

eIF2 $\alpha$  リン酸化を介したタンパク質合成の低下は、  
ショウジョウバエ感覚神経細胞における  
ミトコンドリア機能低下による樹状突起喪失に貢献する

津山 泰一

## 目次

要旨.....	p4
略語表.....	p5
第一章 序論.....p6	
1-1. 細胞におけるミトコンドリアの機能.....p6	
1-2. ミトコンドリアにおける機能低下と神経疾患.....p7	
1-3. ミトコンドリア機能不全によって生じる病変メカニズム理解における課題.....p8	
1-4. da ニューロンは、ミトコンドリア機能低下による神經細胞サブタイプ優先的な 樹状突起形態変化メカニズムを調べるために系を提供する.....p10	
1-5. 先行研究で残された課題.....p11	
第二章 結果.....p13	
2-1. Class IV ニューロンにおける ATP 代謝.....p13	
2-2. ショウジョウバエにおける低温型 ATP プローブ AT1.03[NL]の性能評価.....p14	
2-3. AT[NL]は Class IV ニューロン内での ATP レベル低下を検出可能である.....p16	
2-4. Class IV における ATP レベル低下は 樹状突起形態の乱れとタイミングが一致しない.....p17	
2-5. <i>prel</i> の機能異常をもつ da ニューロンはエネルギー代謝回路の改変を示す.....p19	
2-6. <i>prel</i> 機能異常による樹状突起喪失は eIF2α 脱リン酸化の促進によって部分的に抑制される.....p21	
2-7. ミトコンドリア機能不全は eIF2α リン酸化を介してタンパク質翻訳を低下させうる.....p23	
2-8. da ニューロンにおける Unfolded Protein Response の Ire1 経路の活性は、 Class IV 特異的な発生依存的なプログラムとミトコンドリア機能異常の 両方によって調節されうる.....p24	
2-9. eIF2α リン酸化は、ミトコンドリア機能を損ねる様々な操作によって 誘導される樹状突起の喪失の共通したメカニズムである.....p25	
2-10. eIF2α のリン酸化によるタンパク質合成抑制は、 Class IV においては ATP 消費の低下に貢献しない.....p27	

第三章 議論.....	p29
3-1. ミトコンドリア機能低下条件下での樹状突起の単純化は、 生理的な ATP レベルが維持されている状態でも起こりうる.....	p29
3-2. eIF2α リン酸化はミトコンドリア機能不全による樹状突起喪失に貢献する.....	p31
3-3. 神経サブタイプ間の翻訳抑制の程度の違いは、 サブタイプ間でのミトコンドリア異常への脆弱性の差に貢献するかもしれない.....	p33
第四章 材料と方法.....	p35
謝辞.....	p42
参考文献.....	p43

図表

## 要旨

ミトコンドリアは多くの細胞種において、細胞内で使用される ATP の大部分を産生し、その機能低下は様々な神経変性疾患や、神経筋疾患の発症に関与することが広く受け入れられている。しかし、神経細胞内のエネルギー変換能の低下が、どのようにして神経細胞内の活動に影響し、それがどう疾患の発症につながっているかは、未だに不明な点が多い。本研究において私は、ショウジョウバエ感覚神経細胞 da ニューロンにおけるミトコンドリア機能低下に伴う樹状突起短縮化をモデルとして、ATP 代謝や細胞内シグナリングに着目してその分子機構を明らかにすることを試みた。まず、ミトコンドリア機能低下の細胞内 ATP 量や ATP 代謝動態への影響を明らかにするため、FRET を利用した ATP センサー ATeam をショウジョウバエの実験系に導入した。個体内の ATP イメージングから、顕著な樹状突起喪失を示す da ニューロンでは、ミトコンドリアからの ATP 供給能が低下していること、ATP 消費が低下していることが示された。また、発生期を通じた ATP イメージングと並行した樹状突起形態の観察結果から、ATP レベルの低下は樹状突起喪失に直接関与していない可能性が示唆された。次に、突起喪失メカニズムを明らかにするためにミトコンドリアからのストレスシグナルに着目し、eIF2α の脱リン酸化の促進が様々なミトコンドリア機能不全モデルにおける da ニューロン樹状突起形態異常を軽減することを見出した。これは eIF2α を介した翻訳抑制が樹状突起単純化に貢献していることを示している。さらに、ミトコンドリア機能異常が及ぼす新規タンパク質合成への影響が、da ニューロン内のサブタイプによって異なる可能性を示した。このことは、タンパク質合成における影響の程度の違いが、ミトコンドリア機能異常への細胞種間の感受性の違いに寄与している可能性を示唆している。これらの結果は、神経系におけるミトコンドリア機能異常に伴う細胞種特異的な樹状突起変性やその他の神経変性現象において、eIF2α のリン酸化を介した翻訳抑制が原因メカニズムの一つになりうることを示している。翻訳抑制が細胞内 ATP の維持に関与する可能性についても検討したが、da ニューロンにおいては翻訳のための ATP 需要是あまり大きくはなく、細胞内 ATP レベルの維持には直接関わっていないようであった。

## 略語表

ADOA: Autosomal Dominant Optic Atrophy

AEL: after egg laying

ANOVA: Analysis of variance

AM: Antimycin

AMPK: AMP-activated kinase

ATP: Adenosine triphosphate

CCCP: carbonyl cyanide 3-chlorophenylhydrazone

CMT: Charcot-Marie-Tooth Disease

CHX: cycloheximide

da neuron: dendritic arborization neuron

ETC: Electron Transfer Chain

FRET: Förster Resonance Energy Transfer

HL6: Hemolymph-like 6

KCN: Potassium cyanide

mtDNA: mitochondrial DNA

O/E: Overexpression

OM: Oligomycin

Oub: Ouabain

OXPHOS: Oxidative phosphorylation

PD: Parkinson's Disease

XBP1: X-box binding protein 1

2DG: 2-deoxy-glucose

2-NBDG: 2-deoxy-2-[(7-nitro-2,1,3-benzoxadiazol-4-yl)amino]-D-glucose

eIF2 $\alpha$ : eukaryotic initiation factor 2 $\alpha$

## 第一章 序論

### 1-1. 細胞におけるミトコンドリアの機能

ミトコンドリアは細胞内の主要なエネルギー変換装置であり、多くの細胞において細胞内の主要なエネルギーの通貨であるアデノシン三リン酸 (Adenosine triphosphate: ATP) を產生する。細胞がグルコース一分子を完全酸化する時、グルコースは細胞質における解糖系によりピルビン酸に変換され、ピルビン酸はミトコンドリア内に輸送され TCA 回路により  $\text{CO}_2$  にまで分解される (図 1A)。これらの段階的な酸化過程において、グルコース内の化学結合エネルギーは主に NADH などの酸化還元的なエネルギーへと変換された後、さらにミトコンドリアの電子伝達系によって ATP の形で化学的エネルギーとして保存される。この電子伝達系 (Electron Transfer Complex: ETC)による ATP 产生過程は酸化的リン酸化 (Oxidative Phosphorylation: OXPHOS)と呼ばれる。一連の分解過程において、グルコース一分子から解糖系により 2ATP、ミトコンドリア内では TCA 回路により 2ATP、OXPHOS により約 30ATP が產生される (Voet and Voet, 2005; Hinkle, 2005)。グルコース一分子が完全酸化された場合のミトコンドリア内での ATP 产生は解糖系に比べて多く、多くの組織ではミトコンドリアが主要な ATP 产生経路となっている。產生された ATP は細胞内に広く分配され、様々な細胞内活動 (例えば高分子の合成や、膜を挟んだ分子の濃度勾配の形成・維持など)に用いられるほか、細胞内の重要なエネルギー貯蔵体であると考えられているフォスファゲン (哺乳類におけるクレアチニンリン酸や、節足動物におけるアルギニンリン酸など)へとさらに変換され細胞全体に分配・利用される (Ellington, 2001)。

ミトコンドリアは ATP 产生以外にも、細胞生理において様々な役割を果たしている。代謝においては、アミノ酸代謝、脂質代謝 (脂肪酸  $\beta$  酸化、ステロイドホルモン合成など)あるいはヘムの合成においても重要な機能を持っている (図 1B; Voet and Voet, 2005)。また、近年ではミトコンドリアは細胞内の重要なシグナリング装置であり、シグナルの誘起により細胞全体に影響を及ぼしうることも明らかにされている。ミトコンドリアは Bcl2 ファミリー分子とそれに続くカスパーゼの活性化に関わる重要なシグナリングプラットフォームであり、プログラム細胞死制御に関与する (Parrish et al., 2013; Clavier et al., 2015)。ミトコンドリアはカルシウム貯蔵能を示し、細胞の正常なカルシウム動態の制御に関わる可能性が報告されている (Fluegge et al., 2012; Williams et al., 2013)。これらの正常な細胞において機能しうるシグナリングに加えて、ミトコンドリア機能異常は多様なシグナルを誘導する (図 2)。これらのミトコンドリアストレスシグナルは、核や細胞質へと伝わり、しばしばミトコンドリア内ストレス応答能の増強、細胞のエネルギー消費抑制や、解糖系による補償的なエネルギー产生などに繋がることが様々な生物種で報告されている (図 3)。これら逆方向性 (retrograde)シグナリングは、細胞の生存・機能において重要なミトコンド

リア機能を維持するために、細胞がミトコンドリア機能を監視し、それ対して適切に応答するために進化させてきたと考えられているが、生物種間で保存されていないメカニズムも多く、どの経路がどの生物でどれだけ重要であるかはまだ十分理解されていない。

## 1-2. ミトコンドリアにおける機能低下と神経疾患

ミトコンドリアの機能・形態異常は様々な神経疾患を惹起・修飾する要因となることが広く受け入れられており、このことはミトコンドリアによる細胞内のエネルギー変換の重要性を示していると考えられる (Nunnari and Suomalainen, 2012; DiMauro and Schon, 2008)。ミトコンドリアのエネルギー変換機能との関係が最も深いと考えられる疾患は、ミトコンドリア病として総称される一連の遺伝病である (Koopman et al., 2012)。これらの疾患は OXPHOS との関連が強い核 DNA や mitochondrial DNA (mtDNA) の遺伝子の変異 (例えば ETC の構成要素や、ミトコンドリア tRNA 遺伝子の変異など) によって生じる。これらの疾患では、特に神経系や筋肉の機能が大きく影響されることが多く、これは神経系と筋肉が他の組織に比べてエネルギーの消費量が高いことを反映しているとしばしば議論されている (図 3)。

神経変性疾患とミトコンドリア機能との関連も近年明らかにされている。これらの変性疾患にはパーキンソン病 (Parkinson's Disease: PD)、シャルコーマリートゥース病 (Charcot-Marie-Tooth Disease: CMT)、常染色体優性視神経萎縮 (Autosomal Dominant Optic Atrophy: ADOA) などが含まれる (Itoh et al., 2013; Haelterman et al., 2014; Züchner et al., 2004; Delettre et al., 2000; Alexander et al., 2000)。これら疾患の原因遺伝子の産物には、機能低下したミトコンドリアを取り除くことでミトコンドリア品質管理に関わる Parkin と Pink1、ミトコンドリアの融合の主要な制御因子である Mitofusin や OPA1、などが含まれる。さらに、これらの疾患の患者やマウスモデルなどでは、ミトコンドリアの機能・動態・構造における異常が報告されていることに加え、様々な神経病理学的特徴を示し、細胞の脱落、軸索の脱髓、軸索・樹状突起の形態異常が見られる (Cheng et al., 2011; Patt et al., 1991)。これらの疾患でもミトコンドリア病と同様に、神経系のエネルギー消費の大きさが、神経系において症状が特に顕著となる原因だらうと議論されている。しかし、ミトコンドリア機能の異常が、どのように神経細胞の代謝状態やエネルギー消費活動に影響し、さらに病理学的な変化へと繋がるかについては、現在も不明な点が多い (Pathak et al., 2013)。

### 1-3. ミトコンドリア機能不全によって生じる病変の発症メカニズム理解における課題

1-1 で述べたようにミトコンドリアはエネルギー代謝において重要な役割を果たしており、その機能の破綻は代謝経路の流束、細胞内の代謝物の量の両方に影響を及ぼしうる。代謝経路の流束は、実際に目的の代謝物やエネルギーをどれだけ作り出し、使用したかという、代謝経路の機能自体に密接に関連すると考えられる。一方で、ATP は多くの細胞内活動に必要であり、著しい量の低下が起これば細胞内活動を乱しうると考えられる。また、代謝物の量は基質と産物の比の変化などから代謝経路の流束の変化に関わりうる (Wegner et al., 2015)。さらに代謝物量は細胞内シグナルとしても機能する。ミトコンドリア OXPHOS 機能不全は細胞内のエネルギー代謝状態を示す重要な指標である ATP レベル (細胞内 ATP 濃度)、ATP/AMP 比、NAD+/NAD 比をしばしば変化させるが、これらの変化は直接的にシグナル分子の機能を変化させることが知られている。ATP の濃度変化は ATP 依存性カリウムチャネルやプロテアソーム、ATP/AMP 比は AMP-activated protein kinase (AMPK)、NAD+/NAD 比はサーチュインファミリー分子の活性にそれぞれ影響を及ぼす (図 2; Huang et al., 2010; Tanaka et al., 2014; Hardie et al., 2012; Ying, 2008)。また、アミノ酸、あるいは TCA 回路を構成する代謝物 (とその類縁体) の濃度変化は、Tor 経路や GCN2、あるいは Hif1 経路や JmjC ファミリーヒストン脱メチル化酵素などの活性をそれぞれ調節しうる (Chantranupong et al., 2015; Yuan et al., 2013)。これらのシグナル分子は、細胞質膜イオン濃度勾配や、タンパク質の合成や分解などを含む、細胞内の活動を制御し、神経変性に関わりうることが考えられる。しかしこまでのところ、ミトコンドリア機能低下による神経変性における、これらの代謝シグナリングの役割はまだあまり良くわかつていない。

ミトコンドリア関連神経疾患における重要な課題として、ここまで述べてきた一般的な細胞内メカニズムに関するものに加えて、疾患において広く見られる神経細胞種特異性が挙げられる。ミトコンドリアは ATP 産生というあらゆる細胞の生存・機能にとって極めて基礎的な機能を果たすにも関わらず、神経変性疾患のみならずミトコンドリア病においても、一部の神経細胞種で特に強くその影響を受けるという細胞種特異性を示す (Rossignol et al., 2003; Zhou et al., 1997; Haddad and Nakamura, 2015)。例えば、PD においては黒質緻密部のドーパミンニューロンが特に脆弱である一方、CMT では運動神経、ADOA では視神経節細胞が顕著に影響される。これまで、この細胞種特異性を説明するために様々なメカニズムが提唱されているが、現在でも十分には理解されていない (Dubinsky, 2009; Haddad and Nakamura, 2015)。具体的には、ドーパミン代謝に伴う酸化ストレスの生じやすさ、末梢神経系の長い軸索の末端へのミトコンドリア局在の困難さ、あるいは神経細

胞種間でのエネルギー消費の違いなどが提唱されており、様々な要因が複雑に影響しているのではないかと推測される。

これらの課題が現在も残されている理由として、1細胞レベルで代謝を調べることの技術的な困難さや、ミトコンドリア由来ストレスシグナルの複雑さが挙げられる (Pathak et al., 2013)。前者に関して、代謝物の量や流れの測定には、生化学的な測定法や機能的イメージング技術が広く用いられているが、これらの手法は空間的・時間的な解像度が低く、特定の神経細胞種、さらには特定の1細胞において代謝状態のダイナミクスを調べることは困難であった。しかし近年、遺伝的にコード可能な、様々な代謝物量を測定できる蛍光プローブが相次いで開発され、1細胞レベルでの代謝のダイナミクスが明らかにされつつある (San Martín et al., 2014 and references therein; Surin et al., 2013; Connolly et al., 2014; Hasel et al., 2014; Taloe et al., 2014; Pathak et al., 2015)。

後者に関しては、これまでに様々なシグナリング経路がミトコンドリア機能異常によつて誘導されることが示されているが、その活性化のきっかけは多様 (ATP/AMP 比の低下、ミトコンドリア膜電位低下、ROS 上昇、細胞内カルシウム動態の変化など)であり、さらに幾つかの経路は特定の生物種にしか存在しないなど、現在も統一的な理解は不十分である (図 2)。しかし近年、モデル生物を利用したこれらストレス経路の疾患表現型への寄与を示す研究が報告されてきている (Raimundo, 2014; Cagin et al., 2015)。例えば、Raimundo らはミトコンドリア tRNA の過剰なメチル化によるミトコンドリア内翻訳抑制が生じるミトコンドリア機能低下マウス (Tg-mtTFB1) では、内耳の神経細胞の変性を原因とする難聴の症状を呈するが、この内耳においてアポトーシスを誘導する ROS-AMPK-E2F1 経路が特異的に活性化することを見出している。この研究ではさらに、この経路を抑制することで神経細胞死と難聴症状を改善できることが示され、エネルギー代謝の低下それ自体ではなく、その下流に存在するシグナル経路が変性疾患の発症に重要となりうる可能性が提示された。このような神経変性に積極的に関わりうるシグナルは ROS-AMPK-E2F1 経路だけではなく、ショウジョウバエの幾つかのミトコンドリア関連神経疾患モデルにおいて、低酸素応答に関わる Hif1α が活性化されていること、また Hif1α の抑制によってそれらのモデルが示す登板能力や寿命の低下が回復することが Cagin らによって示されている。これら複雑なストレスシグナルがどのようにして誘導され、神経変性に関わっていくかを理解することは重要な課題となっている。

## 1-4. da ニューロンは、ミトコンドリア機能低下による神経細胞サブタイプ優先的な樹状突起形態変化メカニズムを調べるための系を提供する

ショウジョウバエの dendritic arborization (da)ニューロンは、4つのクラスからなる感覚神経細胞であり、表皮と筋肉の間にその樹状突起を展開する (図 4; Grueber et al., 2002, Jan and Jan, 2010; Yamamoto et al., 2006)。この樹状突起は表皮に近い浅い位置で伸展するため、ショウジョウバエの成虫や幼虫をホールマウントにより、蛍光標識された樹状突起を簡便に観察することができる。本研究では幼虫期の da ニューロンを、ミトコンドリア機能低下によって樹状突起形態異常がどのように生じるかを調べるためのモデルとして利用した。幼虫型 da ニューロンの樹状突起の伸長は胚期の中頃の産卵後約 14 時間 (14 hr AEL: after egg laying 産卵後時間) 頃から始まり、幼虫期の終わりである三齢幼虫後期 (~120 hr AEL)まで、幼虫の成長に伴ってそのサイズが大きくなり続ける (図 5A)。これにより、da ニューロンは体サイズに適切な受容野を保つと考えられる。da ニューロンはクラスごとに特徴的な樹状突起形態を形成・維持する。例えば、Class I は単純で短い、櫛状の突起を伸長するのに対し (図 5E)、Class IV はより大きく複雑な突起を伸長し、それぞれの突起同士はお互いに重ならないような性質を持つ (図 5B)。個体内で効率よく解析が可能な実験系であることから、神経細胞自律的、あるいは神経細胞非自律的なメカニズムによって、どのように特徴的な神経細胞形態が生み出されるかを調べることができる。これらの特徴から、私が所属する上村研究室を含む様々なグループが、この da ニューロンを用いて様々な樹状突起形態形成メカニズムを明らかにしてきた。

上村研究室において坪内朝子博士は、Class IV において過剰発現されることで樹状突起形態を変化させる遺伝子をスクリーニングし、*preli* (*prel*)/*UPS1* の過剰発現が Class IV の樹状突起長を著しく短くさせ、その突起末端数を減少させることを見出した (Tsubouchi et al., 2009; 図 5B、D、K)。*prel*機能喪失型 Class IV でも類似の樹状突起単純化が見られた (図 5C、K)。また、これらの樹状突起表現型は神経細胞種特異性を示した。つまり、Class IV が顕著な樹状突起喪失表現型を示したのに対して、Class I や III ではその形態に大きな変化は見られなかった (Tsubouchi et al., 2009; 図 5E-J、L、M)。なお、各クラスには複数の細胞種が存在するが、今後、特に明記しない限り、それぞれのクラス幼虫の背側に存在する特定の細胞種 (Class IV: ddaC ニューロン、Class I: ddaE ニューロン、Class III: ddaA ニューロン) を対象に実験した。

*Prel* はミトコンドリア膜間に局在するタンパク質であることが知られていたことから、先行研究では様々な細胞を用いてミトコンドリアの形態や機能についても検討が行われた (Tsubouchi et al., 2009)。*prel*のノックダウン (KD) は、ショウジョウバエ由来の培養細胞である S2 細胞において、ミトコンドリア形態の断片化、ミトコンドリア膜電位の低下、

ETC 複合体 IV の酵素活性の低下、細胞内 ATP の低下を引き起こした。PreI の過剰発現によっても、S2 細胞とショウジョウバエ成虫頭部において、ATP 量が低下した。また、da ニューロンでは野生型 Class IV で見られる細胞体の纖維状のミトコンドリア形態が乱れ、断片化することも明らかにされた（図 5C、D、F、G、I、J）。PreI/UPS1 はミトコンドリア膜に特徴的な脂質であるカルジオリピンの代謝に関与することが瀬崎らのグループによって示された（Tamura et al., 2009）。また近年、PreI/UPS1p の分子機能が明らかになり、ER からミトコンドリアへのホスファチジン酸（PA）輸送過程において、酵母や哺乳類においてミトコンドリア外膜から内膜への輸送を直接促進する分子であることが Langer らのグループによって示された（Tatsuta et al., 2014）。PA はカルジオリピンの生合成経路で前駆体となる膜脂質である。カルジオリピンは様々なミトコンドリア膜上のタンパク質複合体の安定化に重要である（Ren et al., 2014）。これらの代謝の乱れがショウジョウバエで観察されたエネルギー代謝表現型の原因である可能性が示唆される。

### 1-5. 先行研究で残された課題

坪内博士による先行研究は、1-4 で述べたようなミトコンドリア形態・代謝への影響などの結果から、da ニューロンにおいてミトコンドリアの酸化的リン酸化能が適切に維持されることが、Class IV の正常な樹状突起形態形成に重要であると提唱した（Tsubouchi et al., 2009）。しかし、この先行研究では不明な点も残されていた。まず、da ニューロンでは広く利用されるミトコンドリア機能を評価する手法の適用が困難であったため、da ニューロンで実際にミトコンドリア機能が損なわれているかは十分に明らかではなかった。また、ミトコンドリア機能の低下が、具体的にどのようなメカニズムで樹状突起の単純化という細胞レベルでの形態変化に繋がるのかは全くわかつていなかった。そして、PreI は広く様々な生物、細胞種で見られるタンパク質であり、その機能の乱れは S2 細胞といった神経細胞ではない細胞においてもミトコンドリア機能の顕著な低下を誘導するにも関わらず、Class IV と Class I 及び Class III の樹状突起が顕著な感受性の違いを示す理由も不明であった。

本研究では、これらの残された課題を明らかにするため、より詳細な解析を進めた。まず、da ニューロンにおける 1 細胞レベルでのエネルギー代謝状態の解析を可能にするために、Förster Resonance Energy Transfer (FRET) に基づく ATP プローブである ATeam をショウジョウバエの系に導入した。これにより、da ニューロンにおける ATP レベルの観察が可能となり、*preI* の過剰発現や機能喪失変異による ATP 代謝状態の変化が示された。発生の進行に伴う Class IV 内 ATP レベルの変化と、樹状突起異常の進行との関連についても検討したが、ATP レベルの低下は樹状突起異常の原因ではないようであった。次に、ミトコンドリア関連エネルギーストレス経路の関与について検討した。その結果、様々なミ

トコンドリア関連遺伝子の遺伝学的な操作によって誘導される Class IV の樹状突起形態単純化において、細胞内の幅広いタンパク質翻訳を制御する eIF2 $\alpha$  経路の抑制が大きく貢献することを見出した。また、このタンパク質合成抑制の程度の違いが、ミトコンドリア異常による神経細胞種特異性に関わる可能性についても明らかにした。

## 第二章 結果

### 2-1. Class IV ニューロンにおける ATP 代謝

序論で述べたようにミトコンドリアタンパク質をコードする *prel* の機能異常によって、Class IVにおいて、Class I と III に比べて、顕著な樹状突起単純化が見られることが先行研究で示された (Tsubouchi et al., 2009)。このことから、Class IVにおいてミトコンドリアによる ATP 産生が特に重要である可能性が考えられた。ATP 需要の大きさと、ミトコンドリア関連遺伝子の高発現は、ある程度の相関が見られる可能性が指摘されている (Wong-Riley, 2012)。そこで、まずミトコンドリア関連遺伝子の各クラス間での発現量の違いについて検討を試みた。1 細胞レベルでの遺伝子発現をクラス間で比較するため、Gal4 エンハンサートラップ系統を利用した。Gal4 は酵母由来の転写活性化因子であり、UAS 配列に結合し、直下の遺伝子の発現を誘導する (Brand and Perrimon, 1993)。Gal4/UAS はショウジョウバエにおいて遺伝子の発現誘導に広く用いられている。Gal4 エンハンサートラップ系統は、そのゲノム中の様々な位置に Gal4 が挿入されている系統である。近傍の内在遺伝子の発現調節領域の制御下で Gal4 が発現しており、内在遺伝子の発現パターンをある程度ミックしていることが期待される。

TCA 回路、電子伝達系と解糖系の回路を構成するタンパク質の遺伝子の 5' UTR に Gal4 が挿入された系統と、UAS-mitoGFP (UAS 配列の直下にミトコンドリア局在シグナルを付加された GFP が挿入を持つ) 系統を掛け合わせ、細胞質面積あたりの GFP 蛍光強度を測定した (図 6)。ミトコンドリア関連遺伝子の Gal4 エンハンサートラップ系統は、Class I や III に比べて、Class IVにおいてより強い蛍光強度を示した (図 6A-F, K)。解糖系遺伝子の発現は Enolase が Class IV で高発現していたが、Hexokinase の一つ (HexA) と GAPDH2 では Class IV と Class III 同程度の発現が見られた (図 6G-I)。この結果は、Class IVにおいて OXPHOS 関連遺伝子が特に強く発現している可能性を示唆する。また、他のグループが報告した、Class IVにおいて多くの OXPHOS 関連遺伝子が個体全体に比べて発現が昂進しており、Class I では上昇していないという、マイクロアレイを用いた解析の結果と一致している (Iyer et al., 2013)。

Class IVにおける選択的な樹状突起喪失と ATP 代謝との関係については、細胞内 ATP 消費という観点からも注目された。Class IV は他の Class に比べて大きく複雑な樹状突起を伸長するため、細胞膜表面積/細胞質体積の比が大きくなることが予想される。神経細胞において最も ATP を消費する細胞内過程は膜電位の形成・維持であると広く受け入れられている (Howarth et al., 2012)。また、膜脂質の合成及びそのリーフレット間の非対称性の維持も比較的エネルギー的に高コストであり、発生中の脳においてはアクチンや微小管などの細胞骨格動態の寄与も比較的大きいことが示されている (Purdon and Ruprecht,

2007; Engl et al., 2016)。これらのことから、膜面積比が高く、細胞骨格制御を必要とする複雑な突起を伸長する Class IV は、他のクラスに比べて、ATP 消費が高い可能性が考えられた。そこで、da ニューロンにおける ATP 代謝に着目し、1 細胞レベルで ATP 測定を可能にするツールの導入を検討した。

## 2-2. ショウジョウバエにおける低温型 ATP プローブ AT1.03[NL]の性能評価

本項では本研究で用いたショウジョウバエにおける ATP センサーの性能評価の試みについて述べる。これらの結果の多くは Tsuyama et al., 2013において報告した結果であるが、本研究と密接に関連するため合わせて詳細に説明する。本項 2-2 の図のうち、図 7 の B と I は根拠論文から、図 7-9 のそれ以外の図は Tsuyama et al., 2013 で使用されたものである。

ATP レベルを測定することを可能にするプローブとして、FRET を利用した ATP センサー ATeam が候補に挙げられた (Imamura et al., 2009)。ATEam は FRET ペアとして mseCFP と cp173-mVenus を採用し、それらを繋ぐリンカーとして、*Bacillus subtilis* F<sub>o</sub>F<sub>1</sub> ATPase の ε サブユニットを利用している (図 7A; Imamura et al., 2009; Tsuyama et al., 2013)。ε サブユニットは ATP と高い特異性で結合し、dATP、ADP、GTP といった構造の似た分子とは結合しない。この ε サブユニットは ATP 結合時に閉じた構造を取り、これによって ATeam は FRET 効率が上昇する。つまり、ATEam は ATP レベルの上昇を FRET 効率の上昇として検出可能にする。しかし、ショウジョウバエにおいて ATeam を利用する上で、その ATP への結合の強さの温度依存性が問題となった (山田, 2009)。ATEam1.03 (AT1.03)は哺乳類細胞内での使用に適切な ATP 結合能を持ち、その *in vitro* における 37°C における解離定数 (K<sub>d</sub>) は約 3.3 mM である。生化学的な測定などから細胞内の ATP 濃度の 1~10 mM 程度であると考えられていることを考慮すると、生理的な ATP レベル変化を捉えるのに適した結合の強さであり、AT1.03 は哺乳類の様々な研究において広く利用されている。しかし、ε サブユニットは低温では ATP に対してより強く結合する性質を持ち、ショウジョウバエの至適温度 25°C に近い、24°C における AT1.03 の K<sub>d</sub> は約 0.64 mM であり、生理的な ATP レベル変化を捉えるのは困難であると予想された。

本研究開始時点において、ATEam 開発者である今村博臣博士は 25°C 付近において適切な ATP 結合能を持つ ATeam の開発を進めており、私は共同研究として低温型である ATeam1.03[NL] (AT[NL])をショウジョウバエ培養細胞、及び個体内においてその性能評価を試みた。AT[NL]の 25°C における K<sub>d</sub> は約 2 mM (今村博士による測定) であり、約 0.5~4 mM 程度の領域で大きな FRET 効率の変化が予想される (図 7A と 7B)。神経細胞内 ATP レベルは、過去の生化学的な測定、あるいは近年の ATP センサーを利用した測定からは、概ねこの範囲内であり、da ニューロンでの利用に適していると期待された (Erecinska and

Silver, 1989; Rangaraju et al., 2014; Pathak et al., 2015)。

AT1.03 と ATeam[NL]の ATP 変化への応答性を比較するため、ショウジョウバエ由来培養細胞である S2 細胞を用いた。それぞれを一過的に発現させ、25°C の培養条件で ATP 産生経路阻害剤による細胞全体の FRET シグナル (=FRET-YFP/CFP 比)変化を比較した。これらの ATeam には細胞内局在シグナルなどは付加しておらず、その蛍光シグナルは主に細胞質と核で観察された (図 7C)。細胞内の主要な ATP 産生経路は OXPHOS と解糖系である。細胞内 ATP レベルを低下させるため、解糖系阻害剤である 2-Deoxyglucose (2DG) と、OSPHOS 阻害剤である Oligomycin (OM; ATP 合成酵素阻害剤) で処理したところ、AT1.03 と AT[NL]のいずれの FRET シグナルも顕著な低下を示した (図 7C-G)。AT[NL]発現細胞のほとんどでは、そのシグナルは数分以内に大きく低下し、さらに、15 分以内にこれ以上シグナルが低下しないレベルまで低下した (図 7E, F, G)。これは ATP レベルが AT[NL]の検出限界以下にまで低下したことを示すと考えられる。対照的に、AT1.03 発現細胞ではシグナルの低下が遅い細胞がしばしば見られ、処理後 30 分においてもシグナルの低下が小さい細胞が存在した (図 7D, F, G)。これらの細胞では AT1.03 の ATP 結合が強いために、初期条件において FRET シグナルが飽和している可能性が考えられた。これらのシグナルの低下が ATP 結合依存的に生じたのか調べるため、ATP への結合が極めて弱く、生理的な ATP レベルにおいては ATP に結合できない ATeam1.03[RKRK] (AT[RK]) で同様の処理を行ったところ、AT[RK]のシグナルは薬剤処理によって変化しなかった (図 7H)。これは ATP 産生阻害剤処理に対する AT1.03 や AT[NL]の FRET シグナル変化が ATP への結合に依存していることを示す。これらの結果から、AT[NL]が 25°C の細胞内において、生理的なレベルの ATP レベルの変化を検出する上で、AT1.03 よりも優れていることが示された。

さらに Prel を S2 細胞に強制発現させ、ATEam の FRET シグナルへの効果を調べた。この遺伝学的な操作は、S2 細胞内の ATP を低下させることが、先行研究において生化学的に示されている (Tsubouchi et al., 2009)。Prel と AT[NL]を共発現させた細胞内では、その FRET シグナルはコントロールに比べて低下していた (図 7I)。一方、Prel 過剰発現は AT[RK]のシグナルには影響しなかった。これらの結果は、AT[NL]はショウジョウバエ細胞内において、遺伝学的な操作による慢性的なミトコンドリア機能低下に伴う ATP 変化を検出しうることを示している。

次に Gal4/UAS システムを用いて AT[NL]をショウジョウバエ個体内の様々な組織で発現させて、そのシグナルを観察した。da ニューロンで発現させたところ、シグナルは細胞質と核で見られ、近位の樹状突起や軸索でも観察された (図 8)。ハエ生体の細胞内での ATP レベルの低下への応答性を確認するため、組織が大きく観察が容易な唾液腺と筋肉を薬剤処理して、細胞内の FRET シグナル変化を調べた。成熟した幼虫 (~120 hr AEL) の唾液腺

を取り出し、培養液中でミトコンドリア阻害剤 OM と Antimycin (AM; ETC 複合体 III 阻害剤)で処理したところ、いずれの条件でも FRET シグナルの迅速な低下が観察された (図 9A-C)。対照的に AT[RK]の FRET シグナルは AM 処理によって影響を受けなかった (図 9D)。特に AM 処理では数分以内に顕著にシグナルが低下しており、AT[NL]の唾液腺細胞内での ATP レベル変化への高い応答性が示された。筋肉内で AT[NL]を発現させた成熟幼虫を解剖し、様々なミトコンドリア阻害剤の効果を調べたところ、筋肉内では処理後 2 時間後においても比較的高い FRET シグナルが観察された (図 9E-H)。この結果は、筋肉はミトコンドリア阻害状態においても長時間、数 mM 程度の ATP レベルを維持していることを示している。OXPHOS 阻害に加えて、解糖系阻害剤 2DG と、トレハラーゼを含む  $\alpha$ -グルコシダーゼの阻害剤である Deoxyanojirimycin (DNM)で処理したところ、顕著なシグナルの低下が観察された (図 9F-H) (トレハラーゼは、昆虫の主要な血糖であるトレハロースを分解し、グルコースを産生する酵素である; Thorat et al., 2012)。これはミトコンドリア阻害剤存在下でみられた長時間の ATP レベルの維持に解糖系が関与していることを示し、筋肉は唾液腺に比べて、解糖系による ATP 産生能が高い可能性が示された。

ここまで得られた結果から、AT[NL]がショウジョウバエの細胞内 ATP レベル低下をモニターすることが可能であり、また異なる組織・細胞間の代謝回路の性質の違いを明らかにするために有用であることが示された。以後、da ニューロンの ATP 代謝を調べるために、da ニューロンでの解析に注力した。

### 2-3. AT[NL]は Class IV ニューロン内での ATP レベル低下を検出可能である

da ニューロンにおける AT[NL]の ATP レベル低下への応答性を調べるために、da ニューロンで AT[NL]および AT[RK]を発現させ、成熟幼虫を解剖し、ATP 産生経路の阻害剤の効果を経時観察により検討した。培養液にはショウジョウバエの体液を模した培養液 Hemolymph-like 6 (HL6)に 5 mM Glucose を加えて使用した (詳細は材料と方法を参照)。FRET シグナルの測定は細胞全体で行った。阻害剤非存在下において、Class IV 内 AT[NL]の FRET シグナルは AT[RK]に比べて顕著に高く (図 10A)、解剖して培養液中で一時間以上安定であった (図 10C の DMSO)。これらのこととは、AT[NL]は ATP 結合依存的に高いシグナルを示し、また細胞内 ATP は ATP の消費と合成が常に概ね釣り合っている可能性を示唆している。この AT[NL]の高い FRET シグナルはミトコンドリア阻害剤 (AM) 処理によって数分以内に低下し、AT[RK]と同等の値にまで低下した (図 10A)。この結果は、AM 処理によって迅速に Class IV 内 ATP レベルが低下し、AT[NL]はそれを検出できる感度を持っていることを示している。解糖系を 2DG 処理によって阻害したところ、AM に比べて小さな AT[NL] FRET シグナルの低下が観察された (図 10B と C)。野生型 Class IV

においては、解糖系に由来する ATP は OXPHOS に由来するものにくらべて少ないことが示唆される。これまでの結果は背側 Class IV である ddaC ニューロンに関するものであるが、OXPHOS の阻害による AT[NL] FRET シグナルの迅速な低下は、他の Class IV ニューロンでも同様のようであった（図 10D）。

各クラスにおける AT[NL] の感度を比較するため、AM と 2DG を用いて主要な ATP 産生経路を阻害し、FRET シグナル変化を経時観察した。Class IV では AM 处理と同程度の速さでシグナルが低下した（図 10B）。この結果も Class IV での ATP レベル維持における解糖系の寄与が小さいことを示している。Class I と III についても、大きな FRET シグナルが観察された（図 10E）。しかし、Class IV に比べて FRET シグナルの低下が遅く、特にシグナルが低下し始めるタイミングが 10-15 分程度遅延しているようであった。この結果の説明として幾つかの可能性が考えられた。まず、Class I と III においては Class IV よりも ATP レベルが高く、AT[NL] の FRET シグナルが飽和している可能性である。また、阻害剤のアクセスが Class I と III で十分ではない可能性も考えられる。da ニューロンの各クラスの細胞体や近位の樹状突起は、グリア細胞によって包まれ保護されている（図 4L; Yamamoto et al., 2006）。このグリアによる遮蔽の影響がクラス間で違う場合、阻害剤の効果自体がクラス間で異なる可能性が否定できない。あるいは、クラス間で細胞内の ATP 変化に対するバッファリング能が異なるのかもしれない。昆虫ではアルギニンリン酸がフォスファゲンとして機能しており、ATP が低下すると ADP にそのリン酸基を移すことで、ATP を再生するバッファーとして働く（Ellington, 2001）。この働きの強さがクラス間で異なることが、ATP 低下のラグという形で現れた可能性も考えられた。この問題については、これ以上の検討は行っていない。

## 2-4. Class IV における ATP レベル低下は樹状突起形態の乱れとタイミングが一致しない

阻害剤を用いた実験から、少なくとも Class IV においては AT[NL] は高感度に ATP レベル変化を検知できる可能性が示唆されたことから、*prel* の過剰発現や機能喪失による細胞体内 FRET シグナルへの影響を検討した。まず、Prel と ATeam を共発現し、幼虫発生の様々なステージで（一齢幼虫初期 early L1: 22-26 hr AEL、二齢幼虫初期 early L2: 46-50hr AEL、三齢幼虫初期 early L3: 70-74 hr AEL、三齢幼虫後期 late L3: ~120 hr AEL）FRET シグナルを観察した（図 11A）。野生型、Prel 過剰発現のいずれの条件でも AT[NL]、AT[RK] の FRET シグナルは発生時期に依存して変化していた（図 11B と C）。ATP 非結合型の AT[RK] のシグナルも変化していることから、これらのシグナル変化は少なくとも部分的には ATP レベル変化以外の要因によって生じていると考えられた。このため、

同じ遺伝子型においても、異なる発生時期の間での比較は困難であった（この原因については第三章において詳しく議論する）。野生型と Prel の過剰発現型 Class IV を比較すると、一齢幼虫初期において、AT[NL]の細胞体内 FRET シグナルを有意に低下させたが、AT[RK] のシグナルには影響しなかった（図 11B と C）。このことは、Prel 過剰発現がこの時期において Class IV 内 ATP レベルを減少させていることを示している。しかし、二齢幼虫及び三齢幼虫初期においては、Prel 過剰発現はむしろ AT[NL] FRET シグナルを上昇させた（図 11B）。三齢幼虫初期では AT[RK] のシグナルも、Prel 過剰発現によって増加した（図 11C）。このことから、AT[NL] の三齢幼虫初期での上昇も部分的には ATP 結合非依存的な変化を含んでいる示唆される。しかし、AT[RK] のシグナル増加は AT[NL] のシグナル増加に比べて、絶対値としても割合としても小さく、AT[RK] のシグナル変化をもとに AT[NL] のシグナル値を補正した場合でも、Prel 過剰発現 Class IV は野生型よりも高いか、同程度の FRET シグナルを示していた（図 11D）。三齢幼虫後期では Prel 過剰発現と野生型の AT[NL] シグナルに差は見られなかった（図 11B）。また、*prel* 機能喪失型でも同様に野生型でも有意な差は検出できなかった（図 11E）。三齢幼虫初期 Class IVにおいては、細胞体内だけではなく樹状突起内での AT[NL] の FRET シグナルも測定したが、野生型と Prel 過剰発現の間に有意な差は見られなかった（図 11F、F'）。これらの結果は、Prel 過剰発現 Class IV ではなくとも二齢幼虫以後、*prel* 機能喪失 Class IV では三齢幼虫後期には、生理的に十分な量の ATP を維持している可能性が高いことを示している。

Class I と Class III についても同様に AT[NL] FRET シグナルを測定した。これらのクラスでも一齢初期にシグナルが低下し（図 11G）、その他の時期では大きな変化は見られなかった（データは示さない）。これらの結果から、Prel 過剰発現による細胞内 ATP レベルへの影響はすべてのクラスで大きな差が無いことが示唆された。

野生型と Prel 過剰発現型 Class IV 内 ATP レベルと樹状突起単純化表現型との間の関係を調べるため、ATeam を観察した発生タイミングで Prel 過剰発現 Class IV の樹状突起形態を観察した。Prel 過剰発現による樹状突起喪失は二齢幼虫初期以後に観察され、細胞体内 ATP レベルの低下が見られた一齢幼虫初期では、野生型と Prel 過剰発現の間に突起形態の違いは見られなかった（図 12A-E'）。この結果から、一齢幼虫初期の樹状突起伸長は、OXPHOS 機能低下による ATP レベルに対して、比較的頑健であることが示唆される。生理的な ATP レベルが維持されている、より後期の発生において、詳しく樹状突起動態の変化を調べるため、同一の Class IV の樹状突起の伸長を二齢幼虫と三齢幼虫の初期で観察した（図 12F-H）。野生型では、二齢幼虫初期に存在する樹状突起末端のうち約 42% が短縮するか、観察されなくなるのに対し、Prel 過剰発現細胞では 70% の末端が短縮するか見られなくなっていた。この結果は、Prel 過剰発現による樹状突起短縮化は、少なくとも部分的

には、樹状突起末端の不安定化によってもたらされていることを示す。また、ATeam の観察結果を合わせると、この不安定化は生理的な ATP レベルが維持された状態で起こっていると考えられる。これら ATP レベルと樹状突起の発生に沿った観察結果から、細胞内 ATP レベルの変化と樹状突起形成プログラムの変化には相関は見られず、ATP レベル変化自体は突起の単純化・不安定化に十分でも必要でもないようだった。

## 2-5. *prel* の機能異常をもつ da ニューロンはエネルギー代謝回路の改変を示す

*prel* の過剰発現や機能喪失は da ニューロンのミトコンドリアに顕著な断片化を誘導し、S2 細胞では生化学的にもミトコンドリア酸化的リン酸化機能の低下を引き起こすにもかかわらず、2-4 で述べたように、da ニューロン内では幼虫発生の後期においては ATP レベルは維持されているようであった。細胞内 ATP レベルはミトコンドリア OXPHOS の活性を示す指標としてしばしば利用されるが、そのレベルはミトコンドリアによる ATP 合成だけでなく、そのほかの ATP 産生経路や、細胞による総 ATP 消費によっても影響される (Brand, 1997; Hofmyer, 2008)。これらの点について、ATP イメージングを用いて検討した。

