

氏 名	フン マン アン HUYNH MAN ANH
学位(専攻分野)	博 士 (学 術)
学 位 記 番 号	博 1 1 8 3 号
学位授与の日付	令和 7 年 3 月 21 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
研 究 科 ・ 専 攻	工芸科学研究科 バイオテクノロジー専攻
学 位 論 文 題 目	Investigation of the roles of Chronophage and Anillin in the Drosophila neural development (ショウジョウバエ神経発生における Chronophage と Anillin の役割と研究)
審 査 委 員	(主査)准教授 吉田 英樹 教授 高野 敏行 教授 小谷 英治 教授 亀井加恵子

論文内容の要旨

神経の正常な発生、機能には、多くの遺伝子が関与している。また、神経の発生や成熟、機能の障害は、認知機能や運動機能、行動の障害を特徴とする神経発達障害 (Neurodevelopmental disorders: NDDs) を引き起こす。本申請論文では、ショウジョウバエの 2 種の遺伝子の神経細胞特異的なノックダウンが、学習や運動に与える影響について詳細に解析されている。本申請論文は、第一章「INTRODUCTION」、第二章「THE ROLE OF CHRONOPHAGE IN THE NERVOUS SYSTEM」、第三章「THE ROLE OF ANILLIN IN THE NERVOUS SYSTEM」、第四章「CONCLUSIONS AND FUTURE DIRECTIONS」から構成されている。

第一章では、本研究の背景が述べられている。NDDs は、社会性、認知機能、運動機能に長期的な影響を及ぼす中枢及び末梢神経系の発達に問題を抱える多様な疾患群であり、これらの障害は、遺伝的要因と環境要因が複雑に絡み合っている。現在、治療法は対症療法に限られており、より効果的な治療法を開発するには、NDDs で起きている異常を分子レベルで理解することが必要不可欠である。ショウジョウバエは、分子生物学的、細胞生物学的、遺伝学的な実験手法や材料が豊富で、神経系において遺伝子の機能を解析するために、非常に優れたモデル生物である。さらに、脳の神経細胞数はヒトに比べて少なく、複雑な行動の分子基盤を解析するために有利である点、ヒトの疾患に関わる遺伝子の 75% を有する高い相同性、また、神経活性化化合物に対する薬理学的反応の類似点から、ショウジョウバエが、神経細胞における遺伝子の機能解析において有用であることを述べている。続いて、本申請論文で機能解析を行なった *Chronophage (Cph)* と *anillin (ani)* について説明している。*Cph* は、NDDs との関連が示唆されている転写因子 BCL11A/B のショウジョウバエの相同遺伝子で、ショウジョウバエにおいても神経の分化、発生で機能することが知られている。また、*ani* は分裂細胞での機能が広く知られているが、ヒト、ショウジョウバエいずれにおいても中枢神経系で発現が高く、神経細胞において保存された機能を有することが予想されることから、ショウジョウバエの神経系における *Cph* 及び *ani* 遺伝子の機能解明が NDDs を含めた神経疾患の発症機構の理解に繋がる可能性を述べている。最後に、本申請論文の目的を述べ、目的を達成することで、NDDs を含めた神経疾患のより深い理解と治療戦

略の基盤となる可能性を述べている。

第二章では、*Cph* を神経細胞特異的にノックダウンし、幼虫及び成虫の行動や組織学的解析を行なっている。*Cph* は選択的スプライシングにより 5 つのバリエーションが発現することが示唆されていたが、神経細胞において発現するバリエーションを、定量的 PCR により明らかにしている。続いて、*Cph* の神経系での機能を明らかにするために、*Cph* を神経細胞特異的にノックダウンし、幼虫及び成虫の行動を観察した。その結果、ノックダウンにより幼虫の運動及び学習能力の低下や成虫の機械刺激によるけいれん様行動が誘発されることを示している。この神経細胞特異的 *Cph* ノックダウン幼虫の神経筋接合部 (NMJ) を免疫染色法にて可視化し観察した結果、シナプスの分岐数が有意に増加していることが明らかとなった。また、哺乳動物で明らかにされた BCL11A/B が発現制御する遺伝子の相同遺伝子の発現量が、*Cph* のノックダウンにより低下することから、BCL11A/B と *Cph* の分子機能の類似性も明らかにした。

