

# 2021 年臺灣國際科學展覽會 優勝作品專輯

作品編號 050018

參展科別 動物學

作品名稱 探討果蠅腦部神經突導向的基因調控

得獎獎項 大會獎 三等獎

美國 ISEF 正選代表

就讀學校 國立臺灣師範大學附屬高級中學

指導教師 林書葦、葉文珊

作者姓名 陳映儒

關鍵詞 果蠅、神經突、基因調控

## 作者簡介



我是師大附中數理資優班高二生陳映儒，在高一有幸獲選中央研究院生命科學人才培育計畫，同時進入中研院分子生物所林書葦老師的實驗室團隊學習。我喜歡未知帶來的挑戰，躍躍欲試解開科學的謎。以前我無法體會 practice makes perfect，透過在實驗室與小小果蠅相處的晨昏中，我終於領悟到了這個真諦。我期許在國際科展，能與各地有潛力的科學同好交流分享，切磋琢磨。

## 摘要

本研究利用 RNA 干擾與基因過度表現兩種方法，觀察基因表現對果蠅蕈狀體神經突導向的影響。我們以 RNA 干擾方式降低基因表現，標定 *dally*、*octβ2r*、*sifr* 與 *frazzled* 基因；而基因過度表現則選定 *frazzled* 基因。利用果蠅 GAL4-UAS 系統使神經細胞表現的綠色螢光蛋白，觀察神經突導向情形。由干擾果蠅腦部蕈狀體 PPL1- $\alpha'2\alpha2$  神經細胞上述基因，觀察到 *dally*、*octβ2r* 基因在降低表現後，此細胞分別呈現失去神經支配與異常神經支配。*sifr* 基因在兩種不同 RNA 干擾序列下，表現出不同之結果，一是和 wild type 的神經突型態相似、另一則是失去神經支配。*frazzled* 基因干擾後，細胞在蕈狀體  $\alpha2$  區失去神經支配。*frazzled* 基因在過度表現下，神經突和 wild type 相比，出現異常導向。綜言之，由我們研究發現透過操控基因表現，果蠅腦部神經突會產生異常的導向與神經支配，顯示果蠅腦部神經系統在分化或發育上，基因扮演極為重要的角色。

## Abstract

This study aimed to observe the genetic involvement in the neurite (including axons and dendrites) outgrowth guidance in *Drosophila* mushroom bodies by using two genetic manipulation techniques, i.e. RNA interference (RNAi) and gene overexpression. The genes that were chosen in this study for RNAi treatment included *dally*, *octβ2r*, *sifr*, and *frazzled* whereas the overexpression targeted the *frazzled* gene. We adopted the GAL4-UAS system to detect the expression of green fluorescence protein so that the neurite outgrowth patterns could be observed. The knockdown of *dally* and *octβ2r* genes by RNAi of PPL1- $\alpha'2\alpha2$  cells in the mushroom bodies, the neurons showed a feature of lost innervation and ectopic innervation in comparison to wild-types. When RNAi was targeted at *sifr* gene by using two separate interference

sequences, two features were observed respectively: the resemblance of wild type and lost innervation, suggesting different RNAi sequences resulted in dissimilar results. Regarding *frazzled* gene, the RNAi knockdown caused loss of innervation of axons to the mushroom body  $\alpha 2$  zone. When we further examined the impact of overexpression of *frazzled* gene on neurite outgrowth guidance, we also observed an abnormal pattern of neurite outgrowth compared to wild type neurons. In summary, by applying the genetic techniques, we found that alterations in gene expression might cause an aberrant pattern of neurite outgrowth and innervation in *Drosophila* mushroom bodies. Our data lent support to previous evidence that Frazzled protein may function in vivo as a component to mediate guidance. These observations suggest the genes play an important role in the different phenotypes of neurite outgrowth and neuronal development of *Drosophila* brain. Future studies on the gene effect on behavior are needed. In addition, the mechanisms could give insight into the understanding the relevant human neurodevelopment.

# 壹、 前言

## 一、研究動機

人類之所以有思考及行為，背後必然有其動機支持；而動機是來自我們腦內錯綜複雜的神經網路所構築而成，這個神經網路依賴著各式各樣的神經細胞及其神經突所負責細胞間溝通，來傳達訊息與影響行為。這個過程受到細胞中基因的調控，進而影響神經突在發育中呈現適當的神經支配，讓神經網路發揮功能。透過對基因調控的探討，可以讓我們對於神經系統運作的機制，有更深一層的認識。此外，觀察果蠅，也可以對低等到高等生物的神經演化過程，在科學上提供一些見解；更長遠來講，對神經病變的病理也提供一些科學資訊。

## 二、研究背景

關於神經間是如何產生連結、神經訊號如何傳遞、以及樹突和軸突被什麼機制引導形成突觸等，是腦科學裡的核心問題之一。由於人類的腦部極為複雜，科學家在試圖解開這些問題的過程中，遇到許多技術上的困難。為了克服這些困難，我們需要找一個在形態上或生理上較簡單，且容易取得及操作的生物大腦來研究，再由其生物演化之保存性，找到神經系統運作上可以推估到人類的機制。