真核細胞において主に ATP 産生に関わる経路は、ミトコンドリアにおける OXPHOS と解糖系である。基本的に多くの分化した細胞では ATP の大部分はミトコンドリアによって合成されるが、様々な系でミトコンドリア機能の低下による補償的な解糖系の流束の増加が報告されている (Malthankar-Phatak et al., 2008; Misko et al., 2012)。このような解糖系への依存度が高まった細胞の ATP レベルは、解糖系阻害への感受性が増加し、OXPHOS 阻害への感受性が低下すると予想される。三齢幼虫後期の野生型と Prel 過剰発現個体を解剖し、30 分間の 2DG 処理によって解糖系を阻害し、細胞体における FRET シグナルを測定した (図 13A)。野生型 da ニューロンでは FRET シグナルは変化しない (Class I) か、あるいは変化してもあまり大きな低下は見られなかった (Class IV と III)。しかし、Prel を過剰発現した da ニューロンの各クラスでは、2DG 処理によって非常に大きなシグナルの低下が観測され、解糖系阻害への感受性の増加が示された (図 13A)。

相対的な依存度だけでなく、解糖系の流束が Class IV 内で増加しているかを調べるために、蛍光標識されたグルコースアナログである 2-deoxy-2-[(7-nitro-2,1,3-benzoxadiazol-4-yl)amino]-D-glucose (NBDG) の Class IV 周辺における取り込みを観察した。解剖個体を 2-NBDG を含む培養液中で静置し、洗浄後観察をした。周囲の組織 (表皮や筋肉) に取り込まれた 2-NBDG シグナルが非常に強く、定量的な比較は困難であったが、そのシグナルのパターンは野生型と Prel 過剰発現で大きく変化していた (図 13B と C)。野生型では 2-NBDG シグナルのピークは Class IV 内ではなく、その周囲に存在していた (図 13C,D)。このシグナルは、Class IV の細胞体や近位樹状突起・軸索を包んでいる、グリア細胞に取

り込まれた 2-NBDG であるようだった（図 4L、図 13E）。この推測は、グリア細胞と神経細胞の間には糖代謝における分業が存在し、グリアがグルコースを部分的に分解し、その中間代謝物を神経細胞に供給するという、進化的に保存された性質と一致する（Schirmeier et al., 2015）。一方、Prel 過剰発現 Class IV では 2-NBDG のシグナルが細胞体内で検出され、2-NBDG がグリアから、あるいは細胞外から効率的に取り込まれていることを示唆している（図 13B、C）。これらの結果は、Prel 過剰発現 Class IV では解糖系の流速が増加している可能性を支持している。

2DG を用いた FRET シグナルの観察結果と対照的に、AM と OM を用いて OXPHOS を阻害した場合、Class IV 細胞体内シグナルの低下速度は、Prel 過剰発現によって緩やかになった（図 14A-C）。*prel* 機能喪失 Class IV についても同様に AM 処理による FRET シグナル低下速度を測定したところ、Prel 過剰発現ほどではないようではあったが、やはりシグナルの低下は遅くなっていた（図 14D と E）。これらの結果から、*prel* の機能異常を持つ da ニューロンでは、ミトコンドリアからの ATP 供給が低下し、ATP 合成に関して解糖系への依存度が高まっていることが示された。これらの結果や、先行研究での S2 細胞における生化学的な実験結果を考慮すると（Tsubouchi et al., 2009）、OXPHOS 機能が低下している可能性が示唆される。

細胞内の主要な ATP 産生経路である解糖系と OXPHOS を同時に強く阻害すると、その FRET シグナル低下速度は細胞内 ATP 消費速度を反映していると考えられる。そこで Class IV の ATP 消費速度を評価するため、野生型と Prel 過剰 Class IV を 2DG と AM で同時に処理し、そのシグナル低下速度を測定した。Prel 過剰発現 Class IV ではシグナル低下速度が有意に減少していた（図 14F と G）。この結果は、Prel 過剰発現によって、細胞内 ATP 消費速度が低下している可能性を示している。

ここで、これまでの da ニューロンにおける ATP イメージングと、平行した樹状突起形態の観察結果についてまとめる。Prel の機能異常は da ニューロンにおいてミトコンドリアからの ATP 産生を低下させていた。しかし、解糖系からの ATP 合成の増加や、ATP 消費の低下によって、少なくとも幼虫発生の後期においては細胞内 ATP レベルが維持されていたようであった。Prel 過剰発現は一齢初期においては ATP レベルを低下させていたが、この発生時期において樹状突起形態はまだ正常であった。さらに、ATP レベルが回復した二齢初期以後において、樹状突起の安定性は低下していた。これらの結果は、*prel* 機能異常は ATP 代謝状態の変化を誘導したが、ATP レベルの低下は樹状突起形態異常の原因ではないという仮説を支持していると考えられる。

## 2-6. *prel* 機能異常による樹状突起喪失は eIF2 $\alpha$ 脱リン酸化の促進によって部分的に抑制される

多くのミトコンドリア機能異常による影響を調べたモデル系において、補償的な解糖系の流速の増加は様々なエネルギーストレス経路によって制御されている (Weisova et al., 2009; Requejo-Aguilar et al., 2014)。また、これらエネルギーストレス経路は細胞内のエネルギー消費を伴う活動を抑制する (Hardie et al., 2012; Storey and Storey, 2007)。ATPイメージングの結果は、*prel* 機能異常によって、da ニューロンのミトコンドリア機能が低下していることを示した。私は、Class IV における恒常的なミトコンドリア機能の低下がエネルギーストレス経路を活性化し、それによって樹状突起の伸長が阻害、あるいは突起の安定性が損なわれたという仮説を立てた。この仮説を検討するため、Prel 過剰発現 Class IV において、ミトコンドリアストレスに関与するとされている様々なシグナル経路を抑制する分子を発現させ (Owusu-Ansah et al., 2008; Baker et al., 2012)、その樹状突起形態が回復するかどうか観察した (図 15A)。

多様なミトコンドリアストレス経路の関与を検討したが、突起長を基準として定量化したところ、多くはほとんど突起形態を回復させないか、短縮化をわずかに回復させる程度であった (図 15B と C)。しかし、検討した制御因子の中で dPPP1R15 の過剰発現は、Prel 過剰発現と顕著な遺伝学的な相互作用を示した (図 15D-F)。dPPP1R15 は eukaryotic initiation factor 2 $\alpha$  (eIF2 $\alpha$ ) と機能を調節するタンパク質である。eIF2 $\alpha$  は eIF2 の  $\alpha$  サブユニットであり、その活性化型タンパク質は 43S preinitiation 褐複合体の安定化を介して、細胞質の全般的なタンパク質の翻訳を促進する (図 15H; Wek et al., 2006)。eIF2 $\alpha$  は進化的に保存されたセリン残基を持ち、このセリン残基のリン酸化は eIF2 $\alpha$  の機能に抑制的に働き、細胞質内でのタンパク質翻訳を阻害する。このリン酸化は、ミトコンドリア機能異常を含む、多様な環境ストレスによって誘導されることが知られている (Wek et al., 2006; Baker et al., 2012)。PPP1R15 ファミリータンパク質はタンパク質脱リン酸化酵素複合体の制御サブユニットであり、その結合分子の脱リン酸化を促進する。この結合分子には eIF2 $\alpha$  が含まれる (図 15I; Bollen et al., 2010)。Malzer らはショウジョウバエの唯一の PPP1R15 ファミリー分子である dPPP1R15 の機能を解析し、HEK 293T 細胞において dPPP1R15 の過剰発現が eIF2 $\alpha$  の脱リン酸化を促進することを明らかにしていた (Malzer et al., 2013)。幼虫期の中頃 (二齢)で dPPP1R15 を全身で過剰発現したところ、対照に比べて eIF2 $\alpha$  のリン酸化が顕著に低下していた (図 15J)。このことから、ショウジョウバエにおいても dPPP1R15 の過剰発現が eIF2 $\alpha$  脱リン酸化を誘導することが示された。

dPPP1R15 を Prel と共に発現し、三齢幼虫後期で Class IV の樹状突起形態を観察したところ、約 2/3 ( $n = 11/17$ ) ではその樹状突起短縮表現系が顕著に緩和された (図 15D と F 左)。

一方、残りの 1/3 ( $n = 6/17$ )ではその異常はさらに悪化しているようであった(図 15D と F 右)。この二峰性の表現型が生じる原因について、はつきりと明らかにはできなかつたが、少なくとも部分的には一度形成された樹状突起が分解されていることが関与していると推測している。この推測は、dPPP1R15 と Prel を Class IV 共発現させた個体では、しばしばその樹状突起を標識するために発現させた膜結合型 GFP が表皮細胞に取り込まれているようだったという観察に基づいている(図 15G)。ショウジョウバエ幼虫の表皮細胞は貪食作用を持ち、人工的、あるいは発生によって誘導された da ニューロンの樹状突起の切断に際して、その切断された突起を細胞内に取り込み、分解することが報告されている(Han et al., 2014)。これらのことから、dPPP1R15 と Prel を共発現する Class IV の一部では突起が傷害などを受け、その後それらが表皮細胞に取り込まれて分解されている可能性が考えられた。dPPP1R15 による樹状突起短縮の緩和は Prel 過剰発現だけでなく、*prel* 機能喪失 Class IV においても観察された(図 15K)。一方、野生型 Class IV における dPPP1R15 の過剰発現は突起形態を大きく変化させなかつた(図 15L)。これらのことから、dPPP1R15 の突起伸長作用は、ミトコンドリア機能異常において少なくともある程度特異的であることが示された。dPPP1R15 の共発現は突起形態を回復させた一方、ミトコンドリア形態は回復させなかつた(図 15M)。このことは、突起表現系の回復は、ミトコンドリア機能自体の回復を伴わずに起きた可能性を示唆している。

さらに Prel 過剰発現による樹状突起喪失への eIF2α リン酸化の関与を検討するため、ショウジョウバエに存在する 2 つの eIF2α リン酸化酵素 (Perk と Gcn2) が樹状突起喪失に必要であるかどうか調べた。Prel 過剰発現と同時に *Perk* を KD したところ、樹状突起表現型は有意に回復したが、*Gcn2* の KD では回復は見られなかつた(図 16A)。また、野生型バックグラウンドにおいては *Perk* の KD は突起長を変化させなかつた(図 16B)。これらの結果は、Perk を介した eIF2α リン酸化がミトコンドリア機能低下によって誘導された樹状突起の乱れに関与している可能性を示している。樹状突起形態の短縮化に Perk が十分であるか検討するため、Class IV において *Perk* を過剰発現したところ、Prel 過剰発現に類似した、短く分岐数の少ない突起を形成した(図 16C)。

翻訳制御因子とショウジョウバエミトコンドリア機能異常モデルとの間の遺伝学的相互作用として、*S6 kinase (S6k)* と *4E-BP (Thor)* がショウジョウバエのパーキンソン病モデルと相互作用することが報告されている(Tain et al., 2009; Liu and Lu., 2010)。これらのモデルでは、翻訳の抑制 (*S6k* の KD や *4E-BP* の過剰発現)によって、ドーパミンニューロンの脱落や飛翔筋の形態学的な異常が回復する。これは、翻訳の促進 (dPPP1R15 の過剰発現や *Perk* の KD) によって突起形態が回復した、本研究における da ニューロンの系とは対照的である。遺伝的な操作によって *S6k* や *Thor* を介して翻訳を促進させた場合に、Prel

過剰発現 Class IV の突起が回復するか検討したが、活性化型 S6k の異所発現、あるいは *Thor* の KD によっても樹状突起形態は回復しなかった（図 15D と図 16A）。この結果から、ミトコンドリア機能異常を介した Class IV 突起短縮化と翻訳の促進との間の相互作用において、eIF2 $\alpha$  を介した経路が特異性を持っている可能性が示唆された。

## 2-7. ミトコンドリア機能不全は eIF2 $\alpha$ リン酸化を介してタンパク質翻訳を低下させる

次に、ショウジョウバエにおいて、ミトコンドリア機能阻害が eIF2 $\alpha$  のリン酸化レベルを上昇させ、翻訳に影響をあたえるかどうか検討した。均一な細胞集団における、ミトコンドリア機能阻害の eIF2 $\alpha$  リン酸化への影響を検討するため、ショウジョウバエ由来の培養細胞である S2 細胞と Dm BG2-c2 細胞を様々なミトコンドリア阻害剤 (AM, OM, CCCP: ミトコンドリアプロトン脱共役剤) で処理し、6 時間後に eIF2 $\alpha$  のリン酸化レベルをウェスタンプロットで定量化した（図 17）。S2 細胞はショウジョウバエ胚由来の細胞で血球系に近い性質を持ち、BG2-c2 細胞は幼虫の中枢神経系から単離された培養細胞である (Ui-Tei et al., 1994)。S2 細胞への AM 処理は eIF2 $\alpha$  リン酸化を低下させたが、BG2-c2 へのミトコンドリア阻害剤処理は eIF2 $\alpha$  リン酸化を上昇させる傾向を示し、CCCP 処理では統計学的に有意な上昇が見られた（図 17A）。また、ハエ個体において、Prel 過剰発現は成虫頭部の eIF2 $\alpha$  リン酸化レベルを対照に比べて有意に増加させ（図 17B と C）、この増加は *Perk* の KD によって部分的に抑制された（図 17C と D）。これらの結果は、少なくとも一部のショウジョウバエ細胞内において、ミトコンドリア機能異常が eIF2 $\alpha$  リン酸化を上昇させうることを示唆している。

次に、da ニューロン内の新規タンパク質合成への、Prel や PPP1R15 過剰発現の影響を検討した。この目的のために、光変換蛍光タンパク質の一つである Kaede を利用した（図 18A）。Kaede は、UV 照射によって、ペプチド切断を介した不可逆な光変換をおこす (Mizuno et al., 2003)。この光変換は、Kaede の放出波長を緑色から赤色に変化させ、UV 照射前に存在した緑色型 Kaede のシグナルを不可逆に低減させる。これによって、光変換後の緑色型 Kaede の蛍光回復を測定することで新規の Kaede 分子の合成の評価を可能にする (Leung and Holt, 2008; Chen et al., 2012)。野生型 da ニューロンで Kaede を発現させ、三齢初期において全身に UV を照射し光変換すると、6 時間後には顕著な緑色型 Kaede シグナルの回復が観察された（図 18B）。この回復は幼虫の餌に、タンパク質合成阻害剤である cycloheximide (CHX) を加えることで完全に抑制された（図 18B）。

da ニューロンにおいて Prel と Kaede と共に発現し、各サブクラスでの蛍光回復の観察を試みた。これらの UAS コンストラクトの発現には *Gal4[21-7]* を利用した。この Gal4 系統は、胚期には Gal4 の発現を既に開始し、一齢幼虫と三齢幼虫で、Class IV、I、III において近いレベルの UAS 発現誘導能を示す（図 18C）。Class IV においては、Prel 過剰発現は 15 時間後の緑色蛍光シグナルの回復を野生型に比べて有意に低下させた（図 18D-F と H）。さらに、この Prel 過剰発現による新規 Kaede 合成の低下は、dPPP1R15 の共発現により検出されなくなった（図 18G と H）。これらの結果は Prel 過剰発現が eIF2α リン酸化を介して Kaede の翻訳を抑制し、dPPP1R15 が脱リン酸化を促進することでその作用を打ち消した可能性を示唆している。一方、Class I と Class III では、Prel 過剰発現による緑色蛍光シグナル回復の抑制効果は、Class IV でのものに比べて弱く、有意ではなかった（図 18D-G と H）。また、Prel 過剰発現は光変換された Kaede のシグナルの強さには、光変換後 6 時間後において影響を及ぼしておらず、細胞内のタンパク質分解には影響が無いことが示唆された（図 18I）。これらの結果から、Prel 過剰発現は Class IV において eIF2α リン酸化を介してタンパク質の翻訳を抑制し、この抑制の程度は他のクラスよりも Class IV で強いことが示唆された。

## 2-8. da ニューロンにおける Unfolded Protein Response の Ire1 経路の活性は、Class IV 特異的な発生依存的なプログラムとミトコンドリア機能異常の両方によって調節される

すでに述べたように、Prel 過剰発現による樹状突起表現型は *Perk* の KD によって緩和された（図 16A）。*Perk* の最もよく知られた活性化因子は ER ストレスである。ER ストレスは Unfolded Protein Response (UPR) と呼ばれる、3 つの主要なシグナル伝達経路 (Ire1 経路、*Perk* 経路、ATF6 経路) から構成される細胞応答を誘導する（図 19; Mori, 2009; Walter and Ron, 2011）。これら UPR が、da ニューロンでのミトコンドリア機能異常によって調節されているのかどうかをより詳しく調べるために、Ire1/XBP1 経路の活性を X-box binding protein 1 (XBP1)-EGFP を利用した (Ryoo et al., 2007)。XBP1 は、ER ストレスセンサーである Ire1 の主要な下流のターゲットであり、ER の緩和に機能する様々なタンパク質の転写を制御する転写因子である。XBP1 pre-mRNA は細胞質に存在し、ER ストレスによって Ire1 が活性化されると、活性化型 Ire1 によって切断され、スプライシングを受けて XBP1 mRNA が形成される。XBP1 pre-mRNA と XBP1 mRNA はそれぞれ異なるタンパク質 XBP1(u) と XBP1(s) をコードしている。XBP1-EGFP システムでは、GFP タグされた XBP1 はスプライシングを受けた XBP1 mRNA のみから合成され、GFP シグナルの核内への集積として、Ire1 経路の活性化を評価することを可能にする。

発生時期に沿って（一齢初期、二齢初期、三齢後期）、野生型と Prel 過剰発現型 da ニューロンにおける XBP1-EGFP を観察したところ、そのシグナルの各クラスでの核内への集積は、発生時期と Prel 過剰発現の有無の両方によって影響を受けていた（図 20A-H）。各 UAS コンストラクトの発現誘導は *Gal4[21-7]* を用いて行った。Class IVにおいて、野生型ではそのシグナルが一齢初期と二齢初期に集積しており、これは発生に従って制御された生理的な Ire1 経路の活性化の存在を示唆している（図 20A、G、H）。Prel 過剰発現 Class IV では一齢初期と二齢初期に野生型と同程度に集積していたのに加えて、三齢後期でも低頻度で観察された（図 20D、G、H）。一方、Class I と III においては、野生型では XBP1-EGFP シグナルの集積はほとんど見られず、Prel 過剰発現によって二齢初期、三齢後期で頻度の上昇が観察された（図 20B, C, E, F, G, H）。そのシグナル強度は Class I ではかなり弱く、Class III では比較的強かった（図 20G）。この結果から少なくとも二齢初期以後について、Class I と III においては、ミトコンドリア機能異常によって Ire1/XBP1 経路が活性化されている可能性が示唆された。Class IVにおいては一齢初期と二齢初期には Prel 過剰発現によって追加的なシグナルの上昇は見られなかったが、これは XBP1 自体が Ire1 経路に対するネガティブフィードバック制御を示すことが報告されており（Li et al., 2011）、生理的なプログラムのフィードバック作用によってミトコンドリア機能異常による活性化が抑制された可能性が考えられる。

XBP1-EGFP の Class IV における生理的な蓄積が背側クラスター以外でも共通の性質であるか確認するため、二齢初期において、野生型個体における背側クラスター以外の da ニューロン各サブクラスも観察した（図 20I）。背側クラスター以外においても、XBP1-EGFP の核内への蓄積は Class IV において特異的に観察された。

## 2-9. eIF2 $\alpha$ リン酸化は、ミトコンドリア機能を損ねる様々な操作によって誘導される樹状突起の喪失の共通したメカニズムである

これまでに、ミトコンドリア機能に関連した様々な遺伝学的操作によって樹状突起の單純化が報告されている（Chen et al., 2007; Williams et al., 2010; Cheng et al., 2012; Oruganty-Das et al., 2012）。da ニューロンにおいて、*prel* 以外の遺伝子の操作によってミトコンドリア機能を損ねた場合においても、eIF2 $\alpha$  を介して樹状突起の喪失につながるのかを調べるため、多様な遺伝子の操作を試みた。この目的に利用した遺伝子は、*Opa1*（ミトコンドリア局在ダイナミン様 GTPase であり、ミトコンドリア内膜同士の融合を促進する）、その変異型 *Opa1[K273A]*（保存されたリシン残基に変異を持つ GTPase 活性を持たないことが期待される変異体）、*Ttm50*（ミトコンドリアへのタンパク質取り込みに関連する

TIM23 複合体のサブユニットの一つ、*Tim50* 遺伝子のオルソログ)、*TFAM*(ミトコンドリア局在型 High mobility group タンパク質で、その過剰発現はミトコンドリア DNA からの遺伝子発現を乱し、ETC の機能を損ねることがマウスとハエで示されている; Ylikallio et al., 2010; Cagin et al., 2015)、そして *CoVa*(ミトコンドリア Complex IV の Va サブユニット; Mandal et al., 2005)である。

*Opa1* あるいは *Opa1[K273A]* の過剰発現は、Class IV ニューロンにおいてミトコンドリア形態を乱し、それぞれ大きな球状の形態、あるいは断片化したような形態を誘導した(図 21A)。これらの結果は、それぞれミトコンドリア融合イベントが分裂に対して優勢になったこと、あるいはすでに同様の変異をもつ *Opa1* が示すと報告されている作用と一致する(Olichon et al., 2007)。*Ttm50* の過剰発現は、ショウジョウバエの複眼でアポトーシス依存的な神経変性(rough eye 表現型)を生じることがこれまでに報告されており、その人為的な高発現がミトコンドリア機能を損ねうる可能性が考えられた(Sugiyama et al., 2007)。

Class IV ニューロンで *Ttm50* を過剰発現したところ、そのミトコンドリアは断片化したような形態を主に示した(図 21A)。これらの遺伝学的操作が ATP 産生に関して解糖系への依存度の上昇を示すかどうか、FRETイメージングで検討した。その結果、すべての条件で 2DG による解糖系阻害によって、顕著な FRET シグナルの低下が観察された(図 21B)。これらの結果は、*Opa1*、*Opa1[K273A]*、*Ttm50* の高レベル発現が、Class IV においてミトコンドリアからの ATP 供給を妨げたことを示唆している。

これらの過剰発現系全てにおいて、Class IV の樹状突起長は顕著に短くなっている、その表現型は dPPP1R15 の共発現によって部分的に回復した(図 21C-J)。このミトコンドリア関連遺伝子への操作による樹状突起の短縮と、dPPP1R15 による回復は、*CoVa* 変異型 Class IV、*TFAM* 過剰発現 Class IV でも同様であった(図 22A-F)。さらに、*Opa1*、*Ttm50* を過剰発現させた成虫頭部では、eIF2α のリン酸化レベルが上昇する傾向を示し、*Ttm50* 過剰発現ではその効果は有意であった(図 21K)。これらの結果は、eIF2α リン酸化が、多様な原因によって生じたミトコンドリア異常による樹状突起喪失の共通したメカニズムであることを示唆している。

これらの過剰発現系における、Class IV 細胞体内 ATP レベルへの影響も検討した。幼虫発生の各ステージで ATP イメージングを行ったところ、*Opa1[K273A]* の発現の二齢初期でわずかに FRET シグナルが減少していたが、それぞれの遺伝学的条件において FRET シグナルはほとんど変化しなかった(図 21L)。これらの結果も、樹状突起の単純化に ATP レベルの変化は必須では無いことを示している。

これらの過剰発現条件における、Class I と Class III 樹状突起形態への影響も調べた。それぞれの樹状突起減少効果は Class IV に比べて軽度であったか、あるいは有意差が見られなかった。これらの結果は、Class 間の樹状突起の感受性の違いは、Prel 過剰発現だけではなく、その他の要因によるミトコンドリア異常でも同様であることを示唆している（図 21 I,M,N）。

## 2-10. eIF2 $\alpha$ リン酸化によるタンパク質合成抑制は、Class IVにおいては ATP 消費の低下に貢献しない

ここまで得られた結果から、様々なミトコンドリア機能異常によって、eIF2 $\alpha$  のリン酸化を介してタンパク質翻訳の低下が誘導されることが考えられた。この経路のミトコンドリア機能不全状態における生理的な意義として、エネルギー消費を低下させることでミトコンドリアからの ATP 供給の低下に対応する可能性が考えられる。個体レベルにおいて、タンパク質の翻訳は主要なエネルギー消費過程であることが知られている（図 3; Rolfe and Brown, 1997）。また、過去の da ニューロンのクラス特異的なトランск립トーム解析において、Class IV は個体全体に比べて、翻訳に関連する遺伝子を高発現していることが報告されている（Iyer et al., 2013）。これらを合わせて考えると、eIF2 $\alpha$  リン酸化は Class IV において細胞内 ATP 消費を下げるに貢献している可能性が考えられた。

野生型 Class IV において、翻訳が主要なエネルギー消費過程であるかどうか調べるため、CHX を用いて翻訳を停止させることによる ATP 消費速度への影響を検討した。また、CHX だけでなく Ouabain (Oub) の効果も調べた。Oub は Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase の阻害剤であり、この複合体は神経系における主要な ATP 消費主体であることが様々な系で知られている（Howarth et al., 2012）。da ニューロンで AT[NL] を発現させた成熟幼虫を解剖し、CHX か Oub で予め処理した後、AM と 2DG 処理によって誘導される Class IV 細胞体内 FRET シグナル低下速度を調べた。CHX 処理下において、ATP 産生阻害後の FRET シグナルの低下速度は対照と違いは見られなかった（図 23A と B）。一方、Oub 処理は有意にシグナル低下速度を小さくした（図 23A と B）。比較のため、Dm BG2-c2 細胞においても同様の実験を行った。この細胞は比較的早い細胞増殖を行うことから、成長のための高いタンパク質翻訳需要を持ち、翻訳が主要な ATP 消費主体であると推測した。BG2-c2 を AM と 2DG で処理したところ、細胞内の FRET シグナルは迅速に低下した（図 23C と D）。このシグナルの低下速度は CHX 処理によって有意に低下したが、Oub 処理はシグナル低下速度に影響を与えたかった（図 23C と D）。これらの結果は、タンパク質翻訳のために使用される ATP

の総 ATP 消費に対する比率は、BG2-c2 細胞においては大きいが、Class IV においては小さいことを示している。

また、仮に eIF2 $\alpha$  リン酸化が Prel 過剰発現下において ATP 消費の抑制に貢献しているのであれば、dPPP1R15 共発現によって翻訳を回復させることで、細胞内 ATP レベルが低下する可能性が考えられた。そこで、三齢幼虫後期において、Prel と dPPP1R15 を共発現させた Class IV における細胞体内 FRET シグナルを測定したが、野生型と比べて有意な変化は見られなかった（図 23E）。

これらの結果は、eIF2 $\alpha$  リン酸化は Class IV においてミトコンドリア ATP 産生能低下後の細胞内 ATP 維持に重要ではない可能性を示している。

### 第3章 議論

#### 3-1. ミトコンドリア機能低下条件下での樹状突起の単純化は、生理的な ATP レベルが維持されている状態でも起こりうる

細胞内 ATP レベルの変化は様々な分子の活性に影響を与える可能性があり、神経細胞内 ATP レベルの低下は、神経細胞の脱落、プレシナプスの異常、軸索変性などの、神経変性において見られる多様な現象に関与することが提唱されている (Verstreken et al., 2005; Morais et al., 2008; Koike et al., 2008; Yang et al., 2015)。また、ラットとマウスの初代培養海馬神経細胞のプレシナプス末端では、正常なエンドサイトーシスのサイクルの維持のために比較的高濃度 (0.5~1 mM 程度) の ATP が必要であることが近年報告されている (Rangaraju et al., 2013; Pathak et al., 2015)。本研究では、FRET を利用した ATP センサーATeam をショウジョウバエの系に導入し、先行研究で示された Prel の機能異常による Class IV 樹状突起喪失に ATP レベルの低下が関与するか検討した。Prel の過剰発現と機能喪失、あるいはその他の過剰発現条件において、樹状突起形態の異常が検出されるステージでは、Class IV 細胞内 FRET シグナルは高く、その ATP レベルは生理的なレベルに維持されていることを明らかにした。このことから、Class IV 内での ATP レベル低下は樹状突起喪失とは密接な関係には無いことが示唆された。

これまで、ATeam は幾つかの研究において、ミトコンドリアの異常を持つ神経系における ATP レベルを調べるために用いられている (Shields et al., 2015; Pathak et al., 2015; Fukumitsu et al., 2015)。海馬初代培養神経細胞において、*NDUFS4* (Complex I のサブユニットの一つ) と *Drp1* (ミトコンドリア分裂の主要な促進因子) の機能喪失はシナプスのブートンにおける ATP レベルを変化させないこと、ATP 産生における解糖系への依存性が上昇していることが、ATeam[YEMK] (ATeam バリアントの一つ) を用いた報告で示されている (Shields et al., 2015; Pathak et al., 2015)。これらの結果は、本研究で da ニューロンから得られた結果と類似している。

本研究において ATP イメージングは、Prel 過剰発現型 Class IV の ATP 消費の抑制も明らかにした。この ATP 消費の抑制も細胞内 ATP レベルの維持に関与しうると考えられる。この ATP 消費抑制の具体的なメカニズムは明らかにできていないが、樹状突起の短縮化が、膜の表面積の細胞体積に対する割合を減少させることで、貢献しているのではないかと推測している。この推測は、膜に関連する細胞活動、例えば膜を介したイオンの運搬やリン脂質の代謝はエネルギー消費が大きいという知見 (Engle and Attwell, 2015) や、da ニューロンにおいても  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase による ATP 消費が大きいことを示した本研究の実験結果に基づいている。

本研究におけるショウジョウバエ da ニューロンでの ATP イメージングは、1 細胞レベルの ATP 代謝動態について重要な情報をもたらしたが、未だいくつかの改良点を残している。まず、本研究では細胞内でのキャリブレーションを行えなかつたため、そのシグナルの値は、定量的というよりは定性的なものとなっている。近年の ATP センサーを用いた哺乳類での研究において、何らかの方法で ATP が通れる程度の、かつ細胞内環境の変化があまり大きくない小孔を細胞膜に開け、細胞外から直接 ATP を投与することで、細胞内で ATP レベルと FRET シグナルレベルの対応付けが行われている (Rangaraju et al., 2013; Tanaka et al., 2014; Pathak et al., 2015)。しかし、ショウジョウバエではこのような適度なサイズの孔を開ける手法は、調べた限り存在しなかつた。ハエ細胞内におけるこのような手法の開発は、より定量的にシグナルを解釈するために重要な課題の一つと考えられる。

次に、本研究の実験結果は、AT[NL]を含む ATeam の FRET シグナルは ATP 非依存的に影響されることを示している。これは、ATP に結合しない AT[RK]の FRET シグナルが、発生時期に伴って、あるいは Prel 過剰発現によって、その ratio が変化したという結果に基づく。近年、柳沼らは、2 つの異なる蛍光タンパク質から構成される FRET プローブでは、それぞれの蛍光分子の成熟のためにかかる時間が異なる場合、あるいは片方の蛍光分子が独立に分解されうる場合において、FRET シグナルがターゲットへの結合非依存的に変化することを示した (Yaginuma et al., 2014)。本研究で見られた AT[RK]のシグナル変化も、da ニューロンでのプローブ発現開始からの時間経過、あるいは Prel 過剰発現による eIF2 $\alpha$  リン酸化を介したタンパク質翻訳の抑制によって説明できる可能性がある。つまり、時間経過とともに 2 つの蛍光タンパク質がともに成熟型である比率が上昇すること、あるいは新規の ATeam 合成が抑制されることで CFP のみが成熟した half-mature な ATeam の比率が低下すること、によって FRET シグナルが上昇しうると考えられる。近年開発された circularly-permuted 型 ATP プローブを利用することで、このような ATP 非依存的な ratio 変化の影響を小さくできるかもしれない (Yaginuma et al., 2014)。

第三に、本研究では樹状突起の最末端部での ATP レベルの測定は行えなかつた。これは、プローブの細胞質内での拡散が十分でなく末端部での蛍光が弱くなってしまうこと、樹状突起に近接するクチクラ層が強い自家蛍光を持つことによる (Class IV 樹状突起は最末端部では表皮細胞に包まれて存在している; Han et al., 2012; Kim et al., 2012)。そのため、ミトコンドリア ATP 供給能が低下した条件下において、ATP が樹状突起末端において低下し、それが何らかの貢献をしている可能性は否定できない。福光らは、初代培養プルキンエ細胞において遠位樹状突起において ATP が低下するという結果を報告している (Fukumitsu et al., 2015)。より効率よく末端まで局在する ATP センサーを開発し、突起末端での ATP レベルを可視化することは、今後の重要な改善点となりうるかもしれない。

### 3-2. eIF2 $\alpha$ リン酸化はミトコンドリア機能不全による樹状突起単純化に貢献する

ミトコンドリア機能低下に伴う樹状突起形態の単純化は様々な神経細胞タイプで報告されており、これまでに知る限り、アクチン動態の変化や細胞質内カルシウム動態の変化が原因となる分子機構として報告されている (Dickey and Struck, 2011; Maltecca et al., 2015; Cichon et al., 2012; Fukumitsu et al., 2015)。本研究では、これらに加わる新たな機構として、eIF2 $\alpha$  リン酸化を介したタンパク質翻訳の低下が、ミトコンドリア機能異常によって誘導される樹状突起喪失に貢献することが明らかにされた。dPPP1R15 の共発現は、Prel 過剰発現 Class IV でのミトコンドリア形態異常は回復させなかつたことから、樹状突起異常の顕著な回復はミトコンドリア機能の回復なしに起こった可能性が考えられる。これは、ミトコンドリアの OXPHOS などの機能の低下自体よりも、その下流のシグナル経路において誘導される eIF2 $\alpha$  リン酸化こそが樹状突起短縮において重要である可能性を示唆している。

ミトコンドリア機能異常と eIF2 $\alpha$  リン酸化の間には密接な関係があると考えられている。例えば、様々な遺伝的、あるいは薬理的な OXPHOS 阻害によって、多様な eIF2 $\alpha$  キナーゼを介して eIF2 $\alpha$  リン酸化の上昇が誘導されることが示されている (Janssen et al., 2006; Baker et al., 2012; Evstafieva et al., 2014; Michel et al., 2015)。eIF2 $\alpha$  リン酸化の上昇は PD 患者の組織や、様々な培養細胞や個体の PD モデルにおいて報告されている (Ryu et al., 2005; Hoozemans et al., 2007; Mutez et al., 2014)。また、近年ショウジョウバエ PD モデルである *pink1* や *parkin* 変異体の表現型が *Perk* の KD によって軽減されたことが示された (Celardo et al., 2016)。本研究において私は、Class IV において Prel 過剰発現によって誘導される樹状突起喪失が *Perk* の KD によって部分的に回復するが、*Gcn2* の KD では回復しないこと、そしてまた、da ニューロンにおける Prel 過剰発現は UPR プログラムの一つである *Ire* 経路が活性化することを見出した。これらの結果は、ミトコンドリア機能低下が da ニューロンにおいて UPR を誘導し、その経路の一つである *Perk* の活性化が樹状突起喪失を起こしていることを示唆している。UPR は ER 内で開始される細胞内応答であり、ミトコンドリアは ER と物理的にも、機能的にも緊密な相互作用を持っている (Naon and Scorrano, 2014; Senft and Ronai, 2015)。しかし、これまでのところ、ミトコンドリアの構造と機能の異常がどのようにして UPR を誘導するかについては不明な点が多く、今後の重要な課題となっている (Naon and Scorrano, 2014)。

UPR と樹状突起パターンングとの関係性も近年報告されている。線虫 *Ire1* 変異体において、その感覚神経細胞の一つである PVD ニューロンの樹状突起末端分岐数が著しく減少する。これは *Ire1* 変異によって UPR の働きが低下し、突起末端の形態形成に重要な細胞膜

タンパク質である DMA-1 の折りたたみの効率が低下することで、末端への局在が低下することによって起こると報告されている (Wei et al., 2015)。また Wei らはさらに、PWD ニューロンの正常発生において、樹状突起の伸長や分岐が盛んな時期において Ire1 経路が活性化されることを発見し、これは増加する ER 内タンパク質合成の増加に対応するためと推測されている。この結果は、本研究における野生型 Class IV における発生期の一過的な Ire1 経路の活性化と類似している。また、ショウジョウバエ嗅覚ニューロンでは、遺伝学的に誘導された ER ストレスによって、Ephrin の神経細胞膜における局在が低下し、樹状突起が本来投射しない領域にミスターングティングすることが示されている (Sekine et al., 2013)。これらの研究では、樹状突起形態形成にかかわる特定の膜タンパク質の折りたたみや運搬が乱れることで異常が誘導されることが示されているが、本研究における樹状突起喪失はこのような経路にはよらない可能性も考えられる。むしろ、私は細胞質全体的なタンパク質合成の低下自体が、Class IV の樹状突起喪失の原因となっているのではないかと推測している。これは、本研究の実験系では、遺伝学的に eIF2α を強制的に脱リン酸化することで樹状突起形態が全体的に回復する傾向を示したが、このような操作は ER へのタンパク質合成負担をさらに上昇し、折りたたみなどにとってより好ましくない環境を誘導しているであろうという推測に基づいている。eIF2α リン酸化を強制的に誘導すると考えられる dPerk の過剰発現が Prel 過剰発現に類似した樹状突起喪失を誘導するという本研究の結果、また樹状突起パターンニングには全般的なタンパク質合成が必要であるという報告 (Chihara et al., 2007; Koike-Kumagai et al., 2009; Niehues et al., 2015) はこの推測を支持している。

ミトコンドリア関連疾患における eIF2α リン酸化の役割はいまだ十分に理解されていない。eIF2α リン酸化の上昇は様々な神経系の機能を乱しうることが、多様な神経変性疾患モデルにおいて示されている (Schepers and Hoozemans, 2015; Kim et al., 2013)。本研究における eIF2α リン酸化の上昇による樹状突起喪失も、神経系機能を乱す方向に機能していると考えられる。しかし、本研究でしばしば観察された、dPPP1R15 共発現による Prel あるいは TFAM 過剰発現表現型の悪化は、eIF2α リン酸化の上昇がこの系において細胞自律的に神経保護的な作用も担っている可能性を示唆している。ATP イメージングの結果から、少なくとも Class IV においては、翻訳の低下が ATP レベルの維持を介して保護的な作用を示している可能性は考えにくい。また、哺乳類神経系でも、タンパク質合成に用いられるエネルギーはあまり大きくないとされており、eIF2α リン酸化の上昇が ATP レベルの維持にあまり重要でないことはこれらの系でも同様かもしれない (Engl and Attwell, 2015; Engl, et al., 2016)。eIF2α リン酸化の上昇が神経保護的な作用を示すためのひとつのありうる経路は ATF4 である。ATF4 は神経系のミトコンドリア機能異常に対して保護的な作用

を持つことが報告されており、ATF4 mRNA はその特徴的な uORF 構造のために eIF2α リン酸化が上昇した際に効率よく翻訳される性質を持つ (Bouman et al., 2011; Sun et al., 2013)。eIF2α リン酸化の神経系への有害な影響と保護的な作用がどのようにして決まるかについては、この翻訳調節メカニズムの変調による神経変性疾患の病理を理解する上で今後の重要な課題となりうるだろう。

個体レベルにおいては、eIF2α リン酸化は生存を有利にするシグナルとして働く可能性も考えられる。個体レベルではタンパク質合成は多くのエネルギーを消費していることから、体内では様々な種類の細胞種が存在し、それらの中にはタンパク質合成のために多くの ATP 需要を示す細胞もあることが予想される。これらの細胞内において、ミトコンドリア機能異常後に eIF2α リン酸化が上昇、そしてタンパク質翻訳が低下すると、その細胞、そして個体レベルの ATP 消費が低下する。これにより、少なくとも一時的な外部からのエネルギー取り込みが困難な状態において、個体内での利用できるエネルギーの蓄えを維持することができ、神経系を含む、高いエネルギーコストを持つ生存に不可欠な組織の機能を維持することが可能かもしれない (Niven and Laughlin, 2008)。本研究における均一な培養細胞を用いた eIF2α リン酸化の測定では、ミトコンドリア阻害によって、S2 細胞では AM 処理で eIF2α リン酸化が低下し、BG2-c2 細胞では eIF2α リン酸化が上昇する傾向が見られた。これらの細胞では、細胞自体の違いに加え、培養液やインスリン添加の有無などの培養条件も異なる (詳細は第四章に記載した)。どの程度のミトコンドリア機能阻害が起った時に、どのような性質や細胞外環境を持つ細胞で eIF2α リン酸化が上昇するのかという疑問は今後の課題である。

### 3-3. 神経サブタイプ間の翻訳抑制の程度の違いは、サブタイプ間でのミトコンドリア異常への脆弱性の差に貢献するかもしれない

ミトコンドリア関連疾患の研究における、重要な課題の一つは細胞サブタイプ選択性の脆弱性のメカニズムの理解である。本研究において、Kaede を利用したモデルタンパク質生合成イメージングから、選択的樹状突起形態異常を示す Class IV において、他のクラスに比べて、より顕著な細胞質タンパク質の翻訳抑制・合成低下が起きていることが示唆された。このことは、タンパク質合成のレベルにおける影響の大きさが、ある種の細胞種でミトコンドリア機能低下への感受性に関わりうる可能性を示している。興味深いことに、翻訳に関連する遺伝子は PD の発症に関わり、近年タンパク質翻訳制御の異常が PD 発症メカニズムの一つとして注目されている (Lu et al., 2014; Taymans et al., 2015)。

ミトコンドリア機能異常がどのようにして、細胞種間の間で程度の異なる翻訳低下を誘導するのだろうか？一つの可能性は、Class IV で見られる発生によって制御された UPR の関与が考えられる。Class IV では野生型でもベースとなる eIF2 $\alpha$  リン酸化レベルが高い、あるいは eIF2 $\alpha$  リン酸化上昇の効率が高い、などの違いがあるのかもしれない。発生過程における生理的な UPR は、神経細胞を含む様々な組織・細胞で見られる (Rutkowski and Hedge, 2010)。神経系における UPR の生理的な活性化は、哺乳類などで一部の神経細胞種に特異的に観察されており、進化的に保存された現象であるようだ (Zhang et al., 2007; Naidoo et al., 2008; Valdés et al., 2014)。今後、生理的な UPR プログラムの詳細な理解が、細胞種特異性の理解に繋がるのかもしれない。

本研究からはミトコンドリア機能低下への感受性において、翻訳抑制の程度の違いが鍵となる可能性が示唆されたが、そのほかの様々な要素が翻訳の活性を通じて、あるいはそれ以外の方法で脆弱性の決定に貢献するだろうと考えられる。タンパク質合成はすべての細胞の生存と機能にとって必要不可欠であるが、タンパク質合成活性やその重要性は発生タイミングや老化、細胞種、あるいは細胞内の領域によっても異なる (Remmen et al., 2011; Sutton and Schuman, 2006; Scheper et al., 2007)。ミトコンドリア機能の低下が、これらタンパク質合成低下に対して高い感受性を示す細胞活動に選択的に高い影響を及ぼしているかどうかはこれまでのところよくわかつていないが、今後の重要な検討課題となるかもしれない。細胞間での ATP 需要の大きさの差異や、あるいはミトコンドリア機能低下自体の程度の違いは、より強いミトコンドリアストレスやエネルギーストレスのシグナリングの発生に繋がると考えられる (Pacelli et al., 2015; Burman et al., 2012)。ATP イメージングは一細胞レベルで ATP 消費を明らかにすることを可能にすることから、個体内における神経細胞種間の ATP 需要の違いが今後の研究から明らかされていくことが期待される。

## 第四章. 材料と方法

### ショウジョウバエ系統

実験に用いたショウジョウバエは標準的なコーンミールを用いた餌を与え、25°Cにおいて飼育した。特定のステージの幼虫を集める際には、アップル寒天プレート上に少量の酵母ペーストを餌として与え、2時間あるいは4時間の間その上に産卵させた後、25°Cで目的のステージまで成長させた。*prel[1]* と *CoVa[tenured]* は致死ヌル変異体であり、成熟した3齢後期幼虫が発生しない (Tsubouchi et al., 2009; Mandal et al., 2005)。致死変異体のモザイク解析には選択的にホモ変異型細胞を標識する Mosaic Analysis with a Repressible Cell Marker (MARCM) を用いた (Wu and Luo, 2007)。MARCMによって作成されたクローニング細胞でのUASの発現は *Gal4<sup>109(80)</sup>* (Gao et al., 1999), *Gal4[5-40]* (Song et al., 2007)、*tub-Gal4* を用いた。また、体細胞組換えの誘導は広く用いられる *hs-FLP* ではなく、daニューロンにおいて効率よく組み換えを誘導する *SOP-FLP* を利用した (Shimono et al., 2014)。樹状突起形態への Prel 過剰発現の影響の検討には、それぞれのクラス特異的な Gal4 系統 *Gal4[2-21]* (Grueber et al., 2003), *Cal4[c161]* (Shepherd and Smith, 1996)、*ppk-Gal4* (Yuh-Nung Jan から贈与)、あるいは胚期から発現を誘導する *Gal4<sup>109(80)</sup>* を用いた。Kaede と XBP1 のイメージングには発生を通じて比較的クラス間での発現量が近い *Gal4[21-7]* (Song et al., 2007) を用いた。*UAS-dPPP1R15* と *UAS-dPerk* は Dr. S. Marciniak (University of Cambridge) から、*UAS-Ttm50#2* は名古屋大学の西田博士から寄贈していただいた。その他の系統はストックセンターから得た。正確な遺伝子型は Table 2 に記載した。

### DNA プラスミドと遺伝子組換えショウジョウバエの作製

*UAS-dOpa1-3HA* 系統の作製のため、当研究室で維持されている *y\* w\** 系統から dOpa1 遺伝子の全長 ORF を単離し、pUAST プラスミドにクローニングした (Brand and Perrimon, 1993)。*dOpa1[K273A]*へのアミノ酸変異の導入は、以下に示したプライマーを用い inverse-PCR をを利用して部位特異的に行った。下線部は DNA 配列上の変異箇所を示す。

Fw: 5'- GCGCGACCTCTGTCCTGGAATCC-3'

Rev: 5'- CGCTGCTCTGATCTCCCACTACC-3'.

