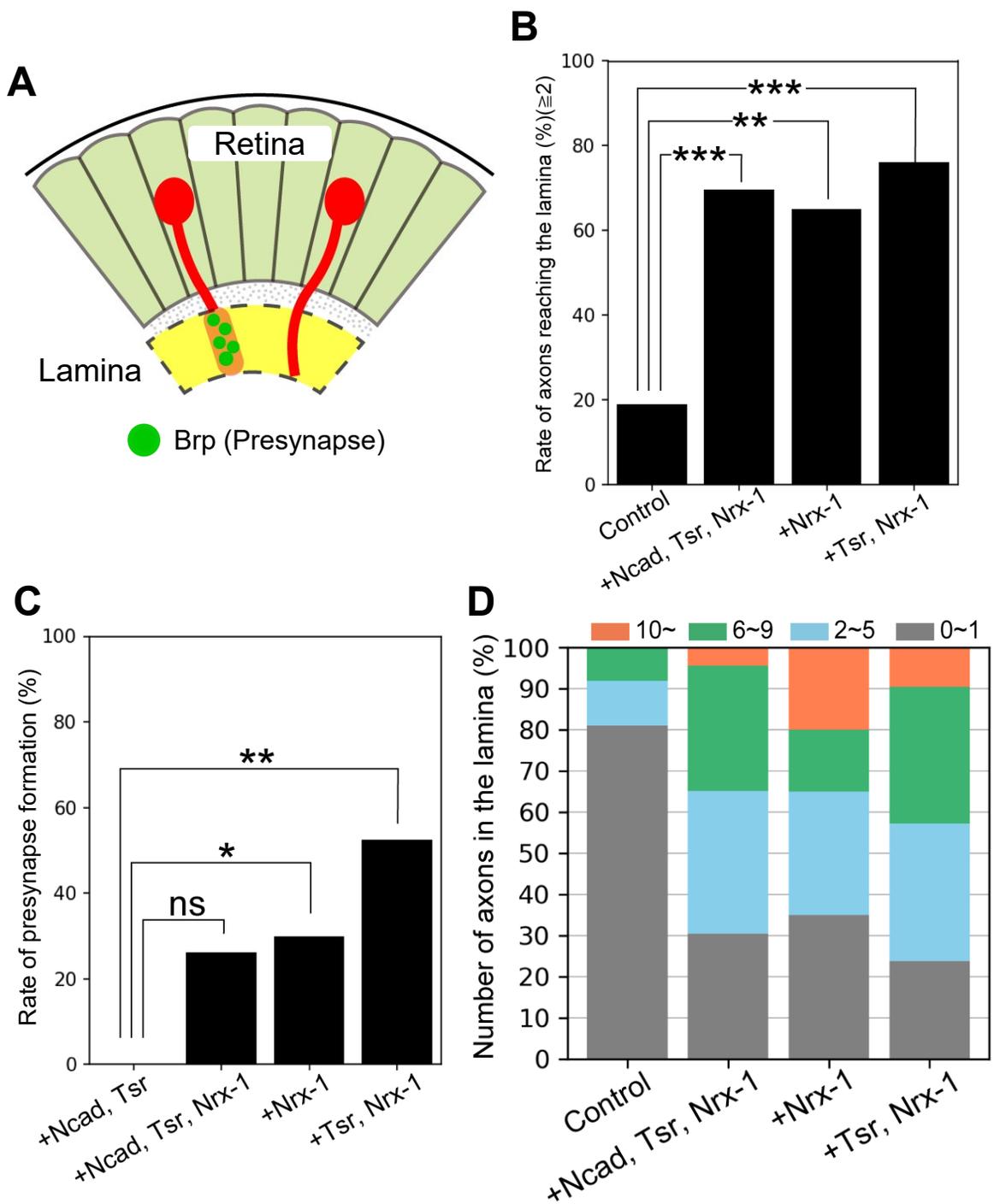


図19.移植した細胞の軸索伸長比較(Nrx-1)