果蠅大腦只有十萬個神經細胞，相對由超過百億個神經細胞組成的人腦而言是比較簡單的構造。果蠅腦雖然簡單，但是已經擁有各種感覺與學習、記憶的能力。果蠅的神經發育過程好追蹤，也比較容易呈現神經命運多變性的各類機轉與運作，從而協助我們釐清腦部運作的原理。果蠅大腦成為一個很好的實驗對象 [Lin, S. W. et al. 2019]。

蕈狀體 (mushroom body, 簡稱 MB) 是果蠅大腦的學習和記憶的中心，也是昆蟲中被研究最徹底的腦構造之一，其架構簡單如圖 1 所示。蕈狀體迴路由三種主要的神經元組成，分別為 Kenyon cells (KCs)、MB output neurons (MBONs)、及 dopaminergic neurons (DANs)。KCs 是蕈狀體的內生性神經元，他們的軸突束組成五個蕈狀體葉 (lobes) 構造， $\alpha$ 、 $\alpha'$ 、 $\beta$ 、 $\beta'$  及  $\gamma$  葉，每個腦葉約有 2200 個 KCs，其中  $\alpha$  與  $\alpha'$  葉為垂直走向， $\beta$ 、 $\beta'$  和  $\gamma$  葉為水平走向。此外，蕈狀體葉被數量龐大的外在神經元 (MBONs 及 DANs) 支配 (innervation)。根據其型態與分子標記，目前約有 21 種 MBONs 及 20 種 DANs 被辨認，每一種 MBON 樹突與 DAN 軸突會延伸到特定蕈狀體葉特定區域。如圖 1，MBONs 與 DANs 把蕈狀體葉細分為 15 個特定區域 ( $\alpha 1$ 、 $\alpha 2$ 、 $\alpha 3$ 、 $\alpha' 1$ 、 $\alpha' 2$ 、 $\alpha' 3$ 、 $\beta 1$ 、 $\beta 2$ 、 $\beta' 1$ 、 $\beta' 2$ 、 $\gamma 1$ 、 $\gamma 2$ 、 $\gamma 3$ 、 $\gamma 4$ 、 $\gamma 5$ )，而大部分的 MBONs 與 DANs 只會支配到 1-2 個區域 [Aso, Y. et al. 2014]。由於蕈狀體葉是連續性軸突束，每一種的 MBONs 與 DANs 如何到特定區域是一個非常精細的過程，到目前為止尚未被完全瞭解。

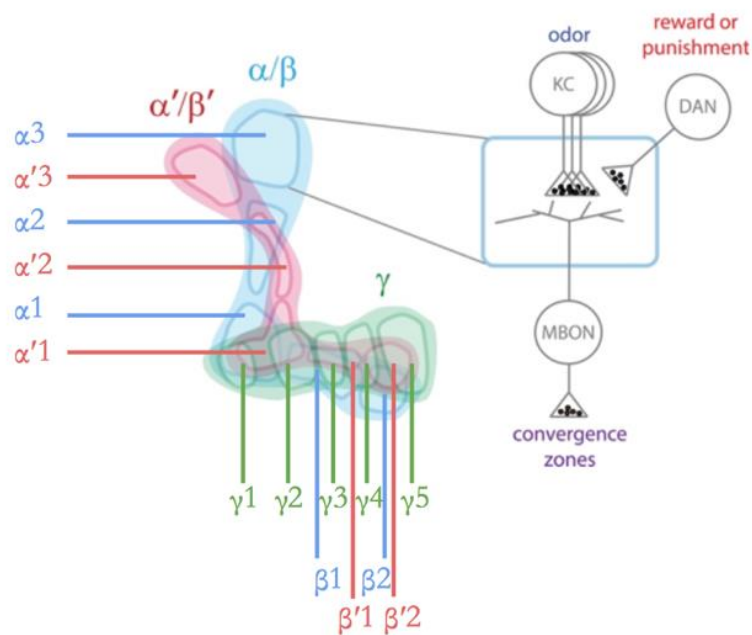


圖 1、果蠅蕈狀體簡圖 (取自[Griffith, L. C. 2014])

蕈狀體神經迴路裡面的神經束相互交叉穿梭，看似雜亂無章，卻又暗藏其規矩 [Lin, S. et al. 2014]，這不禁使我很好奇這些神經是如何知道它該長到哪裡，那裡基因又如何影響神經生長或神經突發育之途徑或型態？為了達到這個目的，我想透過去操作基因表現下降或上升，觀察神經生長如何改變，以確定基因確實會有作用。接下來，我介紹在本研究中使用到兩種改變基因表現的操弄方式。