Opa1[K273A]はダイナミンスーパーファミリーで進化的に保存された GTP 加水分解に重要なリシン残基をアラニンに置換した変異型遺伝子である (Griparik et al., 2004)。

遺伝子組換えショウジョウバエの作製は、当研究室で維持されている *y<sup>\*</sup> w<sup>\*</sup>* 系統に目的の pUAST プラスミドと、pTurbo プラスミド (pUAST をゲノム中に挿入させるためのトランスポゼースを発現させる) をインジェクションして行った。

## 薬剤

解糖系、あるいはミトコンドリア OXPHOS の阻害には 2-Deoxy-glucose (#D-8375, Sigma-Aldrich, Missouri, USA)、antimycin (#ALX-380-075, Enzo Life Sciences, New York, USA)、oligomycin (#ALX-380-037, Enzo Life Sciences)、carbonyl cyanide 3-chlorophenylhydrazone (CCCP, S2759, Sigma-Aldrich) を用いた。Class IV におけるグルコース取り込みの評価には 2-deoxy-2-[(7-nitro-2,1,3-benzoxadiazol-4-yl)amino]-D-glucose (2-NBDG, #11046, Cayman Chemical, Michigan, USA) を用いた。細胞内 ATP 消費過程の阻害には Cycloheximide (#06741-91, 和光純薬) と Ouabain (#Alx-350-666, Enzo Life Sciences) を用いた。Class IV 樹状突起の経時観察のための麻酔には Diethyl ether (#055-01155, 和光純薬) を用いた。

## 樹状突起イメージングと、総突起長の定量

樹状突起イメージングは 50% あるいは 80% グリセロールを用いて、ホールマウントした幼虫で行った。マウント直後に幼虫の動きが盛んで観察が困難な場合、マウントした状態でしばらく 4°C において、動きが鈍るのを待った。観察には、40x/1.30 NA の油浸レンズ、共焦点レーザー顕微鏡 (Nikon C-1) を利用した。突起長の定量化は、Z 方向にスタックしたデータを用いた。多くの場合、ImageJ を用いて画像をスケルトン化し、その長さを定量化した (Schneider et al., 2012; Iyer et al. 2013)。まず、ImageJ を用いて画像の輝度を二値化した。二値化された画像内に残ったバックグラウンドのシグナルと、自家蛍光を持つ目的外の組織は、Analyze Particle plugin を用いて取り除いた。スケルトン化には Skeletonize3D プラグインを使用し、その後、細胞体と軸索のスケルトンはブラシツールで取り除いた。作製したスケルトンの長さは Analyze Skeleton plugin で定量化した。MARCM 解析では樹状突起マーカーシグナルが弱く、上記の処理では突起シグナルを周囲の自家蛍光から分離するのが困難であったため、イラストレーター (Adobe, California, USA) を用いてトレースを作成し、それを Analyze Skeleton plugin で定量化した。

Class IV 樹状突起の経時観察には、二齢初期の幼虫 (46-50 hr AEL) を集め、ジエチルエーテル麻酔を利用した (Sugimura et al., 2003)。二齢幼虫に酵母ペーストを餌としてア

ップル寒天プレートで生育し、PBS で洗った後、ジエチルエーテルで満たしたガラス製のペトリ皿の中に幼虫を数分間置き、動きが止まるのを実体顕微鏡で確認してから取り出した。幼虫は、スライドガラスにビニールテープを貼ることで、マウントによって受ける幼虫のダメージがなるべく小さい状態で観察できるようにし、50%グリセロールでマウントしすぐに観察した。観察後、幼虫を PBS で洗い、ドライイーストを加えた PBS 中で麻酔から回復させた。麻酔から回復後、幼虫はアップル寒天プレートに移し、24 時間後に再び突起を観察した。

## FRET イメージング

FRET を利用した ATP センサーATeam は mseCFP を FRET ドナー、cp173-mVenus を FRET アクセプターとし、それらが *Bacillus subtilis* FoF1 ATP-synthase のイプシロンサブユニットによって繋げられた構造を持つ (Imamura et al., 2009)。FRET イメージングに用いたハエ、培養細胞は 25°C で維持した。

ATeam を発現するサンプルは共焦点レーザー顕微鏡 (Nikon C-1)を用いて観察した。励起は 440 nm 固体レーザー (Melles Griot) を用い、457 dclp ダイクロイックミラーと 2 つのフィルター (CFP: 485/40、YFP-FRET: 530LP, Chroma Technology Corp.)を利用して画像を取得した。必要な場合、画像は Z 方向にスタッカートして解析した。目的の領域 (ROI) に近接したバックグラウンド領域のシグナルも定量化し、それを差し引くことでバックグラウンドシグナルを除いた。FRET シグナル (FRET-YFP/CFP シグナル比)は、ROI 内の FRET-YFP 蛍光強度を CFP の蛍光強度で割ることで計算した。FRET 比を示す画像は Metamorph (Molecular Devices, California, USA)を用いて、intensity modulated display (IMD)として作成した。

S2 細胞と BG2-c2 細胞はそれぞれ、Schneider's *Drosophila* medium (#21720, Gibco, Thermo Fisher Scientific, Missouri, USA)に 10%の FBS と Penicillin/Streptomycin を加えた培養液、あるいは M3 medium (#S3652, Sigma-Aldrich)に 10%の FBS と Penicillin/Streptomycin そして 10 µg/ml の insulin (#I6634, Sigma-Aldrich)を加えた培養液で培養した。pUAST からの遺伝子の誘導には Actin-Gal4 プラスマド (pDA、吉浦博士から寄贈)を用いた。プラスマドのトランسفェクションには、S2 細胞では HilyMax (同仁堂)、BG2-c2 細胞では Effectne (Qiagen, Hilden, Germany)を用いた。これらの試薬の手順書に従って遺伝子導入後、60~72 時間後を目安に観察した。ATeam を発現させた培養細胞は、コートした glass bottom dish に接着させた。コートには、S2 細胞の場合コンカナバ

リン A (#037-08771, 和光純薬工業)、Dm BG2-c2 細胞の場合には poly L-lysine (#P4707, Sigma-Aldrich) を用いた。細胞を dish に播いたあと 8 時間静置してから観察に利用した。

筋肉内での FRET シグナルの観察は幼虫の解剖は、Haemolymph-like 6 medium (HL6) の中で行い、観察もその培養液中で行った (Macleod et al., 2002)。個体の動きを低減するため、HL6 に 7 mM のグルタミン酸を加え、運動ニューロン細胞体を含む中枢神経を切除した。解剖はシルガード 184 (Corning, NY, USA) でコートしたグラスボトムディッシュ上で行った。サンプルはシルガードの層越しに 20x レンズを用いて観察した。

唾液腺での FRET シグナルの観察では、HL6 中で解剖した個体から唾液腺を取り出した。取り出された唾液腺は、HL6 中で Poly-L-リシンでコートしたガラスボトムディッシュ上に静置した。サンプルは 20x/0.75 NA ドライレンズを用いて観察した。

個体のホールマウントでの da ニューロン内の FRET イメージングは樹状突起観察と同様にマウントした後、即座に観察をした。一齢や二齢の初期幼虫は潰れやすいため、グリセロール量を減らしたり、あるいはスライドガラスにビニールテープを貼ったりすることで、マウントされても幼虫がなるべくダメージを負わない状態で観察できるようにした。薬剤処理実験の解剖はマグネットチャンバーを利用した方法を用いた (Ramachandran and Budnik, 2010)。da ニューロンの観察では、その投射先である中枢神経は取り除かなかった。da ニューロンの観察では培養液として、HL6 に 5 mM Glucose を添加して用いた。HL6 は糖として 80 mM トレハロースを含む。これは、ハエの体内における主要な血糖がトレハロースであるためである。しかし、ハエはその体液中にグルコースも mM 単位で含む (Echalier, 1997)。またバッタの中脳神経系を用いた研究では、トレハロースのみでは非常に高い濃度でも神経刺激が無い状態の酸素消費をも支えることができないことが報告されていることから (Strang et al., 1980)、本研究では HL6 に 5 mM のグルコースを添加して使用した。Class IV の自発的な発火は、グルコースとトレハロースを含む培養液中では、比較的低頻度であることが報告されている (Xiang et al., 2010; Im et al., 2015)。特に記載がない限り、細胞体全体を ROI として設定した。観察に使用したレンズは、解剖した個体では 20x/0.75 NA ドライレンズを、ホールマウント個体では 40x/1.30 NA あるいは 60x/1.40 NA 油浸レンズを用いた。

FRET シグナルの結果の解析について、異なる発生ステージ間では比較しなかった。これは主に、ATP に結合しないと考えられる AT[RK] の FRET シグナルが、発生ステージ間で変化しており、ATP 非依存的な FRET シグナルの変化が示されたからである。また、特に一齢幼虫初期ではプローブの発現量が低いため、その他のステージとよりもより感度が

高くなるように、レーザーとゲインの値を設定したため、そのことも FRET シグナルに影響を与えている可能性も考えられる。

## 2-NBDG 取り込みアッセイ

2-NBDG 取り込みの可視化のため、三齢後期の幼虫を HL6+5 mM glucose 溶液中で解剖した。解剖後、後の 2-NBDG 取り込みを促進するため、糖を減らした HL6 (低糖 HL6: 8mM trehalose、glucose 無し) の中で幼虫を 10 分間静置した。溶液を 500 nM 2-NBDG を添加した低糖 HL6 に変更後 5 分間静置し、5 回 HL6+5 mM glucose で洗った後すぐに観察した。観察には共焦点レーザー顕微鏡 (Nikon C-1)、60x/1.40 NA 油浸レンズを用いた。

## Kaede imaging

Kaede の光変換にはマクロズーム顕微鏡 (MVX10、オリンパス) と、水銀ランプ、UV を透過するバンドパスフィルター (U-MWU2、オリンパス) を用いた。光変換は、幼虫が逃げないようにするために、15%スクロースを添加した Schneider's *Drosophila* medium で満たしたチャンバー中に浮いた状態で行った (Reis et al., 2010)。光変換後すぐ、約半数について光変換されていない Kaede のシグナルを観察した。残りの幼虫はインスタントフード (Formula 4·24, Carolina, North Carolina, USA) 中に移し、新規の Kaede 合成を測定する時間まで生育した。観察には共焦点レーザー顕微鏡 (Nikon C-1) と 20x/0.75 NA ドライレンズを用いた。cycloheximide 処理は、インスタントフード調製に使用する純水に 25 mM の cycloheximide を加え、その餌で生育することで行った。幼虫は光変換 4 時間前から、そして光変換後 6 時間まで、cycloheximide を含む餌で生育させた。Prel と PPP1R15 の共発現実験では、15 時間後に観察された各細胞でのシグナルから、光変換直後に観察された各クラスでのシグナルの平均値を差し引き、その値を蛍光の回復量として統計処理に用いた。

## ミトコンドリア、XBPI-EGFP イメージング、ミトコンドリアタンパク質発現量の評価

幼虫は FRET イメージングで述べた方法でマウントした。観察は共焦点レーザー顕微鏡 (Nikon C-1)、60x/1.40 NA 油浸レンズで行った。

da ニューロン内でのミトコンドリア遺伝子の発現量を評価するためには、京都ストックセンターの NP 系統を利用した。NP 系統はゲノム中にランダムに Gal4 配列が挿入されたコレクションであり、その挿入位置が明らかにされている。これらのうち、OXPHOS や解糖系に関連する遺伝子の翻訳開始店の上流近傍に Gal4 が挿入された系統を、

UAS-mitoGFP UAS-mmRFP 系統と掛け合わせ、観察をおこなった。各遺伝子の発現量は細胞体の中の、細胞質部分の面積当たりのシグナルの強さとして定義した。一個体につき一半体節の Class IV、Class I、Class III を観察し、3 つの細胞のシグナルの総計を 1 として、各細胞のシグナルの強さを標準化した。

XBP1-EGFP の da ニューロンでの発現には、*Gal4[21-7]*を利用した。細胞体中の核の位置は同時に発現させた膜結合型赤色蛍光タンパク質 mCherry-CAAX のシグナルから判断した。

## ウェスタンプロット

UAS からの遺伝子の発現は heatshock promoter を利用して Gal4 を発現する *hs-Gal4* を用いた。幼虫期での dPPP1R15 の過剰発現には、二齢後期の幼虫を 37 °C で 1 時間熱ショックを加え、10 時間後に全身からタンパク質を抽出した。成虫での Prel 過剰発現、および *Perk KD* では、若い成虫の雌 (0~5 日齢)を、約 12 時間ごとに 45 分間 37 °C で熱ショックを与え、5 回目の熱ショック処理後 8 時間後に遠沈管の中に入れて -80°C で凍結し、その後タンパク質抽出に利用した。成虫頭部の回収には金属製の篩を用いた (Tian et al., 2013)。使用した篩の開き目は 355 μm と 710 μm の二種類である (野中理科機械、東京、日本)。予め凍結した篩を、開き目が大きい方 (成虫頭部は通すが、胸部や腹部、翅は通さない)を上にして重ねた。凍結した遠沈管を振ることで、内部の成虫の頭部を胸部から分離し、それらを篩に上から落とし、篩を机に叩きつけることで、篩いにかけた。頭部は下の篩に残り、より小さな脚は下の篩も通過する。残った頭部は凍結したチューブに回収した。サンプルを Laemlli サンプルバッファーの中でチューブミキサー (C-3452-2, BM Bio)を用いて破碎し、タンパク質を抽出した。

培養細胞からのタンパク質の抽出は、Lysis buffer (50 mM HEPES pH 7.9; 100 mM NaCl; 5 mM MgCl<sub>2</sub>; 1% (v/v) Triton X-100)にプロテアーゼ阻害剤 (Complete mini、ロシュ)とホスファターゼ阻害剤 (ホスファターゼ阻害剤カクテル、ナカライ)を加えて用いた (Malzer et al., 2013)。

抽出したタンパク質はボイル後、SDS-PAGE の 1 レーンあたり、約 2.5~7.5 μg (total eIF2α)、5~15 μg (P-eIF2α)、1 μg (HA、Actin) を泳動した。使用した抗体は抗 eIF2α 抗体 (Ab26197, rabbit polyclonal, Abcam, Cambridge, UK)と抗 P-eIF2α 抗体 (D9G8, rabbit monoclonal, Cell Signaling, Massachusetts, USA)、抗 HA 抗体 (Y-11, rabbit polyclonal, Santa Cruz, Texas, USA)、抗 Actin 抗体 (C4, mouse monoclonal, Millipore) であり、希釈率はそれぞれ 1:2500、1:5000、1:2500、1:5000 である。抗体反応の促進のた

めに Signal Enhancer Hikari (ナカライ) を使用した。二次抗体にはペルオキシダーゼ標識二次抗体 (GE Healthcare Life Science, Pennsylvania, USA) を用いた。検出は LAS-3000 あるいは LAS-4000 イメージングシステム(富士フィルム、東京、日本)を利用した。バンドのシグナル強度定量化には ImageJ を使用した。

## 統計

データ解析に用いたソフトウェアはマイクロソフトエクセル、カレイダグラフ (HULINKS, Tokyo, Japan)、R (R Core Team, 2016) である。有意差の基準には  $\alpha = .05$  を採用した。平均値、95%信頼区間、P 値、サンプル数は Table 1 にまとめた。

## 謝辞

長い間ご指導いただいた上村匡先生に感謝致します。

本研究の先行研究を行った坪内朝子博士には、実験手法など研究全般について教えていただきました。碓井理夫先生には多くの時間を議論に割いていただき、主論文の執筆でも力になっていただきました。伊藤玲奈博士は本研究に不可欠な FRET イメージングシステムを構成/管理で助けていただきました。佐藤大祐博士、佐藤太一博士にはショウジョウバエの遺伝学の基礎を教えて頂きました。また、全ての上村研究室メンバーには多くの有益な議論を提供してくださり、感謝しています。

今村博臣先生には、共同研究として未発表のものを含む多くの材料を提供していただき、また貴重なご意見も何度もいただき感謝しております。京都大学の井垣達史先生、東京大学の程久美子先生、名古屋大学の西田育巧先生、東京大学の三浦正幸先生、University of Cambridge の Dr. Stefan Marciniak からは貴重な系統、培養細胞や抗体を提供していただきました。

二股真由美様、三宅由希子様、清水久美子様、水越絢子様、沖かなえ様には技術援助で助けていただきました。感謝しております。

本学位論文は以下の学術論文の内容に基づいて書かれたものである。

Tsuyama, T., Tsubouchi, A., Usui, T., Imamura, H., & Uemura, T. (2017).

**Mitochondrial dysfunction induces dendritic loss via eIF2 $\alpha$  phosphorylation.**

*The Journal of Cell Biology*, 216 (3), 815–834. <http://doi.org/10.1083/jcb.201604065>

一部の図は許諾を得て、下の文献から使用した。

Tsuyama, T., J.-I. Kishikawa, Y.-W. Han, Y. Harada, A. Tsubouchi, H. Noji, A. Kakizuka, K.

Yokoyama, T. Uemura, and H. Imamura. 2013.

In Vivo Fluorescent Adenosine 5'-Triphosphate (ATP) Imaging of *Drosophila melanogaster* and *Caenorhabditis elegans* by Using a Genetically Encoded Fluorescent ATP Biosensor Optimized for Low Temperatures. *Anal Chem.* 85:7889–7896. doi:10.1021/ac4015325. Copyright 2013 American Chemical Society.

## 参考文献

- Adachi-Yamada, T., M. Nakamura, K. Irie, Y. Tomoyasu, Y. Sano, E. Mori, S. Goto, N. Ueno, Y. Nishida, and K. Matsumoto. 1999. p38 mitogen-activated protein kinase can be involved in transforming growth factor beta superfamily signal transduction in *Drosophila* wing morphogenesis. *Molecular and Cellular Biology*. 19:2322–2329. doi:10.1128/MCB.19.3.2322.
- Alexander, C., M. Votruba, U.E. Pesch, D.L. Thiselton, S. Mayer, A. Moore, M. Rodriguez, U. Kellner, B. Leo-Kottler, G. Auburger, S.S. Bhattacharya, and B. Wissinger. 2000. OPA1, encoding a dynamin-related GTPase, is mutated in autosomal dominant optic atrophy linked to chromosome 3q28. *Nat Genet*. 26:211–215. doi:10.1038/79944.
- Baker, B.M., A.M. Nargund, T. Sun, and C.M. Haynes. 2012. Protective Coupling of Mitochondrial Function and Protein Synthesis via the eIF2 $\alpha$  Kinase GCN-2. *PLoS Genet*. 8:e1002760. doi:10.1371/journal.pgen.1002760.s007.
- Barcelo, H.L.N., and M.J. Stewart. 2002. Altering *Drosophila* S6 kinase activity is consistent with a role for S6 kinase in growth. *genesis*. 34:83–85. doi:10.1002/gen.10132.
- Bollen, M., W. Peti, M.J. Ragusa, and M. Beullens. 2010. The extended PP1 toolkit: designed to create specificity. *Trends Biochem Sci*. 35:450–458. doi:10.1016/j.tibs.2010.03.002.
- Bouman, L., A. Schlierf, A.K. Lutz, J. Shan, A. Deinlein, J. Kast, Z. Galehdar, V. Palmisano, N. Patenge, D. Berg, T. Gasser, R. Augustin, D. Trümbach, I. Irrcher, D.S. Park, W. Wurst, M.S. Kilberg, J. Tatzelt, and K.F. Winklhofer. 2011. Parkin is transcriptionally regulated by ATF4: evidence for an interconnection between mitochondrial stress and ER stress. *Cell Death Differ*. 18:769–782. doi:10.1038/cdd.2010.142.
- Brand, A.H., and N. Perrimon. 1993. Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development*. 118:401–415.
- Brand, M.D. 1997. Regulation analysis of energy metabolism. *J Exp Biol*. 200:193–202.
- Burman, J.L., S. Yu, A.C. Poole, R.B. Decal, and L. Pallanck. 2012. Analysis of neural subtypes reveals selective mitochondrial dysfunction in dopaminergic neurons from parkin mutants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 109:10438–10443. doi:10.1073/pnas.1120688109.
- Cagin, U., O.F. Duncan, A.P. Gatt, M.S. Dionne, S.T. Sweeney, and J.M. Bateman. 2015. Mitochondrial retrograde signaling regulates neuronal function. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 112:E6000–9. doi:10.1073/pnas.1505036112.

- Celardo, I., A.C. Costa, S. Lehmann, C. Jones, N. Wood, N.E. Mencacci, G.R. Mallucci, S.H.Y. Loh, and L.M. Martins. 2016. Mitofusin-mediated ER stress triggers neurodegeneration in pink1/parkin models of Parkinson's disease. *Cell Death and Disease*. 7:e2271–. doi:10.1038/cddis.2016.173.
- Chantranupong, L., R.L. Wolfson, and D.M. Sabatini. 2015. Nutrient-Sensing Mechanisms across Evolution. *Cell*. 161:67–83. doi:10.1016/j.cell.2015.02.041.
- Chen, C.C., J.K. Wu, H.W. Lin, T.P. Pai, T.F. Fu, C.L. Wu, T. Tully, and A.S. Chiang. 2012. Visualizing Long-Term Memory Formation in Two Neurons of the Drosophila Brain. *Science*. 335:678–685. doi:10.1126/science.1212735.
- Chen, H., J.M. McCaffery, and D.C. Chan. 2007. Mitochondrial fusion protects against neurodegeneration in the cerebellum. *Cell*. 130:548–562. doi:10.1016/j.cell.2007.06.026.
- Cheng, A., R. Wan, J.-L. Yang, N. Kamimura, T.G. Son, X. Ouyang, Y. Luo, E. Okun, and M.P. Mattson. 2012. Involvement of PGC-1 $\alpha$  in the formation and maintenance of neuronal dendritic spines. *Nature Communications*. 3:1250. doi:10.1038/ncomms2238.
- Cheng, H.-C., C.M. Ulane, and R.E. Burke. 2010. Clinical progression in Parkinson disease and the neurobiology of axons. *Ann Neurol*. 67:715–725. doi:10.1002/ana.21995.
- Chihara, T., D. Luginbuhl, and L. Luo. 2007. Cytoplasmic and mitochondrial protein translation in axonal and dendritic terminal arborization. *Nat Neurosci*. 10:828–837. doi:10.1038/nn1910.
- Chintapalli, V.R., J. Wang, and J.A.T. Dow. 2007. Using FlyAtlas to identify better Drosophila melanogaster models of human disease. *Nat Genet*. 39:715–720. doi:10.1038/ng2049.
- Cichon, J., C. Sun, B. Chen, M. Jiang, X.A. Chen, Y. Sun, Y. Wang, and G. Chen. 2012. Cofilin Aggregation Blocks Intracellular Trafficking and Induces Synaptic Loss in Hippocampal Neurons. *Journal of Biological Chemistry*. 287:3919–3929. doi:10.1074/jbc.M111.301911.
- Clavier, A., A. Rincheval-Arnold, J. Colin, B. Mignotte, and I. Guenal. 2015. Apoptosis in Drosophila: which role for mitochondria? *Apoptosis*. doi:10.1007/s10495-015-1209-y.
- Connolly, N.M.C., H. Dussmann, U. Anilkumar, H.J. Huber, and J.H.M. Prehn. 2014. Single-cell imaging of bioenergetic responses to neuronal excitotoxicity and oxygen and glucose deprivation. *Journal of Neuroscience*. 34:10192–10205. doi:10.1523/JNEUROSCI.3127-13.2014.
- Delettre, C., G. Lenaers, J.M. Griffoin, N. Gigarel, C. Lorenzo, P. Belenguer, L. Pelloquin, J. Grosgeorge, C. Turc-Carel, E. Perret, C. Astarie-Dequeker, L. Lasquellec, B. Arnaud, B. Ducommun, J. Kaplan, and C.P. Hamel. 2000. Nuclear gene OPA1, encoding a

- mitochondrial dynamin-related protein, is mutated in dominant optic atrophy. *Nat Genet.* 26:207–210. doi:10.1038/79936.
- Dickey, A.S., and S. Strack. 2011. PKA/AKAP1 and PP2A/B 2 Regulate Neuronal Morphogenesis via Drp1 Phosphorylation and Mitochondrial Bioenergetics. *J Neurosci.* 31:15716–15726. doi:10.1523/JNEUROSCI.3159-11.2011.
- DiMauro, S., and E.A. Schon. 2008. Mitochondrial Disorders in the Nervous System. *Annu Rev Neurosci.* 31:91–123. doi:10.1146/annurev.neuro.30.051606.094302.
- Dubinsky, J.M. 2009. Heterogeneity of nervous system mitochondria: location, location, location! *Exp Neurol.* 218:293–307. doi:10.1016/j.expneurol.2009.05.020.
- Echalier, G. 1997. 1 - Composition of the Body Fluid of Drosophila and the Design of Culture Media for Drosophila Cells. In *Drosophila Cells in Culture*. Academic Press, New York. 1–67.
- Ellington, W.R. 2001. Evolution and Physiological Roles of Phosphagen Systems. *Annu Rev Physiol.* 63:289–325. doi:10.1146/annurev.physiol.63.1.289.
- Engl, E., and D. Attwell. 2015. Non-signalling energy use in the brain. *The Journal of Physiology.* 593:3417–3429. doi:10.1113/jphysiol.2014.282517.
- Erecinska, M., and I.A. Silver. 1989. ATP and brain function. *J Cereb Blood Flow Metab.* 9:2–19. doi:10.1038/jcbfm.1989.2.
- Evstafieva, A.G., A.A. Garaeva, A.A. Khutornenko, A.V. Klepikova, M.D. Logacheva, A.A. Penin, G.E. Novakovsky, I.E. Kovaleva, and P.M. Chumakov. 2014. A sustained deficiency of mitochondrial respiratory complex III induces an apoptotic cell death through the p53-mediated inhibition of pro-survival activities of the activating transcription factor 4. *Cell Death and Disease.* 5:e1511. doi:10.1038/cddis.2014.469.
- Fluegge, D., L.M. Moeller, A. Cichy, M. Gorin, A. Weth, S. Veitinger, S. Cainarca, S. Lohmer, S. Corazza, E.M. Neuhaus, W. Baumgartner, J. Spehr, and M. Spehr. 2012. Mitochondrial Ca<sup>2+</sup> mobilization is a key element in olfactory signaling. *Nat Neurosci.* 15:754–762. doi:10.1038/nn.3074.
- Fujita, Y., M. Ito, Y. Nozawa, M. Yoneda, Y. Oshida, and M. Tanaka. 2007. CHOP (C/EBP homologous protein) and ASNS (asparagine synthetase) induction in cybrid cells harboring MELAS and NARP mitochondrial DNA mutations. *Mitochondrion.* 7:80–88. doi:10.1016/j.mito.2006.11.003.
- Fukumitsu, K., K. Fujishima, A. Yoshimura, Y.K. Wu, J. Heuser, and M. Kengaku. 2015. Synergistic action of dendritic mitochondria and creatine kinase maintains ATP homeostasis

- and actin dynamics in growing neuronal dendrites. *Journal of Neuroscience*. 35:5707–5723. doi:10.1523/JNEUROSCI.4115-14.2015.
- Gao, F.B., J.E. Brenman, L.Y. Jan, and Y.N. Jan. 1999. Genes regulating dendritic outgrowth, branching, and routing in Drosophila. *Genes Dev.* 13:2549–2561.
- Greaves, L.C., A.K. Reeve, R.W. Taylor, and D.M. Turnbull. 2012. Mitochondrial DNA and disease. *J. Pathol.* 226:274–286. doi:10.1002/path.3028.
- Gripasic, L., N.N. van der Wel, I.J. Orozco, P.J. Peters, and A.M. van der Bliek. 2004. Loss of the intermembrane space protein Mgm1/OPA1 induces swelling and localized constrictions along the lengths of mitochondria. *J Biol Chem.* 279:18792–18798. doi:10.1074/jbc.M400920200.
- Grueber, W.B., L.Y. Jan, and Y.N. Jan. 2002. Tiling of the Drosophila epidermis by multidendritic sensory neurons. *Development*. 129:2867–2878.
- Grueber, W.B., L.Y. Jan, and Y.N. Jan. 2003. Different levels of the homeodomain protein cut regulate distinct dendrite branching patterns of Drosophila multidendritic neurons. *Cell*. 112:805–818.
- Haddad, D., and K. Nakamura. 2015. Understanding the susceptibility of dopamine neurons to mitochondrial stressors in Parkinson's disease. *FEBS Lett.* 589:3702–3713. doi:10.1016/j.febslet.2015.10.021.
- Haelterman, N.A., W.H. Yoon, H. Sandoval, M. Jaiswal, J.M. Shulman, and H.J. Bellen. 2014. A Mitocentric View of Parkinson's Disease. *Annu Rev Neurosci.* 37:137–159. doi:10.1146/annurev-neuro-071013-014317.
- Han, C., D. Wang, P. Soba, S. Zhu, X. Lin, L.Y. Jan, and Y.N. Jan. 2012. Integrins regulate repulsion-mediated dendritic patterning of drosophila sensory neurons by restricting dendrites in a 2D space. *Neuron*. 73:64–78. doi:10.1016/j.neuron.2011.10.036.
- Han, C., Y. Song, H. Xiao, D. Wang, N.C. Franc, L.Y. Jan, and Y.N. Jan. 2014. Epidermal Cells Are the Primary Phagocytes in the Fragmentation and Clearanceof Degenerating Dendrites in Drosophila. *Neuron*. 1–17. doi:10.1016/j.neuron.2013.11.021.
- Hardie, D.G., F.A. Ross, and S.A. Hawley. 2012. AMPK: a nutrient and energy sensor that maintains energy homeostasis. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 13:251–262. doi:10.1038/nrm3311.
- Hasel, P., S. Mckay, J. Qiu, and G.E. Hardingham. 2014. Selective dendritic susceptibility to bioenergetic, excitotoxic and redox perturbations in cortical neurons. *Biochim Biophys Acta*. 1853:2066–2076. doi:10.1016/j.bbamcr.2014.12.021.

- Hay, B.A., T. Wolff, and G.M. Rubin. 1994. Expression of baculovirus P35 prevents cell death in *Drosophila*. *Development*. 120:2121–2129.
- Haynes, C.M., C.J. Fiorese, and Y.-F. Lin. 2013. Evaluating and responding to mitochondrial dysfunction: the mitochondrial unfolded-protein response and beyond. *Trends Cell Biol.* 23:311–318. doi:10.1016/j.tcb.2013.02.002.
- Hinkle, P.C. 2005. P/O ratios of mitochondrial oxidative phosphorylation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*. 1706:1–11. doi:10.1016/j.bbabi.2004.09.004.
- Hofmeyr, J.-H.S. 2008. The harmony of the cell: the regulatory design of cellular processes. *Essays Biochem.* 45:57–66. doi:10.1042/bse0450057.
- Hoozemans, J.J.M., E.S. van Haastert, P. Eikelenboom, R.A.I. de Vos, J.M. Rozemuller, and W. Schepers. 2007. Activation of the unfolded protein response in Parkinson's disease. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 354:707–711. doi:10.1016/j.bbrc.2007.01.043.
- Howarth, C., P. Gleeson, and D. Attwell. 2012. Updated energy budgets for neural computation in the neocortex and cerebellum. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*. 32:1222–1232. doi:10.1038/jcbfm.2012.35.
- Hu, Y., I. Flockhart, A. Vinayagam, C. Bergwitz, B. Berger, N. Perrimon, and S.E. Mohr. 2011. An integrative approach to ortholog prediction for disease-focused and other functional studies. *BMC Bioinformatics*. 12:357. doi:10.1186/1471-2105-12-357.
- Huang, H., X. Zhang, S. Li, N. Liu, W. Lian, E. McDowell, P. Zhou, C. Zhao, H. Guo, C. Zhang, C. Yang, G. Wen, X. Dong, L. Lu, N. Ma, W. Dong, Q.P. Dou, X. Wang, and J. Liu. 2010. Physiological levels of ATP negatively regulate proteasome function. *Cell Res.* 20:1372–1385. doi:10.1038/cr.2010.123.
- Im, S.H., K. Takle, J. Jo, D.T. Babcock, Z. Ma, Y. Xiang, and M.J. Galko. 2015. Tachykinin acts upstream of autocrine Hedgehog signaling during nociceptive sensitization in *Drosophila*. *eLife*. 4. doi:10.7554/eLife.10735.
- Imamura, H., K.P.H. Nhat, H. Togawa, K. Saito, R. Iino, Y. Kato-Yamada, T. Nagai, and H. Noji. 2009. Visualization of ATP levels inside single living cells with fluorescence resonance energy transfer-based genetically encoded indicators. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 106:15651–15656. doi:10.1073/pnas.0904764106.
- Itoh, K., K. Nakamura, M. Iijima, and H. Sesaki. 2013. Mitochondrial dynamics in neurodegeneration. *Trends Cell Biol.* 23:64–71. doi:10.1016/j.tcb.2012.10.006.

- Itoh, Y., T. Abe, R. Takaoka, and N. Tanahashi. 2004. Fluorometric Determination of Glucose Utilization in Neurons in Vitro and in Vivo. *J Cereb Blood Flow Metab.* 993–1003. doi:10.1097/01.WCB.0000127661.07591.DE.
- Iyer, E.P.R., S.C. Iyer, L. Sullivan, D. Wang, R. Meduri, L.L. Graybeal, and D.N. Cox. 2013. Functional Genomic Analyses of Two Morphologically Distinct Classes of Drosophila Sensory Neurons: Post-Mitotic Roles of Transcription Factors in Dendritic Patterning. *PLoS ONE.* 8:e72434. doi:10.1371/journal.pone.0072434.
- Jan, Y.N., and L.Y. Jan. 2010. Branching out: mechanisms of dendritic arborization. *Nat Rev Neurosci.* 11:316–328. doi:10.1038/nrn2836.
- Janssen, G.M.C., P. Schwertman, T.A.T. Wanga, R.S.J. Tafrechi, P.J.A. Broek, and A.K. Raap. 2009. Transient and constitutive repression of cytoplasmic translation signaling in cells with mtDNA mutation. *CMLS, Cell. Mol. Life Sci.* 66:721–730. doi:10.1007/s00018-009-8687-4.
- Johnson, E.C., N. Kazgan, C.A. Bretz, L.J. Forsberg, C.E. Hector, R.J. Worthen, R. Onyenwoke, and J.E. Brenman. 2010. Altered Metabolism and Persistent Starvation Behaviors Caused by Reduced AMPK Function in Drosophila. *PLoS ONE.* 5:e12799. doi:10.1371/journal.pone.0012799.g007.
- Kanehisa, M., and S. Goto. 2000. KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes. *Nucleic Acids Res.* 28:27–30.
- Kim, H.-J., A.R. Raphael, E.S. LaDow, L. McGurk, R.A. Weber, J.Q. Trojanowski, V.M.-Y. Lee, S. Finkbeiner, A.D. Gitler, and N.M. Bonini. 2014. Therapeutic modulation of eIF2α phosphorylation rescues TDP-43 toxicity in amyotrophic lateral sclerosis disease models. *Nat Genet.* 46:152–160. doi:10.1038/ng.2853.
- Kim, M.E., B.R. Shrestha, R. Blazek, C.A. Mason, and W.B. Grueber. 2012. Integrins Establish Dendrite-Substrate Relationships that Promote Dendritic Self-Avoidance and Patterning in Drosophila Sensory Neurons. *Neuron.* 73:79–91. doi:10.1016/j.neuron.2011.10.033.
- Knorre, D.A., S.S. Sokolov, A.N. Zyrina, and F.F. Severin. 2016. How do yeast sense mitochondrial dysfunction? *Microbial Cell.* 3. doi:10.15698/mic2016.11.537.
- Koike, T., Y. Yang, K. Suzuki, and X. Zheng. 2008. Axon & dendrite degeneration: its mechanisms and protective experimental paradigms. *Neurochem. Int.* 52:751–760. doi:10.1016/j.neuint.2007.09.007.
- Koike-Kumagai, M., K.-I. Yasunaga, R. Morikawa, T. Kanamori, and K. Emoto. 2009. The target of rapamycin complex 2 controls dendritic tiling of Drosophila sensory neurons through the

- Tricornered kinase signalling pathway. *EMBO J.* 28:3879–3892.  
doi:10.1038/emboj.2009.312.
- Koopman, W.J.H., F. Distelmaier, J.A. Smeitink, and P.H. Willems. 2012. OXPHOS mutations and neurodegeneration. *EMBO J.* 1–21. doi:10.1038/emboj.2012.300.
- Leung, K.-M., and C.E. Holt. 2008. Live visualization of protein synthesis in axonal growth cones by microinjection of photoconvertible Kaede into *Xenopus* embryos. *Nature Protocols*. 3:1318–1327. doi:10.1038/nprot.2008.113.
- Li, J., J.J. Wang, and S.X. Zhang. 2011. Preconditioning with Endoplasmic Reticulum Stress Mitigates Retinal Endothelial Inflammation via Activation of X-box Binding Protein 1. *Journal of Biological Chemistry*. 286:4912–4921. doi:10.1074/jbc.M110.199729.
- Liu, S., and B. Lu. 2010. Reduction of Protein Translation and Activation of Autophagy Protect against PINK1 Pathogenesis in *Drosophila melanogaster*. *PLoS Genet.* 6:e1001237.  
doi:10.1371/journal.pgen.1001237.g007.
- Liu, Z., and R.A. Butow. 2006. Mitochondrial Retrograde Signaling. *Annu Rev Genet.* 40:159–185. doi:10.1146/annurev.genet.40.110405.090613.
- Liu, Z., R. Steward, and L. Luo. 2000. *Drosophila* Lis1 is required for neuroblast proliferation, dendritic elaboration and axonal transport. *Nat Cell Biol.* 2:776–783. doi:10.1038/35041011.
- Lu, B., S. Gehrke, and Z. Wu. 2014. RNA metabolism in the pathogenesis of Parkinson’s disease. *Brain Res.* 1584:105–115. doi:10.1016/j.brainres.2014.03.003.
- Macleod, G.T., M. Hegström-Wojtowicz, M.P. Charlton, and H.L. Atwood. 2002. Fast calcium signals in *Drosophila* motor neuron terminals. *J Neurophysiol.* 88:2659–2663.  
doi:10.1152/jn.00515.2002.
- Maltecca, F., E. Baseggio, F. Consolato, D. Mazza, P. Podini, S.M. Young, I. Drago, B.A. Bahr, A. Puliti, F. Codazzi, A. Quattrini, and G. Casari. 2015. Purkinje neuron Ca<sup>2+</sup> influx reduction rescues ataxia in SCA28 model. *J. Clin. Invest.* 125:263–274. doi:10.1172/JCI74770.
- Malthankar-Phatak, G.H., A.B. Patel, Y. Xia, S. Hong, G.M.I. Chowdhury, K.L. Behar, I.A. Orina, and J.C.K. Lai. 2008. Effects of continuous hypoxia on energy metabolism in cultured cerebro-cortical neurons. *Brain Res.* 1229:147–154. doi:10.1016/j.brainres.2008.06.074.
- Malzer, E., M. Szajewska-Skuta, L.E. Dalton, S.E. Thomas, N. Hu, H. Skaer, D.A. Lomas, D.C. Crowther, and S.J. Marciniak. 2013. Coordinate regulation of eIF2 phosphorylation by PPP1R15 and GCN2 is required during *Drosophila* development. *J Cell Sci.* 126:1406–1415.  
doi:10.1242/jcs.117614.

- Malzer, E., M.L. Daly, A. Moloney, T.J. Sendall, S.E. Thomas, E. Ryder, H.D. Ryoo, D.C. Crowther, D.A. Lomas, and S.J. Marciniak. 2010. Impaired tissue growth is mediated by checkpoint kinase 1 (CHK1) in the integrated stress response. *J Cell Sci.* 123:2892–2900. doi:10.1242/jcs.070078.
- Mandal, S., P. Guptan, E. Owusu-Ansah, and U. Banerjee. 2005. Mitochondrial Regulation of Cell Cycle Progression during Development as Revealed by the tenured Mutation in *Drosophila*. *Dev Cell.* 9:843–854. doi:10.1016/j.devcel.2005.11.006.
- Martínez Reyes, I., M. Sánchez Aragó, and J.M. Cuevva. 2012. AMPK and GCN2–ATF4 signal the repression of mitochondria in colon cancer cells. *Biochem J.* 444:249–259. doi:10.1074/jbc.M412994200.
- McCammon, M.T., C.B. Epstein, B. Przybyla-Zawislak, L. McAlister-Henn, and R.A. Butow. 2003. Global transcription analysis of Krebs tricarboxylic acid cycle mutants reveals an alternating pattern of gene expression and effects on hypoxic and oxidative genes. *Mol Biol Cell.* 14:958–972. doi:10.1091/mbc.E02-07-0422.
- Michel, S., M. Canonne, T. Arnould, and P. Renard. 2015. Inhibition of mitochondrial genome expression triggers the activation of CHOP-10 by a cell signaling dependent on the integrated stress response but not the mitochondrial unfolded protein response. *Mitochondrion.* 21:58–68. doi:10.1016/j.mito.2015.01.005.
- Misko, A.L., Y. Sasaki, E. Tuck, J. Milbrandt, and R.H. Baloh. 2012. Mitofusin2 mutations disrupt axonal mitochondrial positioning and promote axon degeneration. *Journal of Neuroscience.* 32:4145–4155. doi:10.1523/JNEUROSCI.6338-11.2012.
- Mizuno, H., T.K. Mal, K.I. Tong, R. Ando, T. Furuta, M. Ikura, and A. Miyawaki. 2003. Photo-induced peptide cleavage in the green-to-red conversion of a fluorescent protein. *Molecular Cell.* 12:1051–1058.
- Monaghan, R.M., and A.J. Whitmarsh. 2015. Mitochondrial Proteins Moonlighting in the Nucleus. *Trends Biochem Sci.* 40:728–735. doi:10.1016/j.tibs.2015.10.003.
- Morais, V.A., P. Verstreken, A. Roethig, J. Smet, A. Snellinx, M. Vanbrabant, D. Haddad, C. Frezza, W. Mandemakers, D. Vogt-Weisenhorn, R. Van Coster, W. Wurst, L. Scorrano, and B. De Strooper. 2009. Parkinson's disease mutations in PINK1 result in decreased Complex I activity and deficient synaptic function. *EMBO Mol Med.* 1:99–111. doi:10.1002/emmm.200900006.
- Mori, K. 2009. Signalling Pathways in the Unfolded Protein Response: Development from Yeast to Mammals. *J Biochem.* 146:743–750. doi:10.1093/jb/mvp166.