(A) Laminaにおいて前シナプス構造を形成した軸索と形成しなかった軸索の模式図。
 (B) Laminaへ軸索伸長した個体の割合。コントロールと比較して*Ncad*,*tsr*,*Nrx-1*の過剰発現、*Nrx-1*の過剰発現、*tsr*,*Nrx-1*の過剰発現において有意差が見られた。(C) 伸長した軸索において前シナプス構造を形成した個体の割合。*Ncad*と*tsr*の過剰発現と比較して、*Nrx-1*の過剰発現、*tsr*と*Nrx-1*の過剰発現において有意差が見られた。(D) Laminaへ伸長した軸索数の割合。軸索数を4つに分類した: 0~1 axon (灰色), 2~5 axons (青), 6~9 axons (緑), 10~axons (オレンジ)。10本以上軸索伸長した割合は*Nrx-1*の過剰発現において高かった。n.s. $P \geq 0.05$, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

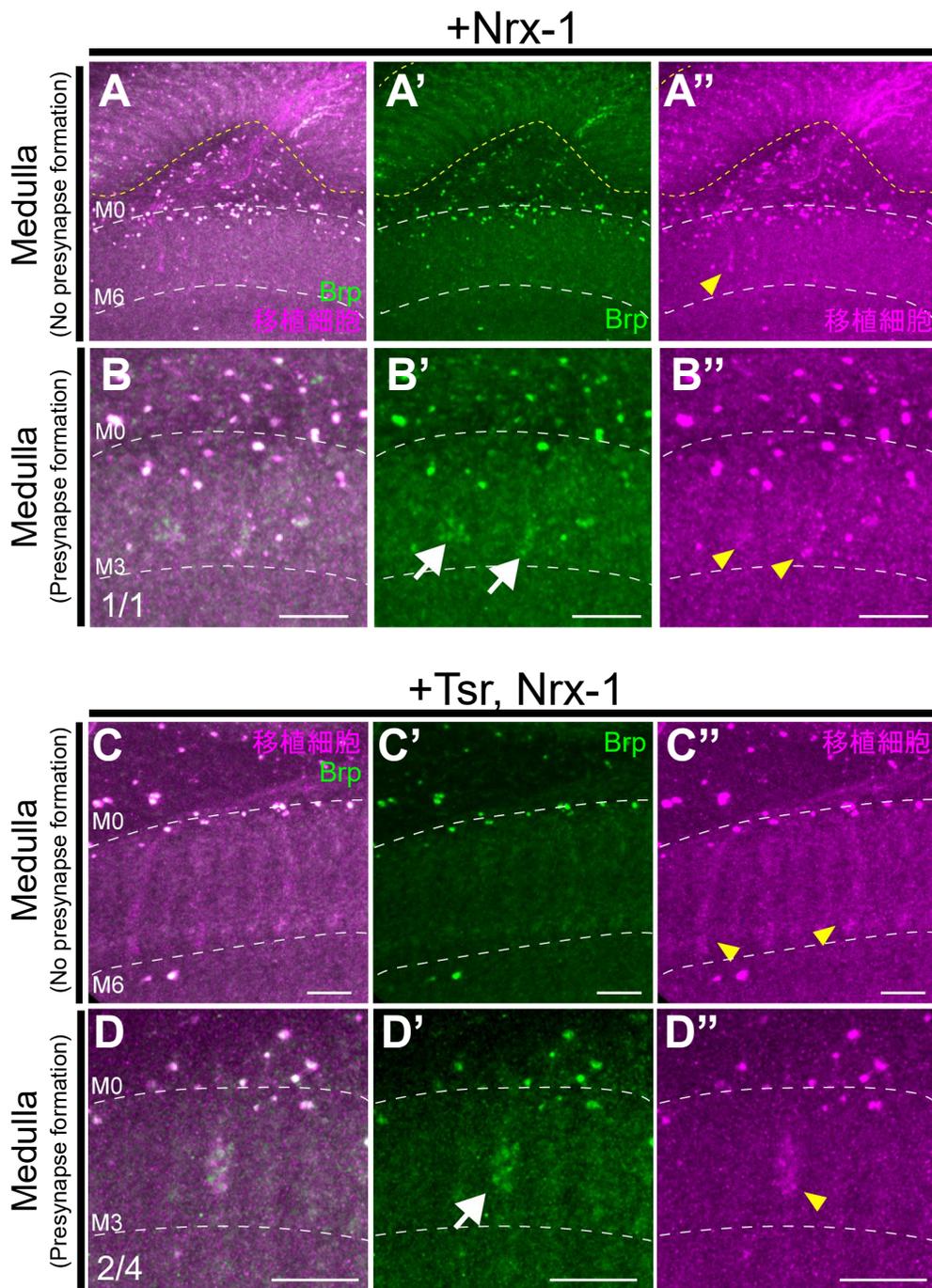