### 三、基因操弄原理

#### (一) RNA 干擾 (RNA interference)

RNA interference，縮寫為 RNAi，中文稱為 RNA 干擾，是指一種在真核細胞中，經由序列互補和 mRNA 序列上形成雙鏈結合 (double-stranded RNA, dsRNA)，導致 mRNA 降解而誘發基因沉默 (gene silencing) 現象，這個作用使得特定基因的轉錄或轉譯受到阻礙，是調控基因表現的一個分子機制 [Setten, R. L. et al. 2019]。當給予細胞與內源性 mRNA 編碼區同源的核苷酸，形成雙鏈 RNA 後，會啟動 Dicer 酵素和 RISC (RNA induced silencing complex)，該基因的表現就會被降解或抑制 (其機制如圖 2)。RNA 干擾主要是以內生性的微型核糖核酸 (microRNA, miRNA)，和外源性的小干擾核糖核酸存在。後者在過去果蠅的研究中發現，RNA 干擾多半是由長度約 21~23 核苷酸的小 RNA 分子 (siRNA) 引起 [Heigwer, F. et al. 2018]。本研究使用 RNA 干擾技術去檢視我們所要探討的基因表現，以及其與神經細胞的關係。

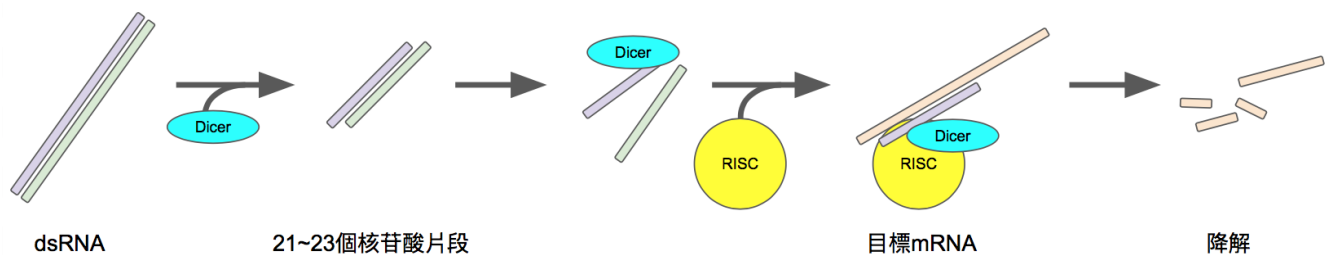


圖 2、Dicer 酵素將雙股 RNA (dsRNA)切割成約 21 至 23 個核苷酸的片段。siRNA (small interference RNA)會與細胞質內 RISC (RNA induced silencing complex) 結合，siRNA 雙股中的 sense RNA 會被分解，而保留下來的 anti-sense RNA 會引導 RISC 結合至與其互補的 mRNA 上，RISC 切斷這個互補的 mRNA，使得 mRNA 降解而失去原有的功能。(作者自繪)

## (二) 基因過度表現

基因過度表現 (overexpression) 是基因技術上常用來了解目標基因在生理上扮演著什麼功能的一種方式[Prelich, G. 2012]。過度表現指的是目標基因在轉錄形成 RNA 時，RNA 的量比正常條件下 RNA 的表現量呈現顯著增加的現象，而這個增加的 RNA 表現也會導致轉譯成蛋白質的也隨而上升。如果這個過程會造成生物性狀或型態(比如神經突導向或神經支配)的改變，則可讓科學家們去了解這個基因對生物現象所扮演的角色。

## 四、研究目的

本研究我們利用 RNA 干擾與基因過度表現兩種技術設計，觀察基因表現的改變對果蠅葷狀體神經支配型態的影響，包括失去神經支配 (lost innervation)、異常神經支配 (ectopic innervation)、神經突向下延伸 (strange downward neurites)。目的如下：

(一) 利用 RNA 干擾觀察基因表現下降對 PPL1- $\alpha'2\alpha2$  神經 (一種 DAN 神經) 在神經支配型態 (如圖 3) 的影響。除了觀察不同基因是否會有不同影響外，也觀察同一個基因但不同 RNA 干擾序列是否會不同影響。