- Mutez, E., A. Nkiliza, K. Belarbi, A. de Broucker, C. Vanbesien-Mailliot, S. Bleuse, A. Duflot, T. Comptdaer, P. Semaille, R. Blervaque, D. Hot, F. Leprêtre, M. Figeac, A. Destée, and M.-C. Chartier-Harlin. 2014. Involvement of the immune system, endocytosis and EIF2 signaling in both genetically determined and sporadic forms of Parkinson's disease. *Neurobiology of Disease*. 63:165–170. doi:10.1016/j.nbd.2013.11.007.
- Naidoo, N., M. Ferber, M. Master, Y. Zhu, and A.I. Pack. 2008. Aging Impairs the Unfolded Protein Response to Sleep Deprivation and Leads to Proapoptotic Signaling. *J Neurosci*. 28:6539–6548. doi:10.1523/JNEUROSCI.5685-07.2008.
- Naon, D., and L. Scorrano. 2014. At the right distance: ER-mitochondria juxtaposition in cell life and death. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*. 1843:2184–2194. doi:10.1016/j.bbamcr.2014.05.011.
- Niehues, S., J. Bussmann, G. Steffes, I. Erdmann, C. Köhrer, L. Sun, M. Wagner, K. Schäfer, G. Wang, S.N. Koerdt, M. Stum, U.L. RajBhandary, U. Thomas, H. Aberle, R.W. Burgess, X.-L. Yang, D. Dieterich, and E. Storkebaum. 2015. Impaired protein translation in Drosophila models for Charcot-Marie-Tooth neuropathy caused by mutant tRNA synthetases. *Nature Communications*. 6:7520. doi:10.1038/ncomms8520.
- Niven, J.E., and S.B. Laughlin. 2008. Energy limitation as a selective pressure on the evolution of sensory systems. *Journal of Experimental Biology*. 211:1792–1804. doi:10.1242/jeb.017574.
- Nunnari, J., and A. Suomalainen. 2012. Mitochondria: In Sickness and in Health. *Cell*. 148:1145–1159. doi:10.1016/j.cell.2012.02.035.
- Olichon, A., T. Landes, L. Arnauné-Pelloquin, L.J. Emorine, V. Mils, A. Guichet, C. Delettre, C. Hamel, P. Amati-Bonneau, D. Bonneau, P. Reynier, G. Lenaers, and P. Belenguer. 2007. Effects of OPA1 mutations on mitochondrial morphology and apoptosis: Relevance to ADOA pathogenesis. *J Cell Physiol*. 211:423–430. doi:10.1002/(ISSN)1097-4652.
- Ollmann, M., L.M. Young, C.J. Di Como, F. Karim, M. Belvin, S. Robertson, K. Whittaker, M. Demsky, W.W. Fisher, A. Buchman, G. Duyk, L. Friedman, C. Prives, and C. Kopczynski. 2000. Drosophila p53 is a structural and functional homolog of the tumor suppressor p53. *Cell*. 101:91–101. doi:10.1016/S0092-8674(00)80626-1.
- Orgogozo, V., and W.B. Grueber. 2005. FlyPNS, a database of the Drosophila embryonic and larval peripheral nervous system. *BMC Dev Biol*. 5:4. doi:10.1186/1471-213X-5-4.

- Oruganty-Das, A., T. Ng, T. Udagawa, E.L.K. Goh, and J.D. Richter. 2012. Translational Control of Mitochondrial Energy Production Mediates Neuron Morphogenesis. *Cell metabolism*. 16:789–800. doi:10.1016/j.cmet.2012.11.002.
- Owusu-Ansah, E., A. Yavari, S. Mandal, and U. Banerjee. 2008. Distinct mitochondrial retrograde signals control the G1-S cell cycle checkpoint. *Nat Genet*. 40:356–361. doi:10.1038/ng.2007.50.
- Pacelli, C., N. Giguère, M.-J. Bourque, M. Lévesque, R.S. Slack, and L.-É. Trudeau. 2015. Elevated Mitochondrial Bioenergetics and Axonal Arborization Size Are Key Contributors to the Vulnerability of Dopamine Neurons. *Current Biology*. 25:2349–2360. doi:10.1016/j.cub.2015.07.050.
- Parrish, A.B., C.D. Freel, and S. Kornbluth. 2013. Cellular mechanisms controlling caspase activation and function. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. 5. doi:10.1101/cshperspect.a008672.
- Pathak, D., A. Berthet, and K. Nakamura. 2013. Energy Failure. *Ann Neurol*. 74:506–516. doi:10.1002/ana.24014.
- Pathak, D., L.Y. Shields, B.A. Mendelsohn, D. Haddad, W. Lin, A.A. Gerencser, H. Kim, M.D. Brand, R.H. Edwards, and K. Nakamura. 2015. The Role of Mitochondrially Derived ATP in Synaptic Vesicle Recycling. *Journal of Biological Chemistry*. 290:22325–22336. doi:10.1074/jbc.M115.656405.
- Patt, S., H.J. Gertz, L. Gerhard, and J. Cervós-Navarro. 1991. Pathological changes in dendrites of substantia nigra neurons in Parkinson's disease: a Golgi study. *Histol. Histopathol*. 6:373–380.
- Pomar, N., J.J. Berlanga, S. Campuzano, G. Hernandez, M. Elias, and C. De Haro. 2003. Functional characterization of *Drosophila melanogaster* PERK eukaryotic initiation factor 2alpha (eIF2alpha) kinase. *Eur J Biochem*. 270:293–306. doi:10.1046/j.1432-1033.2003.03383.x.
- Price, J.C., S. Guan, A. Burlingame, S.B. Prusiner, and S. Ghaemmaghami. 2010. Analysis of proteome dynamics in the mouse brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 107:14508–14513. doi:10.1073/pnas.1006551107.
- Purdon, A.D., and S.I. Rapoport. 2007. 4.6 Energy consumption by phospholipid metabolism in mammalian brain. *Handbook of Neurochemistry and Molecular Neurobiology*. 401–427. doi:10.1007/978-0-387-30411-3\_15.

- R Core Team (2016). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.
- Raimundo, N. 2014. Mitochondrial pathology: stress signals from the energy factory. *Trends in Molecular Medicine*. 20:282–292. doi:10.1016/j.molmed.2014.01.005.
- Ramachandran, P., and V. Budnik. 2010a. Dissection of Drosophila larval body-wall muscles. *Cold Spring Harbor Protocols*. 2010:pdb.prot5469.
- Rangaraju, V., N. Calloway, and T.A. Ryan. 2014. Activity-Driven Local ATP Synthesis Is Required for Synaptic Function. *Cell*. 156:825–835. doi:10.1016/j.cell.2013.12.042.
- Reis, T., M.R. Van Gilst, and I.K. Hariharan. 2010. A Buoyancy-Based Screen of Drosophila Larvae for Fat-Storage Mutants Reveals a Role for Sir2 in Coupling Fat Storage to Nutrient Availability. *PLoS Genet*. 6:e1001206. doi:10.1371/journal.pgen.1001206.s003.
- Remmen, H., W.F. Ward, and R.V. Sabia. 2011. Gene expression and protein degradation. *Comprehensive Physiology*. 171–234. doi:10.1002/cphy.cp110109.
- Ren, M., C.K.L. Phoon, and M. Schlame. 2014. Metabolism and function of mitochondrial cardiolipin. *Prog. Lipid Res*. 55:1–16. doi:10.1016/j.plipres.2014.04.001.
- Requejo-Aguilar, R., I. Lopez-Fabuel, E. Fernández, L.M. Martins, A. Almeida, and J.P.B.N. os. 2014. PINK1 deficiency sustains cell proliferation by reprogramming glucose metabolism through HIF1. *Nature Communications*. 5:1–9. doi:10.1038/ncomms5514.
- Rolfe, D.F., and G.C. Brown. 1997. Cellular energy utilization and molecular origin of standard metabolic rate in mammals. *Physiol Rev*. 77:731–758.
- Rossignol, R., B. Faustin, C. Rocher, M. Malgat, J.-P. Mazat, and T. Letellier. 2003. Mitochondrial threshold effects. *Biochem J*. 370:751–762. doi:10.1042/BJ20021594.
- Rutkowski, D.T., and R.S. Hegde. 2010. Regulation of basal cellular physiology by the homeostatic unfolded protein response. *J Cell Biol*. 189:783–794. doi:10.1124/mol.109.057067.
- Ryoo, H.D., P.M. Domingos, M.-J. Kang, and H. Steller. 2007. Unfolded protein response in a Drosophila model for retinal degeneration. *EMBO J*. 26:242–252. doi:10.1038/sj.emboj.7601477.
- Ryu, E.J., J.M. Angelastro, and L.A. Greene. 2005. Analysis of gene expression changes in a cellular model of Parkinson disease. *Neurobiology of Disease*. 18:54–74. doi:10.1016/j.nbd.2004.08.016.
- San Martín, A., T. Sotelo-Hitschfeld, R. Lerchundi, I. Fernández Moncada, S. Ceballo, R. Valdebenito, F. Baeza-Lehnert, K. Alegría, Y. Contreras-Baeza, P. Garrido-Gerter, I.

- Romero-Gómez, and L.F. Barros. 2014. Single-cell imaging tools for brain energy metabolism: a review. *Neurophoton*. 1:011004. doi:10.1117/1.NPh.1.1.011004.
- Scheper, G.C., M.S. van der Knaap, and C.G. Proud. 2007. Translation matters: protein synthesis defects in inherited disease. *Nat Rev Genet*. 8:711–723. doi:10.1038/nrg2142.
- Scheper, W., and J.J.M. Hoozemans. 2015. The unfolded protein response in neurodegenerative diseases: a neuropathological perspective. *Acta Neuropathol*. 1–17. doi:10.1007/s00401-015-1462-8.
- Schirmeier, S., T. Matzat, and C. Klämbt. 2015. Axon ensheathment and metabolic supply by glial cells in Drosophila. *Brain Res*. doi:10.1016/j.brainres.2015.09.003.
- Schneider, C.A., W.S. Rasband, and K.W. Eliceiri. 2012. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods*. 9:671–675. doi:10.1038/nmeth.2089.
- Sekine, S.U., S. Haraguchi, K. Chao, T. Kato, L. Luo, M. Miura, and T. Chihara. 2013. Meigo governs dendrite targeting specificity by modulating Ephrin level and N-glycosylation. *Nat Neurosci*. 16:683–691. doi:10.1038/nn.3389.
- Senft, D., and Z.A. Ronai. 2015. UPR, autophagy, and mitochondria crosstalk underlies the ER stress response. *Trends Biochem Sci*. 40:141–148. doi:10.1016/j.tibs.2015.01.002.
- Shepherd, D., and S.A. Smith. 1996. Central projections of persistent larval sensory neurons prefigure adult sensory pathways in the CNS of Drosophila. *Development*. 122:2375–2384.
- Shields, L.Y., H. Kim, L. Zhu, D. Haddad, A. Berthet, D. Pathak, M. Lam, R. Ponnusamy, L.G. Diaz-Ramirez, T.M. Gill, H. Sesaki, L. Mucke, and K. Nakamura. 2015. Dynamin-related protein 1 is required for normal mitochondrial bioenergetic and synaptic function in CA1 hippocampal neurons. *Cell Death and Disease*. 6:e1725. doi:10.1038/cddis.2015.94.
- Shimono, K., K. Fujishima, T. Nomura, M. Ohashi, T. Usui, M. Kengaku, A. Toyoda, and T. Uemura. 2014. An evolutionarily conserved protein CHORD regulates scaling of dendritic arbors with body size. *Sci. Rep*. 4:4415. doi:10.1038/srep04415.
- Silva, J.M., A. Wong, V. Carelli, and G.A. Cortopassi. 2009. Inhibition of mitochondrial function induces an integrated stress response in oligodendroglia. *Neurobiology of Disease*. 34:357–365. doi:10.1016/j.nbd.2009.02.005.
- Song, W., M. Onishi, L.Y. Jan, and Y.N. Jan. 2007. Peripheral multidendritic sensory neurons are necessary for rhythmic locomotion behavior in Drosophila larvae. *Proc Natl Acad Sci USA*. 104:5199–5204. doi:10.1073/pnas.0700895104.

- Storey, K.B., and J.M. Storey. 2007. Tribute to P. L. Lutz: putting life on 'pause' - molecular regulation of hypometabolism. *Journal of Experimental Biology*. 210:1700–1714.  
doi:10.1242/jeb.02716.
- Strang, R., and E.M. Clement. 1980. The relative importance of glucose and trehalose in the nutrition of the nervous system of the locust *Schistocerca americana gregaria*. *Insect biochemistry*. 10:155–161. doi:10.1016/0020-1790(80)90067-0.
- Sugimura, K., M. Yamamoto, R. Niwa, D. Satoh, S. Goto, M. Taniguchi, S. Hayashi, and T. Uemura. 2003. Distinct developmental modes and lesion-induced reactions of dendrites of two classes of *Drosophila* sensory neurons. *J Neurosci*. 23:3752–3760.
- Sugiyama, S., S. Moritoh, Y. Furukawa, T. Mizuno, Y.-M. Lim, L. Tsuda, and Y. Nishida. 2007. Involvement of the mitochondrial protein translocator component tim50 in growth, cell proliferation and the modulation of respiration in *Drosophila*. *Genetics*. 176:927–936.  
doi:10.1534/genetics.107.072074.
- Sun, X., J. Liu, J.F. Crary, C. Malagelada, D. Sulzer, L.A. Greene, and O.A. Levy. 2013. ATF4 Protects Against Neuronal Death in Cellular Parkinson's Disease Models by Maintaining Levels of Parkin. *Journal of Neuroscience*. 33:2398–2407.  
doi:10.1523/JNEUROSCI.2292-12.2013.
- Surin, A.M., S. Khiroug, L.R. Gorbacheva, B.I. Khodorov, V.G. Pinelis, and L. Khiroug. 2013. Comparative analysis of cytosolic and mitochondrial ATP synthesis in embryonic and postnatal hippocampal neuronal cultures. *Front. Mol. Neurosci*. 5.  
doi:10.3389/fnmol.2012.00102.
- Sutton, M.A., and E.M. Schuman. 2006. Dendritic Protein Synthesis, Synaptic Plasticity, and Memory. *Cell*. 127:49–58. doi:10.1016/j.cell.2006.09.014.
- Tain, L.S., H. Mortiboys, R.N. Tao, E. Ziviani, O. Bandmann, and A.J. Whitworth. 2009. Rapamycin activation of 4E-BP prevents parkinsonian dopaminergic neuron loss. *Nat Neurosci*. 12:1129–1135. doi:10.1038/nn.2372.
- Tamura, Y., T. Endo, M. Iijima, and H. Sesaki. 2009. Ups1p and Ups2p antagonistically regulate cardiolipin metabolism in mitochondria. *J Cell Biol*. 185:1029–1045.  
doi:10.1083/jcb.200812018.
- Tanaka, T., K. Nagashima, N. Inagaki, H. Kioka, S. Takashima, H. Fukuoka, H. Noji, A. Kakizuka, and H. Imamura. 2014. Glucose-stimulated single pancreatic islets sustain increased cytosolic ATP levels during initial Ca<sup>2+</sup> influx and subsequent Ca<sup>2+</sup> oscillations. *Journal of Biological Chemistry*. 289:2205–2216. doi:10.1074/jbc.M113.499111.

- Tatsuta, T., M. Scharwey, and T. Langer. 2014. Mitochondrial lipid trafficking. *Trends Cell Biol.* 24:44–52. doi:10.1016/j.tcb.2013.07.011.
- Taymans, J.-M., A. Nkiliza, and M.-C. Chartier-Harlin. 2015. Dereulation of protein translation control, a potential game-changing hypothesis for Parkinson's disease pathogenesis. *Trends in Molecular Medicine.* 21:466–472. doi:10.1016/j.molmed.2015.05.004.
- Thorat, L.J., S.M. Gaikwad, and B.B. Nath. 2012. Trehalose as an indicator of desiccation stress in *Drosophila melanogaster* larvae: A potential marker of anhydrobiosis. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 419:638–642. doi:10.1016/j.bbrc.2012.02.065.
- Tian, X., M. Zhu, L. Li, and C. Wu. 2013. Identifying protein-protein interaction in *Drosophila* adult heads by Tandem Affinity Purification (TAP). *JoVE.* 50968. doi:10.3791/50968.
- Toloe, J., R. Mollajew, S. Kügler, and S.L. Mironov. 2014. Metabolic differences in hippocampal “Rett” neurons revealed by ATP imaging. *Mol Cell Neurosci.* 59:47–56. doi:10.1016/j.mcn.2013.12.008.
- Tsubouchi, A., T. Tsuyama, M. Fujioka, H. Kohda, K. Okamoto-Furuta, T. Aigaki, and T. Uemura. 2009. Mitochondrial protein Preli-like is required for development of dendritic arbors and prevents their regression in the *Drosophila* sensory nervous system. *Development.* 136:3757–3766. doi:10.1242/dev.042135.
- Tsuyama, T., J.-I. Kishikawa, Y.-W. Han, Y. Harada, A. Tsubouchi, H. Noji, A. Kakizuka, K. Yokoyama, T. Uemura, and H. Imamura. 2013. In Vivo Fluorescent Adenosine 5'-Triphosphate (ATP) Imaging of *Drosophila melanogaster* and *Caenorhabditis elegans* by Using a Genetically Encoded Fluorescent ATP Biosensor Optimized for Low Temperatures. *Anal Chem.* 85:7889–7896. doi:10.1021/ac4015325.
- Ui-Tei, K., S. Nishihara, M. Sakuma, K. Matsuda, T. Miyake, and Y. Miyata. 1994. Chemical analysis of neurotransmitter candidates in clonal cell lines from *Drosophila* central nervous system. I. ACh and L-dopa. *Neuroscience Letters.* 174:85–88. doi:10.1016/0304-3940(94)90125-2.
- Valdés, P., G. Mercado, R.L. Vidal, C. Molina, G. Parsons, F.A. Court, A. Martinez, D. Galleguillos, D. Armentano, B.L. Schneider, and C. Hetz. 2014. Control of dopaminergic neuron survival by the unfolded protein response transcription factor XBP1. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 111:6804–6809. doi:10.1073/pnas.1321845111.
- Valente, E.M., P.M. Abou-Sleiman, V. Caputo, M.M.K. Muqit, K. Harvey, S. Gispert, Z. Ali, D. Del Turco, A.R. Bentivoglio, D.G. Healy, A. Albanese, R. Nussbaum, R. González-Maldonado, T. Deller, S. Salvi, P. Cortelli, W.P. Gilks, D.S. Latchman, R.J. Harvey, B. Dallapiccola, G.

- Auburger, and N.W. Wood. 2004. Hereditary early-onset Parkinson's disease caused by mutations in PINK1. *Science*. 304:1158–1160. doi:10.1126/science.1096284.
- Verstreken, P., C.V. Ly, K.J.T. Venken, T.-W. Koh, Y. Zhou, and H.J. Bellen. 2005. Synaptic mitochondria are critical for mobilization of reserve pool vesicles at Drosophila neuromuscular junctions. *Neuron*. 47:365–378. doi:10.1016/j.neuron.2005.06.018.
- Viader, A., Y. Sasaki, S. Kim, A. Strickland, C.S. Workman, K. Yang, R.W. Gross, and J. Milbrandt. 2013. Aberrant Schwann Cell Lipid Metabolism Linked to Mitochondrial Deficits Leads to Axon Degeneration and Neuropathy. *Neuron*. 77:886–898. doi:10.1016/j.neuron.2013.01.012.
- Vincow, E.S., G. Merrihew, R.E. Thomas, N.J. Shulman, R.P. Beyer, M.J. MacCoss, and L.J. Pallanck. 2013. The PINK1-Parkin pathway promotes both mitophagy and selective respiratory chain turnover in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 110:6400–6405. doi:10.1073/pnas.1221132110.
- Voet, D and Voet, J. 2005. ヴォート生化学 (第3版). 東京化学同人.
- Wallace, D.C., and W. Fan. 2009. The pathophysiology of mitochondrial disease as modeled in the mouse. *Genes Dev*. 23:1714–1736. doi:10.1101/gad.1784909.
- Walter, P., and D. Ron. 2011. The Unfolded Protein Response: From Stress Pathway to Homeostatic Regulation. *Science*. 334:1081–1086. doi:10.1126/science.1209038.
- Wegner, A., J. Meiser, D. Weindl, and K. Hiller. 2015. How metabolites modulate metabolic flux. *Curr Opin Biotechnol*. 34:16–22. doi:10.1016/j.copbio.2014.11.008.
- Wei, X., A.S. Howell, X. Dong, C.A. Taylor, R.C. Cooper, J. Zhang, W. Zou, D.R. Sherwood, K. Shen, and G.W. Davis. 2015. The unfolded protein response is required for dendrite morphogenesis. *eLife*. 4:e06963. doi:10.7554/eLife.06963.
- Weisova, P., C.G. Concannon, M. Devocelle, J.H.M. Prehn, and M.W. Ward. 2009. Regulation of Glucose Transporter 3 Surface Expression by the AMP-Activated Protein Kinase Mediates Tolerance to Glutamate Excitation in Neurons. *Journal of Neuroscience*. 29:2997–3008. doi:10.1523/JNEUROSCI.0354-09.2009.
- Wek, R.C., H.-Y. Jiang, and T.G. Anthony. 2006. Coping with stress: eIF2 kinases and translational control. *Biochem Soc Trans*. 34:7–11. doi:10.1042/BST20060007.
- Williams, G.S.B., L. Boyman, A.C. Chikando, R.J. Khairallah, and W.J. Lederer. 2013. Mitochondrial calcium uptake. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 110:10479–10486. doi:10.1073/pnas.1300410110.

- Williams, P.A., J.E. Morgan, and M. Votruba. 2010. Opa1 deficiency in a mouse model of dominant optic atrophy leads to retinal ganglion cell dendropathy. *Brain*. 133:2942–2951. doi:10.1093/brain/awq218.
- Wong-Riley, M.T.T. 2012. Bigenomic regulation of cytochrome c oxidase in neurons and the tight coupling between neuronal activity and energy metabolism. *Adv. Exp. Med. Biol.* 748:283–304. doi:10.1007/978-1-4614-3573-0\_12.
- Wu, J.S., and L. Luo. 2007. A protocol for mosaic analysis with a repressible cell marker (MARCM) in *Drosophila*. *Nature Protocols*. 1:2583–2589. doi:10.1038/nprot.2006.320.
- Wu, M.N., T. Fergestad, T.E. Lloyd, Y. He, K. Broadie, and H.J. Bellen. 1999. Syntaxin 1A interacts with multiple exocytic proteins to regulate neurotransmitter release in vivo. *Neuron*. 23:593–605. doi:10.1016/S0896-6273(00)80811-9.
- Xiang, Y., Q. Yuan, N. Vogt, L.L. Looger, L.Y. Jan, and Y.N. Jan. 2010. Light-avoidance-mediating photoreceptors tile the *Drosophila* larval body wall. *Nature*. 1–8. doi:10.1038/nature09576.
- Yaginuma, H., S. Kawai, K.V. Tabata, K. Tomiyama, A. Kakizuka, T. Komatsuzaki, H. Noji, and H. Imamura. 2014. Diversity in ATP concentrations in a single bacterial cell population revealed by quantitative single-cell imaging. *Sci. Rep.* 4:6522. doi:10.1038/srep06522.
- Yamamoto, M., R. Ueda, K. Takahashi, K. Saigo, and T. Uemura. 2006. Control of Axonal Sprouting and Dendrite Branching by the Nrg-Ank Complex at the Neuron-Glia Interface. *Current Biology*. 16:1678–1683. doi:10.1016/j.cub.2006.06.061.
- Yang, J., Z. Wu, N. Renier, D.J. Simon, K. Uryu, D.S. Park, P.A. Greer, C. Tournier, R.J. Davis, and M. Tessier-Lavigne. 2015. Pathological Axonal Deaththrough a MAPK Cascade that Triggers a Local Energy Deficit. *Cell*. 160:161–176. doi:10.1016/j.cell.2014.11.053.
- Ying, W. 2008. NAD +/NADH and NADP +/NADPH in Cellular Functions and Cell Death: Regulation and Biological Consequences. *Antioxid Redox Signal*. 10:179–206. doi:10.1089/ars.2007.1672.
- Ylikallio, E., H. Tyynismaa, H. Tsutsui, T. Ide, and A. Suomalainen. 2010. High mitochondrial DNA copy number has detrimental effects in mice. *Hum Mol Genet*. 19:2695–2705. doi:10.1093/hmg/ddq163.
- Yuan, H.-X., Y. Xiong, and K.-L. Guan. 2013. Nutrient sensing, metabolism, and cell growth control. *Molecular Cell*. 49:379–387. doi:10.1016/j.molcel.2013.01.019.

- Zhang, X., E. Szabo, M. Michalak, and M. Opas. 2007. Endoplasmic reticulum stress during the embryonic development of the central nervous system in the mouse. *Int. J. Dev. Neurosci.* 25:455–463. doi:10.1016/j.ijdevneu.2007.08.007.
- Zhou, L., A. Chomyn, G. Attardi, and C.A. Miller. 1997. Myoclonic epilepsy and ragged red fibers (MERRF) syndrome: selective vulnerability of CNS neurons does not correlate with the level of mitochondrial tRNALys mutation in individual neuronal isolates. *J Neurosci.* 17:7746–7753.
- Züchner, S., I.V. Mersiyanova, M. Muglia, N. Bissar-Tadmouri, J. Rochelle, E.L. Dadali, M. Zappia, E. Nelis, A. Patitucci, J. Senderek, Y. Parman, O. Evgrafov, P.D. Jonghe, Y. Takahashi, S. Tsuji, M.A. Pericak-Vance, A. Quattrone, E. Battaloglu, A.V. Polyakov, V. Timmerman, J.M. Schröder, and J.M. Vance. 2004. Mutations in the mitochondrial GTPase mitofusin 2 cause Charcot-Marie-Tooth neuropathy type 2A. *Nat Genet.* 36:449–451. doi:10.1038/ng1341.
- 山田康之. 2009. ATP合成酵素の活性調節における $\epsilon$ サブユニットの役割. 生化学. 第81巻. 第11号. pp.943-951

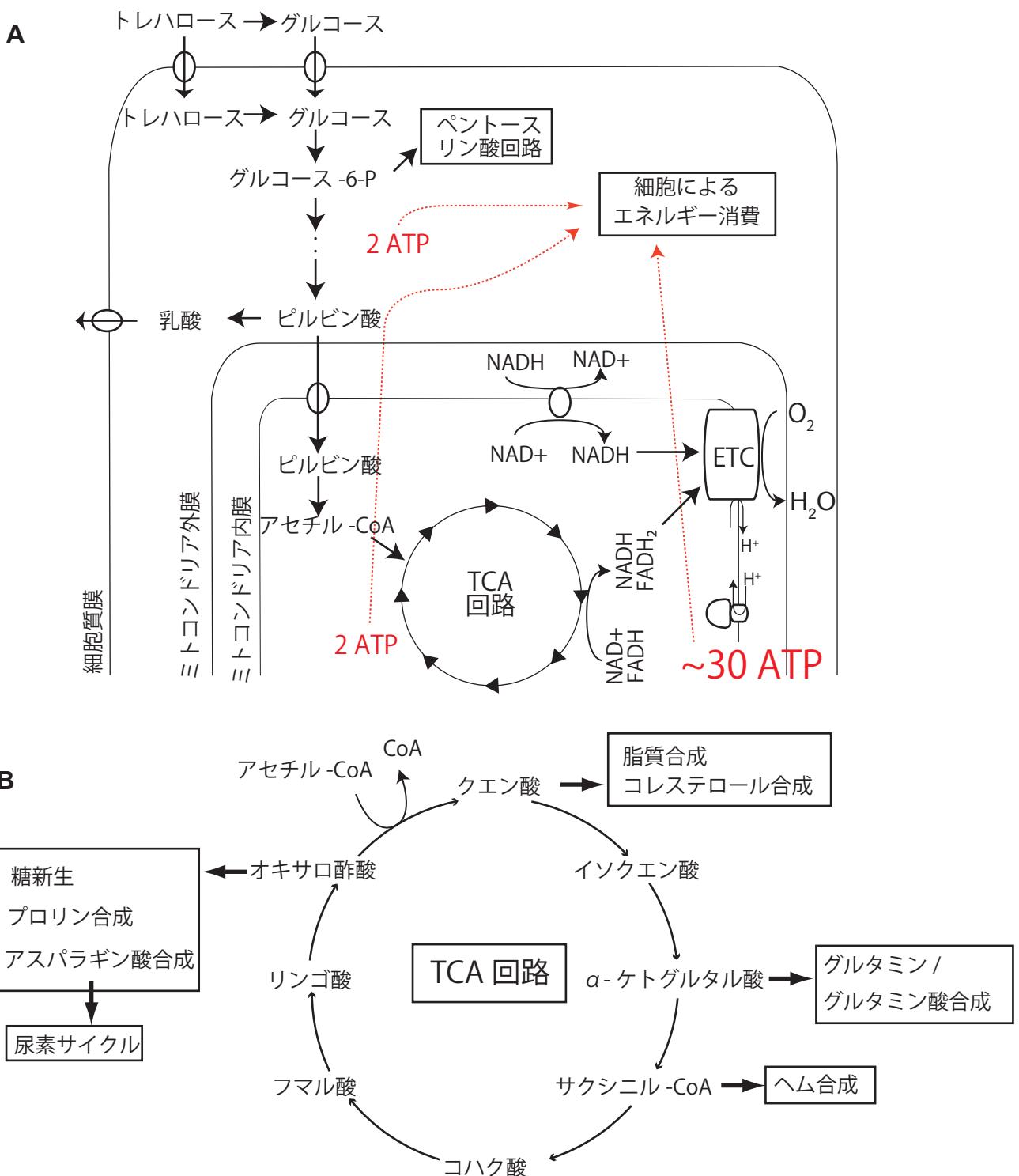


図1. ミトコンドリアの機能

(A) 真核細胞における ATP 生産 (Koopman 2012 をもとに改変 ; Voet and Voet, 2005)。昆虫における主要な血糖であるトレハロースが完全酸化される場合、2分子のグルコースに分解された後、解糖系、TCA 回路を経て二酸化炭素にまで酸化される。一連の過程で段階的にエネルギーが ATP の形で取り出されるが、多くの細胞種では、ミトコンドリア内の電子伝達系 (ETC) によって行われる酸化的リン酸化 (OXPHOS) による ATP 产生の寄与が最も大きい。

(B) TCA 回路はその他の生合成経路へと連結している (Voet and Voet, 2005 をもとに作成)。



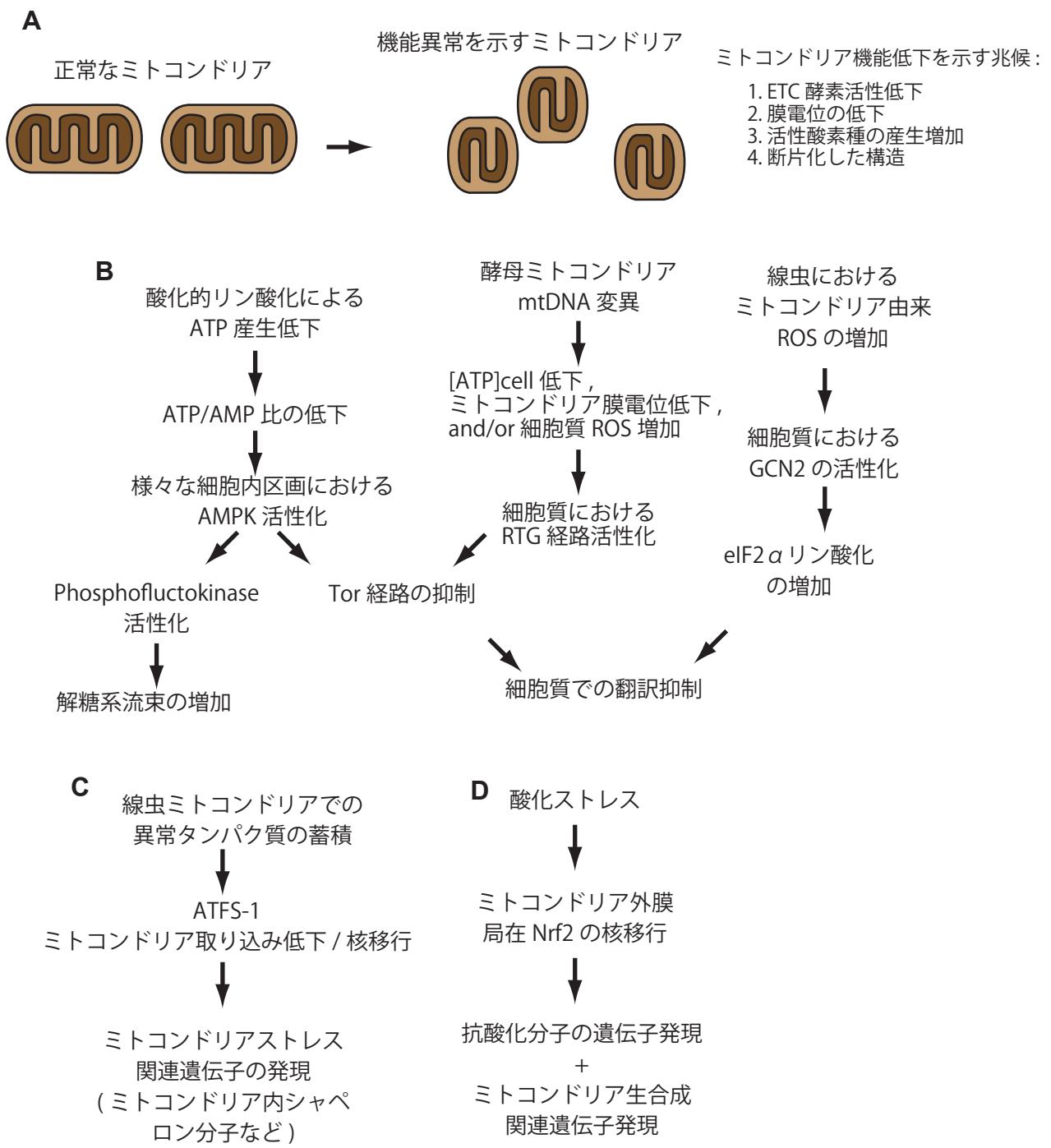


図 2. ミトコンドリア機能の乱れによって誘導されるストレスシグナルは多様である  
レジェンドは次頁に示した。

図2. ミトコンドリア機能の乱れによって誘導されるストレスシグナルは多様である

(A) ミトコンドリアの機能低下の兆候の概要。OXPHOS 機能が低下したミトコンドリアではその原因となる酵素活性の低下だけでなく、膜電位の低下、活性酸素種の増加など、様々な異常がしばしば観測される。このようなミトコンドリアの品質を示す特徴はそれ自体がストレスシグナルの引き金となりうる (Cagin and Enriques, 2015)。

(B) ミトコンドリアストレスシグナルによる、細胞内エネルギー合成・消費過程の制御の例。ミトコンドリアからの ATP 供給の低下はしばしば AMP の増加を導き、細胞内 AMPK を活性化する。AMPK はホスホフルクトキナーゼや Tor 経路の制御によって、解糖系の流速増加や、細胞質内での翻訳抑制を誘導することが知られている。酵母ではミトコンドリア変異体などで RTG 経路も Tor 抑制に関与することが明らかにされているが、この経路は真菌類以外では見つかっていない (Liu and Butow, 2006)。Rtg 経路の活性化因子として、細胞質内 ATP 濃度の低下、ミトコンドリア膜電位の低下、細胞質内 ROS の上昇などが挙げられている (Knorre et al., 2016)。翻訳の抑制は、Tor 経路だけでなく eIF2 $\alpha$  のリン酸化を介してもミトコンドリア機能低下時に起こりうることが報告されている。例で上げた GCN2 は進化的に高度に保存されているが、ミトコンドリア機能低下時に必ずしも活性化されているわけではなく、またその他の eIF2 $\alpha$  kinase (Perk, PKR, HRI) の関与も報告されており、ミトコンドリア機能低下時の eIF2 $\alpha$  経路の制御は不明な点が多い (Janssen et al., 2009; Baker et al., 2012; Michel et al., 2015; Fujita et al., 2007; Silva et al., 2009; Evstafieva et al., 2014; Reyes et al., 2012; Viader et al., 2013)。

(C) ミトコンドリアストレスシグナルによるミトコンドリア内シャペロンの制御の例。線虫ミトコンドリアにおける異常タンパク質の蓄積は、ATFS-1 タンパク質のミトコンドリア内への取り込み効率の低下を誘導する (Haynes et al., 2013)。正常時ミトコンドリア内に多く局在する ATFS-1 は、ミトコンドリア内に入り損ねることで核移行し、ミトコンドリア内シャペロンなどの転写を誘導する。ミトコンドリア内への取り込み効率の低下の要因として、ミトコンドリア膜電位の低下やミトコンドリア内シャペロン活性の不足などが挙げられる。ATFS-1 はこの UPRmt と呼ばれる経路の重要な調節因子であるが、そのオルソログは今のところ線虫以外では見つかっていない (OrthoDB: Q23272)。

(D) ミトコンドリアストレスシグナルによるミトコンドリア生合成の制御の例。抗酸化応答とミトコンドリア生合成を促進する転写因子 Nrf2 の少なくとも一部は、哺乳類細胞で Keap1 とミトコンドリア外膜タンパク質 PGAM5 の相互作用を介して、ミトコンドリア外膜に繫留されている (Monaghan and Whitmarsh, 2015)。活性酸素種はこの相互作用を乱し、Nrf2 の核内移行を促進する。Nrf2 は進的によく保存されているが、Keap1 は酵母や線虫で保存されておらず (DIOPT v5.3; DIOPT については Hu et al., 2011)、PGAM5 は酵母で保存されていない (DIOPT v5.3)。

**A**

器官	体積(%)	酸素消費 (%)	酸素消費/体積
脳	2	20	10.00
骨格筋	42	20	0.48
肝臓	2	17	8.50
心臓	0.4	11	27.50
消化管	2	10	5.00
腎臓	0.5	6	12.00
肺	0.9	4	4.44
総計	49.8	88	1.77

**B**

	細胞内過程	エネルギー消費(%)
ハウスキーピング	アクチン動態	< 1~50
	微小管動態	< 1~22
	タンパク質合成	~1.3
	脂質代謝	~20
	ミトコンドリアプロトン漏洩	~20
情報伝達	活動電位後の膜電位回復など	~60

図3 個体全体、あるいは脳・神経系におけるエネルギー消費

(A) ヒトにおいて大きなエネルギー消費を占める各器官の体積、及びその酸素消費速度 (Rolle and Brown, 1997 から改変して作製)。器官ごとのデータはそれぞれ異なる研究によって得られたものについて示している点に注意。肝臓や腎臓は、神経や筋肉を含まないが比較的エネルギー消費が高く、これらの組織もミトコンドリア病で顕著な病変がよく見られる。

(B) 脳における ATP 消費の、様々な細胞内活動ごとの内訳の推定 (Engl and Attwell, 2015; Engle et al., 2016 から改変して作製)。分子数や分子動態を考慮した計算上の推定値、及び実験結果からの推定値などに基づく。少なくとも一部の推定値の信頼性は今のところ十分ではなく、総計が 100% を大きく超えているのは部分的にはそのためである。特に、アクチン動態については Attwell らの成体脳内の分子数とその動態を考慮した計算による推定による 1% 以下 (Engl and Attwell, 2015) から、発生中のラット脳内における実験的な結果である 25 % (Engle et al., 2016)、ニワトリ毛様体神経細胞初代培養系を用いた実験的な推定である約 50% (Bernstein and Bamburg, 2003) まで渡っており、不明な点が多い。



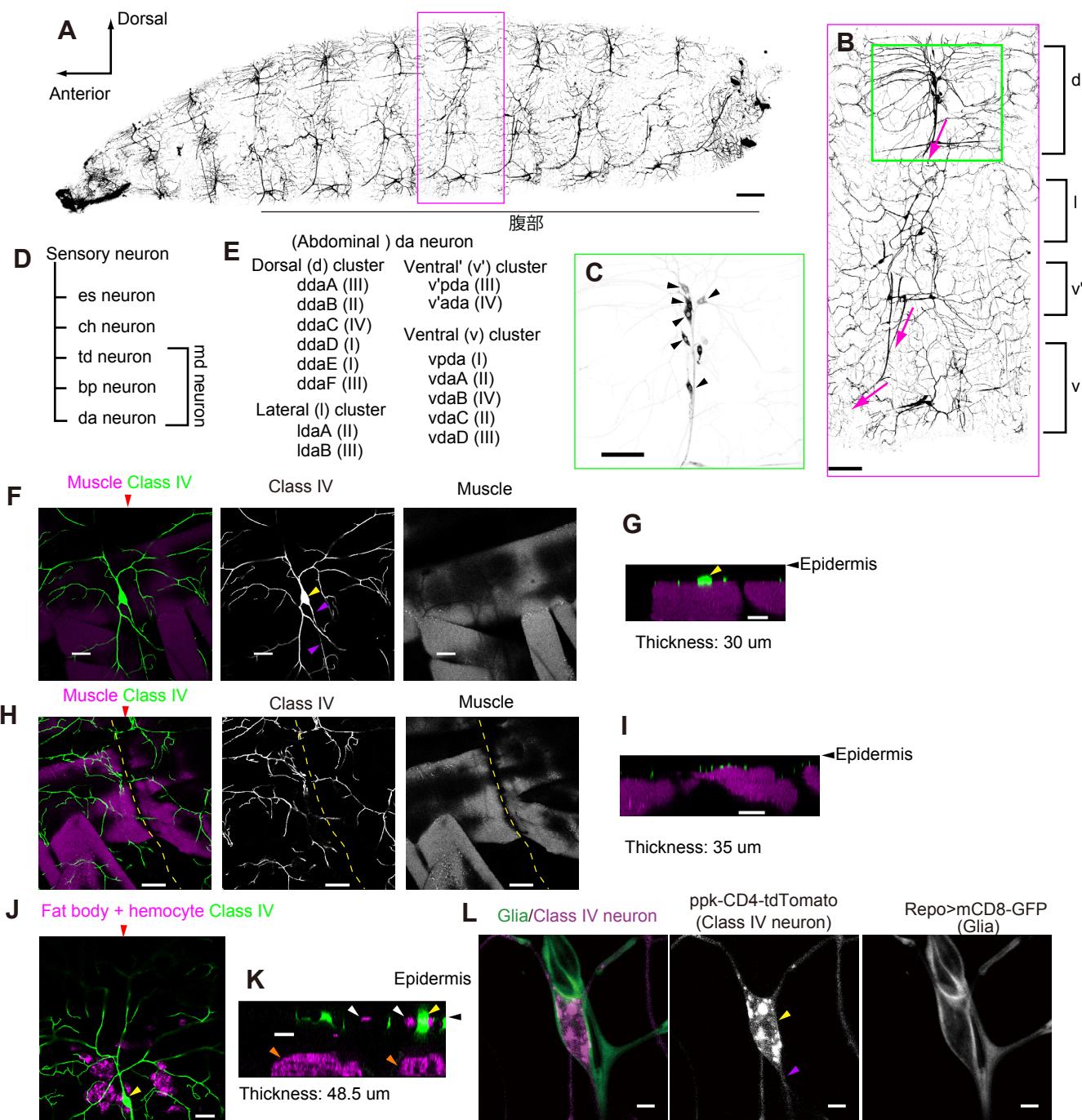


図 4. da ニューロンの構成、及び周辺組織の関係  
レジェンドは次頁に示した。

#### 図 4. da ニューロンの構成、及び周辺組織の関係

個体における画像データでは上が背側正中線方向、左が前方方向である。

(A-E) da ニューロンの構成。da ニューロンを含む md ニューロン (D) を膜結合型 GFP で標識した個体の画像 (A-C)。Aにおいて、幼虫の上端、下端がそれぞれほぼ背側正中線、腹側正中線に相当する。A のマゼンタ四角の領域を B で拡大し、B の緑四角の領域を C で拡大した。ショウジョウバエ末梢神経系は左右の半体節ごとに構造が繰り返されている (A)。昆虫の体は前方から頭部、胸部、腹部に分けられるが、本研究では腹部、特に腹部第 3-6 体節を対象にした。各体節にはほぼ決まった数の感覺神経が存在し (B)、腹部では半体節あたり 15 の da ニューロンが 4 つのクラスターの決まった位置に存在する (E; Orgogozo and Grueber, 2005)。B の右に背腹軸での大まかなクラスターの位置を示した。感覺神経の軸索はその体節内で腹側に投射しまとまって軸索束をつくり、腹部で前方に位置する中枢神経系に向かって投射する (B マゼンタ矢印)。C では da ニューロンの細胞体のみをやじりで示した。