第三章では、分裂細胞の収縮環で機能するアクチン結合タンパク質 *Ani* の神経細胞における機能解析を行なっている。これまで、*ani* は、分裂細胞での機能が精力的に解析されてきた一方で、ヒトにおいては、中枢神経系が、*ani* の発現量が最も高い部位の一つであることが報告されていた。また、ショウジョウバエにおいても、ヒトと同様、中枢神経系で高発現することが示されていることから、*ani* が神経系で機能しているのではないかとこの着想を得て、神経細胞特異的に *ani* をノックダウンし、その影響を調べた。*Ani* タンパク質の中枢神経系での発現を免疫染色法によって調べたところ、そのほとんどが増殖している細胞で発現する一方、末梢神経細胞では、軸索や NMJ で、低いながらも特徴的な発現パターンを示すことを明らかにした。中枢神経系全体で *ani* をノックダウンすると、ほとんどの個体が蛹の間に致死となったが、幼虫期の運動能、学習能を調べたところ、いずれも低下していることが明らかとなった。神経細胞特異的 *ani* ノックダウン幼虫の中枢神経系のニューロピルを調べたところ、パターンが大幅に乱れており、細胞分裂も異常となることが明らかとなった。運動神経細胞特異的な *ani* ノックダウンでは、中枢神経系のニューロピルのパターンや学習能に影響を与えないことから、中枢神経系での *ani* の機能低下によりニューロピルのパターンが異常を来し、学習能が低下したことが示唆された。一方、運動神経細胞特異的な *ani* のノックダウンによって、運動神経細胞の軸索の *Ani* タンパク質の発現低下及びアクチン繊維のパターンの乱れ、NMJ の形態異常、幼虫の運動能が低下することも明らかにした。

第四章では、*Cph* 及び *ani* の神経細胞特異的なノックダウンによるそれぞれの影響をまとめ、応用の可能性及び今後の研究について提案している。

論文審査の結果の要旨

脳を含む中枢神経系が正常に発生、機能するには、多くの遺伝子が厳密且つ協調的に制御されることが必要である。これらの遺伝子の機能不全により、NDDs を含む様々な神経疾患を発症するが、その発症機構を明らかにするためには、中枢神経系の正常な発生、機能を理解する必要がある。しかし、ヒトの脳は 860 億個の神経細胞がネットワークを形成するなど、分子機構を理解するためには複雑過ぎる。そこで申請者は、ヒトの遺伝子との相同性が高く、中枢神経系の構造は単純ではあるが、神経と行動を関連させて解析するには十分に複雑であるショウジョウバエを

用いて、*Cph* と *ani* の神経系での機能を解析した。NDDs への関連が示唆される *BCL11A/B* のショウジョウバエの相同遺伝子 *Cph* の神経細胞特異的なノックダウンにより、幼虫の運動能及び学習能の低下、幼虫の NMJ の形態異常、成虫のてんかん様症状、転写制御の標的と予想される遺伝子の発現低下が認められた。また、*ani* の神経細胞特異的なノックダウンにおいても、幼虫の運動能と学習能、NMJ の形態異常が認められ、*ani* が中枢神経細胞の正常な機能において重要であることを示し、今後、神経疾患の原因遺伝子として同定され得る可能性を示している。これら二つの研究は、ショウジョウバエが、既知の神経疾患の発症機構の解析や未知の神経疾患の原因遺伝子の探索に有用であることを示しており、神経系における遺伝子解析だけでなく、新規治療薬開発への利用も期待され、社会的な影響も大きいと考えられる。

これらの研究の成果は、申請者が筆頭著者 1 編を含む、査読のある下記の国際科学雑誌 2 編に掲載された。

- 1) Knockdown of *Chronophage* in the nervous system mimics features of neurodevelopmental disorders caused by *BCL11A/B* variants
Mizuki Yamaguchi*, Man Anh Huynh*, Tomohiro Chiyonobu, Hideki Yoshida, Experimental Cell Research, 433(2):113827. doi: 10.1016/j.yexcr.2023.113827., 2023 *These authors contributed equally to this work.
- 2) The *anillin* knockdown in the *Drosophila* nervous system shows locomotor and learning defects
Man Anh Huynh, Dang Thi Phuong Thao, Hideki Yoshida, Experimental Cell Research, 444(2):114364. doi: 10.1016/j.yexcr.2024.114364, 2025