(二) 利用基因過度表現探討基因對神經支配型態的影響。



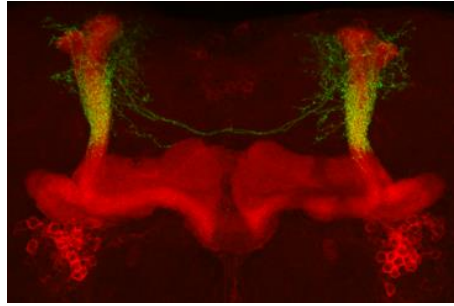


圖 3、果蠅蕈狀體（紅）PPL1- $\alpha'2\alpha2$  神經細胞（綠）

## 貳、 研究方法與過程

本研究整體架構如圖 4，細節分述如下幾單元介紹。

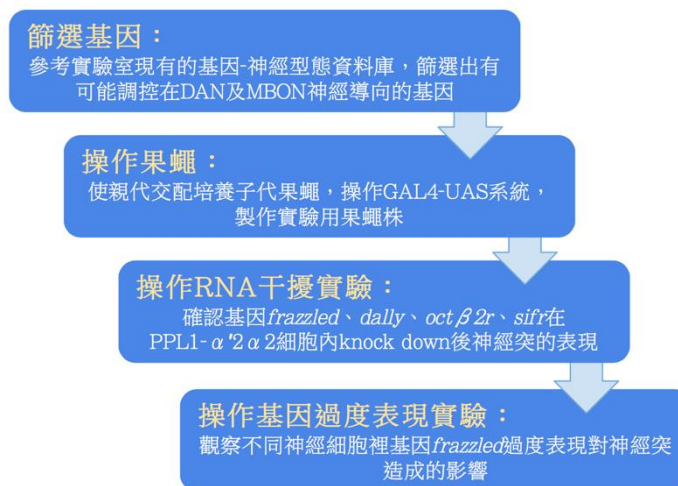


圖 4、研究的流程架構圖

### 一、材料與設備

#### (一) 果蠅株

##### 1. GAL4-UAS system

目前果蠅的神經科學研究上，運用先進的遺傳技術，發展出 GAL4-UAS 系統來標定出神經細胞，並讓細胞發光，發光的神經細胞在顯微鏡下可以清楚呈現。GAL4-UAS 是目前常用來操控果蠅基因表現的系統 [Rodriguez, A. V. et al. 2012]。原理如圖 5，簡言之就是 GAL4 蛋白結合到 UAS 基因序列上，同時驅動 UAS 下游基因的表現。GAL4 蛋白是取自酵母菌的一種轉錄因子 (transcription factor)，可以促進轉錄的進行。研究者將可以表現 GAL4 蛋白的 GAL4 基因置入果蠅體內，改變了 GAL4 基因的上游 DNA 序列，讓 GAL4 能在果蠅大腦不同的神經細胞中表現出來。這樣所產生的基因轉殖果蠅株，稱為 GAL4 殖系 (GAL4 line)。而 UAS 則是一種特殊基因序列，當 GAL4 和 UAS 結合之後，可以驅動 UAS 下游基因的表現，比方說表現出綠色螢光蛋白。研究者可以使用免疫法去標定綠色螢光蛋白 (Green Fluorescent Protein，縮寫 GFP)，追蹤表現此 GFP 的神經細胞。我們利用不同神經裡的 GAL4 驅使 UAS-mCD8::GFP (*Um8g*)、RNA 干擾及基因過度表現。我們可以透過共扼焦顯微鏡來觀察這些發生綠色螢光的神經細胞。

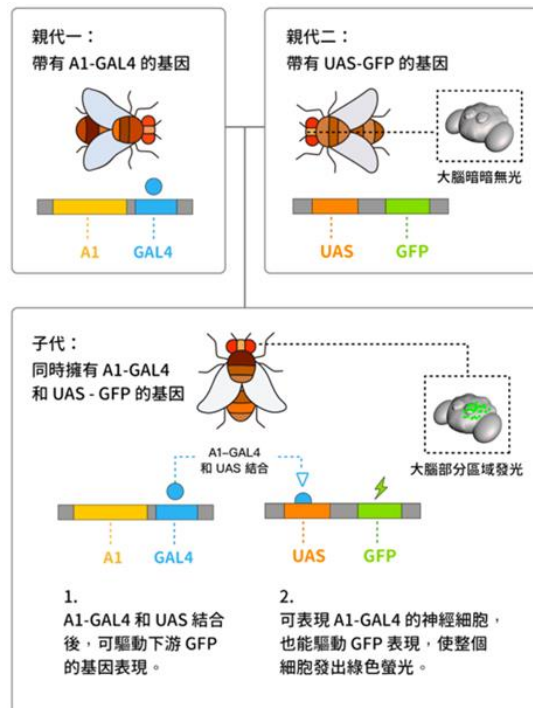


圖 5、利用 GAL4-UAS 的原理標記果蠅的神經細胞 [歐宇甜 與 林洵安 2019]

## 2. 基因干擾與基因過度表現親代果蠅株

本研究採用過去研究室果蠅基因-神經表現資料庫之果蠅，RNA 干擾選擇 *fra*、*octβ2r*、*sifr*、*dally* 基因；基因過度表現選擇基因 *frazzled*。表 1 為 RNA 干擾與基因過度表現之親代果蠅株。

表 1、RNA 干擾與基因過度表現之親代果蠅株 (*Um8g* : UAS-mCD8::GFP)

RNA 干擾果蠅株		基因過度表現果蠅株
處女蠅	處女蠅	公果蠅
<i>Um8g; MB058B</i> 處女蠅	<i>sifr-RNAi(2)</i> 處女蠅	<i>UAS-fra</i> 公果蠅
公果蠅	公果蠅	處女蠅
<i>Um8g; MB058B</i> 公果蠅	<i>Um8g; MB058B</i> 公果蠅	<i>Um8g; MB296C</i> 處女蠅
<i>fra-RNAi</i> 公果蠅		<i>Um8g; MB091C</i> 處女蠅
<i>octβ2r-RNAi</i> 公果蠅		<i>Um8g; MB093C</i> 處女蠅
<i>sifr-RNAi</i> 公果蠅		<i>Um8g; MB399C</i> 處女蠅
<i>dally-RNAi</i> 公果蠅		<i>Um8g; MB027B</i> 處女蠅