(F-I) da ニューロンは筋肉と表皮の間の狭い細胞外マトリックスの領域に、細胞体が位置し樹状突起を進展している。da ニューロンのうち Class IV のみを GFP で、筋肉を Cherry で標識している。代表例として背側の da ニューロンの例を示した。黄色のやじり細胞体を、マゼンタのやじりは軸索を示している。F と H は共焦点レーザー顕微鏡画像の特定の一枚の平面を示す。G と I は、F と H で赤いやじりで示した位置の直線の Z 方向の切断面画像の一部である。細胞体と樹状突起は筋肉のほぼ上に位置している (G と I)。Class IV は突起を体節境界まで伸ばす (H; 黄色の破線は体節境界を示す)。体節境界では、前後の体節からの樹状突起が存在する (H 中央)。体節境界付近の遠位の樹状突起も筋肉の直上に存在する (I)。観察は三齢幼虫後期で行った。

(J と K) 細胞体の周囲には血球細胞が集まっている。da ニューロンのうち Class IV のみを GFP で、血球細胞 (hemocyte; 白のやじり) と脂肪体 (Fat body; 橙色のやじり) を myr-mRFP で標識している。J は一枚の平面を、K は J で赤いやじりで示した位置の直線上の Z 方向の切断面画像の一部である。観察は三齢幼虫後期で行った。

(G) 細胞体はグリア細胞によって包まれている。da ニューロンのうち Class IV のみを tdTomato で、グリアを GFP で標識した。da ニューロンの細胞体と軸索の全体、近位の樹状突起の一部は、グリアによって包まれ、体液中の環境から遮断されている (Yamamoto et al., 2006)。観察は三齢幼虫後期で行った。

スケールバーは 200  $\mu\text{m}$  (A)、100  $\mu\text{m}$  (B)、50 (C, F-K) あるいは 5  $\mu\text{m}$  (L) を示す。G, I, K では深さ方向のスケールはバーの長さに合わせていない。正確な遺伝子型は Table 2 にまとめた。

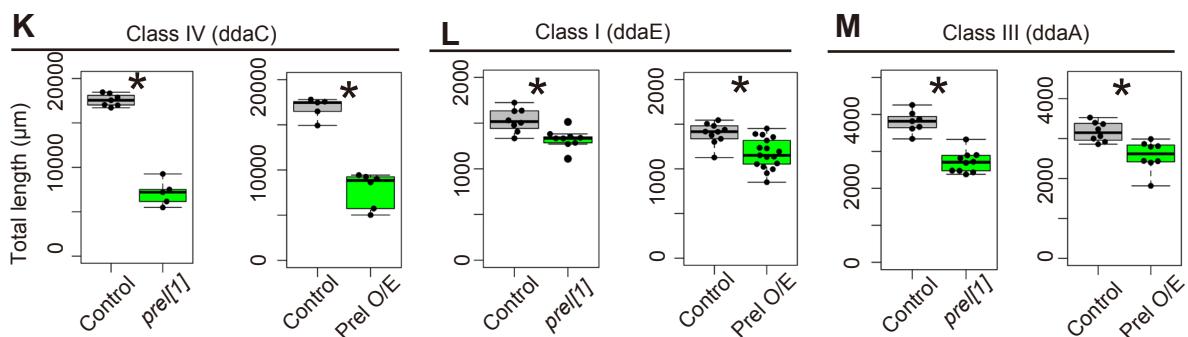
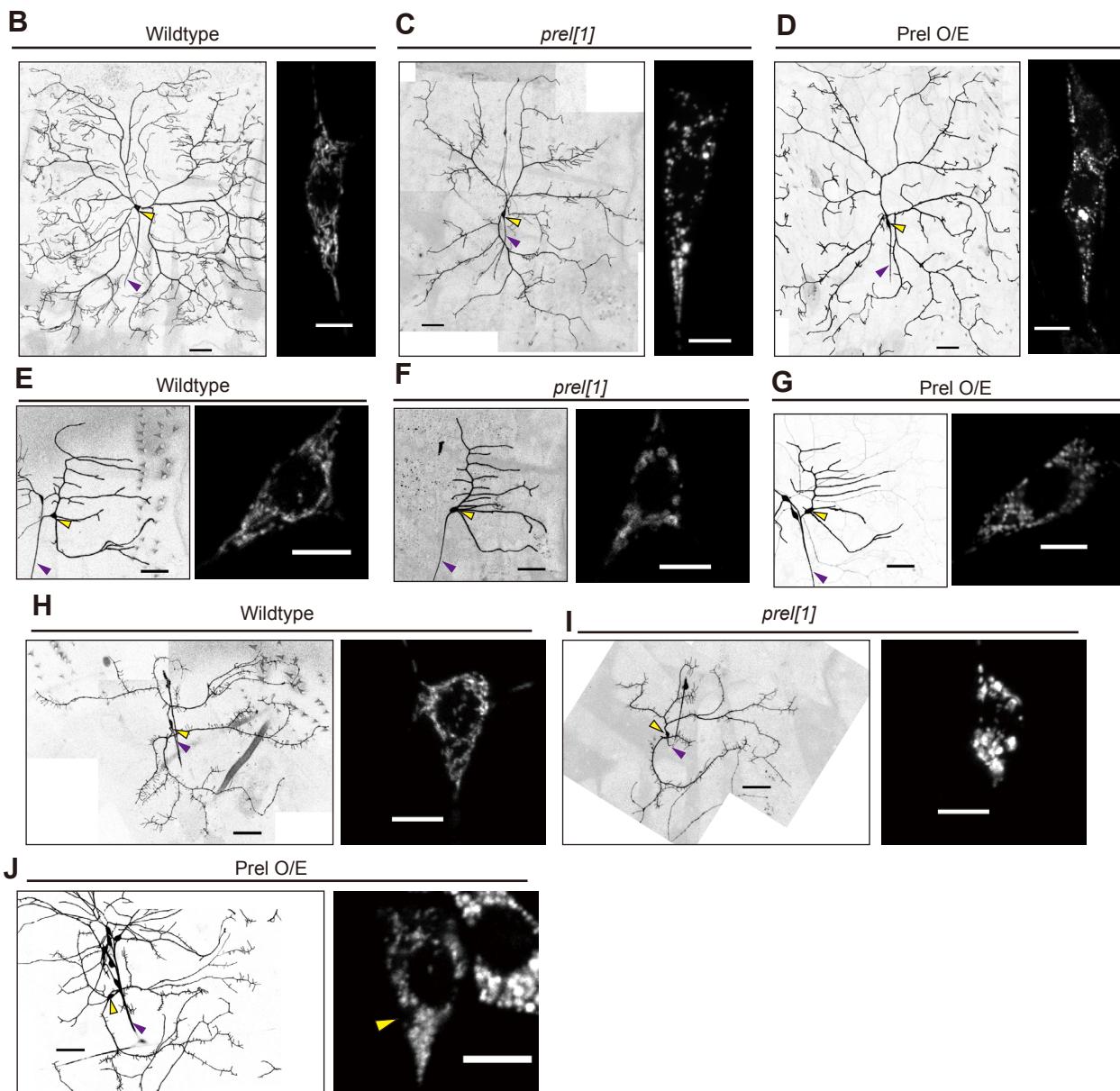
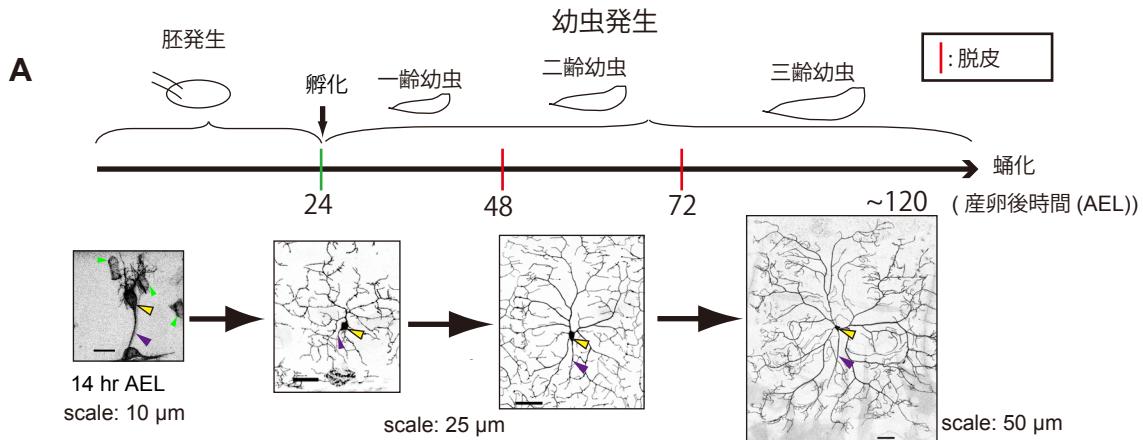


図 5. da ニューロンの成長と、*prel* 機能異常による da ニューロン樹状突起への影響  
レジエンドは次頁に示した

#### 図 5. da ニューロンの成長と、*prel* 機能異常による da ニューロン樹状突起への影響

(A) da ニューロンは幼虫の成長とともに拡大、複雑化する。da ニューロンの樹状突起の進展は胚期の中頃である産卵後約 14 時間 (14 hr After Egg Laying [AEL]) から始まり、幼虫の体サイズの成長に伴って持続する。一齢幼虫は二度の脱皮 (ecdysis) により、二齢、三齢と発生ステージを進め、さらに蛹期に進行する。以後、特に記さない限り、樹状突起形態の観察は成熟した三齢幼虫後期において行った。黄色のやじりは細胞体を、紫のやじりは軸索を指す。A 左の 14 hr AEL 画像の緑のやじりは、da ニューロンではなく、表皮細胞で発現したマーカー由来のシグナルを示す。

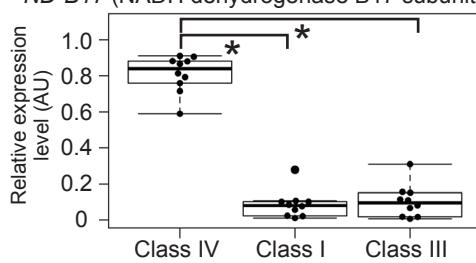
(B-J) 野生型あるいは *prel* 機能異常を持つ da ニューロンにおける、代表的な樹状突起と細胞体におけるミトコンドリアの形態。樹状突起は膜結合型 GFP、ミトコンドリアはミトコンドリア局在シグナルが付加された GFP (mitoGFP) を用いて可視化した。Class IV (B-D)、Class I (E-G)、Class III (H-J) のいずれにおいても *prel* 機能欠失変異 (C, F, I) と過剰発現 (Overexpression: O/E, D, G, J) によってミトコンドリア形態が断片化するが、樹状突起形態の異常は Class IV において特に顕著である。

Class III における過剰発現には、Class I やその他の末梢神経系の細胞も標識する *Gal4[c161]* を用いた (J)。J では Class III の細胞体のみを黄色のやじりで示した。

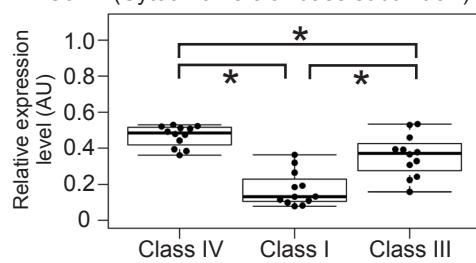
(K-M) 各 Class における、野生型、*prel* 機能欠失、PreI 過剰発現ニューロンの総樹状突起長の定量化。グラフ内の点は一つのニューロンの樹状突起長を示し、箱ひげ図の箱は中央値と四分位範囲数 (IQR)、ヒゲの上端は第 1 四分位数 +1.5\*IQR の中の最大値、ヒゲの下端は第 3 四分位数 -1.5\*IQR の中の最小値を示す。アスタリスクは  $p < .05$  を示す。平均値、95% 信頼区間、サンプル数、使用した検定、正確な  $p$  値は Table 1 にまとめた。スケールは樹状突起の画像では  $50 \mu\text{m}$ 、ミトコンドリアの画像では  $5 \mu\text{m}$  を示す。

B-M の結果は既に先行研究 (Tsubouchi et al., 2009) で報告されているものを、私自身が再現を試みたものである。

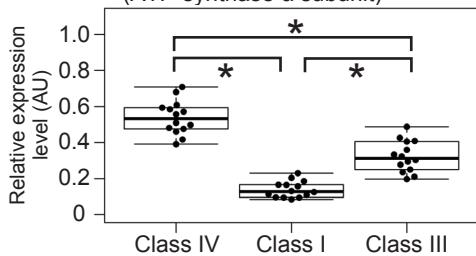
**A** NP3275: a Gal4 enhancer trap line of *ND-B17* (NADH dehydrogenase B17 subunit)



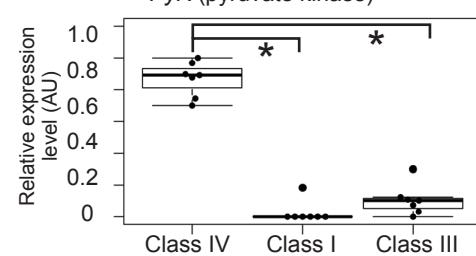
**B** NP2344: a Gal4 enhancer trap line of *CoVB* (Cytochrome c oxidase subunit 5B)



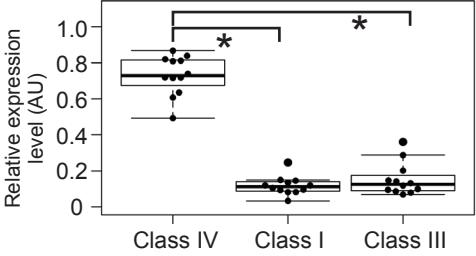
**C** NP2718: a Gal4 enhancer trap line of *b/w* (ATP-synthase  $\alpha$  subunit)



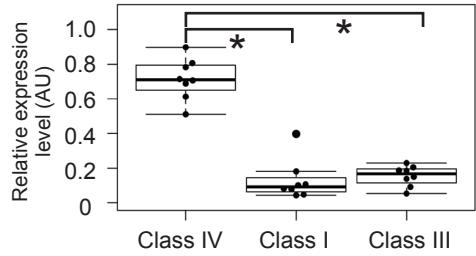
**D** NP2635: a Gal4 enhancer trap line of *PyK* (pyruvate kinase)



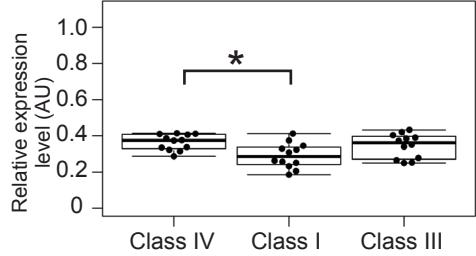
**E** NP0607: a Gal4 enhancer trap line of *Nc73EF* ( $\alpha$ -ketoglutarate dehydrogenase)



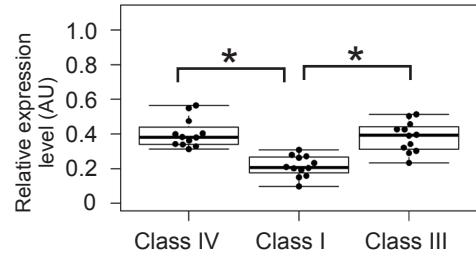
**F** NP5107: a Gal4 enhancer trap line of *kdn* (citrate synthase)



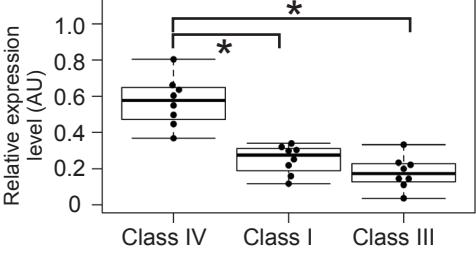
**G** NP6120: a Gal4 enhancer trap line of *HexA* (Hexokinase A)



**H** NP3500: a Gal4 enhancer trap line of *GAPDH2*



**I** NP2353: a Gal4 enhancer trap line of *Eno* (Enolase)



**J** *Ubi-Gal4*

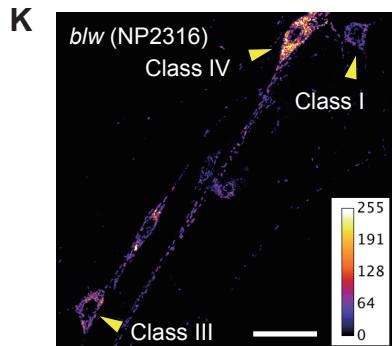
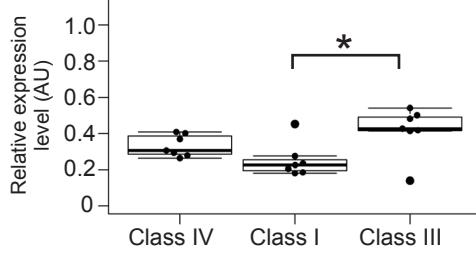


図 6. Gal4 系統を用いた代謝関連遺伝子の da ニューロンでの発現解析  
レジェンドは次頁に示した。

図 6. Gal4 系統を用いた代謝関連遺伝子の da ニューロンでの発現解析

(A-F) ミトコンドリア関連遺伝子 NP 系統の発現レベル。ETC 構成要素 (A-C)、TCA 回路構成要素 (D-F) とともに Class IV で発現が高い傾向があった。*ND-B17*、*CoVB*、*blw* にはパラログは存在しない (KEGG pathway, Oxidative phosphorylation - *Drosophila melanogaster*; KEGG については Kanehisa and Goto., 2000)。*Pyk* には 5 つのパラログ (*CG7362*、*CG11249*、*CG12229*、*CG2964*、*CG7069*; KEG Enzyme: 2.7.1.40) が存在するが、FlyAtlas-RNA データベースのデータによると、*Pyk* が発生を通じて比較的強く全身で発現しているのに対し、*CG7362* は全身で発現しているがレベルは非常に低く、残りの 4 つのパラログは雄成虫の精巣で強く、その他の組織では成虫原基や脂肪体で弱く発現しているようだった (FlyAtlas; FlyAtlas については Chintapalli et al., 2007)。*Nc73EF* にも 2 つのパラログが存在したが (*CG1544*、*CG33791*; KEGG Enzyme 1.2.4.2)、*CG1544* は *Nc73EF* に比べて全身で発現量が低く、*CG33791* は雄成虫の精巣特異的に発現が強いようだった (FlyAtlas)。*kdn* にも 1 つパラログが存在したが (*CG14740*; KEGG Enzyme 2.3.3.1)、*CG14740* は雄成虫の精巣特異的に発現が強いようだった (FlyAtlas)。

(G-I) 解糖系遺伝子 NP 系統の発現レベル。ハエには 4 つの Hexokinase (*HexA*、*HexC*、*Hext1*、*Hext2*; KEGG Enzyme: 2.7.1.1) がコードされているが、*HexC* は成虫で強い発現を示し、幼虫期では比較的発現が弱く、中枢神経系を含むほとんどの組織で発現が検出されていない (FlyAtlas)。また、*Hext1* と *Hext2* は成虫の精巣特異的に発現しており他の組織からはほとんど検出されない (FlyAtlas)。ハエには GAPDH が 3 つ (*GAPDH1*、*GAPDH2* と *CG9010*; KEGG Enzyme: 1.2.1.12) コードされており、*CG9010* は成虫の精巣特異的に発現しているが、*GAPDH1* と *GAPDH2* はいずれも比較的広い組織で強く発現しているようだった (FlyAtlas)。Enolase にはパラログは存在しないようだった (KEGG Enzyme: 4.2.1.11)。

(J) Ubiquitin promoter によって Gal4 を発現する *Ubi-Gal4* の発現レベル。ここで示した結果に加え、これら遺伝子の他の NP 系統も観察したが、*blw* (*NP2316*) と *NP2527*)、*Pyk* (*NP2224*)、*Nc73EF* (*NP6535*)、*HexA* (*NP0735*)、示した結果とそれ類似した結果であった。

(K) *blw* エンハンサートラップライン *NP2316* による da ニューロンでの UAS の発現量を示す代表的擬似色画像。スケールバーは 50  $\mu\text{m}$  を示す。

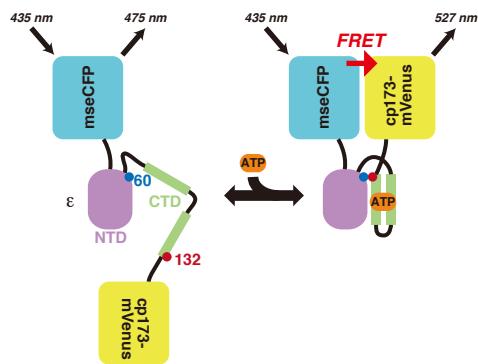
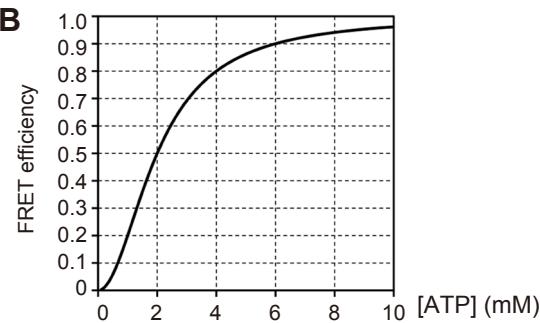
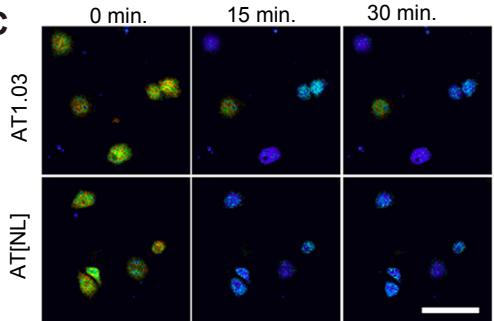
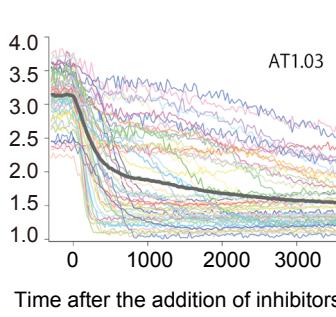
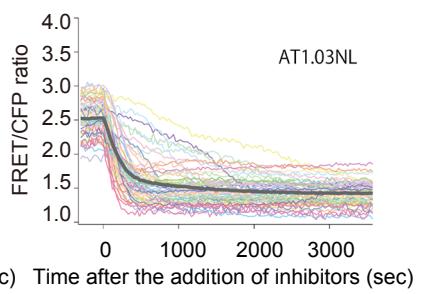
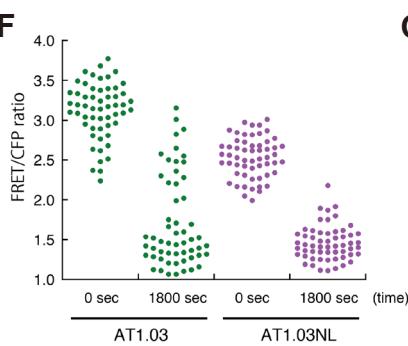
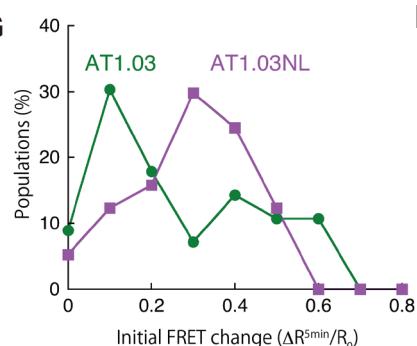
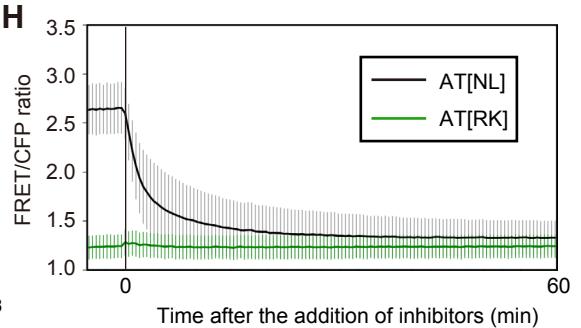
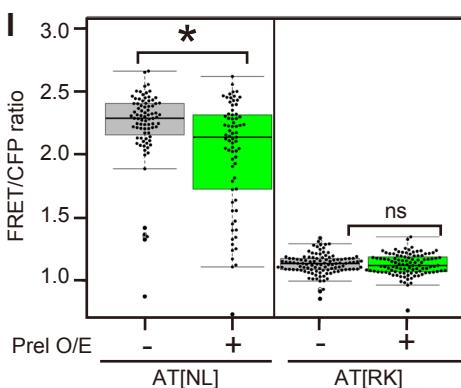
**A****B****C****D****E****F****G****H****I**

図7. 低温度型 ATP センサー ATeam のショウジョウバエ培養細胞における性能評価  
レジェンドは次頁に示した。

#### 図7. 低温度型 ATP センサー ATeam のショウジョウバエ培養細胞における性能評価

(A) Ateam1.03[NL] (AT[NL]) の模式図 (Tsuyama et al., 2013)。図は今村博士が作成した。 $\epsilon$  はその ATP 結合によって、N 末端ドメイン (NTD) と C 末端ドメイン (CTD) が相互作用した閉じた構造をとり、その結果 CFP から Venus への FRET 効率が上昇する。AT[NL] の  $\epsilon$  は、閉じた構造をとった際の相互作用を不安定化するアミノ酸変異 (M60L/K132L) が加えられており、ATP 結合状態の安定性が低下し、Kd が上昇している。

(B) ATP 濃度変化と AT[NL] FRET 効率変化の関係。AT[NL] は 25°C での ATP に対する解離定数 Kd = 約 2 mM を持ち、ヒル定数は約 2 である (これらの数値は今村博士の実験・測定によって決定された)。これらの数値から予想される FRET 効率をプロットした。0.5 mM から 4 mM あたりで急峻な FRET 効率の変化が起こり、ATP 変化検出に適していると予想された。

(C-G) AT[NL] は AT1.03 よりも、S2 細胞内において感度良く ATP 変化を検出する (Tsuyama et al., 2013)。実験と定量化を私が、解析とグラフの作製は今村博士が行った。AT1.03、あるいは AT[NL] を一過的に発現する S2 細胞内 FRET シグナルに対する ATP 産生阻害の効果を示す、代表的な FRET シグナル画像 (C) と各細胞における FRET シグナル変化の経時変化 (D と E)。阻害剤として 20  $\mu$ M oligomycin (OM; ATP 合成酵素阻害剤) と 50 mM 2-deoxyglucose (2DG; 解糖系阻害剤) を用いた。D と E において、灰色のラインは平均値を、カラーインは各 1 細胞における FRET シグナルを示す。AT[NL] では、ほとんどの細胞で薬剤処理後比較的早く FRET シグナルが低下するが、AT1.03 では薬剤処理後 30 分後でも高いシグナルの細胞がしばしば見られた (C-F)。薬剤処理前の FRET シグナルに対する、処理後 5 分後におけるシグナル変化率の定量 (G)。AT[NL] は AT1.03 に比べて、シグナル低下率が大きい。スケールバーは 5  $\mu$ m を示す。

(H) AT[NL] あるいは AT[RK] を発現させた S2 細胞の FRET シグナルへの、ATP 産生阻害の効果。阻害剤として 20  $\mu$ M OM と 50 mM 2DG を用いた。AT[RK] のシグナルは阻害剤処理によって変化しなかった。平均値  $\pm$  SD。n = 31 (AT[NL]), 27 (AT[RK])。

(K) Prel 過剰発現は S2 細胞内 AT[NL] FRET シグナルを低下させる。Prel と、AT[NL] あるいは AT[RK] を共発現した細胞の FRET シグナルの定量化の結果を示した。AT[NL] ではシグナルが有意に低下し、AT[RK] では低下しなかった。検定は t 検定を用いた。

これらの結果は少なくとも 3 度以上独立した実験を行い、類似した結果を得ている。

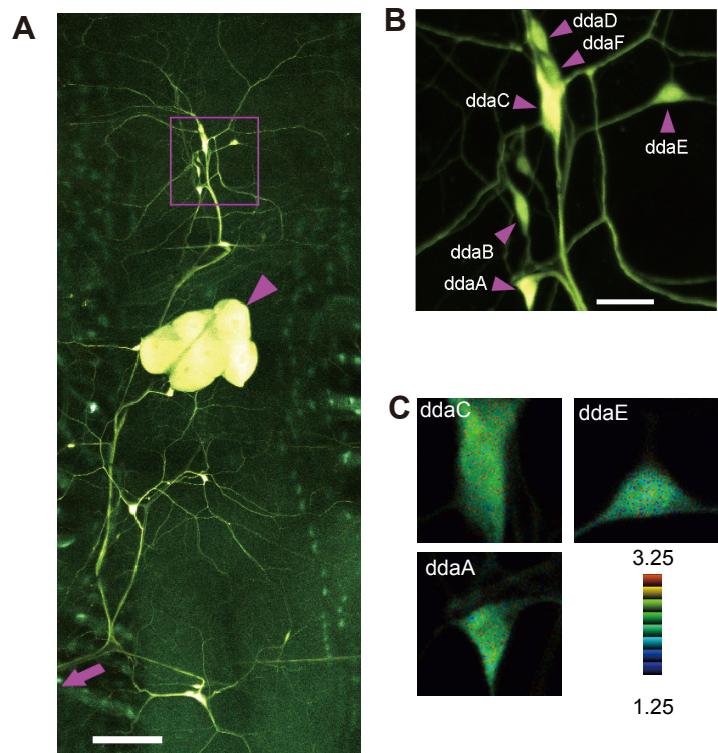


図 8. ショウジョウバエにおける AT[NL] の発現

(A と B) AT[NL] を da ニューロン、bipolar ニューロン、エノサイト (oenocyte) などで発現させた個体の半体節の蛍光画像。観察は解剖した個体で行った。A のマゼンタのやじりはエノサイト、矢印は軸索束が中枢への伸長する方向を示している。A の四角で囲った領域を B で拡大した。(C) da ニューロン細胞体の FRET シグナルの疑似色画像。スケールバーは 100  $\mu\text{m}$  (A)、20  $\mu\text{m}$  (B) を示す。

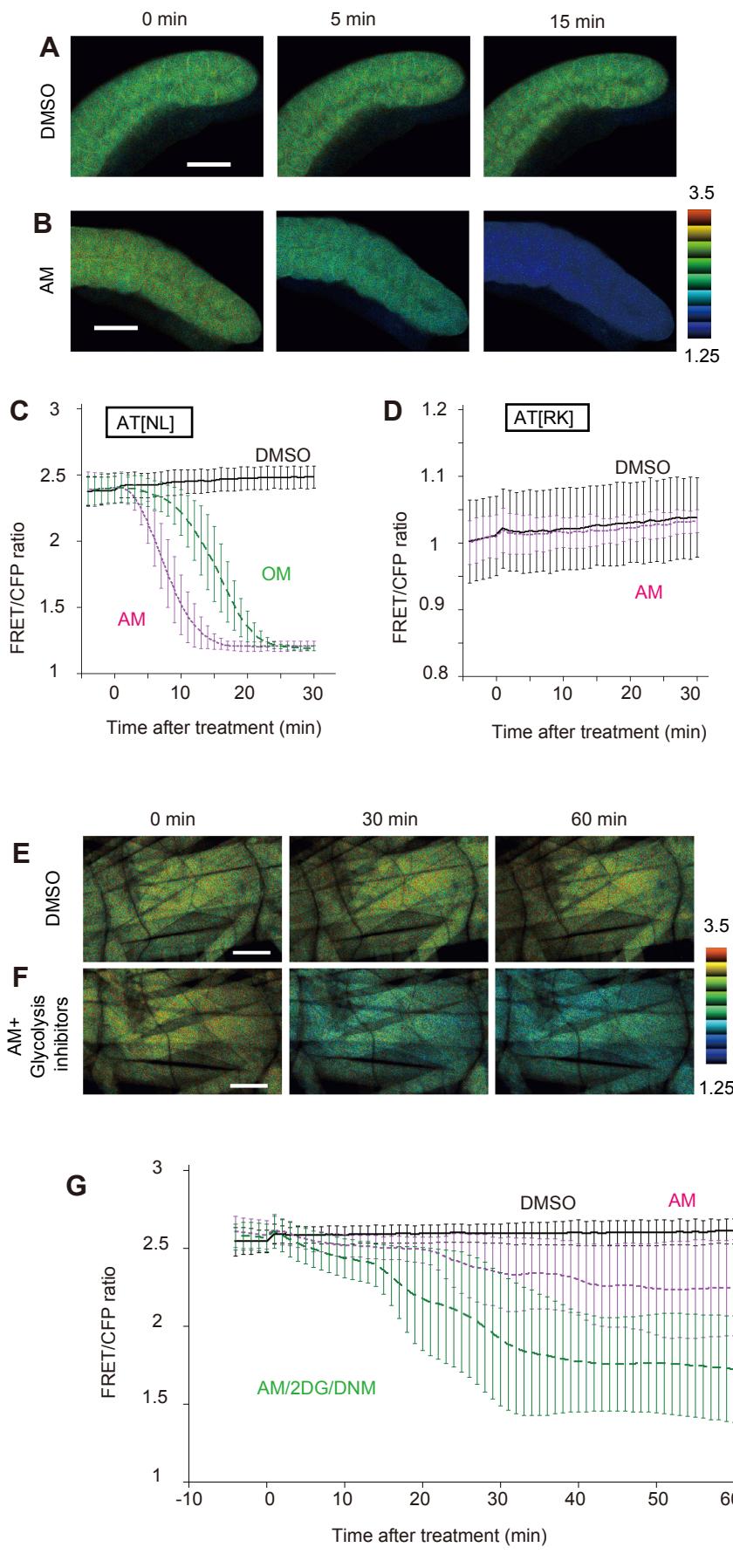


図 9. AT[NL] は個体内での ATP 低下を検知できる

(A-C) 培養下での唾液腺細胞内 ATP イメージング。代表的な FRET シグナルの疑似色画像 (A と B)、とシグナル定量化 (C と D)。AT[NL] を発現させた個体から取り出した唾液腺における FRET シグナルは、 $20 \mu\text{M}$  Antimycin (AM; ミトコンドリア Complex III 阻害剤) あるいは  $50 \mu\text{M}$  OM 処理によって迅速に低下した (B と C)。一方、AT[RK] の FRET シグナルは AM 処理で低下しなかった (D)。n = 7 (AT[NL]/DMSO), 6 (AT[NL]/AM), 6 (AT[NL]/OM), 8 (AT[RK]/DMSO), 7 (AT[RK]/AM)。

(E-H) 解剖個体の体壁筋における ATP イメージング。代表的な FRET シグナルの疑似色画像 (E と F)、とシグナル定量化 (G と H)。ATP 産生阻害のため、 $100 \mu\text{M}$  AM、 $50 \text{ mM}$  2DG、 $100 \mu\text{M}$  Deoxyxojirimycin (DNM; トレハラーゼを含むグリコシダーゼ阻害剤)、 $100 \mu\text{M}$  OM、 $10 \text{ mM}$  KCN (Complex IV 阻害剤) を用いた。処理時間一時間のタイムコース (G; n = 10 (DMSO), 9 (AM), and 7 (AM/2DG/DNM)) と処理時間二時間後での FRET シグナルの定量化 (H)。ミトコンドリアの阻害だけでは、長時間の処理でも FRET シグナルの低下は小さかった (G と H)。しかし、解糖系阻害剤を同時に用いることで、シグナルは大きく低下した (G と H の AM/2DG/DNM)。H で用いた検定は ANOVA とそれに続く post-hoc Dunnett's test (vs. control) である。

経時観察データでは平均値  $\pm$  SD を示した。スケールバーは  $100 \mu\text{m}$  を示す。

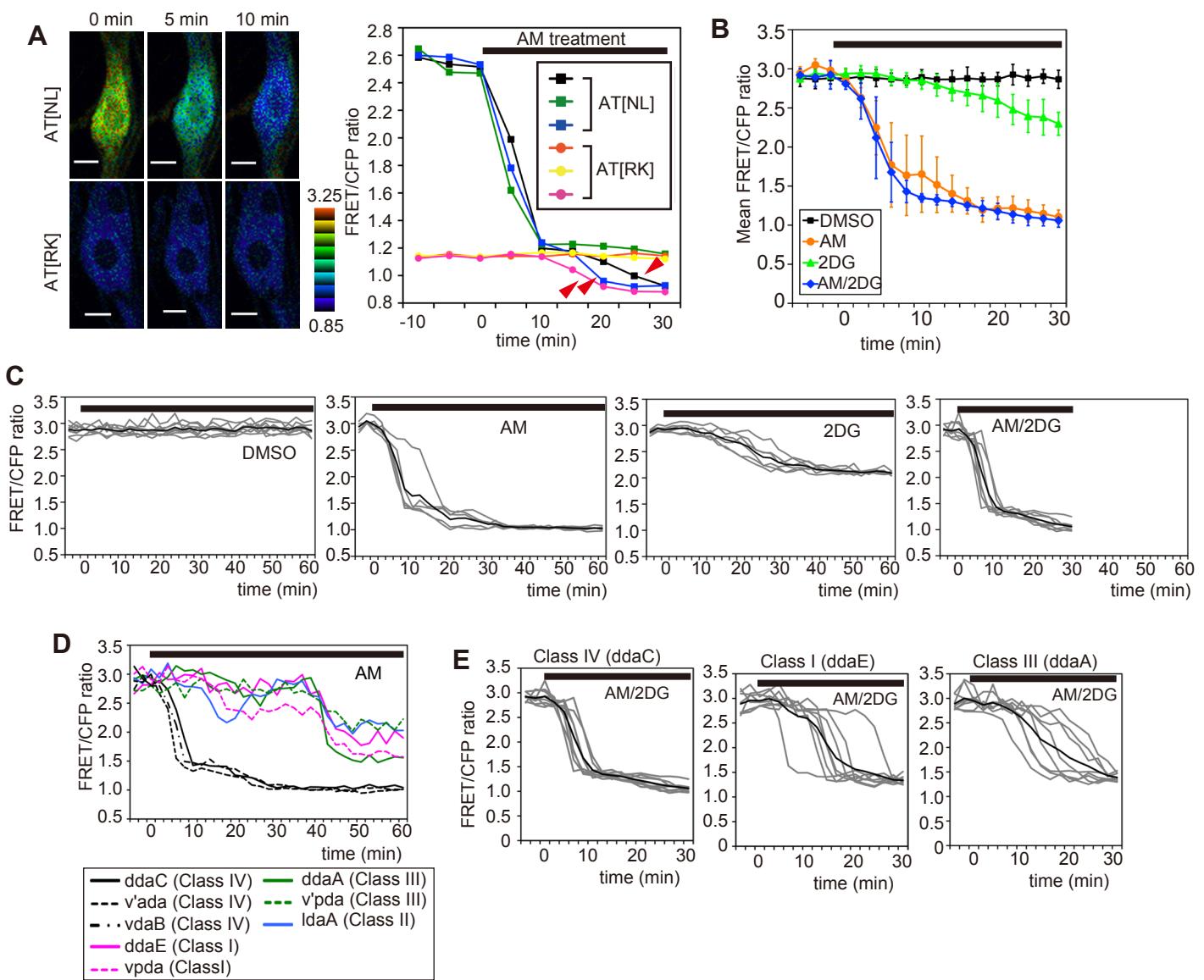


図 10. AT[NL] は Class IV 内 ATP 低下を迅速に検知する

(A-C) 解剖個体 Class IV 細胞体における FRET シグナルの経時観察。ミトコンドリア阻害剤  $100 \mu\text{M}$  AM 処理による ATeam FRET シグナルへの効果を示す代表的な FRET シグナル画像 (A 左) とプロット (A 右)。A 右では 1 細胞ごとの FRET シグナルをプロットしている。A 右とこれ以後の FRET シグナルの経時変化グラフにおいて、上部の太い黒線は薬剤処理を行った期間をしめす。AM は AT[NL] のシグナルを迅速 (5 分以内) に低下させるが、同じ処理時間において AT[RK] のシグナルに影響しない。赤のやじりは AM 処理依存的な、阻害剤非存在下での AT[RK] FRET シグナルよりも低いシグナルへの低下を示す。これは ATP に結合しない AT[RK] においても観測されたことから、ATP 非依存的と推測される。このような変化を示す Class IV では、樹状突起の形態変化 (dendritic varicosity の形成) やプローブの核への異常な蓄積が見られることから、細胞内の恒常性が著しく乱れたことによって、ATP 非依存的な変化が誘導されたのではないかと推測している。Class IV 細胞体 AT[NL] FRET シグナルへの解糖系阻害剤 ( $50 \text{ mM}$  2DG) とミトコンドリアへの阻害剤の効果 (B と C)。B は平均値  $\pm$  SD を、C では平均値 (黒のライン) と各条件での 1 細胞ごとのシグナル (灰色のライン) をプロットした。n = 8 (DMSO), 5 (AM), 6 (2DG), and 12 (AM/2DG)。

(D) ある同一半節の da ニューロン内の AT[NL] FRET シグナルへの AM 処理の効果。半節に存在する 3 つの Class IV ニューロン全て (ddAC, v'ada, vdaB) で AM 処理により迅速なシグナル変化が検出された。

(E) ATP 産生阻害 (AM と 2DG によるミトコンドリアと解糖系の同時阻害) の AT[NL] FRET シグナルへの効果のクラス間での違い。平均値 (黒のライン) と各条件での 1 細胞ごとのシグナル (灰色のライン) をプロットした。Class I と Class III では FRET シグナルの低下にラグがみられた。Class IV の結果は C で示したデータと同一であり、その Class IV と同一体節の Class I と III の結果を示した。n = 12.