図20. 移植細胞のLaminaを超えたMedullaへの軸索伸長

(A-D) 移植細胞はRFP (マゼンタ) で標識、Brp (緑) はGFPで標識した。破線 (黄) はLaminaの領域、破線 (白) はMedullaの層を示す。矢頭 (黄) が軸索を、矢印 (白) が明瞭な前シナプスを示す。(A) *Nrx-1*を過剰発現した細胞は、Laminaへ軸索伸長した個体のうち1ケース MedullaのM2-M5層へ軸索伸長した ($n = 1/15$)。 (B-B'') Medullaへ伸長した軸索において前シナプスの形成が確認された。(C-C'') *Tsr, Nrx-1*を過剰発現した細胞は、Laminaへ軸索伸長した個体のうち4ケース Medullaへの軸索伸長が見られた ($n = 4/20$)。最も伸長したものはMedullaのM6層に到達した。(D-D'') Medullaへ伸長した軸索において前シナプスの形成が確認された。スケールバー: 10 μm

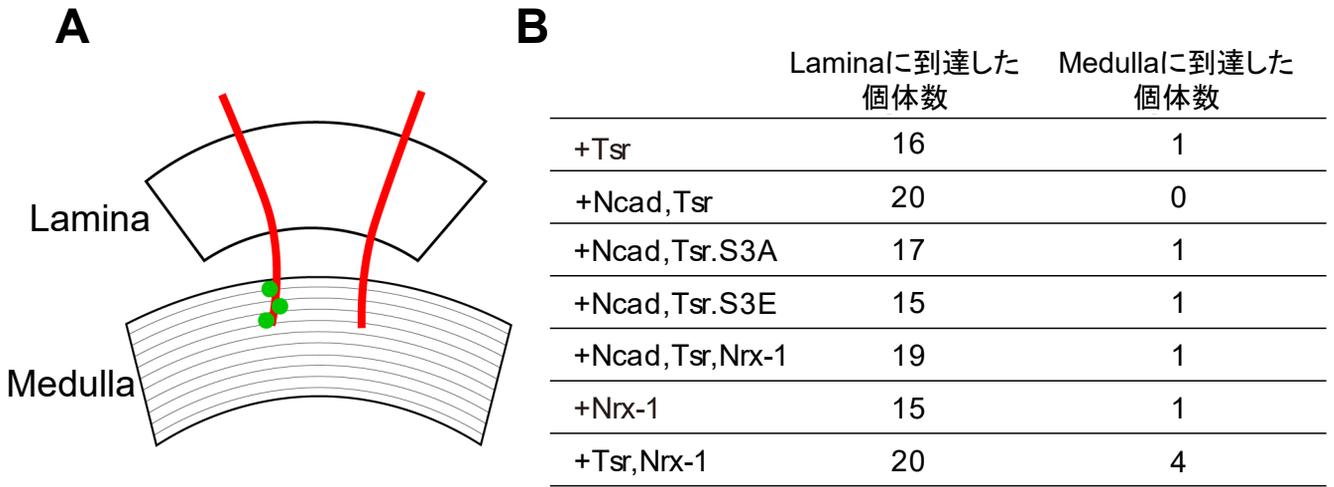
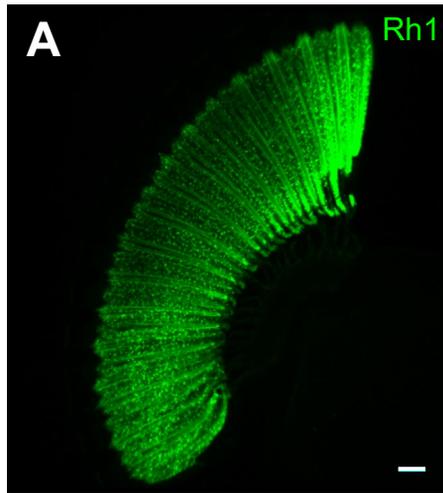