(二) 器材：如表 2

表 2、各項器材

直徑 2.5cm 高 9.5cm 培養基	鑷子	Chamber
恆溫箱 (25°C)	吸量管	載玻片
蓋玻片	無水凡士林	指甲油
酵母	小試管 15μL	冰桶

### (三) 溶液：

實驗中所需的各類溶液包括 PBS、Formaldehyde、PBST、NGS、mounting solution、一級抗體溶液、二級抗體溶液等，它們的詳細配置方式如表 3 所示：

表 3、各項溶液及其配置

溶液	配置方式
4% Formaldehyde in PBS	以 1:2:1 的比例混合 16% Formaldehyde、2xPBS、ddH <sub>2</sub> O
2xPBS	以 1:4 的比例混合 10xPBS、ddH <sub>2</sub> O
1xPBS	以 1:9 的比例混合 10xPBS、ddH <sub>2</sub> O
PBST	以 4:1:35 的比例混合 10xPBS、20% Triton X-100、ddH <sub>2</sub> O
5% NGS in PBST	以 1:19 的比例混合 100% NGS、PBST
Mounting solution	
一級抗體	以 1:1:1:100 的比例混合 chicken $\alpha$ GFP、mouse $\alpha$ FasII、mouse $\alpha$ Trio、5% NGS in PBST
二級抗體	以 1:400 的比例混合 Donkey $\alpha$ chicken-488、Goat $\alpha$ mouse-Cy3、5% NGS in PBST

### (四) 儀器：研究中我學習操作的儀器如圖 6

1. 解剖顯微鏡：放大觀察物，以便挑選處女蠅，以及解剖微小的果蠅腦。
2. 振盪器：重覆穩定搖晃，避免果蠅腦黏在 chamber 底部，而出現部分染色不全的狀況。
3. 共軛焦顯微鏡：拍攝玻片不同層的影像，方便進行神經的型態的觀察。

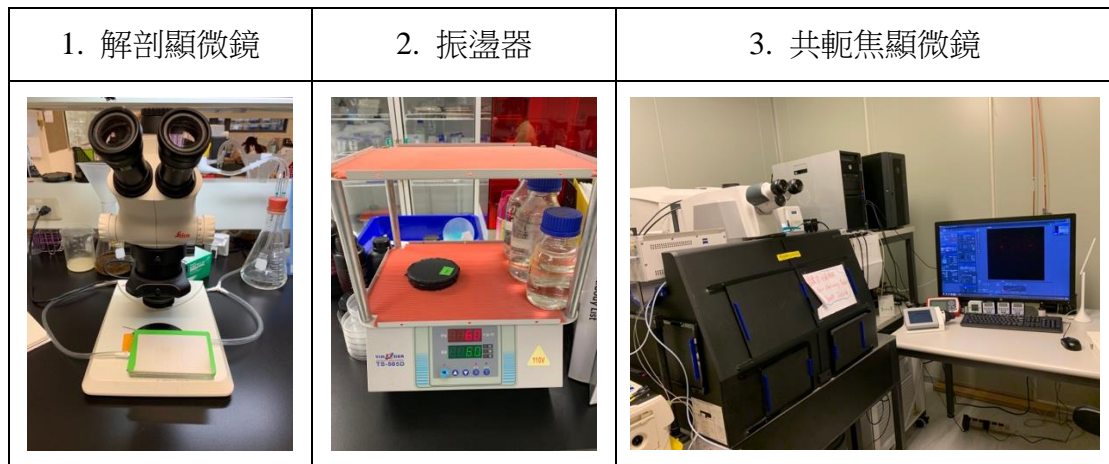


圖 6、研究過程中使用的重要儀器

## 二、果蠅株及果蠅培養

如圖 7，果蠅養在以玉米份、糖、酵母菌和洋菜組成的培養管裡。用二氧化碳麻醉果蠅，用羽毛刷子挑選腹部有斑點的處女果蠅 7~9 隻和 5~7 隻公果蠅，處女果蠅和公果蠅各帶有 GAL4-UAS、RNA 干擾和基因過度表現的相關基因，將它們放到 25°C 恆溫恆濕空間，加入酵母菌的培養基裡養殖、讓它們進行交配，以繁殖出實驗用的子代。