スケールは  $5 \mu\text{m}$  を示す。



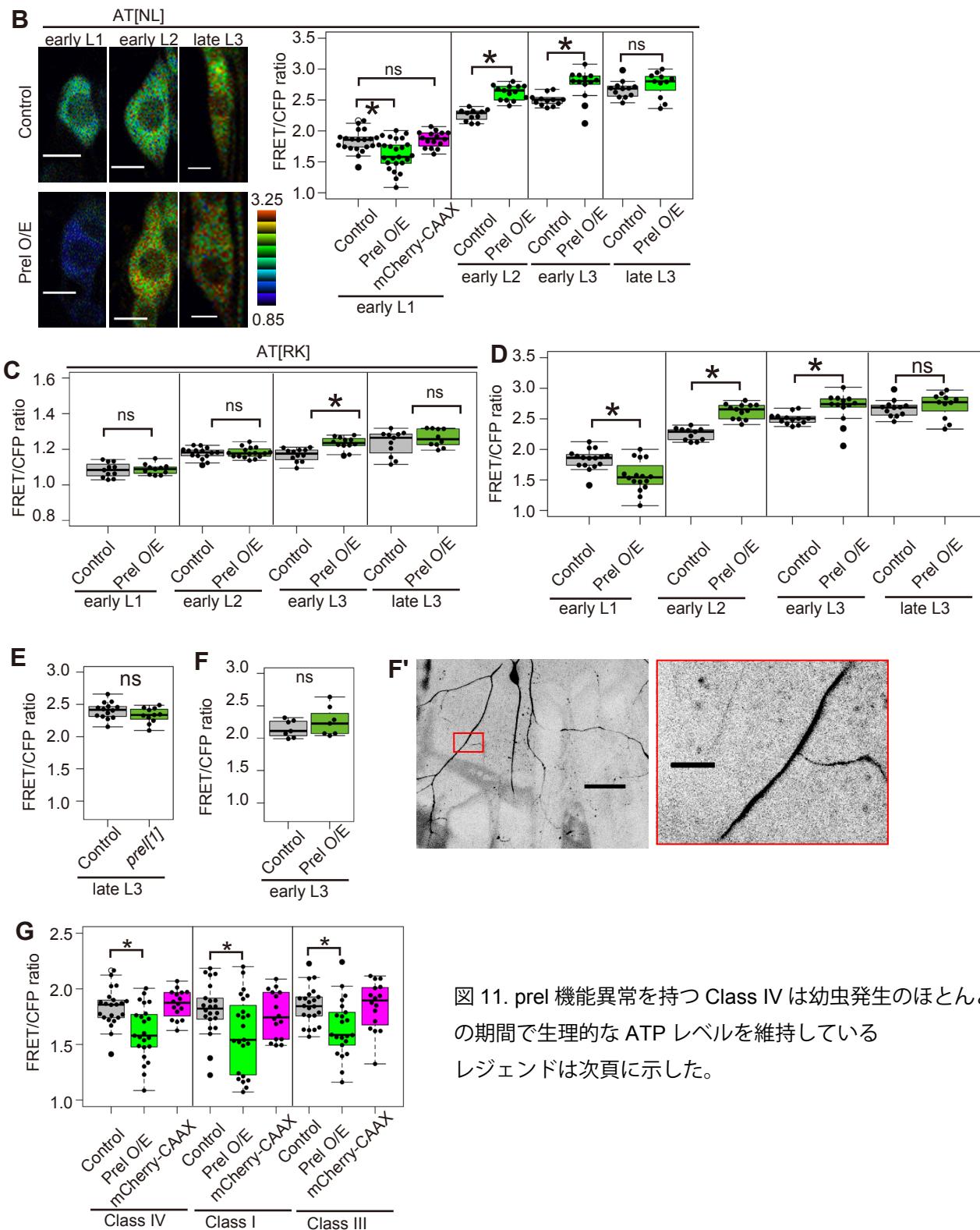
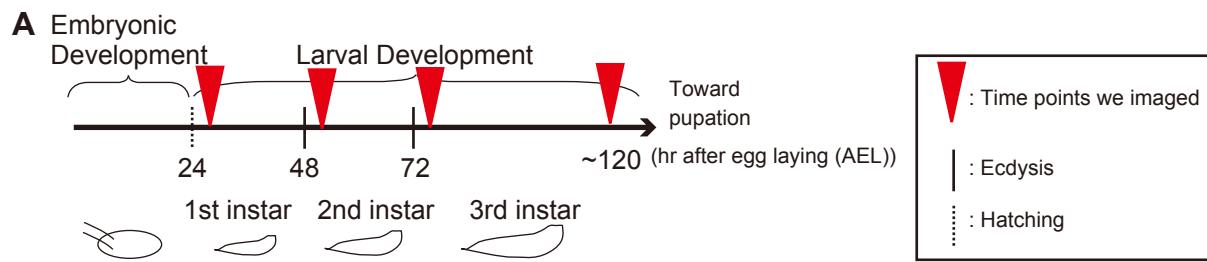


図 11. *prel* 機能異常を持つ Class IV は幼虫発生のほとんどの期間で生理的な ATP レベルを維持している  
レジエンドは次頁に示した。

図 11. *prel* 機能異常を持つ Class IV は幼虫発生のほとんどの期間で生理的な ATP レベルを維持している

- (A) ショウジョウバエの発生と、ATeam FRET シグナルを観察したタイムポイント。一齢初期 (22–26 hr AEL)、二齢初期 (46–50 hr AEL)、三齢初期 (72–76 hr AEL)、三齢後期 (約 120 hr AEL) で観察した。FRET プローブと Prel の発現には発現開始タイミングの早い *Gal4<sup>109(2)</sup>80* を利用した。*Gal4<sup>109(2)</sup>80* は全ての da ニューロンで Gal4 を発現し、その発現は胚期の比較的早いタイミングに開始される。GFP を発現させた場合、樹状突起伸長前の 12 hr AEL には既にイメージング可能なレベルの GFP 発現を誘導できる (Gao et al., 1999)。
- (B) AT[NL] FRET シグナルへの Prel 過剰発現の効果。代表的なシグナル画像 (B 左) と定量化の結果 (B 右)。スケールバーは 5  $\mu\text{m}$  を示す。mCherry-CAAX 共発現は、UAS コピー数の増加によって UAS-AT[NL] 発現量と発現タイミングに影響する可能性があり、それが FRET シグナルを変化させるかどうか調べるためにコントロールとして観察したが、野生型と差は見られなかった。検定には ANOVA とそれに続く post-hoc Dunnett's test (vs. control; early L1) あるいは t 検定を用いた。
- (C) AT[RK] FRET シグナルへの Prel 過剰発現の効果の測定。検定には t 検定を用いた。
- (D) Prel 過剰発現による AT[NL] FRET シグナルへの影響は、AT[RK] の結果 (C) をを利用して補正してもほとんどかわらない。各条件において、野生型と Prel 過剰発現型における、それぞれの条件の AT[RK] FRET シグナル平均値の変化を、B の各細胞の FRET シグナル値から差し引くことで、ATP 結合非依存的なシグナル変化を補正した。検定は t 検定を用いた。
- (E) 野生型と *prel* 変異型 Class IV の細胞体における AT[NL] FRET シグナルには差がなかった。検定は t 検定を用いた。
- (F) 野生型と Prel 過剰発現 Class IV の樹状突起内における AT[NL] FRET シグナルには差がなかった。観察は三齢初期で行った。測定は、樹状突起に沿って細胞体から 100  $\mu\text{m}$  以上離れた領域で行った。F' は野生型 Class IV の AT[NL] の Venus シグナルの蛍光画像であり、定量化した突起の位置の例を示している (右は左の赤四角の拡大)。スケールバーは 50  $\mu\text{m}$  (左) あるいは 10  $\mu\text{m}$  (右) を示す。検定は t 検定を用いた。
- (G) 全てのクラスにおける一齢初期の細胞体内 AT[NL] FRET シグナルの測定。全ての Class で類似した FRET シグナルの低下が観察された。Class IV については、(B) と同じデータを比較のため再び示した。検定には ANOVA とそれに続く post-hoc Dunnett's test (vs. control) を用いた。

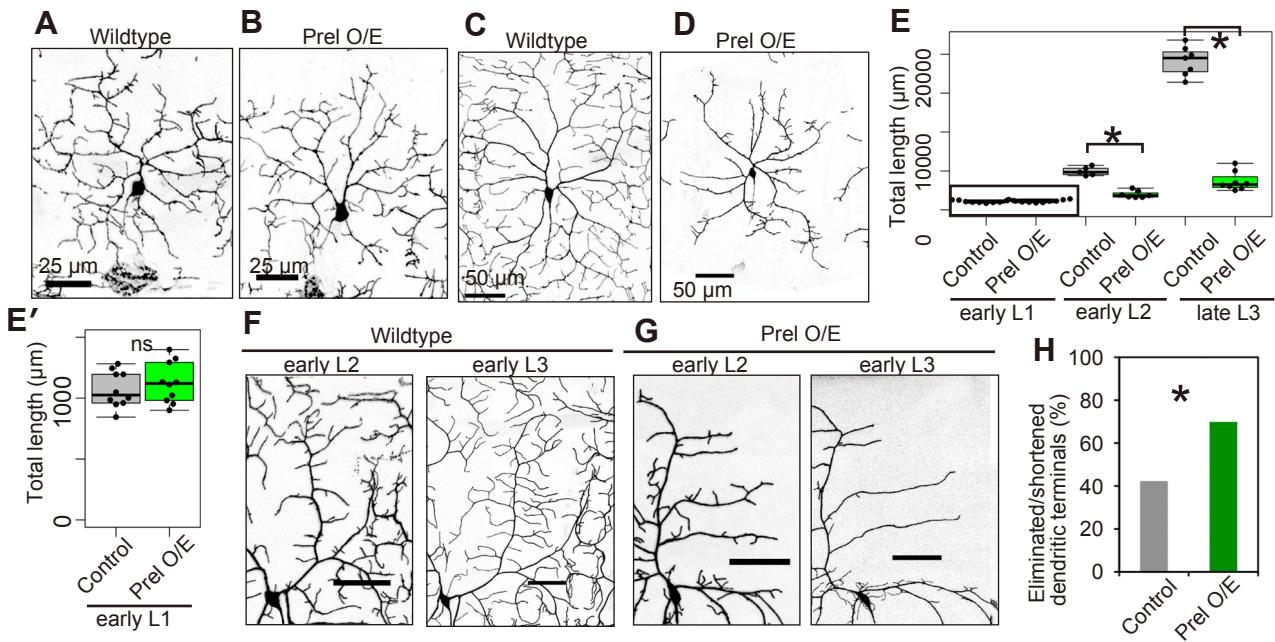


図 12. Class IV 樹状突起形態の乱れは ATP レベルの低下タイミングと一致しない

(A-E) 野生型と Prel 過剰発現 Class IV における、幼虫発生に伴う樹状突起の発達。代表的な画像 (A-D) とその定量化 (E と E')。E の四角で囲んだ領域を、E' で拡大して示した。UAS-Prel-3HA の強制発現には図 11 で示した実験と同様に、胚期から強い発現を誘導する *Gal4<sup>109</sup>(2)<sup>80</sup>* を利用した。Class IV 樹状突起の標識は Gal4/UAS ではなく、Class IV 特異的プロモーターから直接膜結合型 GFP を発現させることで行った。一齢初期 (22–26 hr AEL) では突起の異常はまだ観察されなかつた (A, B, E, と E'が、二齢初期 (46–50 hr AEL) 以後で顕著な樹状突起長の低下が見られた (C-E)。(F-H) Prel 過剰発現 Class IV は二齢初期から三齢初期にかけて、樹状突起不安定性を示す。同一 Class IV 樹状突起の経時観察の代表的画像 (F: 野生型と G: Prel 過剰発現)。二齢初期に既に存在した樹状突起末端のうち、観察されなくなった、あるいは短くなった末端の比率の定量化 (H; 野生型: n = 4 細胞から 806 末端、Prel 過剰発現: n = 6 細胞から 701 末端)。検定は G 検定を用いた。スケールバーは 50 μm を示す。

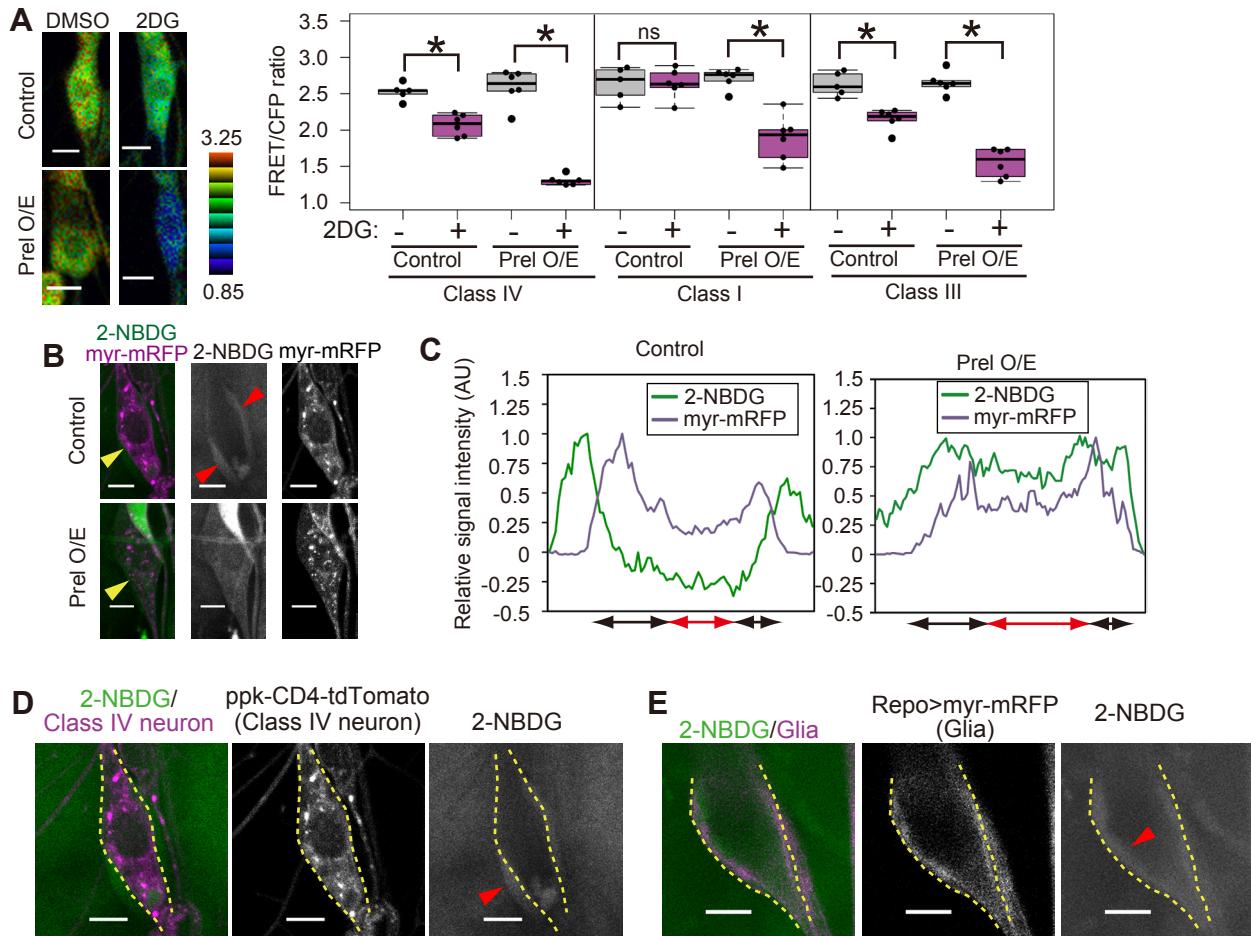


図 13. Prel 過剰発現 da ニューロンは、解糖系による ATP 産生が上昇している

(A) Prel 過剰発現 da ニューロンの細胞体内 ATP は解糖系阻害によって顕著に低下した。2DG (50 mM、30 分間) 处理を行った、野生型、及び Prel 過剰発現 Class IV 細胞体における AT[NL] FRET シグナル代表的な FRET シグナル画像 (A 左) とその定量化 (A 右)。

(B-E) 蛍光標識グルコースアナログ (2-NBDG) を用いた、Class IV による糖取り込みの可視化。Class IV (B) あるいはグリア細胞 (E) の細胞膜は myr-mRFP で標識させ、解剖後 2-NBDG を取り込ませた。Class IV 近傍の代表的画像 (B) と、細胞体を横切る直線でのシグナルの定量化 (C)。B の画像は特徴を見やすくするために 2-NBDG シグナル強度を非線形に調節している。C の定量結果はこのような調節を行っていない画像の数値を示している。黄色のやじりは Class IV 細胞体を、赤のやじりは野生型で 2-NBDG が蓄積した領域を指す。C の下の両矢印は細胞質領域 (黒) と核領域 (赤) を示す。野生型 Class IV では取り込まれた 2-NBDG のピークは細胞体の周囲に観察された (B 上と C 左)。この細胞体の外側のシグナルの蓄積はグリア細胞に取り込まれた 2-NBDG であるようだ (D と E)。D と E の黄色破線は Class IV あるいはグリアの細胞膜の辺縁を示す。グリアの細胞膜マーカーよりも内側で 2-NBDG が観察された (E)。Prel 過剰発現 Class IV ではこのような細胞体近傍の細胞外領域での顕著な蓄積は見られず、細胞体全体が標識されているようだった (B 下と C 右)。野生型と Prel 過剰発現 Class IV の染色は 6 個体 6 細胞で行って、類似したパターンを確認した。

スケールバーは 5  $\mu\text{m}$  を示す。

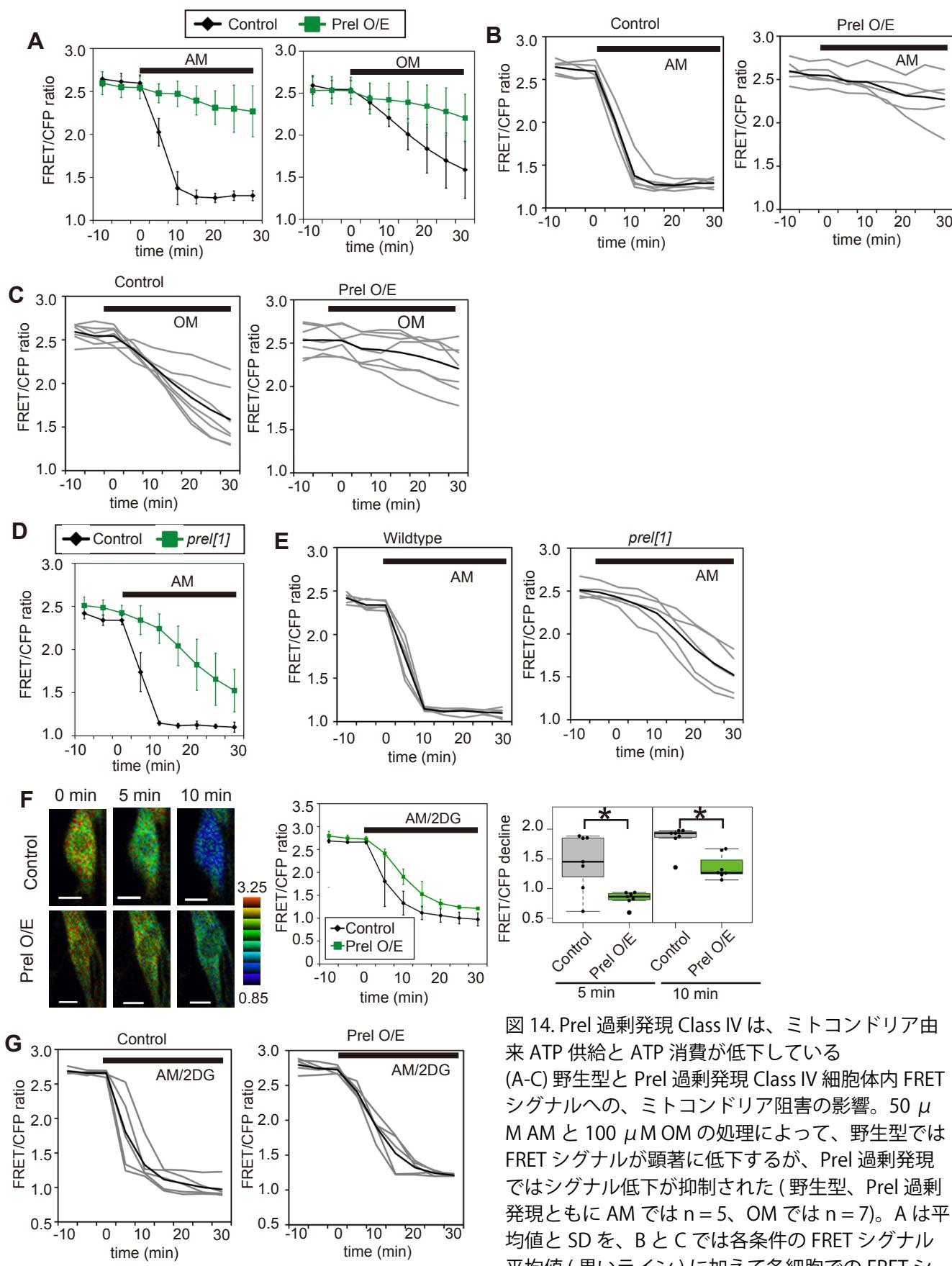


図 14. Prel 過剰発現 Class IV は、ミトコンドリア由来 ATP 供給と ATP 消費が低下している  
(A-C) 野生型と Prel 過剰発現 Class IV 細胞体内 FRET シグナルへの、ミトコンドリア阻害の影響。50  $\mu$  M AM と 100  $\mu$  M OM の処理によって、野生型では FRET シグナルが顕著に低下するが、Prel 過剰発現ではシグナル低下が抑制された(野生型、Prel 過剰発現ともに AM では n = 5、OM では n = 7)。A は平均値と SD を、B と C では各条件の FRET シグナル平均値(黒いライン)に加えて各細胞での FRET シグナル(灰色のライン)を示した。

(D と E) 野生型と *prel* 機能欠失 Class IV 細胞体内 FRET シグナルへのミトコンドリア阻害の影響。*prel* 機能欠失 Class IV では 50  $\mu$  M AM 処理による FRET シグナルの低下が抑制された(n=5 ずつ)。

(F と G) 野生型と Prel 過剰発現 Class IV での、ミトコンドリアと解糖系の同時阻害(100  $\mu$  M AM と 50 mM 2DG)による細胞体内 FRET シグナルの低下速度の測定。F 左は代表的な FRET シグナル画像を、F 中央は平均値と SD の経時変化を、F 右は 5 分後と 10 分後の FRET シグナル低下量を示す。G は各条件の FRET シグナル平均値(黒いライン)に加えて各細胞での FRET シグナル(灰色のライン)を示した。検定は t 検定を用いた。



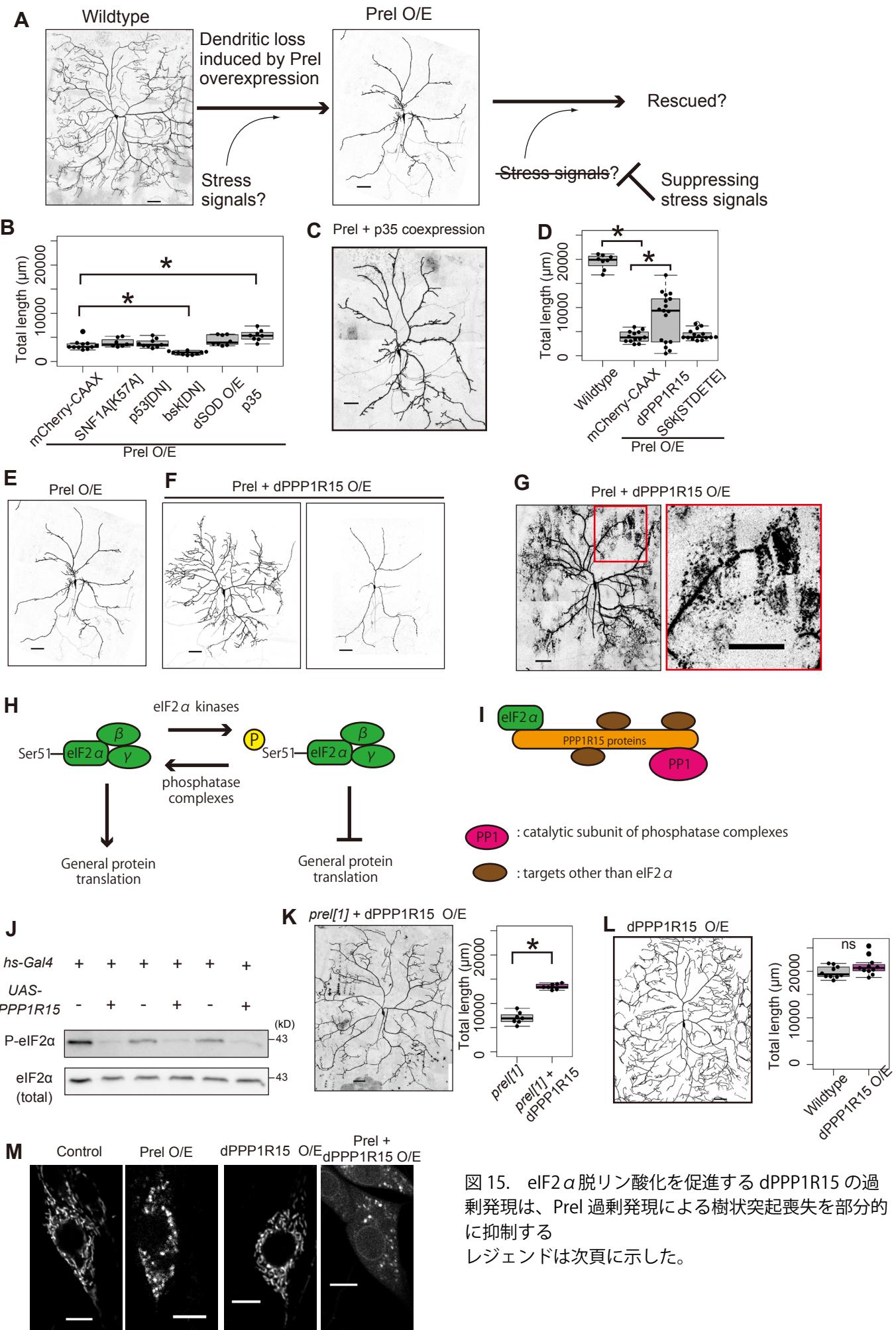


図 15. eIF2 $\alpha$  脱リン酸化を促進する dPPP1R15 の過剰発現は、Prel 過剰発現による樹状突起喪失を部分的に抑制する  
レジェンドは次頁に示した。

図 15. eIF2 $\alpha$ 脱リン酸化を促進する dPPP1R15 の過剰発現は、Prel 過剰発現による樹状突起喪失を部分的に抑制する

(A) Prel 過剰発現とストレスシグナル抑制の間の遺伝学的相互作用の模式図。Prel 過剰発現による樹状突起喪失が下流のミトコンドリアストレスシグナルによって誘導されているのであれば、そのシグナルの抑制により突起形態が回復すると予想した。

(B と C) 多くのミトコンドリアストレスの抑制因子の発現は突起形態を回復させなかつた。SNF1A [K57A]: AMPK 触媒サブユニットのキナーゼ不活性型; p53[DN]: dominant negative 型 p53; bsk[DN]: dominant negative 型 JNK (Johnson et al., 2010; Ollmann et al., 2000; Adachi-Yamada et al., 1999). バキュロウイルス由来エフェクターカスパーゼ阻害タンパク質 p35 の発現は、樹状突起形態をわずかに回復させた (Hay et al., 1994)。しかし、その回復の程度は小さく、カスパーゼの貢献は小さいと考えられる (B と C)。Prel 発現量に影響する UAS コンストラクトのコピー数を揃えるために、mCherry-CAAX を共発現した Class IV をコントロールとして用いた。検定には ANOVA とそれに続く post-hoc Dunnett's test (versus mCherry-CAAX) を用いた。

(D-G) Prel 過剰発現による Class IV 樹状突起短縮化効果への、dPPP1R15 あるいは恒常的活性化型 S6k (S6k[STDETE]) の共発現効果 (Barcelo and Stewart, 2002)。Class IV における Prel と dPPP1R15 の共発現は、突起形態が部分的に回復したらしい細胞 (D と F 左) と、さらに突起が短くなった細胞 (D と F 右) の両方が観察された。Class IV で Prel と dPPP1R15 の共発現を行った個体では、まれに突起を標識するために発現させた膜結合型 tdGFP シグナルが表皮細胞様の六角形の形態で観察され、表皮に取り込まれているような様子が観察された (G; n = 4/17)。このようなシグナルは野生型では見られなかつた。検定には ANOVA とそれに続く post-hoc Turkey-Cramer 法を用いた。

(H) eIF2 $\alpha$ リン酸化はタンパク質合成を制御する。eIF2 $\alpha$ のリン酸化状態は eIF2 $\alpha$ キナーゼ活性と脱リン酸化活性のバランスで決定されると考えられる。

(I) PPP1R15 タンパク質は、ホスファターゼ触媒サブユニットとターゲット分子との相互作用を仲介し、P-eIF2 $\alpha$ の脱リン酸化を促進する (Bollen et al., 2009 をもとに作製)。

(J) dPPP1R15 の過剰発現は eIF2 $\alpha$ のリン酸化レベルを低下させる。dPPP1R15 の過剰発現には heat-shock 依存的に Gal4 発現を誘導できる hs-Gla4 を用いた。二齢幼虫を 37 °C で 1 時間処理後、10 時間後にタンパク質を抽出し、抗 P-eIF2 $\alpha$ 抗体と抗 eIF2 $\alpha$ 抗体を用いて検出を行つた。3 つの生物学的レプリケートの結果を示した。

(K) dPPP1R15 の発現は prel 機能欠失 Class IV の樹状突起形態も部分的に回復させた。代表的画像 (K 左) と総突起長の定量化 (K 右)。検定には t 検定を用いた。

(L) 野生型 Class IV における dPPP1R15 の発現は樹状突起形態に影響しなかつた。代表的画像 (L 左) と総突起長の定量化 (L 右)。検定には t 検定を用いた。

(M) dPPP1R15 は Prel 過剰発現によるミトコンドリア形態を回復しなかつた。野生型、Prel 過剰発現、dPPP1R15 過剰発現、Prel+dPPP1R15 共発現 Class IV 細胞体におけるミトコンドリアの代表的画像。dPPP1R15 のみの発現はミトコンドリア形態に影響を与えた。

スケールバーは 50 μm (A, C, E-G, K, L)、あるいは 5 μm (M) を示す。

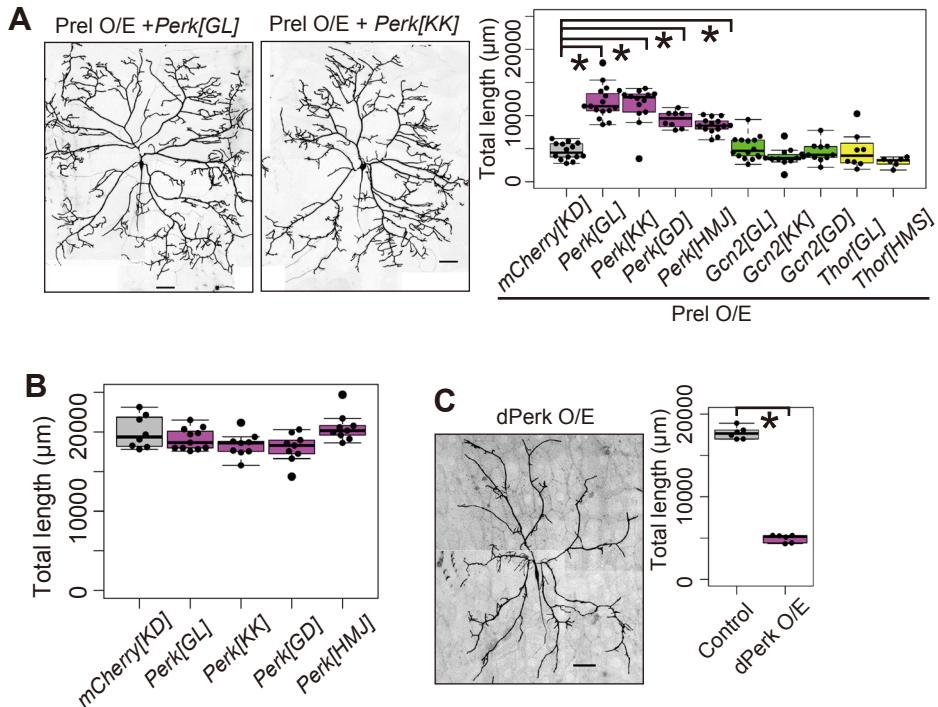


図 16. *Perk* の KD は PreI 過剰発現依存的な樹状突起喪失を部分的に回復させる

(A) PreI 過剰発現 Class IV 樹状突起長に対する、*Perk*、*Gcn2*、*Thor* の RNAi を用いた KD の効果。代表的画像 (A 左) と総突起長の定量化 (A 右)。*Perk[HMJ]* 系統のアンプリコンはその他の *Perk* RNAi 系統のアンプリコンと配列上の重なりがない (Flybase)。検定には ANOVA とそれに続く post-hoc Dunnett's test (vs. *mCherry[KD]*) を用いた。スケールバーは 50  $\mu\text{m}$  を示す。

(B) 野生型 Class IV における *Perk* RNAi の樹状突起長への影響。いずれの条件でも有意差は検出されなかった。検定には ANOVA とそれに続く post-hoc Dunnett's test (vs. *mCherry[KD]*) を用いた。

(C) dPerk 過剰発現の Class IV 樹状突起形態への樹状突起短縮効果。dPerk を過剰発現する Class IV の代表的画像 (C 左) と総樹状突起長の定量化 (C 右)。スケールバーは 50  $\mu\text{m}$  を示す。検定には t 検定を用いた。

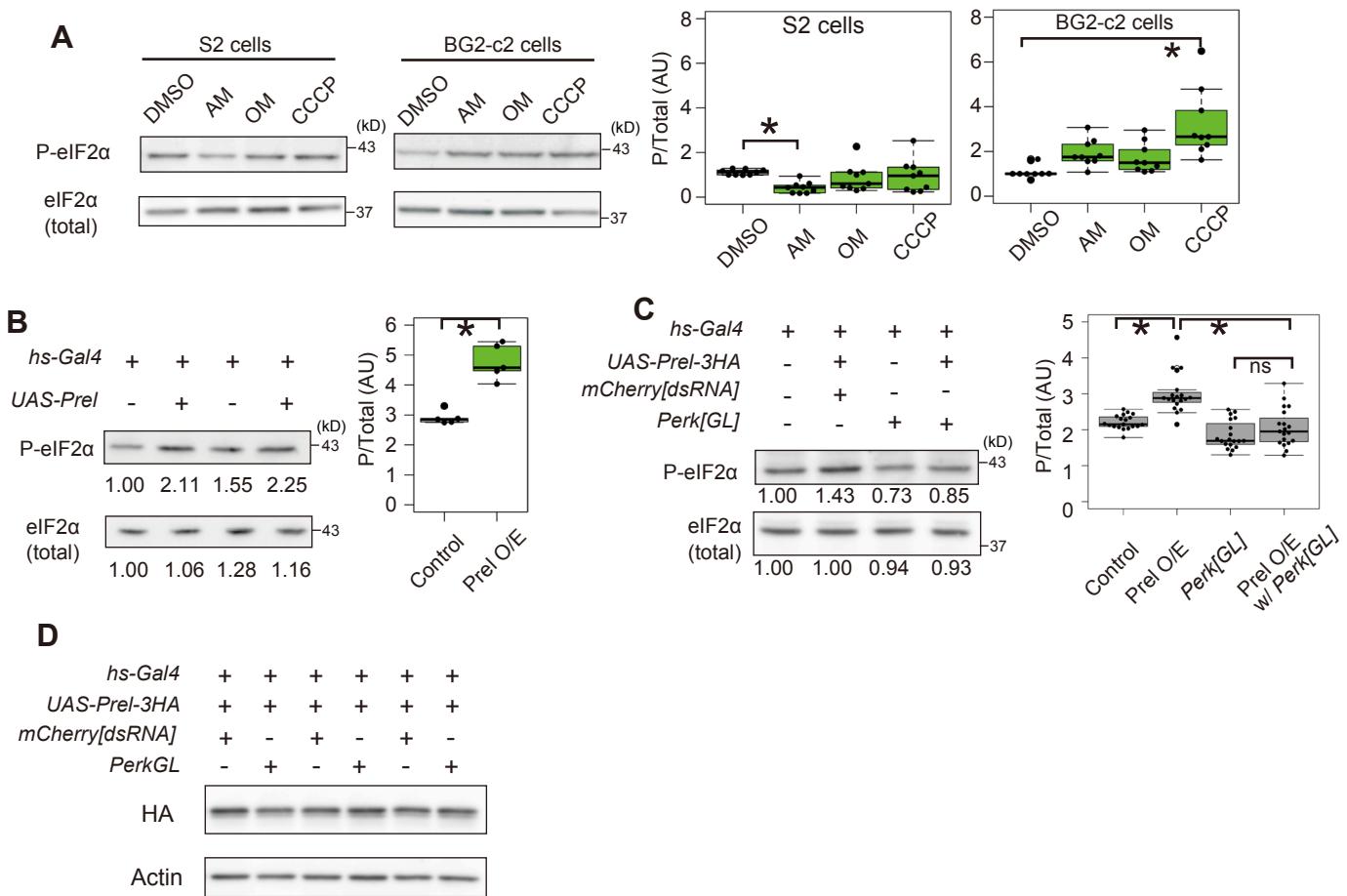


図 17. ミトコンドリア機能阻害はショウジョウバエ細胞において eIF2 $\alpha$  リン酸化を誘導しうる  
(A) ミトコンドリア阻害剤処理は、ショウジョウバエ由来培養細胞 (S2 細胞と Dm BG2-c2 細胞) における eIF2 $\alpha$  リン酸化レベルを上昇しうる。ミトコンドリア阻害剤 (20 nM AM, 40 nM OM, あるいは 15  $\mu$ M CCCP) で 5 時間処理し、タンパク質を抽出し、抗 P-eIF2 $\alpha$  抗体と抗 eIF2 $\alpha$  抗体を用いて検出を行った。代表的なプロット (A 左) と P-eIF2 $\alpha$  / 総 eIF2 $\alpha$  比の定量化 (A 右)。検定には ANOVA とそれに続く post-hoc Dunnett's test (vs. DMSO) を用いた。

(B と C) Prel 過剰発現は成虫頭部の eIF2 $\alpha$  リン酸化レベルを上昇し、Perk の KD はその上昇を部分的に抑制する。Prel の過剰発現は *hs-Gal4* を用いて行った。雌成虫の頭部からタンパク質を抽出し、抗 P-eIF2 $\alpha$  抗体と抗 eIF2 $\alpha$  抗体を用いたウェスタンブロッティングにより頭部全体での eIF2 $\alpha$  リン酸化レベルを測定した。各バンドの下にそのシグナル強度を示した。野生型と Prel 過剰発現での代表的なプロット (B 左; 2 つの生物学的 replicate の結果) と P-eIF2 $\alpha$  / 総 eIF2 $\alpha$  比の定量化 (B 右)。野生型、Prel 過剰発現 +UAS コピー数コントロール、Perk KD、Prel 過剰発現 +Perk KD での代表的なプロット (C 左) と P-eIF2 $\alpha$  / 総 eIF2 $\alpha$  比の定量化 (C 右)。検定には t 検定 (B)、あるいは ANOVA とそれに続く post-hoc Turkey-Kramer 法 (C) を用いた。

(D) Prel 過剰発現個体における Prel-HA 発現レベル。C で用いた遺伝子型 (Prel 過剰発現 +UAS コピー数コントロールと Prel 過剰発現 +Perk KD) の個体において、HA 抗体を用いて頭部での Prel 発現量を測定した。3 つの生物学的レプリケートの結果を示した。2 つの遺伝子型における Prel 発現量は類似していた。

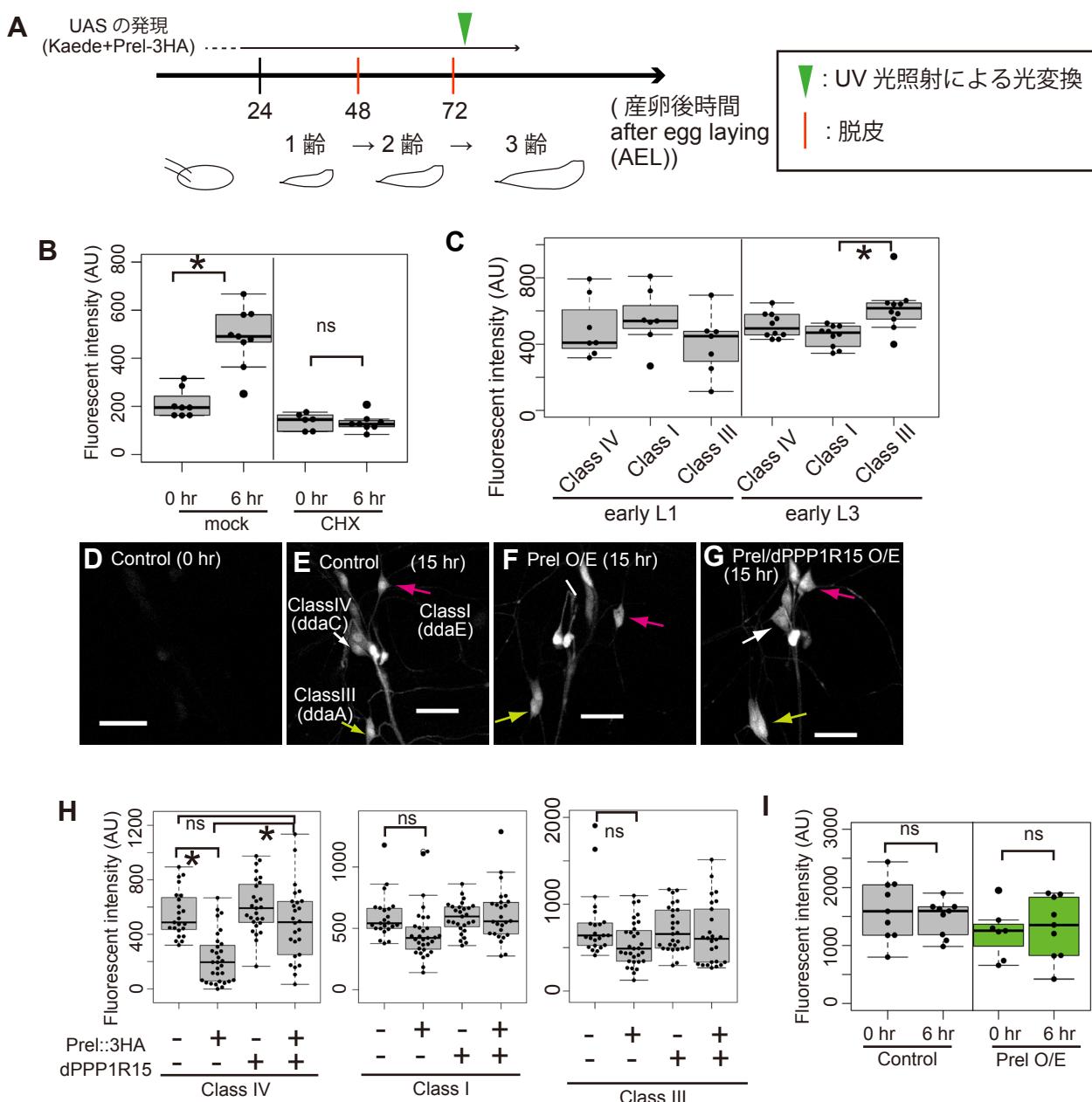


図 18. Prel 過剰発現は Class IV において顕著に新規タンパク質合成を阻害する

(A) Kaede を用いた新規タンパク質合成量測定実験の概要。Kaede と Prel の強制発現には *Gal4[21-7]* を用いた。三齢幼虫初期に UV 光を全身に照射することで光変換を行い、光変換直後とその 6 時間後あるいは 15 時間後に観察した (A 緑やじり)。

(B) Kaede イメージングはシクロヘキシミド (CHX) による翻訳阻害を検出可能であった。三齢初期幼虫を光変換し、光変換直後に約半数の個体で、Class IV 細胞体内における変換されていない Kaede 緑蛍光を定量化した (0 hr)。残りの半分の個体は CHX を含む餌中で 6 時間生育し、その後同様に定量化した (6 hr)。CHX 処理群では光変換前にも CHX を含む餌中で 4 時間生育した。

(C) *Gal4[21-7]* を用いた各クラスでの発現量の評価。*Gal4[21-7]* は胚期には発現を既に開始し、一齢幼虫と三齢幼虫で、Class IV、I、III において近いレベルの UAS 発現誘導能を示す。*Gal4[21-7]* による発現量は、膜結合型 GFP を発現させて、その細胞体における蛍光輝度を測定することで評価した。

(D-H) Prel 過剰発現は Class IV において顕著に新規 Kaede 合成を阻害した。野生型 (D と E)、Prel 過剰発現 (F)、Prel+dPPP1R15 共発現 (G) の光変換されていない Kaede 緑蛍光の代表的画像。やじりはそれぞれ、Class IV 細胞体 (白)、Class I 細胞体 (マゼンタ)、Class III 細胞体 (黄) を示す。スケールバーは 50  $\mu$ m を示す。細胞体におけるシグナルの定量化 (H)。観察は光変換直後 (0 hr) と、15 時間後 (15 hr) に行い、直後に観察した各条件のシグナル平均値を、対応する条件の 15 時間後の各細胞体のシグナル値から差し引いた。検定には ANOVA とそれに続く post-hoc Tukey-Kramer 法を用いた。スケールバーは 50  $\mu$ m を示す。(I) 光変換直後と 6 時間後における光変換された Kaede 赤色蛍光の定量化。野生型、Prel 過剰発現 Class IV 細胞体における、光変換直後と 6 時間後のシグナルの強さを示した。検定には t 検定を用いた。