図21. Medullaへ伸長した軸索数

(A) Medullaまで伸長し、Medullaにおいて前シナプス構造を形成した軸索と形成しなかった軸索の模式図。(B) Laminaまで軸索伸長した個体のうちMedullaまで軸索伸長した個体の数。*Tsr*, *Nrx-1*を過剰発現させた細胞の移植においてMedullaへの到達率が高かった。



+Ncad, Tsr

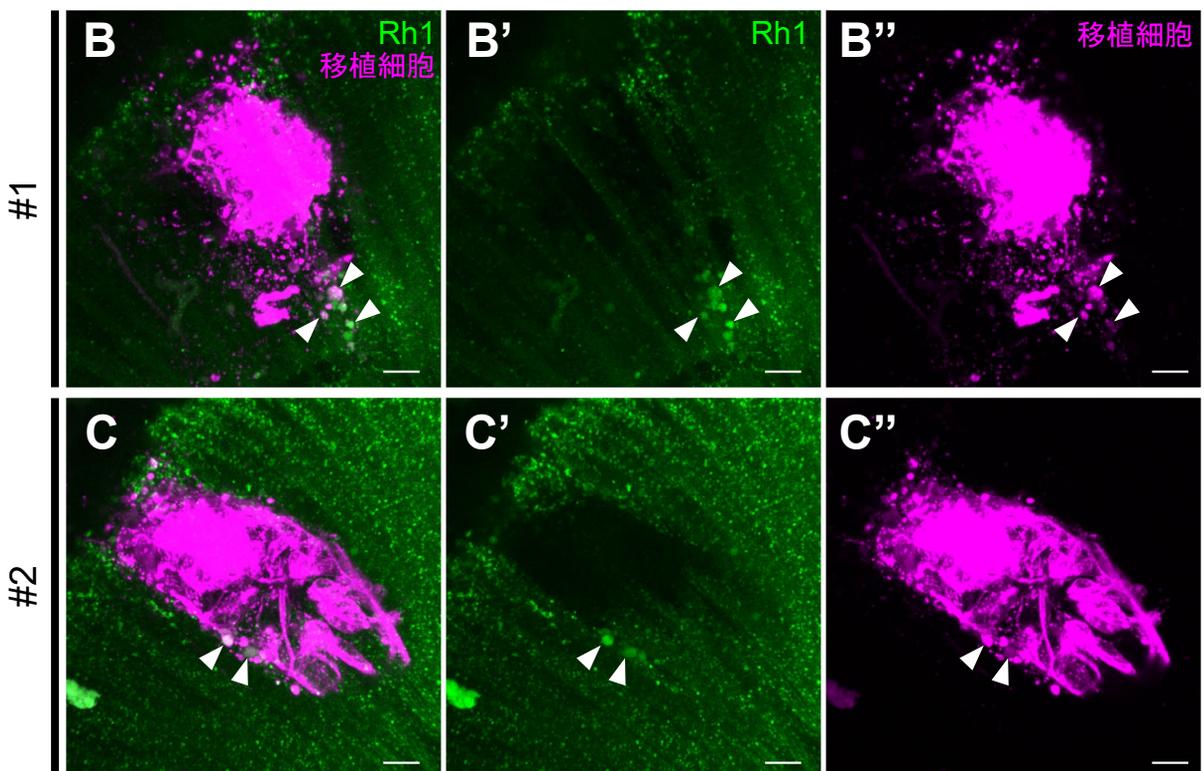


図22. 移植細胞におけるロドプシン(Rh1)の発現

(A) Rh1 (緑)による染色。RetinalにおいてRh1はR1-R6特異的に発現している。(B,C) 移植細胞はRFP (マゼンタ)で標識し、緑はRh1を示す。矢頭(白)はRh1により染色された移植細胞を示す。一部の細胞にのみRh1が発現していることが分かった。