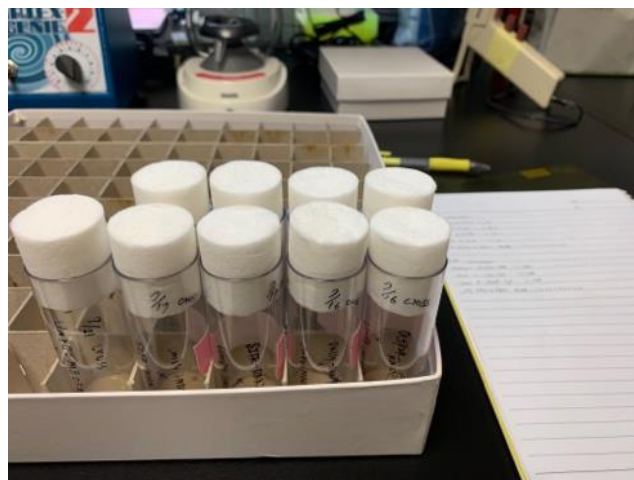


圖 7、果蠅培養於培養管中

表 4 為利用表一的親代果蠅產生子代的實驗果蠅株。每二天到三天做一次培養管之更換，進行培養下一批果蠅。

表 4、實驗用果蠅株（子代）

實驗用 RNA 干擾果蠅株	基因過度表現的果蠅株
<i>UAS-fra x Um8g; MB058B</i>	<i>UAS-fra x Um8g; MB296C</i>
<i>Um8g; MB058B x fra-RNAi</i>	<i>UAS-fra x Um8g; MB091C</i>
<i>Um8g; MB058B x octβ2r-RNAi</i>	<i>UAS-fra x Um8g; MB093C</i>
<i>Um8g; MB058B x sifr-RNAi</i>	<i>UAS-fra x Um8g; MB399C</i>
<i>Um8g; MB058B x sifr-RNAi(2)</i>	<i>UAS-fra x Um8g; MB027B</i>
<i>Um8g; MB058B x dally-RNAi</i>	

### 三、解剖果蠅以取得果蠅腦

取羽化四到七天的公果蠅，將它們放在冰塊上使它們昏迷，在室溫下裝 PBS 溶液的 chamber 裡用鑷子解剖 3~6 顆腦。為了保持果蠅腦的新鮮以確保實驗的準確性，將腦泡在放在冰塊上裝 PBS 溶液的 chamber 裡，不能超過一個小時。如圖 8 為解剖顯微鏡下的果蠅腦。



圖 8、白色為解剖顯微鏡下的果蠅腦

#### 四、神經組織染色

每一組果蠅的神經組織染色分成三天完成

第一天	<p>解剖完一組實驗用的果蠅後</p> <p>→將原本浸泡的 PBS 置換成 100<math>\mu</math>l 4% Formaldehyde in PBST 裡固定，放到振盪器在室溫 60rpm 搖 20 分鐘</p> <p>→用 200<math>\mu</math>l PBST 沖洗腦 3 次，再把腦放到 200<math>\mu</math>l PBST 放到振盪器上二十分鐘，重複 3 次。</p> <p>→將腦放入 100<math>\mu</math>l 5% NGS in PBST 放到振盪器上搖 30 分鐘後，將腦放入一抗溶液 50 <math>\mu</math>l/well 4<math>^{\circ}</math>c 60rpm 放在不透光黑色盒子裡在振盪器上搖隔夜。</p>
第二天	<p>→以 200<math>\mu</math>l PBST 沖洗腦 3 次，再把腦放到 200<math>\mu</math>l PBST 放到振盪器上二十分鐘，重複 3 次。</p> <p>→將腦放入二抗溶液 50 <math>\mu</math>l/well 4<math>^{\circ}</math>c 60rpm 放在不透光黑色盒子裡在振盪器上搖隔夜。</p>
第三天	<p>→以 200<math>\mu</math>l PBST 沖洗腦 3 次，再把腦放到 200<math>\mu</math>l PBST 放到振盪器上二十分鐘，重複 3 次。</p> <p>→進行裝片。</p>

## 五、裝片（如圖 9）

首先將載玻片擦拭乾淨，在玻片寫上此組實驗的名稱（裝片日期 / 果蠅株基因型 / 所剖的果蠅的生命階段、性別、腦顆數 / 所染的一抗抗體-染的顏色 / 編號）在載玻片用無水凡士林點四個點，以支撐蓋玻片。用吸量管把腦移到玻片中央，把多餘的 PBST 吸掉，並將大腦排列整齊，統一正面朝上。加一滴 mounting solution 等腦變透明後，把擦乾淨的蓋玻片放到四點凡士林上，輕壓蓋玻片直到腦上緣吸附到蓋玻片，注意不可以將腦壓太扁。從蓋玻片邊緣加 mounting solution 直到它充滿兩玻片之間縫隙。用黑色指甲油封片，然後拿到共軛焦顯微鏡下拍照。

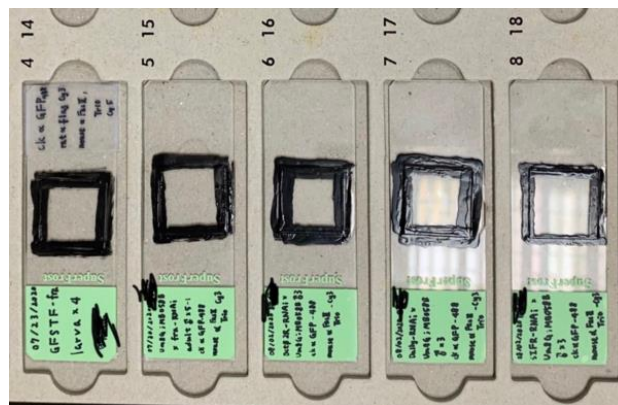


圖 9、裝片後之玻片

## 參、研究結果與討論

### 一、研究結果

#### （一）利用 RNA 干擾基因（PPL1- $\alpha$ '2 $\alpha$ 2 神經細胞）

如圖 10 所示 PPL1- $\alpha$ '2 $\alpha$ 2 是一種 DAN 神經細胞，其軸突應被支配到葷狀體的  $\alpha$ '2 及  $\alpha$ 2 區。我用 MB058B 驅使 *Um8g* 和各種 RNA 干擾基因在此細胞裡的表現，觀察 PPL1- $\alpha$ '2 $\alpha$ 2 神經細胞在葷狀體支配的改變。