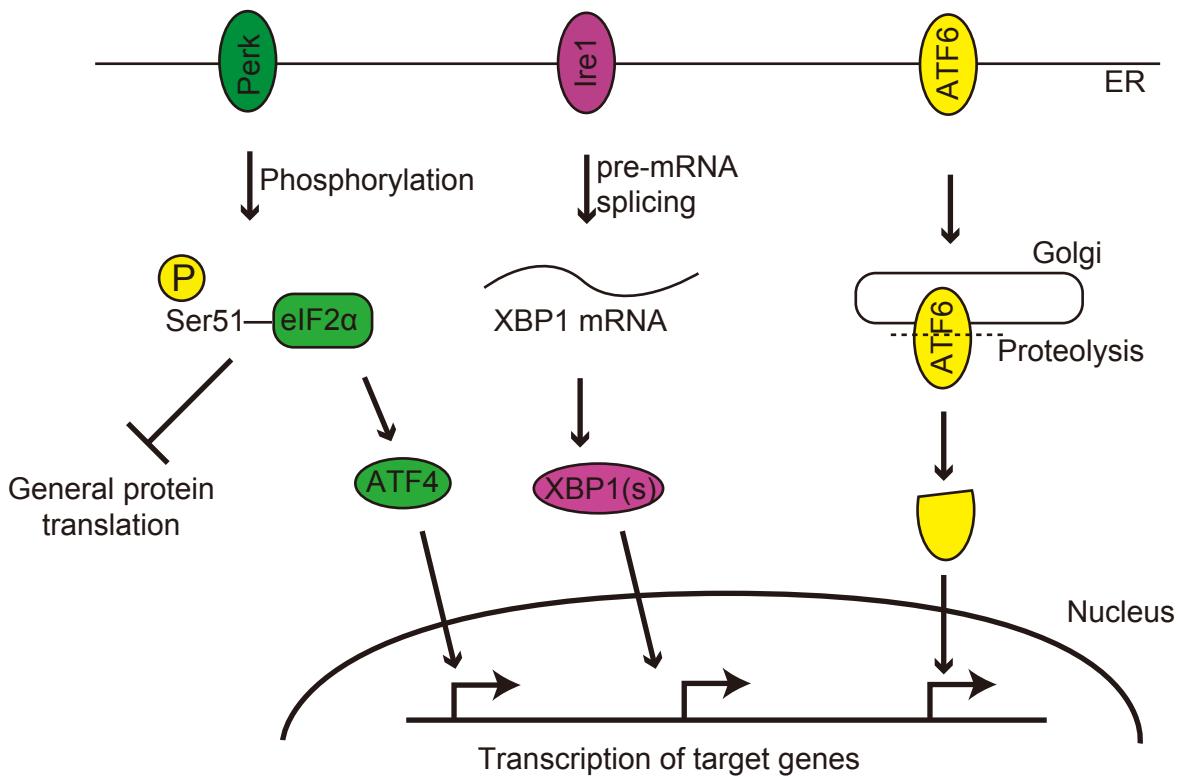


図 19. Unfolded Protein Response シグナル経路の模式図

Unfolded Protein Response (UPR) は、ER 内の異常タンパク質の蓄積やカルシウム動態の乱れなど、ER ストレスにより開始される。UPR は主に 3 つのシグナル経路から構成され、それぞれの ER 内の変化を検知するセンサータンパク質は Perk、Ire1、ATF6 である。Perk の主なターゲットは eIF2 $\alpha$  であり、そのリン酸化によって、細胞質におけるタンパク質の全体的な抑制、あるいは転写因子 ATF4 の翻訳促進を誘導する。Ire1 のターゲットは XBP1 pre-mRNA であり、そのスプライシングを促進することで、転写因子 XBP1(s) の合成を導く。ATF6 は ER ストレスを検知するとゴルジ体に移行し、そこでタンパク質切断を受け、その切断部分が転写因子として働くようになる。これらの転写因子は様々な ER ストレス緩和に働く遺伝子の転写を誘導する。

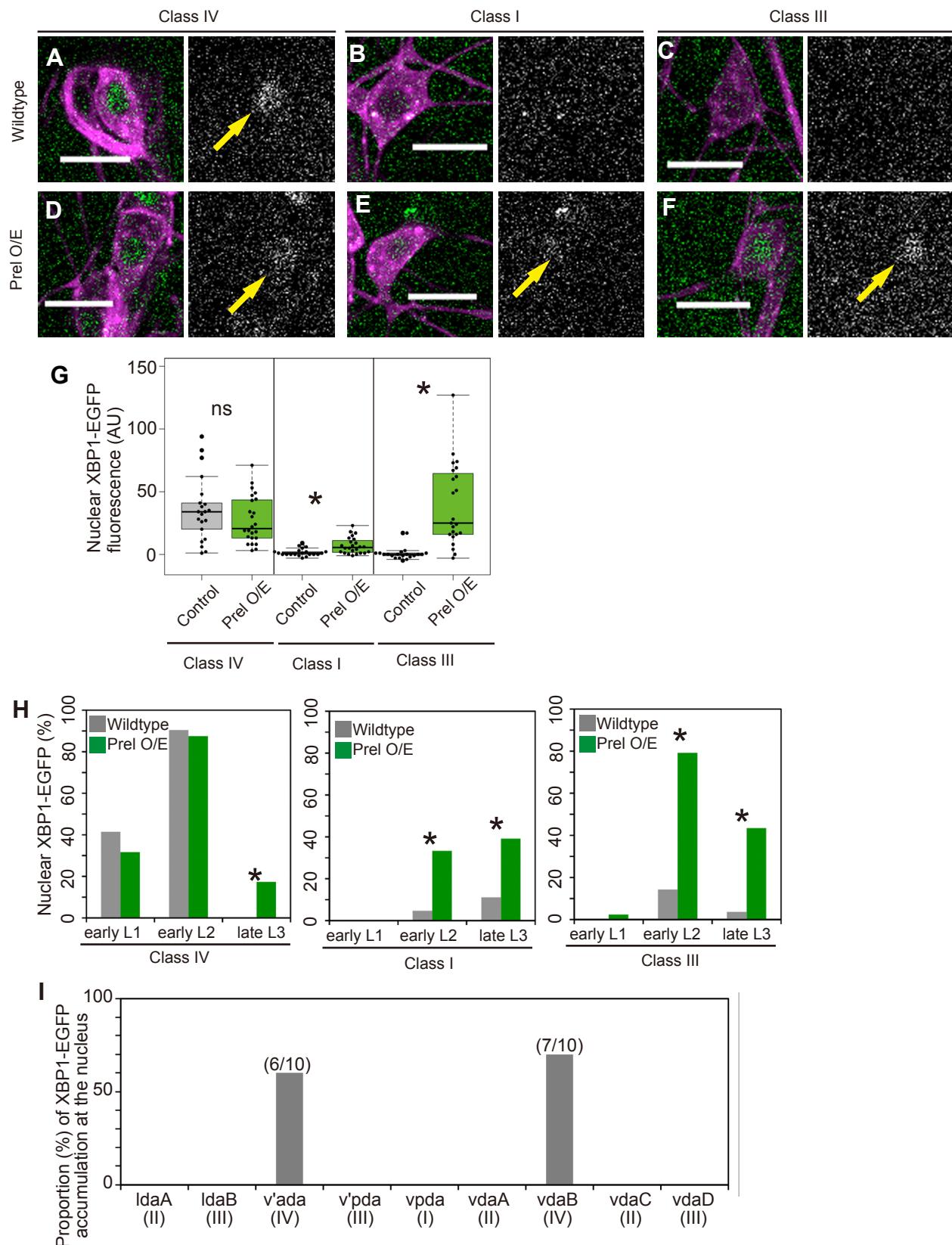


図 20. Prel 過剰発現は da ニューロンにおいて UPR の *Ire1* 経路を活性化する  
(A-I) XBP1-EGFP レポーターの da ニューロン核への蓄積。野生型 (A-C)、Prel 過剰発現 (D-F) の二齢幼虫初期 (46–50 hr AEL) での細胞体における、XBP1-EGFP と膜マーカー (mCherry-CAAX) の代表的画像。UAS からの発現は *Gal4[21-7]* を用いた。黄色のやじりは核に蓄積した XBP1-EGFP を示す。二齢幼虫初期における各クラスの核領域における EGFP 蛍光シグナル強度の定量化 (G)。一齢初期 (22–26 hr AEL)、二齢初期、三齢初期 (72–76 hr AEL) における核への蓄積が見られた da ニューロンの割合 (H)。二齢幼虫初期における背側クラスター以外の da ニューロンでの XBP1-EGFP の核内への蓄積 (I; 10 個体から 10 細胞)。  
検定は *t* 検定 (G) あるいは Fisher の正確確率検定 (H) を用いた。スケールバーは 5  $\mu$ m を示す。



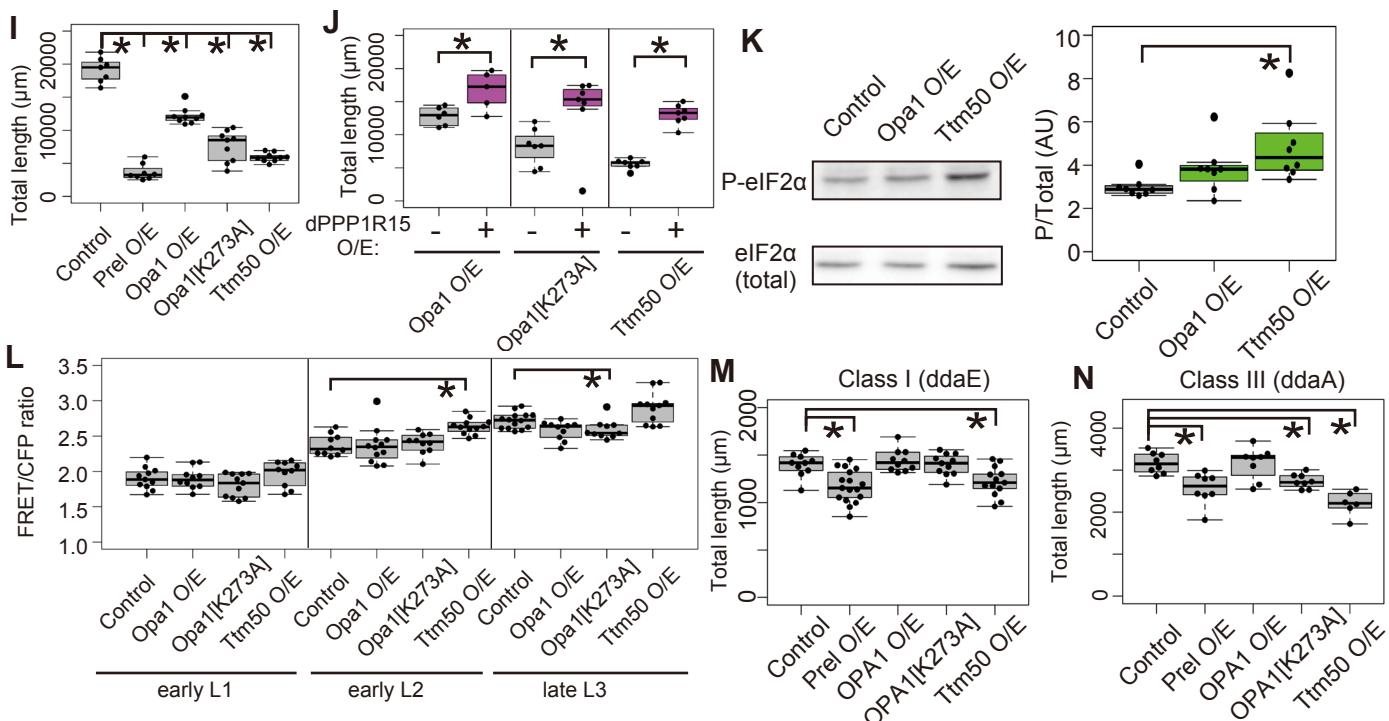
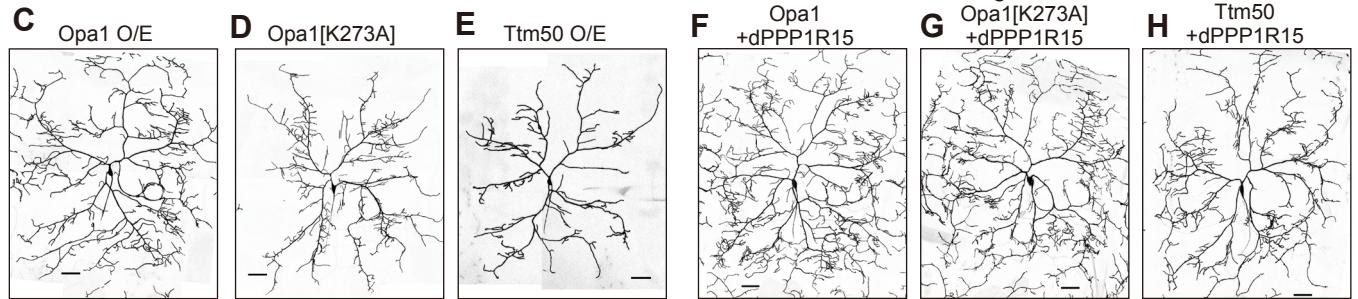
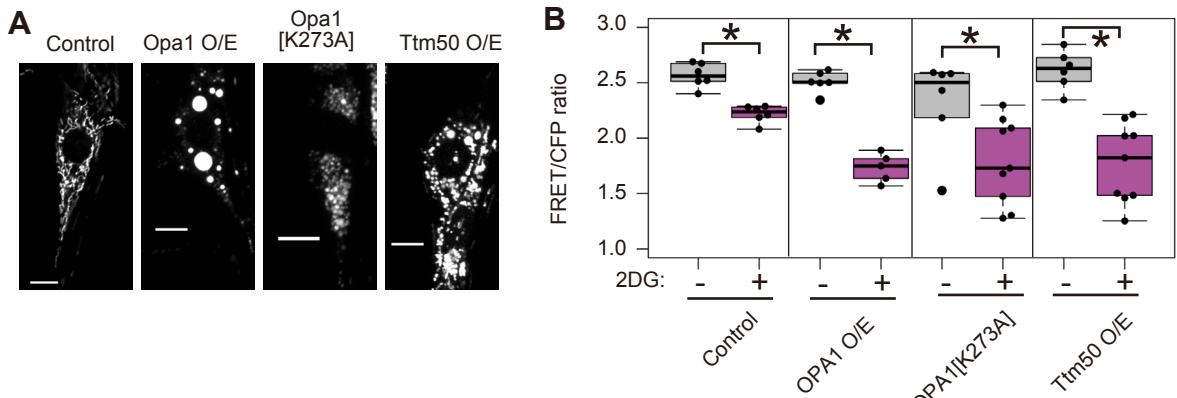


図 21. eIF2 $\alpha$  リン酸化の上昇は、ミトコンドリア異常を導く様々な操作による樹状突起喪失に共通したメカニズムである  
レジェンドは次頁に示した。

図 21. eIF2 $\alpha$  リン酸化の上昇は、ミトコンドリア異常を導く様々な操作による樹状突起喪失に共通したメカニズムである

(A) Opa1 過剰発現、Opa1[K273A] 異所発現、Ttm50 過剰発現 Class IV 細胞体におけるミトコンドリア形態の代表的画像。ミトコンドリアは mitoGFP で可視化されている。

(B) Opa1 過剰発現、Opa1[K273A] 異所発現、Ttm50 過剰発現は Class IV 内 ATP レベル維持に関して解糖系依存度を上昇させた。da ニューロンにおいて Opa1、Opa1[K273A]、あるいは Ttm50 を AT[NL] とともに発現させた個体を解剖し、50 mM 2-DG で 60 分間処理し、細胞体における FRET シグナルを定量化した。

(C-J) Opa1、Opa1[K273A]、あるいは Ttm50 の Class IV ニューロンでの強制発現は樹状突起短縮を誘導し、dPPP1R15 の共発現はそれを部分的に抑制した。Opa1 (C)、Opa1[K273A] (D)、Ttm50 (E)、Opa1+dPPP1R15 (F)、Opa1[K273A]+dPPP1R15 (G)、あるいは Ttm50+dPPP1R15 (H) を発現させた Class IV 樹状突起の代表的画像と、その定量化 (I と J)。

(K) Opa1 あるいは Ttm50 過剰発現させた成虫頭部 eIF2 $\alpha$  リン酸化レベルへの効果。Opa1 あるいは Ttm50 を *hs-Gal4* で発現させ、その頭部から得たタンパク質中の eIF2 $\alpha$  リン酸化レベルを、ウェスタンブロッティングにより測定した。

(L) Opa1 過剰発現、Opa1[K273A] 異所発現、Ttm50 過剰発現は Class IV の ATP レベルをあまり変化させなかった。Class IV で AT[NL] と共に発現させ、一齢初期 (22–26 hr AEL)、二齢初期 (46–50 hr AEL)、三齢後期 (約 120 hr AEL) における細胞体 FRET シグナルを測定した。

(M と N) Opa1 過剰発現、Opa1[K273A] 異所発現、Ttm50 過剰発現の Class I あるいは III の樹状突起への影響は比較的小さかった。クラス特異的 Gal4 で発現を誘導し、Class I (M) と Class III (N) の樹状突起の総突起長を定量化した。樹状突起形態への影響は、Class IV (I) に比べて軽微であった。Prel 過剰発現の結果は図 5 で示した結果を比較のため改めて示した。

検定には ANOVA とそれに続く post-hoc Dunnett's test (vs. Control; I, K, L, M, N)、あるいは *t* 検定 (B と J) を用いた。スケールバーは 5  $\mu$ m (A)、あるいは 50  $\mu$ m (C-H) を示す。

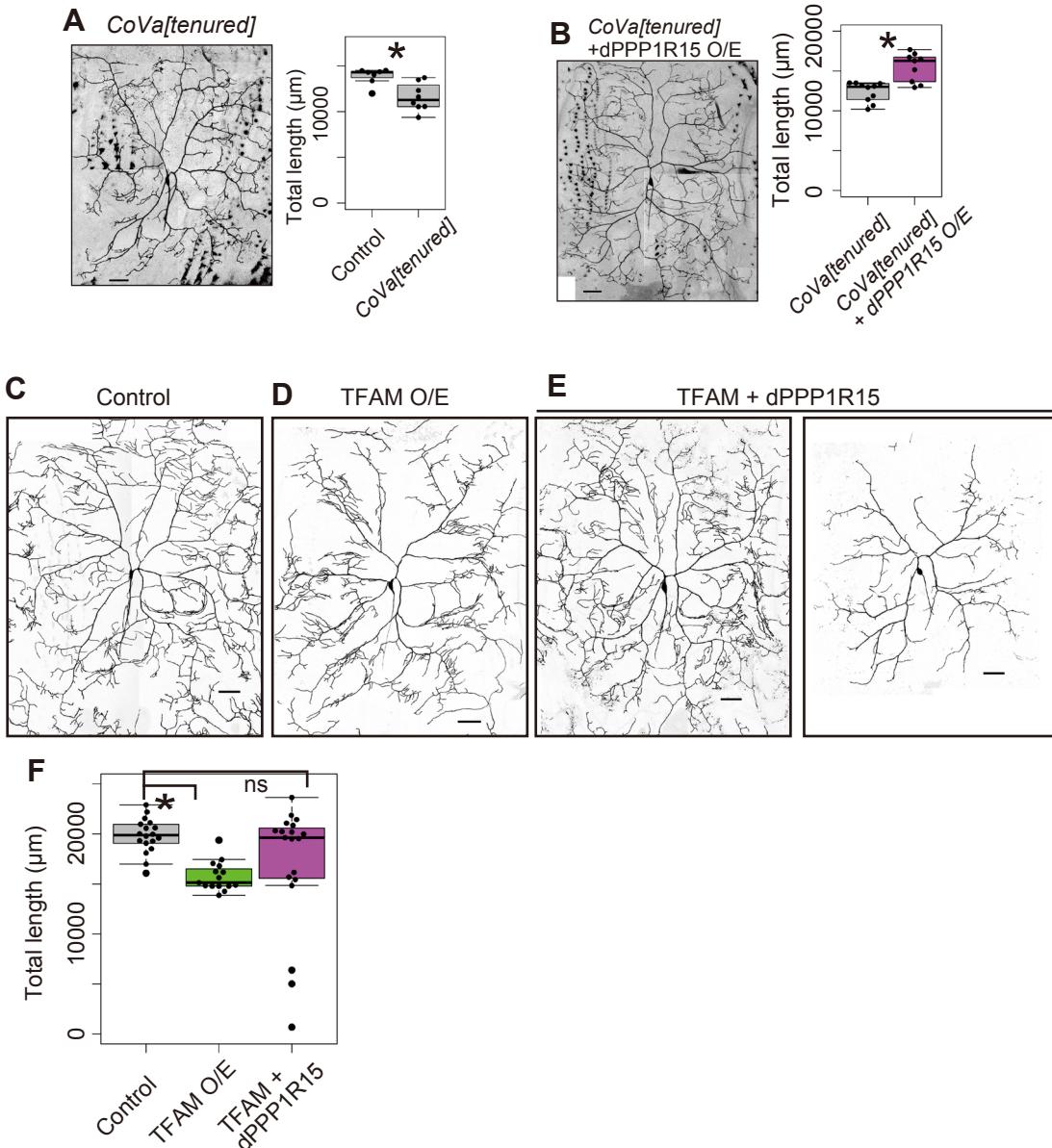


図 22. dPPP1R15 共発現は、CoVa 変異型あるいは TFAM 過剰発現 Class IV 樹状突起形態を回復した (A と B) *CoVa[tenured]* (Complex IV のサブユニット Va のヌル変異) 変異は Class IV 樹状突起長を減少させ、それは dPPP1R15 の発現により回復した。代表的画像 (A) と定量化 (B)。CoVa ホモ機能欠失 Class IV (*CoVa[tenured]* *FRT82B/CoVa[tenured]* *FRT82B*) はヘテロ変異体個体 (*CoVa[tenured]* *FRT82B/+*) の中で、MARCM 法を用いて体細胞組換えで誘導した。CoVa の機能喪失によって引き起こされた突起長の減少の程度は小さかった。このことは、体細胞組換え前に存在する内在の CoVa タンパク質の残存 (Steward and Liu, 2000) と、ミトコンドリアの OXPHOS 関連複合体は神経系において比較的遅い代謝回転速度を持っている (Price et al., 2010; Vincow et al., 2013) ことによるのではないかと推測している。

(C-F) TFAM の過剰発現は Class IV 樹状突起長を減少させ、それは dPPP1R15 の発現により回復、あるいは悪化した。野生型 (C)、TFAM 過剰発現 (D)、TFAM+dPPP1R15 共発現 (E) の Class IV 樹状突起形態の代表的画像、とその定量化 (F)。多くの TFAM+dPPP1R15 共発現 Class IV は野生型並の樹状突起長を持つたが、まれに TFAM の単独過剰発現よりもはるかに突起長が短い場合も見られた (F)。これは Prel+dPPP1R15 共発現 Class IV で見られた二峰性の樹状突起長の分布と類似している (図 15D、F 右)。スケールバーは  $50 \mu\text{m}$  を示す。検定には *t* 検定 (A と B)、あるいは ANOVA とそれに続く post-hoc Tukey-Kramer 法を用いた。

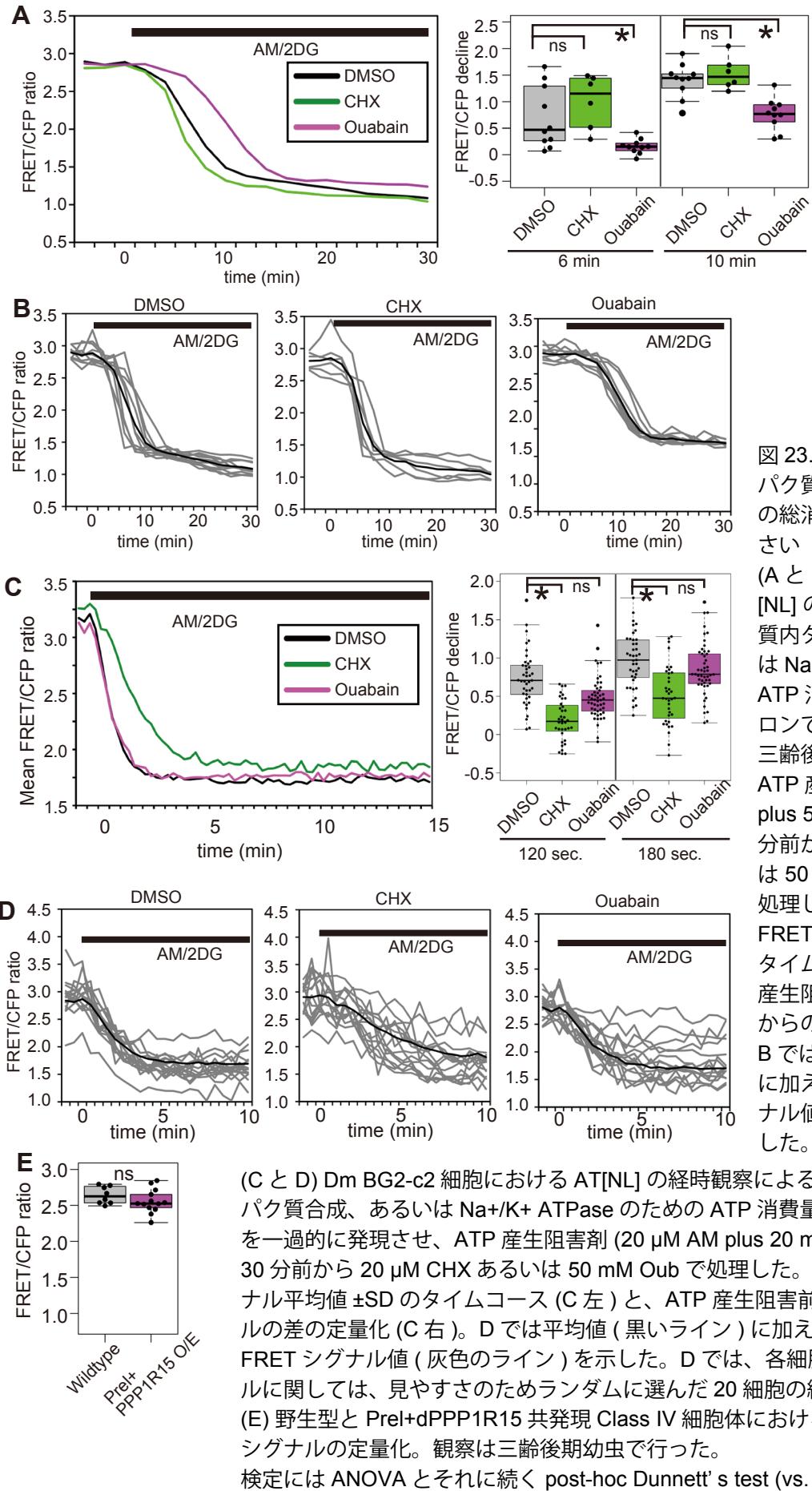


図 23. Class IV におけるタンパク質合成のための ATP 消費の総消費量に対する比率は小さい

(A と B) Class IV における AT[NL] の経時観察による、細胞質内タンパク質合成、あるいは  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase のための ATP 消費量の測定。da ニューロンで AT[NL] を発現させた三齢後期幼虫個体を解剖し、ATP 産生阻害剤 (100  $\mu\text{M}$  AM plus 50 mM 2-DG) の添加 30 分前から 25 mM CHX あるいは 50 mM Ouabain (Oub) で処理した。Class IV 細胞体 FRET シグナル平均値  $\pm$  SD のタイムコース (A 左) と、ATP 産生阻害前の FRET シグナルからの低下量の定量化 (A 右)。B では平均値 (黒いライン)に加え、各細胞の FRET シグナル値 (灰色のライン) を示した。

(C と D) Dm BG2-c2 細胞における AT[NL] の経時観察による、細胞質内タンパク質合成、あるいは  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase のための ATP 消費量の測定。AT[NL] を一過的に発現させ、ATP 産生阻害剤 (20  $\mu\text{M}$  AM plus 20 mM 2-DG) の添加 30 分前から 20  $\mu\text{M}$  CHX あるいは 50 mM Oub で処理した。細胞内 FRET シグナル平均値  $\pm$  SD のタイムコース (C 左) と、ATP 産生阻害前の FRET シグナルの差の定量化 (C 右)。D では平均値 (黒いライン) に加え、各細胞ごとの FRET シグナル値 (灰色のライン) を示した。D では、各細胞の FRET シグナルに関しては、見やすさのためランダムに選んだ 20 細胞の結果のみを示した。(E) 野生型と Prel+dPPP1R15 共発現 Class IV 細胞体における AT[NL] FRET シグナルの定量化。観察は三齢後期幼虫で行った。

検定には ANOVA とそれに続く post-hoc Dunnett's test (vs. DMSO) を用いた。

Table 1. Statistics.

図5. daニューロンの成長と、*prel*機能異常によるdaニューロン樹状突起への影響

図5K	Dendritic Length (μm)	N	P
Control	17566 ± 614	7	
<i>prel[1]</i>	7122 ± 1659	5	< .001

平均値 ± 95% CI.

Statistical test: Welch's t-test.

図5K	Dendritic Length (μm)	N	P
Control	16851 ± 1361	5	
Prel O/E	7852 ± 1950	6	< .001

平均値 ± 95% CI.

Statistical test: Welch's t-test.

図5L	Dendritic Length (μm)	N	P
Control	1531 ± 105	8	
<i>prel[1]</i>	1324 ± 80	9	< .001

平均値 ± 95% CI.

Statistical test: Welch's t-test.

図5L	Dendritic Length (μm)	N	P
Control	1394 ± 84	10	
Prel O/E	1171 ± 88	17	< .001

平均値 ± 95% CI.

Statistical test: Welch's t-test.

図5M	Dendritic Length (μm)	N	P
Control	3799 ± 511	7	
<i>prel[1]</i>	2712 ± 218	9	< .001

平均値 ± 95% CI.

Statistical test: Welch's t-test.

図5M	Dendritic Length (μm)	N	P
Control	3170 ± 200	8	
Prel O/E	2569 ± 309	8	< .001

平均値 ± 95% CI.

Statistical test: Welch's t-test.

Table 1. Statistics.

## 図6. Gal4系統を用いた代謝関連遺伝子のdaニューロンでの発現解析

A. NP3275		Relative expression level (AU)		N
(NADH dehydrogenase B17 subunit)	Class IV	0.811	± 0.072	10
	Class I	0.086	± 0.054	10
	Class III	0.103	± 0.064	10
Statistical test: ANOVA ( $F(2, 27) = 210.7$ , $p < .001$ ) followed by Tukey's HSD test.				
B. NP2344		Relative expression level (AU)		N
(Cytochrome c oxidase subunit B)	Class IV	0.538	± 0.037	12
	Class I	0.140	± 0.060	12
	Class III	0.322	± 0.073	12
Statistical test: ANOVA ( $F(2, 33) = 30.94$ , $p < .001$ ) followed by Tukey's HSD test.				
C. NP2718		Relative expression level (AU)		N
(ATP-synthase α subunit)	Class IV	0.538	± 0.053	14
	Class I	0.140	± 0.026	14
	Class III	0.322	± 0.050	14
Statistical test: ANOVA ( $F(2, 39) = 91.311$ , $p < .001$ ) followed by Tukey's HSD test.				
D. NP2635		Relative expression level (AU)		N
(Pyruvate kinase)	Class IV	0.869	± 0.098	7
	Class I	0.026	± 0.062	7
	Class III	0.105	± 0.086	7
Statistical test: ANOVA ( $F(2, 18) = 174.7$ , $p < .001$ ) followed by Tukey's HSD test.				
E. NP0607		Relative expression level (AU)		N
(α-ketoglutarate dehydrogenase)	Class IV	0.731	± 0.069	12
	Class I	0.118	± 0.033	12
	Class III	0.152	± 0.056	12
Statistical test: ANOVA ( $F(2, 33) = 30.94$ , $p < .001$ ) followed by Tukey's HSD test.				
F. NP5107		Relative expression level (AU)		N
(Cyrate synthase)	Class IV	0.715	± 0.097	8
	Class I	0.130	± 0.095	8
	Class III	0.155	± 0.048	8
Statistical test: ANOVA ( $F(2, 21) = 84.17$ , $p < .001$ ) followed by Tukey's HSD test.				
G. NP6120		Relative expression level (AU)		N
(Hexokinase A)	Class IV	0.365	± 0.028	12
	Class I	0.290	± 0.044	12
	Class III	0.345	± 0.042	12
Statistical test: ANOVA ( $F(2, 33) = 4.726$ , $p = .0161$ ) followed by Tukey's HSD test.				
H. NP3500		Relative expression level (AU)		N
(GAPDH)	Class IV	0.403	± 0.053	12
	Class I	0.214	± 0.038	12
	Class III	0.383	± 0.055	12
Statistical test: ANOVA ( $F(2, 33) = 21.29$ , $p < .001$ ) followed by Tukey's HSD test				
I. NP2353		Relative expression level (AU)		N
(Enolase)	Class IV	0.571	± 0.111	8
	Class I	0.251	± 0.065	8
	Class III	0.178	± 0.073	8
Statistical test: ANOVA ( $F(2, 21) = 31.69$ , $p < .001$ ) followed by Tukey's HSD test.				
J. Ubi-Gal4		Relative expression level (AU)		N
	Class IV	0.332	± 0.053	7
	Class I	0.251	± 0.084	7
	Class III	0.417	± 0.118	7

平均値 ± 95% CI.

Statistical test: ANOVA ( $F(2, 18) = 4.838$ ,  $p = .021$ ) followed by Tukey's HSD test

Table 1. Statistics.

## 図6. Gal4系統を用いた代謝関連遺伝子のdaニューロンでの発現解析

P values (post-hoc Turkey's HSD test).

Driver lines	Class VI vs I	Class IV vs III	Class I vs III
<i>NP3275</i>	< .001	< .001	0.907
<i>NP2344</i>	< .001	< .001	< .001
<i>NP2718</i>	< .001	< .001	< .001
<i>NP2635</i>	< .001	< .001	0.276
<i>NP0607</i>	< .001	< .001	0.608
<i>NP5107</i>	< .001	< .001	0.877
<i>NP6120</i>	0.015	0.716	0.089
<i>NP3500</i>	< .001	0.81	< .001
<i>NP2353</i>	< .001	< .001	0.363
<i>Ubi-Gal4</i>	0.313	0.369	0.016

## 図7. 低温度型ATPセンサーATeamのショウジョウバエ培養細胞における性能評価

図7F	FRET/CFP ratio	N
AT1.03 (0 sec)	3.125 ± 0.093	57
AT1.03 (900 sec)	1.893 ± 0.180	57
AT[NL] (0 sec)	2.532 ± 0.067	56
AT[NL] (900 sec)	1.54 ± 0.077	56
平均値 ± 95% CI.		

図7I	FRET/CFP ratio	N	P
Control (AT[NL])	2.233 ± 0.064	83	
Prel O/E (AT[NL])	2.009 ± 0.100	73	< .001
Conrol (AT[RK])	1.135 ± 0.015	108	
Prel O/E (AT[RK])	1.133 ± 0.016	105	0.843
平均値 ± 95% CI.			

Statistical test: Welch's t-test.

## 図9. AT[NL]は個体内でのATP低下を検出できる

図9H	FRET/CFP ratio	N	P
DMSO	2.982 ± 0.078	17	
AM	2.438 ± 0.149	13	< .0001
OM	2.860 ± 0.039	17	0.412
KCN	2.941 ± 0.032	19	0.931
AM+KCN	2.466 ± 0.120	12	< .0001
AM+2DG+DNM	1.276 ± 0.033	11	< .0001
平均値 ± 95% CI.			

Statistical test: ANOVA ( $F(5, 69) = 200.6, p < .001$ ) followed by Dunnet's test.

Table 1. Statistics.

図11. *prel*/機能異常を持つClassIVは幼虫発生のほとんどの期間で生理的なATPレベルを維持している

図11B	FRET/CFP ratio	N	P
Control (early L1)	1.831 ± 0.075	22	
Prel O/E (early L1)	1.607 ± 0.105	23	< .001
mCherry::CAAX	1.863 ± 0.067	16	0.837
Control (early L2)	2.256 ± 0.063	11	
Prel O/E (early L2)	2.627 ± 0.073	13	< .001
Control (early L3)	2.497 ± 0.058	12	
Prel O/E (early L3)	2.746 ± 0.149	13	< .001
Control (late L3)	2.670 ± 0.087	12	
Prel O/E (late L3)	2.750 ± 0.140	11	0.302

平均値 ± 95% CI.

Statistical test: ANOVA ( $F(2, 58) = 10.93, p < .001$ ) followed by Dunnet's test (early L1).

Welch's t-test (early L2, early L3とlate L3).

図11C	FRET/CFP ratio	N	P
Conrtol (early L1)	1.083 ± 0.028	11	
Prel O/E (early L1)	1.087 ± 0.19	11	0.802
Control (early L2)	1.177 ± 0.018	15	
Prel O/E (early L2)	1.18 ± 0.015	16	0.780
Control (early L3)	1.169 ± 0.023	12	
Prel O/E (early L3)	1.233 ± 0.023	12	< .001
Control (late L3)	1.233 ± 0.047	11	
Prel O/E (late L3)	1.263 ± 0.035	10	0.278

平均値 ± 95% CI.

Statistical test: Welch's t-test.

図11E	FRET/CFP ratio	N	P
Control	2.404 ± 0.074	14	
<i>prel[1]</i>	2.329 ± 0.078	11	0.145
平均値 ± 95% CI.	Statistical test: Welch's t-test.		

図11F	FRET/CFP ratio	N	P
Control	2.146 ± 0.119	7	
Preli O/E	2.259 ± 0.204	7	0.281

平均値 ± 95% CI.

Statistical test: Welch's t-test.

図11G	FRET/CFP ratio	N	P
Control (Class IV)	1.831 ± 0.075	22	
Prel O/E (Class IV)	1.607 ± 0.105	23	< .001
mCherry-CAAX (Class IV)	1.863 ± 0.067	16	0.837
Conrol (Class I)	1.815 ± 0.105	22	
Prel O/E (Class I)	1.592 ± 0.149	23	0.018
mCherry-CAAX (Class I)	1.767 ± 0.111	16	0.827
Conrol (Class III)	1.844 ± 0.075	22	
Prel O/E (Class III)	1.645 ± 0.113	22	< .001
mCherry-CAAX (Class III)	1.848 ± 0.115	16	0.999

平均値 ± 95% CI.

図11Bと同じデータを比較のため再び示した。

Statistical test: ANOVA followed by Dunnet's test

 $F(2, 58) = 10.93, p < .001$  (Class IV),  $F(2, 58) = 3.937, p = 0.025$  (Class I), $F(2, 57) = 5.985, p = 0.0044$  (Class III).

Table 1. Statistics.

## 図12. Class IV樹状突起形態の乱れはATPレベルの低下タイミングと一致しない

図12E	Dendritic Length (μm)	N	P
Control (early L1)	1071 ± 104	10	
Prel O/E (early L1)	1124 ± 118	10	0.459
Control (early L2)	4959 ± 645	5	
Prel O/E (early L2)	1983 ± 402	7	< .001
Control (late L3)	19118 ± 1703	7	
Prel O/E (late L3)	3659 ± 983	8	< .001

平均値 ± 95% CI.

Statistical test: Welch's t-test (early L1 and L2)

Data from late L3 in Figure 7E are presented for comparison.

図12H	Total ends	Eliminated or shortened ends	N	P
Control	860	364	4	
Prel O/E	701	490	6	< .001

Nは計測に使用した細胞数を示す。Statistical test: G-test.

## 図13. Prel過剰発現daニューロンは、解糖系によるATP産生が上昇している

図13A	2DG	FRET/CFP ratio	N	P
Control (Class IV)	-	2.526 ± 0.133	5	
Control (Class IV)	+	2.070 ± 0.148	6	< .001
Prel O/E (Class IV)	-	2.590 ± 0.240	6	
Prel O/E (Class IV)	+	1.306 ± 0.067	6	< .001
Control (Class I)	-	2.636 ± 0.268	5	
Control (Class I)	+	2.637 ± 0.200	6	0.991
Prel O/E (Class I)	-	2.712 ± 0.055	6	
Prel O/E (Class I)	+	1.889 ± 0.310	6	< .001
Control (Class III)	-	2.629 ± 0.190	5	
Control (Class III)	+	2.150 ± 0.140	6	< .001
Prel O/E (Class III)	-	2.651 ± 0.144	6	
Prel O/E (Class III)	+	1.553 ± 0.200	6	< .001

平均値 ± 95% CI.

Statistical test: Welch's t-test.

## 図14. Prel過剰発現Class IVは、ミトコンドリア由来ATP供給と、細胞内ATP消費が低下している

図14F	FRET/CFP decline	N	P
Control (5 min)	0.935 ± 0.431	7	
Prel O/E (5 min)	0.482 ± 0.105	7	0.016
Control (10 min)	1.342 ± 0.196	7	
Prel O/E (10 min)	0.862 ± 0.185	7	0.001

平均値 ± 95% CI.

Statistical test: Welch's t-test.

Table 1. Statistics.

図15. eIF2alpha脱リン酸化を促進するdPPP1R15の過剰発現は、PreI過剰発現による樹状突起

喪失を部分的に抑制する

図15B	Dendritic Length (μm)	N	P
mCherry::CAAX	3407 ± 683	11	
SNF1A[K57A]	3901 ± 804	7	0.719
p53[DN]	3750 ± 669	9	0.887
bsk[DN]	1775 ± 245	10	<.001
dSOD1 O/E	4369 ± 853	8	0.114
p35	5373 ± 923	8	<.001

平均値 ± 95% CI.

Statistical test: ANOVA (F (5, 47) = 15.29, p &lt; .001) followed by Dunnet's test.

図15D	Dendritic Length (μm)	N	P
Wildtype	19549 ± 1240	8	<.001
mCherry-CAAX	4083 ± 694	12	
dPPP1R15	7779 ± 2513	18	<.001
S6k[STDELETE]	4344 ± 593	15	0.975

平均値 ± 95% CI.

Statistical test: ANOVA (F (3, 49) = 52.92, p &lt; .001) followed by Dunnet's test.

図15K	Dendritic Length (μm)	N	P
prel[1]	7002 ± 1100	7	
prel[1] + dPPP1R15	13499 ± 516	7	<.001

平均値 ± 95% CI.

Statistical test: Welch's t-test.

図16. PerkのKDはPreI過剰発現依存的な樹状突起喪失を部分的に回復させる

図16A	Dendritic Length (μm)	N	P
mCherry[KD]	4605 ± 723	14	
Perk[GL]	11968 ± 1383	15	<.001
Perk[KK]	11708 ± 1603	14	<.001
Perk[GD]	9422 ± 1028	8	<.001
Perk[HMJ]	8520 ± 655	14	<.001
Gcn2[GL]	5177 ± 1032	14	0.978
Gcn2[KK]	3739 ± 846	12	0.84
Gcn2[GD]	4443 ± 970	11	1
Thor[GL]	4676 ± 2237	8	1
Thor[HMS]	3004 ± 703	6	0.433

平均値 ± 95% CI.

Statistical test: ANOVA (F (9, 106) = 38.1, p &lt; .001) followed by Dunnet's test.

図16B	Dendritic Length (μm)	N	P
mCherry[KD]	19974 ± 1668	8	
Perk[GL]	19098 ± 901	11	0.621
Perk[KK]	18340 ± 1130	9	0.159
Perk[GD]	17992 ± 1366	9	0.066
Perk[HMJ]	20579 ± 1357	9	0.867

平均値 ± 95% CI.

Statistical test: ANOVA (F (4, 41) = 3.632, p = 0.0127) followed by Dunnet's test.

図16C	Dendritic Length (μm)	N	P
Control	17695 ± 733	6	
dPerk O/E	4957 ± 463	6	<.001

平均値 ± 95% CI.

Statistical test: Welch's t-test.

Table 1. Statistics.

## 図17. ミトコンドリア機能阻害はショウジョウバエ細胞においてeIF2alphaリン酸化を誘導しうる

図17A	P/Total	N	P
S2 cell/DMSO	1.054	± 0.065	9
S2 cell/AM	0.414	± 0.198	9
S2 cell/OM	0.836	± 0.480	9
S2 cell/CCCP	0.936	± 0.573	9
BG2-c2 cell/DMSO	0.992	± 0.206	9
BG2-c2 cell/AM	1.742	± 0.469	9
BG2-c2 cell/OM	1.586	± 0.580	9
BG2-c2 cell/CCCP	3.017	± 1.293	9

平均値 ± 95% CI.

Statistical test: ANOVA followed by Dunnet's test

F (3, 32) = 3.099, p = 0.040 (S2 cells), F (3, 32) = 8.816, p &lt; .001 (BG2-c2 cells)

図17B	P/Total (AU)	N	P
Control	2.908	± 0.259	5
Prel O/E	4.768	± 0.681	5

平均値 ± 95% CI.

Statistical test: Welch's t-test.

図17C	P/Total (AU)	N	P
Control	2.209	± 0.094	19
Prel O/E + <i>mCherry KD</i>	3.011	± 0.266	19
<i>Perk[GL]</i>	1.849	± 0.188	19
Prel O/E + <i>Perk[GL]</i>	2.056	± 0.253	19

Control versus Prel O/E + *mCherry KD* < .001Control versus *Perk[GL]* 0.066Control versus Prel O/E + *Perk[GL]* 0.711Prel O/E + *mCherry KD* versus *Perk[GL]* < .001Prel O/E + *mCherry KD* versus Prel O/E + *Perk[GL]* < .001*Perk[GL]* versus Prel O/E + *Perk KD* 0.473

平均値 ± 95% CI.