スケールバー (A): 20 μm 、(B,C): 10 μm

Control (Brp-GFP)

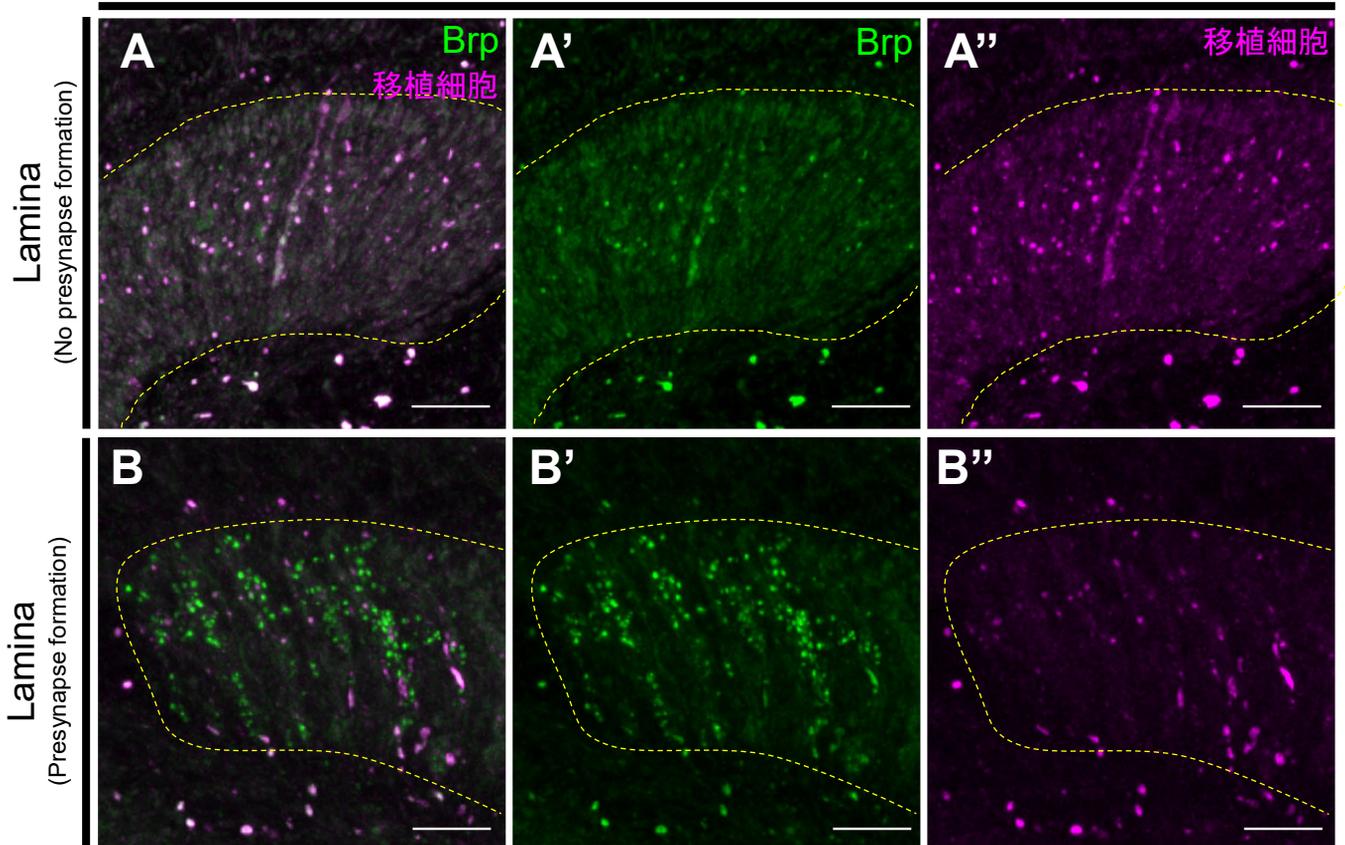


図23. コントロールにおけるBrp-GFPの発現

(A,B) 移植細胞はRFP (マゼンタ) で標識、Brp (緑) はGFPで標識した。破線 (黄) は Lamina の領域、矢印 (白) は明瞭な前シナプスを示す。(A-A'') *elav-FLP GMR-FsF-Gal4* で標識した細胞を移植した場合における Brp-GFP の発現を観察した結果、Lamina へ伸長した軸索全体で Brp-GFP の発現していた。(B-B'') Lamina において点状の Brp-GFP シグナルが確認された。スケールバー: 10 μm

