

平成 31 年 11 月 14 日

海外特別研究員最終報告書

独立行政法人 日本学術振興会 理事長 殿

採用年度 平成 29 年度

受付番号 67

氏 名 酒井 奈緒子

(氏名は必ず自署すること)

海外特別研究員としての派遣期間を終了しましたので、下記のとおり報告いたします。

なお、下記及び別紙記載の内容については相違ありません。

記

1. 用務地（派遣先国名）用務地： ニューヨーク （国名： 米国 ）
2. 研究課題名（和文）※研究課題名は申請時のものと違わないように記載すること。
神経系でのシナプス接続の特異性を決める分子の同定
3. 派遣期間：平成 29 年 7 月 1 日 ～ 平成 31 年 6 月 30 日
4. 受入機関名及び部局名
アルバートアインシュタイン医科大学 Department of Genetics
5. 所期の目的の遂行状況及び成果…書式任意 **書式任意（A4 判相当 3 ページ以上、英語で記入**

も可）

(研究・調査実施状況及びその成果の発表・関係学会への参加状況等)

(注)「6. 研究発表」以降については様式 10－別紙 1～4 に記入の上、併せて提出すること。

5. 所期の目的の遂行状況及び成果

【目的の遂行状況】

研究はやや遅れているものの進展している。

本研究の大きな目的は、細胞表面に存在する細胞接着分子が神経接続パターンを決めているのか、決めているとしたらどのように決めているのかを調べることである。その目的のため、我々は、線虫 *C. elegans* の雄の尾部の神経接続と細胞接着分子の発現パターンに着目し、研究を進めている。この研究により、特定の神経を特徴付ける細胞接着分子の発現パターンを特定することを期待していた。現在までに、神経細胞の形態に影響を与える細胞接着分子を見つけたものの、どのような制御により神経の発生運命が制御されているのかを解明するには至っていない。

【研究の実施状況】

本研究は、主に 3 つのテーマにより構成されている。

- [1. 線虫の尾部の細胞接着分子の発現パターンの解析]
- [2. 線虫交尾器の Ray 感覚神経のパートナー特異性を決定する細胞接着分子の探索]
- [3. 雄尾部の発生に関わる転写因子変異体での細胞接着分子発現パターンの観察]

[1. 線虫の尾部の細胞接着分子の発現パターンの解析]

本テーマの目的は、線虫尾部で発現するすべての細胞接着分子の発現パターンを知り、細胞接着分子の発現マトリックスを作成することである。当研究室ではこれまでに、線虫の雄の尾部のすべての神経細胞の接続パターンを解析、報告してきた(Jarrel et al., 2012. Cook et al., 2019)。これに加え、線虫尾部での細胞接着分子の発現を網羅的に解析することで、神経接続と細胞接着分子との相関を探ろうと試みている。線虫の神経系に発現する細胞接着分子は 114 個が報告されており、これまでに、各細胞接着分子の予測プロモーター領域に GFP をつなげたプラスミドを線虫に導入し、100 個の細胞接着分子について解析を終えている。

私は、線虫の尾部の発生に特に重要と思われる 10 遺伝子について、より正確な発現パターンを得るために、Crispr/Cas 9 システムを用いて蛍光タンパクである mNeongreen をコードする DNA をゲノムにノックインし、これまでに得られたプラスミド導入個体の発現パターンと一致するかどうかを検証した。このうち 5 系統に関しては、mNeongreen の発現が弱すぎたために発現細胞を同定することができなかった。一方、このうち一つの細胞接着分子については、プラスミド導入個体では 2 細胞でしか発現が見られなかったのに対し、Crispr-Cas9 システムを用いた mNeongreen ノックイン個体では、計 6 個の細胞での mNeongreen 発現が確認された。Crispr-Cas9 システムを用いた蛍光タンパク質ノックイン系統では、プラスミド導入個体に比べより正確な発現パターンの情報が得られるものの、遺伝子によっては発現量の低さから、解析が困難であることが明らかになった。