Statistical test: ANOVA (F (3, 72) = 25.24, p &lt; .001 followed by Turkey's HSD test.

Table 1. Statistics.

## 図18 Prel過剰発現はClass IVにおいて顕著に新規タンパク質合成を阻害する

図18B	CHX	Intensity (AU)	N	P
0 h	-	209.9	$\pm$ 47.9	8
6 h	-	486.9	$\pm$ 93.0	9
0 h	+	136.8	$\pm$ 34.1	6
6 h	+	131.8	$\pm$ 29.0	8
平均値 $\pm$ 95% CI.				

Statistical test: Welch's t-test.

図18C	Fluorescent intensity (AU)	N	P
Class IV (early L1)	497.9 $\pm$ 165.4	7	
Class I (early L1)	553.6 $\pm$ 156.5	7	
Class III (early L1)	400.6 $\pm$ 166.5	7	
Class IV versus class I (early L1)			0.837
Class IV versus class III (early L1)			0.587
Class I versus class III (early L1)			0.283
Class IV (early L3)	512.5 $\pm$ 50.9	10	
Class I (early L3)	449.9 $\pm$ 43.6	10	
Class III (early L3)	615.2 $\pm$ 91.2	10	
Class IV versus class I (early L3)			0.340
Class IV versus class III (early L3)			0.066
Class I versus class III (early L3)			0.002

平均値  $\pm$  95% CI.Statistical test: ANOVA ( $F(2, 18) = 1.264$ ,  $p = 0.306$  (early L1);F (2, 27) = 7.287,  $p < .001$  (early L3) followed by the post hoc Tukey-Kramer test.

Table 1. Statistics.

## 図18 Prel過剰発現はClass IVにおいて顕著に新規タンパク質合成を阻害する

図18H (Class IV)	Fluorescent intensity (AU)	N	P
Control	547.9 ± 73.2	23	
Prel O/E	227.8 ± 69.3	30	
dPPP1R15 O/E	609.7 ± 77.9	27	
Prel + dPPP1R15 O/E	483.5 ± 108.7	26	
Control versus Pre O/E			<.001
Control versus dPPP1515			0.725
Control versus Prel + dPPP1R15 O/E			0.705
Pre O/E versus dPPP1R15 O/E			<.001
Pre O/E versus Prel + dPPP1R15 O/E			<.001
dPPP1R15 O/E versus Prel + dPPP1R15 O/E			0.131
図18H (Class I)	Fluorescent intensity (AU)	N	P
Control	593.8 ± 76.2	23	
Prel O/E	470.7 ± 82.5	30	
dPPP1R15 O/E	588.5 ± 47.9	27	
Prel + dPPP1R15 O/E	608.9 ± 88.6	26	
Control versus Pre O/E			0.071
Control versus dPPP1515			1.000
Control versus Prel + dPPP1R15 O/E			0.993
Pre O/E versus dPPP1R15 O/E			0.070
Pre O/E versus Prel + dPPP1R15 O/E			0.027
dPPP1R15 O/E versus Prel + dPPP1R15 O/E			0.980
図18H (Class III)	Fluorescent intensity (AU)	N	P
Control	754.7 ± 157.2	23	
Prel O/E	553.2 ± 95.4	30	
dPPP1R15 O/E	707.6 ± 102.5	27	
Prel + dPPP1R15 O/E	652.8 ± 144.1	26	
Control versus Pre O/E			0.070
Control versus dPPP1515			0.950
Control versus Prel + dPPP1R15 O/E			0.659
Pre O/E versus dPPP1R15 O/E			0.191
Pre O/E versus Prel + dPPP1R15 O/E			0.551
dPPP1R15 O/E versus Prel + dPPP1R15 O/E			0.917

平均値 ± 95% CI.

Statistical test: ANOVA ( $F(3, 103) = 19.49$ ,  $p < .001$  (Class IV);  $3.607$ ,  $p = 0.016$  (Class I);  $2.388$ ,  $p = 0.073$  (Class III) followed by Tukey's HSD test.

図18I	Fluorescence intensity (AU)	N	P
Control (0 h)	1617 ± 398	9	
Control (6 h)	1472 ± 234	9	0.492
Prel O/E (0 h)	1224 ± 389	7	
Prel O/E (6 h)	1308 ± 402	9	0.735

平均値 ± 95% CI.

Statistical test: Welch's t-test.

Table 1. Statistics.

## 図20. Prel過剰発現はdaニューロンにおいてUPRのIre1経路を活性化する

図20G	Fluorescent intensity (AU)	N	P
Control (Class IV)	35.71 ± 7.68	21	
Prel O/E (Class IV)	27.13 ± 5.90	24	0.214
Control (Class I)	1.57 ± 2.73	21	
Prel O/E (Class I)	6.92 ± 3.39	24	<.001
Control (Class III)	1.05 ± 3.31	21	
Prel O/E (Class III)	39.17 ± 8.90	23	<.001

平均値 ± 95% CI. Statistical test: Welch's t-test.

図20H (Class IV)	Stages	XBP1 (+) cells	Total	P
Wildtype	early L1	17	41	
Prel O/E	early L1	13	41	0.492
Wildtype	early L2	19	21	
Prel O/E	early L2	21	24	1.000
Wildtype	late L3	0	27	
Prel O/E	late L3	4	23	0.038

Statistical test: Fisher's exact test for count data.

図20H (Class I)	Stages	XBP1 (+) cells	Total	P
Wildtype	early L1	0	41	
Prel O/E	early L1	0	41	1.000
Wildtype	early L2	1	21	
Prel O/E	early L2	8	24	0.025
Wildtype	late L3	3	27	
Prel O/E	late L3	9	23	0.044

Statistical test: Fisher's exact test for count data.

図20H (Class III)	Stages	XBP1 (+) cells	Total	P
Wildtype	early L1	0	41	
Prel O/E	early L1	1	41	1.000
Wildtype	early L2	3	21	
Prel O/E	early L2	19	23	<.001
Wildtype	late L3	1	27	
Prel O/E	late L3	10	23	0.001

Statistical test: Fisher's exact test for count data.

Table 1. Statistics.

図21. eIF2alphaリン酸化の上昇は、ミトコンドリア異常を導く様々な操作による樹状突起喪失に共通したメカニズムである

図20B	2DG	FRET/CFP ratio	N	P
Control	-	2.566	$\pm 0.110$	6
Control	+	2.218	$\pm 0.078$	6
OPA1 O/E	-	2.508	$\pm 0.095$	6
OPA1 O/E	+	1.732	$\pm 0.150$	5
OPA1[K273A]	-	2.315	$\pm 0.416$	6
OPA1[K273A]	+	1.787	$\pm 0.290$	9
Ttm50 O/E	-	2.614	$\pm 0.174$	6
Ttm50 O/E	+	1.773	$\pm 0.268$	9

平均値  $\pm$  95% CI.

Statistical test: Welch's t-test.

図20I	Dendritic Length (μm)	N	P
Control	19118 $\pm$ 1703	7	
Prel OE	3659 $\pm$ 983	8	<.001
OPA1 OE	12183 $\pm$ 949	9	<.001
OPA1[K273A]	7578 $\pm$ 1775	9	<.001
Ttm50 OE	5915 $\pm$ 515	9	<.001

平均値  $\pm$  95% CI.

Statistical test: ANOVA ( $F(4, 37) = 113.1$ ,  $p < .001$ ) followed by Dunnet's test.

図20J	Dendritic Length (μm)	N	P
OPA1 O/E	12811 $\pm$ 1378	6	
OPE1 + dPPP1R15	16714 $\pm$ 3353	5	0.037
OPA1[K273A]	8199 $\pm$ 2494	7	
OPA1[K273A] + dPPP1R15	13803 $\pm$ 4987	7	0.042
Ttm50	5558 $\pm$ 672	7	
Ttm50 + dPPP1R15	12867 $\pm$ 1240	8	< .001

平均値  $\pm$  95% CI.

Statistical test: Welch's t-test.

図20K	P/Total	N	P
Control	2.986 $\pm$ 0.374	8	
Opa1 O/E	3.840 $\pm$ 0.920	8	0.266
Ttm50 O/E	4.852 $\pm$ 0.1.312	8	0.008

平均値  $\pm$  95% CI.

Statistical test: ANOVA followed by Dunnet's test.

$F(2, 21) = 5.142$ ,  $p = 0.015$ .

Table 1. Statistics.

図21. eIF2alphaリン酸化の上昇は、ミトコンドリア異常を導く様々な操作による樹状突起喪失に共通したメカニズムである

図20L	FRET/CFP ratio	N	P
Control (early L1)	1.902 ± 0.103	11	
OPA1 O/E (early L1)	1.899 ± 0.103	10	1
OPA1[K273A] (early L1)	1.804 ± 0.108	11	0.355
Ttm50 (early L1)	1.969 ± 0.124	10	0.658
Control (early L2)	2.371 ± 0.105	10	
OPA1 O/E (early L2)	2.363 ± 0.157	12	1
OPA1[K273A] (early L2)	2.398 ± 0.100	10	0.97
Ttm50 (early L2)	2.636 ± 0.068	12	0.002
Control (early L3)	2.718 ± 0.065	14	
OPA1 O/E (early L3)	2.581 ± 0.093	10	0.095
OPA1[K273A] (early L3)	2.594 ± 0.094	10	0.146
Ttm50 (early L3)	2.898 ± 0.146	11	0.017

平均値 ± 95% CI.

Statistical test: ANOVA followed by Dunnet's test.

$F(3, 38) = 1.911, p = 0.144$  (early L1);  $F(3, 40) = 6.696, p < .001$  (early L2);

$F(3, 41) = 9.712, p < .001$  (early L3).

図20M	Dendritic Length (μm)	N	P
Control	1394 ± 84	10	
Prel O/E	1171 ± 88	17	< .001
OPA1 O/E	1440 ± 82	10	0.871
OPA1[K273A]	1400 ± 74	11	1
Ttm50 O/E	1220 ± 93	13	0.018

平均値 ± 95% CI.

Statistical test: ANOVA ( $F(4, 56) = 9.385, p < .001$ ) followed by Dunnet's test.

図20N	Dendritic Length (μm)	N	P
Control	3170 ± 200	8	
Prel OE	2569 ± 309	8	0.002
OPA1 OE	3164 ± 313	8	1.000
OPA1[K273A]	2738 ± 138	8	0.027
Ttm50 OE	2205 ± 288	6	< .001

平均値 ± 95% CI.

Statistical test: ANOVA ( $F(4, 33) = 12.71, p < .001$ ) followed by Dunnet's test.

Table 1. Statistics.

図22. dPPP1R15共発現は、CoVa変異型あるいはTFAM過剰発現Class IV樹状突起形態を回復した

図22A	Dendritic Length (μm)	N	P
Control	13867 ± 819	7	
CoVa[tend]	11568 ± 1239	8	< .001

平均値 ± 95% CI.

Statistical test: Welch's t-test.

図22B	Dendritic Length (μm)	N	P
CoVa[tend]	12383 ± 881	10	
CoVa[tend] + dPPP1R15	15480 ± 1366	9	< .001

平均値 ± 95% CI.

Statistical test: Welch's t-test.

図22F	Dendritic Length (μm)	N	P
Control	19814 ± 852	18	
TFAM O/E	15736 ± 803	15	
TFAM + dPPP1R15 O/E	16932 ± 2857	20	
Control versus TFAM O/E			0.015
Control versus TFAM + dPPP1R15 O/E			0.091
TFAM O/E versus TFAM + dPPP1R15 O/E			0.065

平均値 ± 95% CI.

Statistical test: ANOVA (F (2, 49) = 4.572, p = 0.015, followed by Tukey-Kramer test).

図23. Class IVタンパク質合成のためのATP消費の総消費に対する比率は小さい

図23A	FRET/CFP decline	N	P
DMSO (6 min)	0.700 ± 0.411	10	
CHX (6 min)	1.007 ± 0.506	6	0.327
Ouabain (6 min)	0.158 ± 0.097	10	0.022
DMSO (10 min)	1.399 ± 0.226	10	
CHX (10 min)	1.531 ± 0.308	6	0.635
Ouabain (10 min)	0.763 ± 0.211	10	< .001

平均値 ± 95% CI.

Statistical test: ANOVA followed by Dunnet's test.

F (2, 23) = 7.666, p &lt; .001 (6 min); F (2, 23) = 15.38, p &lt; .001 (10 min).

図23B	FRET/CFP decline	N	P
DMSO (120 sec)	0.733 ± 0.111	41	
CHX (120 sec)	0.188 ± 0.089	36	< .001
Ouabain (120 sec)	0.475 ± 0.079	49	0.641
DMSO (180 sec)	0.968 ± 0.112	41	
CHX (180 sec)	0.514 ± 0.129	36	< .001
Ouabain (180 sec)	0.847 ± 0.100	49	0.204

平均値 ± 95% CI.

Statistical test: ANOVA followed by Dunnet's test.

F (2, 123) = 20.63, p &lt; .001 (120 sec); F (2, 123) = 16.1, p &lt; .001 (180 sec).

図23E	FRET/CFP ratio	N	P
Control	2.642 ± 0.098	8	
Prel + dPPP1R15	2.558 ± 0.098	13	0.192

平均値 ± 95% CI.

Statistical test: Welch's t-test.

Table 2. Genotypes.

Figure	Genotype	X chromosome	Second chromosome	Third chromosome
図4A-C		+/+	<i>Gal4[21-7], UAS-mCD8::GFP/+</i>	+/+
図4F-I		+/+	<i>ppk-CD4-tdGFP/+</i>	<i>MHC-mCherry/+</i>
図4JとK		+/+	<i>ppk-CD4-tdGFP/Cg-Gal4 UAS-myrmRFP</i>	
図4L		+/+	+/+	<i>Repo-Gal4 UAS-mCD8-GFP/ppk-CD4-tdTomato</i>
図5A	14 hr AEL	<i>NP1015, UAS-Venus::pm/+</i>	+/+	+/+
図5A	24/48 AEL	+/+	<i>Gal4<sup>109(2)80</sup>, ppk-CD4-tdGFP/+</i>	+/+
図5A	~120 hr AEL	<i>Gal4[5-40], SOP-FLP.42, UAS-Venus.pm</i>	<i>FRTG13, Gal4<sup>109(2)80</sup>/FRTG13</i>	+/+
図5BとK	Control	<i>Gal4[5-40], SOP-FLP.42, UAS-Venus.pm</i>	<i>FRTG13, Gal4<sup>109(2)80</sup>/FRTG13</i>	+/+
図5B	Control	<i>Gal4[5-40], SOP-FLP.42</i>	<i>FRTG13, Gal4<sup>109(2)80</sup>/FRTG13</i>	<i>UAS-mito-HA-GFP, UAS-myrmRFP/+</i>
図5CとK	<i>prel[1]</i>	<i>Gal4[5-40], SOP-FLP.42, UAS-Venus.pm</i>	<i>prel[1], FRTG13, Gal4<sup>109(2)80</sup>/prel[1], FRTG13</i>	+/+
図5C	<i>prel[1]</i>	<i>Gal4[5-40], SOP-FLP.42</i>	<i>prel[1], FRTG13, Gal4<sup>109(2)80</sup>/prel[1], FRTG13</i>	<i>UAS-mito-HA-GFP, UAS-myrmRFP/+</i>
図5K	Control	+	+/+	<i>ppk-Gal4, UAS-mCD8::GFP/+</i>
図5DとK	Prel O/E	<i>UAS-prel::3HA</i>	+/+	<i>ppk-Gal4, UAS-mCD8::GFP/+</i>
図5D	Prel O/E	<i>UAS-prel::3HA</i>	+/+	<i>ppk-Gal4, UAS-mito-HA-GFP, UAS-myrmRFP/+</i>
図5EとL	Control	<i>Gal4[5-40], SOP-FLP.42, UAS-Venus.pm</i>	<i>FRTG13, Gal4<sup>109(2)80</sup>/FRTG13</i>	+/+
図5E	Control	<i>Gal4[5-40], SOP-FLP.42</i>	<i>FRTG13, Gal4<sup>109(2)80</sup>/FRTG13</i>	<i>UAS-mito-HA-GFP, UAS-myrmRFP/+</i>
図5FとL	<i>prel[1]</i>	<i>Gal4[5-40], SOP-FLP.42, UAS-Venus.pm</i>	<i>prel[1], FRTG13, Gal4<sup>109(2)80</sup>/prel[1], FRTG13</i>	+/+
図5F	<i>prel[1]</i>	<i>Gal4[5-40], SOP-FLP.42</i>	<i>prel[1], FRTG13, Gal4<sup>109(2)80</sup>/prel[1], FRTG13</i>	<i>UAS-mito-HA-GFP, UAS-myrmRFP/+</i>
図5L	Control	+	+/+	<i>Gal4[2-21], UAS-mCD8::GFP/+</i>
図5GとL	Prel O/E	<i>UAS-prel::3HA</i>	+/+	<i>Gal4[2-21], UAS-mCD8::GFP/+</i>
図5G	Prel O/E	<i>UAS-prel::3HA</i>	+/+	<i>Gal4[2-21], UAS-mito-HA-GFP, UAS-myrmRFP/+</i>

Table 2. Genotypes.

Figure	Genotype	X chromosome	Second chromosome	Third chromosome
図5HとM	Control	<i>Gal4[5-40], SOP-FLP.42, UAS-Venus.pm</i>	<i>FRTG13,</i> <i>Gal4<sup>109(2)80</sup>/FRTG13</i>	<i>+/+</i>
図5H	Wildtype	<i>Gal4[5-40], SOP-FLP.42</i>	<i>FRTG13,</i> <i>Gal4<sup>109(2)80</sup>/FRTG13</i>	<i>UAS-mito-HA-GFP,</i> <i>UAS-myrmRFP/+</i>
図5IとM	<i>prel[1]</i>	<i>Gal4[5-40], SOP-FLP.42, UAS-Venus.pm</i>	<i>prel[1], FRTG13,</i> <i>Gal4<sup>109(2)80</sup>/prel[1],</i> <i>FRTG13</i>	<i>+/+</i>
図5I	<i>prel[1]</i>	<i>Gal4[5-40], SOP-FLP.42</i>	<i>prel[1], FRTG13,</i> <i>Gal4<sup>109(2)80</sup>/prel[1],</i> <i>FRTG13</i>	<i>UAS-mito-HA-GFP,</i> <i>UAS-myrmRFP/+</i>
図5M	Control	+	<i>+/+</i>	<i>Gal4[c161], UAS-mCD8::GFP/+</i>
図5JとM	Prel O/E	<i>UAS-prel::3HA</i>	<i>+/+</i>	<i>Gal4[c161], UAS-mCD8::GFP/+</i>
図5J	Prel O/E	<i>UAS-prel::3HA</i>	<i>+/+</i>	<i>Gal4[c161], UAS-mito-HA-GFP, UAS-myrmRFP/+</i>
図6A	<i>NP3275</i>	+	<i>ND-B17[NP3275]/+</i>	<i>UAS-mito-HA-GFP,</i> <i>UAS-myrmRFP/+</i>
図6B	<i>NP2344</i>	+	<i>CoVb[NP2344]/+</i>	<i>UAS-mito-HA-GFP,</i> <i>UAS-myrmRFP/+</i>
図6C	<i>NP2718</i>	+	<i>blw[NP2718]/+</i>	<i>UAS-mito-HA-GFP,</i> <i>UAS-myrmRFP/+</i>
図6D	<i>NP2635</i>	+	<i>+/+</i>	<i>UAS-mito-HA-GFP,</i> <i>UAS-myrmRFP/PyK[NP2635]</i>
図6E	<i>NP0607</i>	+	<i>+/+</i>	<i>UAS-mito-HA-GFP,</i> <i>UAS-myrmRFP/NC73-EF[NP0607]</i>
図6F	<i>NP5107</i>	<i>kdn[NP5107]</i>	<i>+/+</i>	<i>UAS-mito-HA-GFP,</i> <i>UAS-myrmRFP/+</i>
図6G	<i>NP6120</i>	<i>HecA[NP6120]</i>	<i>+/+</i>	<i>UAS-mito-HA-GFP,</i> <i>UAS-myrmRFP/+</i>
図6H	<i>NP3500</i>	<i>GAPDH2[NP3500]</i>	<i>+/+</i>	<i>UAS-mito-HA-GFP,</i> <i>UAS-myrmRFP/+</i>
図6I	<i>NP2353</i>	+	<i>Eno[NP2353]/+</i>	<i>UAS-mito-HA-GFP,</i> <i>UAS-myrmRFP/+</i>
図6J	<i>Ubi-Gal4</i>	+	<i>Ubi-Gal4.U/+</i>	<i>UAS-mito-HA-GFP,</i> <i>UAS-myrmRFP/+</i>
図6K	<i>NP2316</i>	+	<i>blw[NP2316]/+</i>	<i>UAS-mito-HA-GFP,</i> <i>UAS-myrmRFP/+</i>
図8A-C		+	<i>Gal4<sup>109(2)80</sup>, UAS-ATeam1.03[NL]/+</i>	<i>+/+</i>
図9A-C		+	<i>Ubi-Gal4.U, UAS-ATeam1.03[NL]/+</i>	<i>+/+</i>
図9D		+	<i>Ubi-Gal4.U, UAS-ATeam1.03[RKRK]/+</i>	<i>+/+</i>
図9E-H		+	<i>+/+</i>	<i>Gal4-Mef2.R, UAS-Ateam[NL]/+</i>

Table 2. Genotypes.

Figure	Genotype	X chromosome	Second chromosome	Third chromosome
図10A	AT[NL]	+	<i>Gal4<sup>109(2)80</sup>, UAS-ATeam1.03[NL]/+</i>	+/+
図10A	AT[RK]	+	<i>Gal4<sup>109(2)80</sup>, UAS-ATeam1.03[RKRK]/+</i>	+/+
図10B-E	AT[NL]	+	<i>Gal4<sup>109(2)80</sup>, UAS-ATeam1.03[NL]/Gal4[2-1-7]</i>	<i>UAS-ATeam1.03[NL]/+</i>
図11BとG	Control	+	<i>Gal4<sup>109(2)80</sup>, UAS-ATeam1.03[NL]/+</i>	+/+
図11BとG	Prel O/E	<i>UAS-prel::3HA</i>	<i>Gal4<sup>109(2)80</sup>, UAS-ATeam1.03[NL]/+</i>	+/+
図11BとG	mCherry-CAAX	+	<i>Gal4<sup>109(2)80</sup>, UAS-ATeam1.03[NL]/+</i>	<i>UAS-mCherry-CAAX/</i>
図11C	Control	+	<i>Gal4<sup>109(2)80</sup>, UAS-ATeam1.03[RKRK]/+</i>	+/+
図11C	Prel O/E	<i>UAS-prel::3HA</i>	<i>Gal4<sup>109(2)80</sup>, UAS-ATeam1.03[RKRK]/+</i>	+/+
図11D	Control	+	<i>Gal4<sup>109(2)80</sup>, UAS-ATeam1.03[NL]/+</i>	+/+
図11D	Prel O/E	<i>UAS-prel::3HA</i>	<i>Gal4<sup>109(2)80</sup>, UAS-ATeam1.03[NL]/+</i>	+/+
図11E	Control	<i>Gal4[5-40], SOP-FLP.42</i>	<i>FRTG13, Gal4<sup>109(2)80</sup>/FRTG13</i>	<i>tubP-Gal4.LL7, UAS-ATeam1.03[NL]/</i>
図11E	prel[1]	<i>Gal4[5-40], SOP-FLP.42</i>	<i>prel[1], FRTG13, Gal4<sup>109(2)80</sup>/prel[1], FRTG13</i>	<i>tubP-Gal4.LL7, UAS-ATeam1.03[NL]/</i>
図11F	Control	+	<i>ppk-Gal4, UAS-AT1.03[NL]/</i>	
図11F	Prel O/E	<i>UAS-prel::3HA</i>	<i>ppk-Gal4, UAS-AT1.03[NL]/</i>	
図12A、C、E、F、H	Wildtype	Wildtype	<i>Gal4<sup>109(2)80</sup>, ppk-CD4-tdGFP/+</i>	+/+
図12B、D、E、G、H	Prel O/E	<i>UAS-prel::3HA</i>	<i>Gal4<sup>109(2)80</sup>, ppk-CD4-tdGFP/+</i>	+/+
図13A	Control	+	<i>Gal4<sup>109(2)80</sup>, UAS-ATeam1.03[NL]/</i>	+/+
図13A	Prel O/E	<i>UAS-prel::3HA</i>	<i>Gal4<sup>109(2)80</sup>, UAS-ATeam1.03[NL]/</i>	+/+
図13B、D	Control	+	<i>Gal4<sup>109(2)80</sup>, UAS-myrmRFP/+</i>	+/+
図13BとC	Prel O/E	<i>UAS-prel::3HA</i>	<i>Gal4<sup>109(2)80</sup>, UAS-myrmRFP/+</i>	+/+
図13E		+/+	+/+	<i>Repo-Gal4, UAS-myrmRFP/+</i>
図14A-C、FとG	Control	+	<i>Gal4<sup>109(2)80</sup>, UAS-ATeam1.03[NL]/</i>	+/+

Table 2. Genotypes.

Figure	Genotype	X chromosome	Second chromosome	Third chromosome
図14A-C、FとG	Prel O/E	<i>UAS-prel::3HA</i>	<i>Gal4<sup>109(2)80</sup></i> , <i>UAS-ATeam1.03[NL]/+</i>	+/+
図14D、E	Control	<i>Gal4[5-40], SOP-FLP.42</i>	<i>FRTG13</i> , <i>Gal4<sup>109(2)80</sup>/FRTG13</i>	<i>tubP-Gal4.LL7, UAS-ATeam1.03[NL]/+</i>
図14D、E	<i>prel[1]</i>	<i>Gal4[5-40], SOP-FLP.42</i>	<i>prel[1], FRTG13</i> , <i>Gal4<sup>109(2)80</sup>/prel[1], FRTG13</i>	<i>tubP-Gal4.LL7, UAS-ATeam1.03[NL]/+</i>
図15B	Prel O/E with mCherry::CAA X	<i>UAS-prel::3HA/+</i>	<i>Gal4<sup>109(2)80</sup>, ppk-CD4-tdGFP/+</i>	<i>UAS-mCherry-CAAX/+</i>
図15B	Prel O/E with SND1A[K57A]	<i>UAS-prel::3HA/+</i>	<i>Gal4<sup>109(2)80</sup>, ppk-CD4-tdGFP/+</i>	<i>UAS-SNF1A.K57A.3/+</i>
図15B	Prel O/E with p53[DN]	<i>UAS-prel::3HA/+</i>	<i>Gal4<sup>109(2)80</sup>, ppk-CD4-tdGFP/+</i>	<i>UAS-p53[H159N].Ex.3/+</i>
図15B	Prel O/E with bsk[DN]	<i>UAS-prel::3HA/UAS-bsk[DN].2</i>	<i>Gal4<sup>109(2)80</sup>, ppk-CD4-tdGFP/+</i>	+/+
図15B	Prel O/E with dSOD.A O/E	<i>UAS-prel::3HA/+</i>	<i>Gal4<sup>109(2)80</sup>, ppk-CD4-tdGFP/+</i>	<i>UAS-Sod.A.37/+</i>
図15B、C	Prel O/E with p35	<i>UAS-prel::3HA/+</i>	<i>Gal4<sup>109(2)80</sup>, ppk-CD4-tdGFP/+</i>	<i>UAS-p35.H/+</i>
図15D	Wildtype	+	<i>Gal4<sup>109(2)80</sup>, ppk-CD4-tdGFP/+</i>	+/+
図15D、E	Prel O/E + mCherry-CAAX	<i>UAS-prel::3HA/+</i>	<i>Gal4<sup>109(2)80</sup>, ppk-CD4-tdGFP/+</i>	<i>UAS-mCherry-CAAX/+</i>
図15D、F、G	Prel O/E + dPPP1R15	<i>UAS-prel::3HA/+</i>	<i>Gal4<sup>109(2)80</sup>, ppk-CD4-tdGFP/UAS-PPP1R15</i>	+/+
図15D	Prel O/E + S6k[STDETE]	<i>UAS-prel::3HA/+</i>	<i>Gal4<sup>109(2)80</sup>, ppk-CD4-tdGFP/UAS-S6k.STDETE</i>	+/+
図15J	Control	+	<i>Gal4-Hsp70.PB.2/+</i>	<i>UAS-mCherry-CAAX/+</i>
図15J	dPPP1R15 O/E	+	<i>Gal4-Hsp70.PB.2/UAS-PPP1R15</i>	+/+
図15K	<i>prel[1]</i>	<i>Gal4[5-40], SOP-FLP.42, UAS-Venus.pm</i>	<i>prel[1], FRTG13</i> , <i>Gal4<sup>109(2)80</sup>/prel[1], FRTG13</i>	<i>Gal4-elav.L.3E1/+</i>
図15K	<i>prel[1] + dPPP1R15</i>	<i>Gal4[5-40], SOP-FLP.42, UAS-Venus.pm</i>	<i>prel[1], FRTG13</i> , <i>Gal4<sup>109(2)80</sup>, UAS-dPPP1R15/prel[1], FRTG13, UAS-dPPP1R15</i>	<i>Gal4-elav.L.3E1/+</i>
図15L	Wildtype	+	<i>Gal4<sup>109(2)80</sup>, ppk-CD4-tdGFP/+</i>	+/+
図15L	dPPP1R15 O/E	+	<i>Gal4<sup>109(2)80</sup>, ppk-CD4-tdGFP/UAS-PPP1R15</i>	+/+
図15M	Control	+	<i>Gal4<sup>109(2)80</sup>, UAS-mito-HA-GFP/+</i>	+/+

Table 2. Genotypes.

Figure	Genotype	X chromosome	Second chromosome	Third chromosome
図15M	Prel O/E	+	<i>Gal4<sup>109(2)80</sup>, UAS-mito-HA-GFP/UAS-prel::3HA</i>	+/+
図15M	dPPP1R15 O/E	+	<i>Gal4<sup>109(2)80</sup>, UAS-mito-HA-GFP/UAS-PPP1R15</i>	+/+
図15M	Prel + dPPP1R15 O/E	+	<i>Gal4<sup>109(2)80</sup>, UAS-mito-HA-GFP/UAS-prel::3HA UAS-PPP1R15</i>	+/+
図16A	Prel O/E with <i>mCherry[KD]</i>	<i>UAS-prel::3HA/+</i>	<i>Gal4<sup>109(2)80</sup>, ppk-CD4-tdGFP/+</i>	<i>UAS-mCherry.VALIUM10/+</i>
図16A	Prel O/E with <i>Perk[GL]</i>	<i>UAS-prel::3HA/+</i>	<i>Gal4<sup>109(2)80</sup>, ppk-CD4-tdGFP/+</i>	<i>UAS-Perk-<i>RNAi.GL00030</i>/+</i>
図16A	Prel O/E with <i>Perk[KK]</i>	<i>UAS-prel::3HA/+</i>	<i>Gal4 109(2)80, ppk-CD4-tdGFP/UAS-Perk-<i>RNAi.KK100348</i></i>	+/+
図16A	Prel O/E with <i>Perk[GD]</i>	<i>UAS-prel::3HA/+</i>	<i>Gal4<sup>109(2)80</sup>, ppk-CD4-tdGFP/UAS-Perk-<i>RNAi.GD5584</i></i>	+/+
図16A	Prel O/E with <i>Perk[HMJ]</i>	<i>UAS-prel::3HA/+</i>	<i>Gal4<sup>109(2)80</sup>, ppk-CD4-tdGFP/UAS-Perk-<i>RNAi.HMJ02063</i></i>	+/+
図16A	Prel O/E with <i>GCN2[GL]</i>	<i>UAS-prel::3HA/+</i>	<i>Gal4<sup>109(2)80</sup>, ppk-CD4-tdGFP/+</i>	<i>UAS-Gen2-<i>RNAi.GL00267</i>/+</i>
図16A	Prel O/E with <i>GCN2[KK]</i>	<i>UAS-prel::3HA/+</i>	<i>Gal4<sup>109(2)80</sup>, ppk-CD4-tdGFP/UAS-Gen2-<i>RNAi.KK103566</i></i>	+/+
図16A	Prel O/E with <i>GCN2[GD]</i>	<i>UAS-prel::3HA/+</i>	<i>Gal4<sup>109(2)80</sup>, ppk-CD4-tdGFP/UAS-Gen2-<i>RNAi.GD9162</i></i>	+/+
図16A	Prel O/E with <i>Thor[GL]</i>	<i>UAS-prel::3HA/+</i>	<i>Gal4<sup>109(2)80</sup>, ppk-CD4-tdGFP/+</i>	<i>UAS-Thor-<i>RNAi.GL01034</i>/+</i>
図16A	Prel O/E with <i>Thor[HMS]</i>	<i>UAS-prel::3HA/+</i>	<i>Gal4<sup>109(2)80</sup>, ppk-CD4-tdGFP/UAS-Thor-<i>RNAi.HMS01555</i></i>	+/+
図16B	<i>mCherry[KD]</i>	+	<i>Gal4<sup>109(2)80</sup>, ppk-CD4-tdGFP/+</i>	<i>UAS-mCherry.VALIUM10/+</i>
図16B	<i>Perk[GL]</i>	+	<i>Gal4<sup>109(2)80</sup>, ppk-CD4-tdGFP/+</i>	<i>UAS-Perk-<i>RNAi.GL00030</i>/+</i>
図16B	<i>Perk[KK]</i>	+	<i>Gal4<sup>109(2)80</sup>, ppk-CD4-tdGFP/UAS-Perk-<i>RNAi.KK100348</i></i>	+/+
図16B	<i>Perk[GD]</i>	+	<i>Gal4<sup>109(2)80</sup>, ppk-CD4-tdGFP/UAS-Perk-<i>RNAi.GD5584</i></i>	+/+
図16B	<i>Perk[HMJ]</i>	+	<i>Gal4<sup>109(2)80</sup>, ppk-CD4-tdGFP/UAS-Perk-<i>RNAi.HMJ02063</i></i>	+/+

Table 2. Genotypes.

Figure	Genotype	X chromosome	Second chromosome	Third chromosome
図16C	Control	+	+/+	<i>ppk-Gal4, UAS-mCD8::GFP/+</i>
図16C	dPERK O/E	+	+/+	<i>ppk-Gal4, UAS-mCD8::GFP/UAS-PERK</i>
図17B	Control	+/+	+/+	<i>Gla4-Hsp70.PB.89-2-1/UAS-mCherry-CAAX</i>
図17B	Prel O/E	<i>UAS-prel::3HA/+</i>	<i>UAS-prel::3HA/+</i>	<i>Gla4-Hsp70.PB.89-2-1/+</i>
図17C	Control	+/+	+/+	<i>Gla4-Hsp70.PB.89-2-1/UAS-mCherry-CAAX</i>
図17C, D	Prel O/E	+/+	<i>UAS-prel::3HA/+</i>	<i>Gla4-Hsp70.PB.89-2-1/UAS-mCherry.VALIUM10</i>
図17C	<i>Perk[GL]</i>	+/+	+/+	<i>Gla4-Hsp70.PB.89-2-1/UAS-Perk-RNAi.GL00030</i>
図17C, D	Prel O/E with <i>Perk[GL]</i>	+/+	<i>UAS-prel::3HA/+</i>	<i>Gla4-Hsp70.PB.89-2-1/UAS-Perk-RNAi.GL00030</i>
図18B		+	<i>Gal4<sup>109(2)80</sup>/+</i>	<i>UAS-Kaede/+</i>
図18C	<i>Gal4[21-7] &gt; mCD8::GFP</i>	+	<i>Gal4[21-7]/UAS-mCD8::GFP</i>	+/+
図18D, E, H, and I	Control	+	<i>Gal4[21-7]/+</i>	<i>UAS-Kaede/UAS-mCherry-CAAX</i>
図18F, H, and I	Prel O/E	<i>UAS-prel::3HA</i>	<i>Gal4[21-7]/+</i>	<i>UAS-Kaede/+</i>
図18 H	dPPP1R15 O/E	+	<i>Gal4[21-7]/UAS-PPP1R15</i>	<i>UAS-Kaede/+</i>
図18 G and H	Prel + dPPP1R15 O/E	<i>UAS-prel::3HA</i>	<i>Gal4[21-7]/UAS-PPP1R15</i>	<i>UAS-Kaede/+</i>
図20A-C, G, H, I	Wildtype	+	<i>Gal4[21-7]/+</i>	<i>UAS-mCherry-CAAX, UAS-XBP1-EGFP/+</i>
図20-F, G, H	Prel O/E	<i>UAS-prel::3HA</i>	<i>Gal4[21-7]/+</i>	<i>UAS-mCherry-CAAX, UAS-XBP1-EGFP/+</i>
図21A	Control	+	<i>Gal4<sup>109(2)80</sup>, UAS-mito-HA-GFP/+</i>	+/+
図21A	Opa1 O/E	+	<i>Gal4<sup>109(2)80</sup>, UAS-mito-HA-GFP/UAS-dOpa1::3HA</i>	+/+
図21A	Opa1[K273A]	+	<i>Gal4<sup>109(2)80</sup>, UAS-mito-HA-GFP/+</i>	<i>UAS-dOpa1[K273A]:3HA/+</i>
図21A	Ttm50 O/E	+	<i>Gal4<sup>109(2)80</sup>, UAS-mito-HA-GFP/+</i>	<i>UAS-Ttm50.2/+</i>
図21	Control	+	<i>Gal4<sup>109(2)80</sup>, UAS-mito-HA-GFP/+</i>	+/+

Table 2. Genotypes.

Figure	Genotype	X chromosome	Second chromosome	Third chromosome
図21C、I	Opa1 O/E	+	<i>Gal4<sup>109(2)80</sup>, ppk-CD4-tdGFP/UAS-dOpa1::3HA</i>	+/+
図21D、I	Opa1[K273A]	+	<i>Gal4<sup>109(2)80</sup>, ppk-CD4-tdGFP/+</i>	<i>UAS-dOpa1[K273A]::3HA/+</i>
図21E、I	Ttm50 O/E	+	<i>Gal4<sup>109(2)80</sup>, ppk-CD4-tdGFP/+</i>	<i>UAS-Ttm50.2/+</i>
図21J	Opa1 O/E	+	<i>Gal4<sup>109(2)80</sup>, ppk-CD4-tdGFP/UAS-dOpa1::3HA</i>	<i>UAS-mCherry-CAAX/+</i>
図21F、J	Opa1 + dPPP1R15 O/E	+	<i>Gal4<sup>109(2)80</sup>, ppk-CD4-tdGFP/UAS-dOpa1::3HA UAS-PPP1R15</i>	+/+
図21J	Opa1[K273A]	+	<i>Gal4<sup>109(2)80</sup>, ppk-CD4-tdGFP/+</i>	<i>UAS-dOpa1[K273A]::3HA/UAS-mCherry-CAAX</i>
図21G、J	Opa1[K273A] + dPPP1R15	+	<i>Gal4<sup>109(2)80</sup>, ppk-CD4-tdGFP/UAS-PPP1R15</i>	<i>UAS-dOpa1[K273A]::3HA/+</i>
図21J	Ttm50 O/E	+	<i>Gal4<sup>109(2)80</sup>, ppk-CD4-tdGFP/+</i>	<i>UAS-Ttm50.2/UAS-mCherry-CAAX</i>
図21H、J	Ttm50 + dPPP1R15 O/E	+	<i>Gal4<sup>109(2)80</sup>, ppk-CD4-tdGFP/UAS-PPP1R15</i>	<i>UAS-Ttm50.2/+</i>
図21K	Control	+/+	+/+	<i>Gla4-Hsp70.PB.89-2-1/UAS-mCherry-CAAX</i>
図21K	Opa1 O/E	+/+	<i>UAS-dOpa1::3HA/+</i>	<i>Gla4-Hsp70.PB.89-2-1/+</i>
図21K	Ttm50 O/E	+/+	+/+	<i>Gla4-Hsp70.PB.89-2-1/UAS-Ttm50.2</i>
図21L	Control	+	<i>Gal4<sup>109(2)80</sup>, UAS-ATeam1.03[NL]/+</i>	+/+
図21L	Opa1 O/E	+	<i>Gal4<sup>109(2)80</sup>, UAS-ATeam1.03[NL]/UAS-dOpa1::3HA</i>	+/+
図21L	Opa1[K273A]	+	<i>Gal4<sup>109(2)80</sup>, UAS-ATeam1.03[NL]/+</i>	<i>UAS-dOpa1[K273A]::3HA/+</i>
図21L	Ttm50 O/E	+	<i>Gal4<sup>109(2)80</sup>, UAS-ATeam1.03[NL]/+</i>	<i>UAS-Ttm50.2/+</i>
図21M	Control (Class I)	+	+/+	<i>Gal4[2-21], UAS-mCD8::GFP/+</i>
図21M	Prel O/E (Class I)	<i>UAS-prel::3HA</i>	+/+	<i>Gal4[2-21], UAS-mCD8::GFP/+</i>
図21M	Opa1 O/E (Class I)	+	<i>UAS-dOpa1::3HA/+</i>	<i>Gal4[2-21], UAS-mCD8::GFP/+</i>
図21M	Opa1[K273A] (Class I)	+	+/+	<i>Gal4[2-21], UAS-mCD8::GFP/UAS-dOpa1[K273A]::3HA</i>
図21M	Ttm50 O/E (Class I)	+	+/+	<i>Gal4[2-21], UAS-mCD8::GFP/UAS-Ttm50.2</i>

Table 2. Genotypes.

Figure	Genotype	X chromosome	Second chromosome	Third chromosome
図21N	Control (Class III)	+	+/+	<i>Gal4[c161], UAS-mCD8::GFP/+</i>
図21N	Prel O/E (Class III)	<i>UAS-prel::3HA</i>	+/+	<i>Gal4[c161], UAS-mCD8::GFP/+</i>
図21N	Opa1 O/E (Class III)	+	<i>UAS-dOpa1::3HA/+</i>	<i>Gal4[c161], UAS-mCD8::GFP/+</i>
図21N	Opa1[K273A] (Class III)	+	+/+	<i>Gal4[c161], UAS-mCD8::GFP/UAS-dOpa1[K273A]::3HA</i>
図21N	Ttm50 O/E (Class III)	+	+/+	<i>Gal4[c161], UAS-mCD8::GFP/UAS-Ttm50.2</i>
図22A	Control	<i>Gal4[5-40], SOP-FLP.42, UAS-Venus.pm</i>	+/+	<i>FRTG82B/FRTG82B</i>
図22A	<i>CoVa[tenured]</i>	<i>Gal4[5-40], SOP-FLP.42, UAS-Venus.pm</i>	+/+	<i>CoVe[tenured], FRT82B/CoVe[tenured], FRT82B</i>
図22B	<i>CoVa[tenured]</i>	<i>Gal4[5-40], SOP-FLP.42, UAS-Venus.pm</i>	<i>Gal4<sup>109(2)80</sup>/+</i>	<i>CoVe[tenured], FRT82B/CoVe[tenured], FRT82B</i>
図22B	<i>CoVa[tenured]</i> + dPPP1R15 O/E	<i>Gal4[5-40], SOP-FLP.42, UAS-Venus.pm</i>	<i>Gal4<sup>109(2)80</sup>, UAS-PPP1R15/+</i>	<i>CoVe[tenured], FRT82B/CoVe[tenured], FRT82B</i>
図22C, F	Control	+	<i>Gal4<sup>109(2)80</sup>, ppk-CD4-tdGFP/+</i>	
図22D, F	TFAM O/E	+	<i>Gal4<sup>109(2)80</sup>, ppk-CD4-tdGFP/+</i>	<i>UAS-mCherry-CAAX/+</i>
図22E, F	TFAM + dPPP1R15 O/E	+	<i>Gal4<sup>109(2)80</sup>, ppk-CD4-tdGFP, UAS-dPPP1R15/+</i>	
図23A, B	<i>Gal109 &gt; AT[NL]</i>	+	<i>Gal4<sup>109(2)80</sup>, UAS-ATeam1.03[NL]/+</i>	+/+
図23E	Wildtype	+	<i>Gal4<sup>109(2)80</sup>, UAS-ATeam1.03[NL]/+</i>	+/+
図23E	Prel + PPP1R15 O/E	+	<i>Gal4<sup>109(2)80</sup>, UAS-ATeam1.03[NL]/UAS-PPP1R15, UAS-prel::3HA</i>	+/+