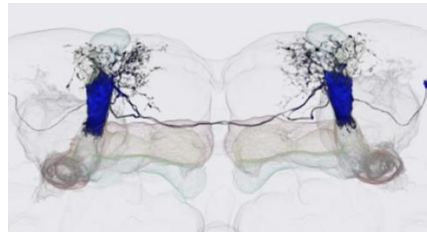


圖 10、PPL1- $\alpha'2\alpha2$  神經細胞支配圖 [Aso, Y., et al. 2014]

### 1. *Um8g; MB058B x fra-RNAi*

根據圖 11 的 a 與 b，圖 b 上白色箭頭處可得知若將基因 *frazzled* 干擾，PPL1- $\alpha'2\alpha2$  神經細胞的軸突將失去應出現在蕈狀體  $\alpha2$  區的神經支配。

### 2. *Um8g; MB058B x oct $\beta$ 2r-RNAi*

根據圖 11 的 a 與 c，圖 c 上白色箭頭處可得知若將基因 *oct $\beta$ 2r* 干擾，PPL1- $\alpha'2\alpha2$  神經細胞的軸突將失去應出現在蕈狀體  $\alpha2$  區的神經支配，另外也有在  $\alpha1$  發現異常神經支配。

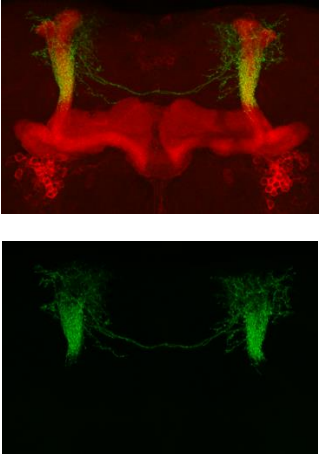
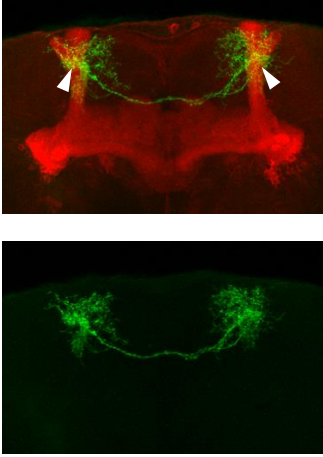
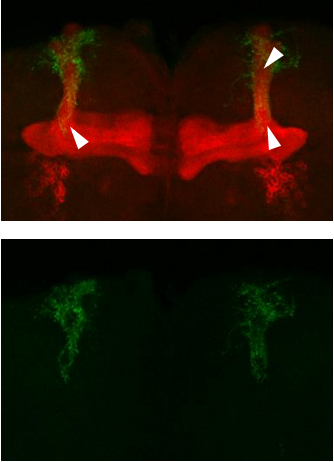
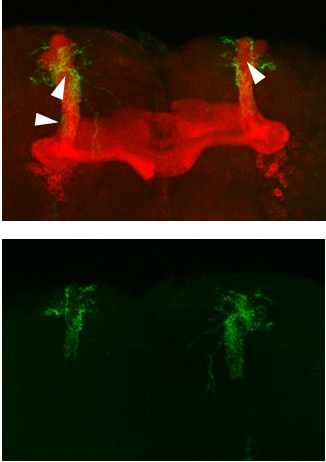
### 3. *Um8g; MB058B x sifr-RNAi* 與 *Um8g; MB058B x sifr-RNAi(2)*

根據圖 11 的 a、d 與 e，圖 d 上白色箭頭指出 PPL1- $\alpha'2\alpha2$  神經細胞的軸突失去在蕈狀體  $\alpha2$  裡的神經支配且有異常神經支配到  $\alpha1$ ，而圖 e 在蕈狀體  $\alpha'2$  和  $\alpha2$  區塊的神經支配只有變稀疏。

我發現同樣是 *sifr* 干擾基因，兩種 RNA 干擾基因序列做出的結果卻不同，由此可推知不同 RNA 干擾基因序列可能會阻擋不同片段的基因表現，造成實驗結果的差異。

4. *Um8g; MB058B x dally-RNAi*

根據圖 11 的 a 與 f，圖 f 上白色箭頭處可得知若將基因 *dally* 干擾，PPL1- $\alpha'2\alpha2$  神經細胞的軸突在葷狀體  $\alpha'2$  和  $\alpha2$  區的神經支配變稀疏，另外也有在  $\alpha1$  發現異常神經支配。