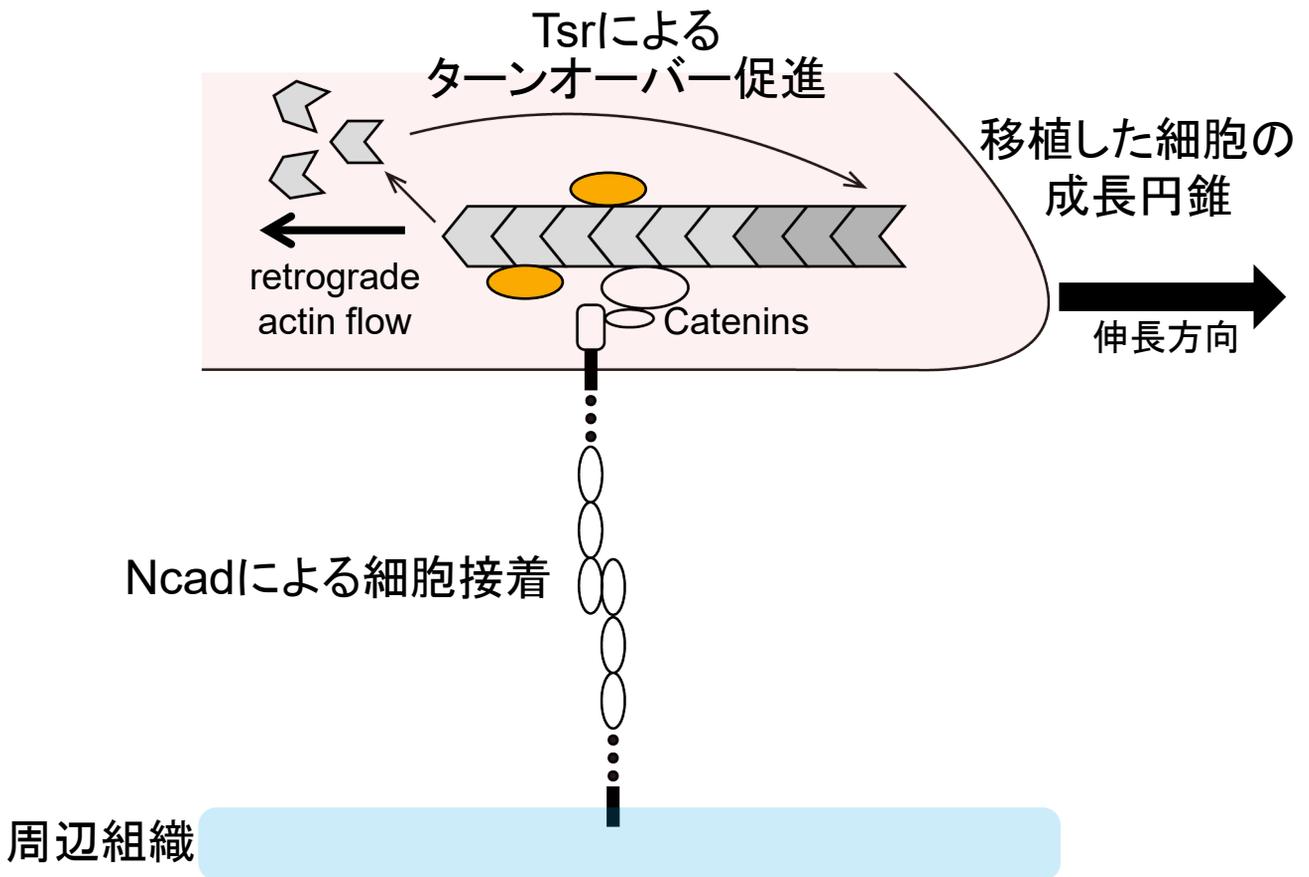


図24. NcadとTsrによる軸索伸長の模式図

本研究で明らかになったNcadとTsrの移植細胞の軸索伸長における関係性を表した模式図である。Tsr（オレンジ）によってアクチンターンオーバーが促進され、retrograde actin flowが増加する。それと同時に、Cateninsを介してアクチンフィラメント（灰色）と結合しているNcadによって、周辺組織（水色）と接着することによって、細胞膜が伸長方向へと伸長し、軸索伸長に繋がったと考えられる。