また、残りの 14 の細胞接着分子についても現在、プラスミド導入による解析を進めている。本テーマについては来年度中に論文にしたいと考えている。

[2. 線虫交尾器の Ray 感覚神経のパートナー特異性を決定する細胞接着分子の探索]

雄の線虫の尾部に位置する Ray と呼ばれる器官は、交尾の際に雌雄同体との接触を感知し交尾行動を開始するのに必要な感覚器官であり、左右 9 対の A タイプ感覚神経(RA1~9)、左右 9 対の B タイプ感覚神経(RB1~9)と、A タイプ、B タイプ感覚神経を取り巻く左右 9 対の支持組織(Rst1~9)から構成される。Ray 感覚神経の発生過程はこれまでに複数の研究室により調べられていたものの、正確に神経接続が構築される機構は未だによくわかっていない。そこで、Ray 感覚神経に発現する細胞接着分子の変異体を用いて、プレシナプスの分布や神経の形状に異常が生じるかどうかを、特に B タイプ感覚神経に着目して調べた。B タイプの感覚神経に特異的に遺伝子発現を誘導する PKD-2 promoter に GFP をつないだものを発現させ、RB ニューロンの形態を観察した。当研究室で行われてきた細胞接着分子の発現パターン解析から、B タイプ感覚神経では、計 8 つの細胞接着分子が発現していることがわかっている。このうち、変異体が入った 6 つの変異体について、RB ニューロンの形態を詳細に解析したところ、*sax-3* 変異体で軸索形成の異常、および Ray の形態異常が見られた。野生型では左右 9 対見られる Ray 感覚器が、*sax-3* 変異体においては Ray3 と Ray4 が

融合した形態となっていたほか、野生型では RB ニューロンの軸索同士で束を形成する部位 (synaptic ring と呼んでいる) の形が円状に形成されるのに対し、*sax-3* 変異体では synaptic ring の形状が歪になっていた。RNAi によるノックダウン実験でも同様の結果が見られた。現在、レスキュー実験と時期特異的 RNAi 実験により、*sax-3* の機能部位、機能タイミングを調べている。

また、各変異体で交尾行動に異常が見られるかも検証している。線虫の雄の Ray 神経の神経接続に異常が生じれば、交尾行動に異常が見られるはずである。各細胞接着分子の変異体の雄を用いて、交尾の成功率を雄由来の染色体を持つ子孫の数を比較することで検証した。その結果、3 遺伝子の変異体の雄は野生型に比べて有意に交尾の成功率が低かった。これらの変異体での神経接続が異常になっていることが、交尾確率の低下の原因となっている可能性がある。線虫の交尾行動は順序だった 4 つの一連の行動(雌雄同体との接触、体表の探索、ターン、交尾針の挿入)から構成されることがわかっている。今後、さらに詳細に、どの交尾行動が異常になっているのかを検証する予定である。

[3. 雄尾部の発生に関わる転写因子変異体での細胞接着分子発現パターンの観察]

Emmons 研究室ではこれまでに、線虫の雄の尾部の発生異常を引き起こす転写因子をいくつか報告してきた。これらの発生異常が転写因子による細胞接着因子の発現制御異常によるものではないかという仮説に基づき、転写因子の変異体で、細胞接着分子の発現パターンが変化するかを検証した。

Ray の支持組織で発現する細胞接着分子の発現パターンを、雄の尾部の発生を制御することが知られる転写因子の変異体で観察した。このうち一つの転写因子変異体において、細胞接着分子の発現細胞の数が減少しているものがあり、現在細胞の同定を行なっている。

[今後について]

今後も当研究室で現在進行中のテーマをまとめるために研究を続ける予定である。テーマ 1,2 については、一年以内に発表したいと考えている。海外学振のサポートのおかげで、この 2 年間集中して研究に取り組むことができ、非常に感謝している。