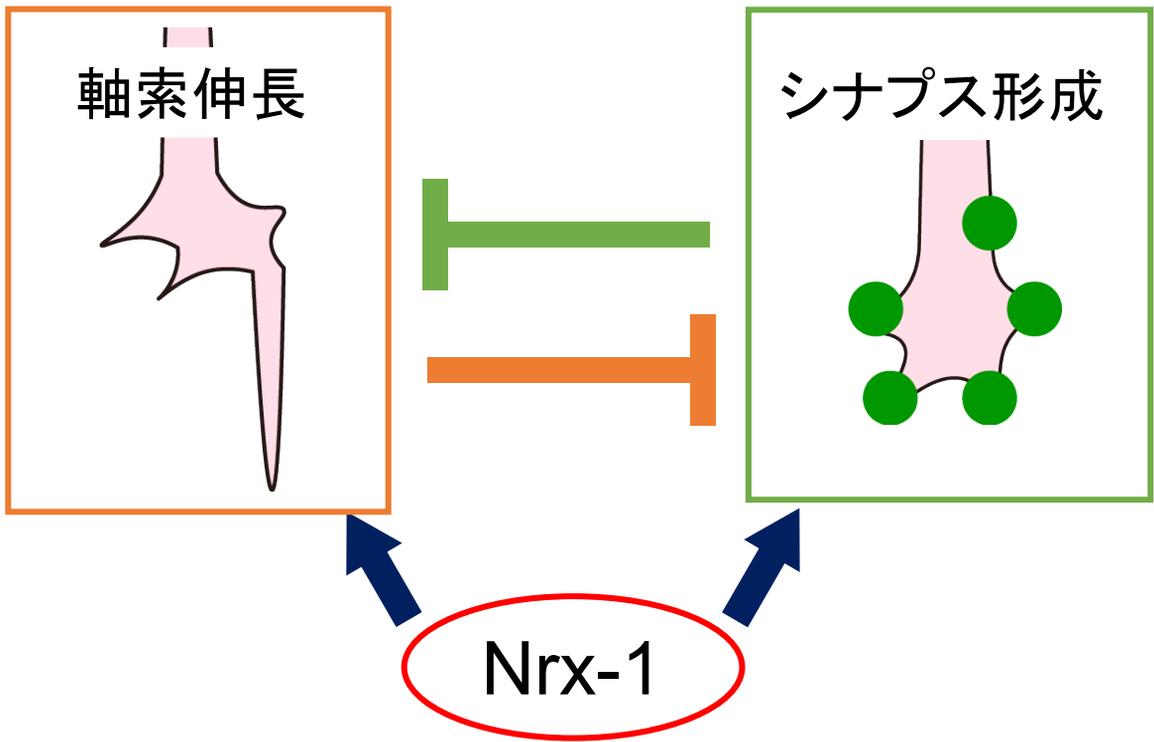


図25. Nrx-1による軸索伸長促進とシナプス形成の模式図

Nrx-1による軸索伸長促進とシナプス形成の関係性を表した模式図である。軸索伸長とシナプス形成について、軸索伸長が起こっている場合はシナプスの形成は抑制され、シナプス形成によって軸索伸長が抑制されると考えられているが、移植細胞においてNrx-1を過剰発現することによって、軸索伸長もシナプス形成も両方促進されることが分かった。