<p>a. Wild type PPL1-<math>\alpha'2\alpha2</math> (MB058B)</p>	<p>b. <i>Um8g; MB058B x fra-RNAi</i> (n=4)</p>
	
<p>c. <i>Um8g; MB058B x octβ2r-RNAi</i> (n=3)</p>	<p>d. <i>Um8g; MB058B x sifr-RNAi</i> (n=3)</p>
	
<p>e. <i>Um8g; MB058B x sifr-RNAi(2)</i> (n=3)</p>	<p>f. <i>Um8g; MB058B x dally-RNAi</i> (n=3)</p>

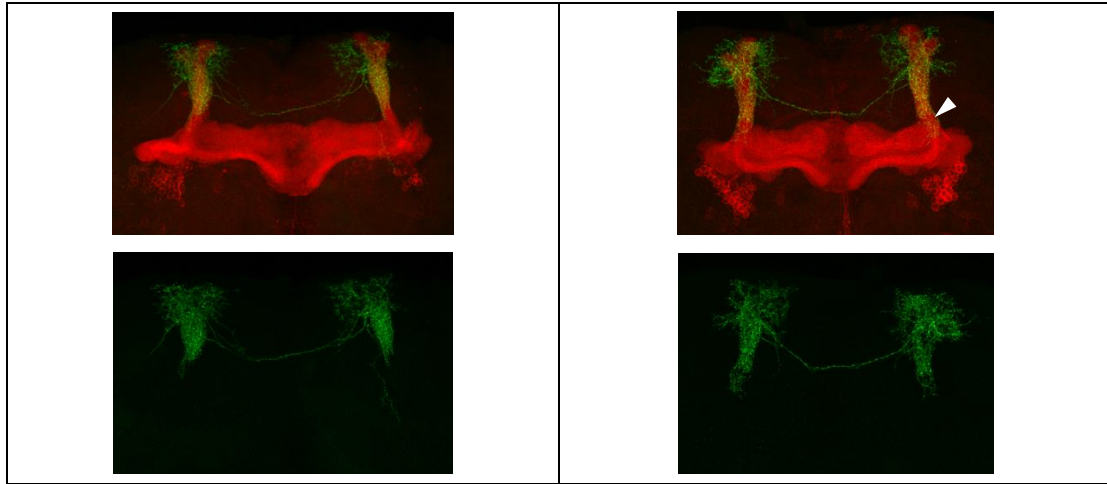


圖 11、各種基因干擾後 PPL1- $\alpha'2\alpha2$  神經細胞在蕈狀體內神經支配的變化 (n : 果蠅數)

干擾果蠅腦部 PPL1- $\alpha'2\alpha2$  細胞內的上述四個基因，我們的觀察整理如下：

1. *dally*、*oct $\beta$ 2r* 基因在降低表現後，PPL1- $\alpha'2\alpha2$  細胞皆分別呈現兩種神經支配類型的變異：失去神經支配 (lost innervation)與異常神經支配 (ectopic innervation)；
2. *sifr* 基因在兩種不同 RNA 干擾序列下，表現兩種相異之結果，一是和 wild type 的神經支配型態相似、另一則是失去神經支配。
3. *frazzled* 基因在被干擾之後，對軸突神經支配的影響較為單一：在  $\alpha2$  區失去神經支配，在型態上較易觀察。所以我選擇關注 *frazzled* 基因，進行過度表現的實驗。

(二) 利用基因過度表現探討基因 *frazzled* 影響果蠅腦神經發育的機制

1. *UAS-fra x Um8g; MB296B* (PPL1- $\gamma2 \alpha'1$  神經細胞)

如圖 12 所示 PPL1- $\gamma$ 2  $\alpha'$ 1 是一種 DAN 神經細胞，其軸突應被支配到蕈狀體的  $\gamma$ 2 及  $\alpha'$ 1 區。我用 *MB296B* 驅使 *Um8g* 和 *UAS-fra* 在此細胞裡的表現，觀察 PPL1- $\gamma$ 2  $\alpha'$ 1 神經細胞在蕈狀體支配的改變。

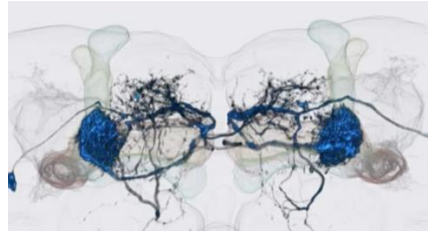


圖 12、PPL1- $\gamma$ 2  $\alpha'$ 1 神經細胞支配圖 [Aso, Y., et al. 2014]

根據圖 13 的 a、b 與 c，圖 b 的 PPL1- $\gamma$ 2  $\alpha'$ 1 神經細胞沒有明顯的異常表現，而圖 c 中，PPL1- $\gamma$ 2  $\alpha'$ 1 神經細胞的軸突有被異常支配到  $\alpha'$ 2 和  $\alpha$ 2 區。五實驗組有四個結果如圖 b，卻只有一組如圖 c，代表過度表現 *frazzled* 可能對 PPL1- $\gamma$ 2  $\alpha'$ 1 神經細胞的影響有限。

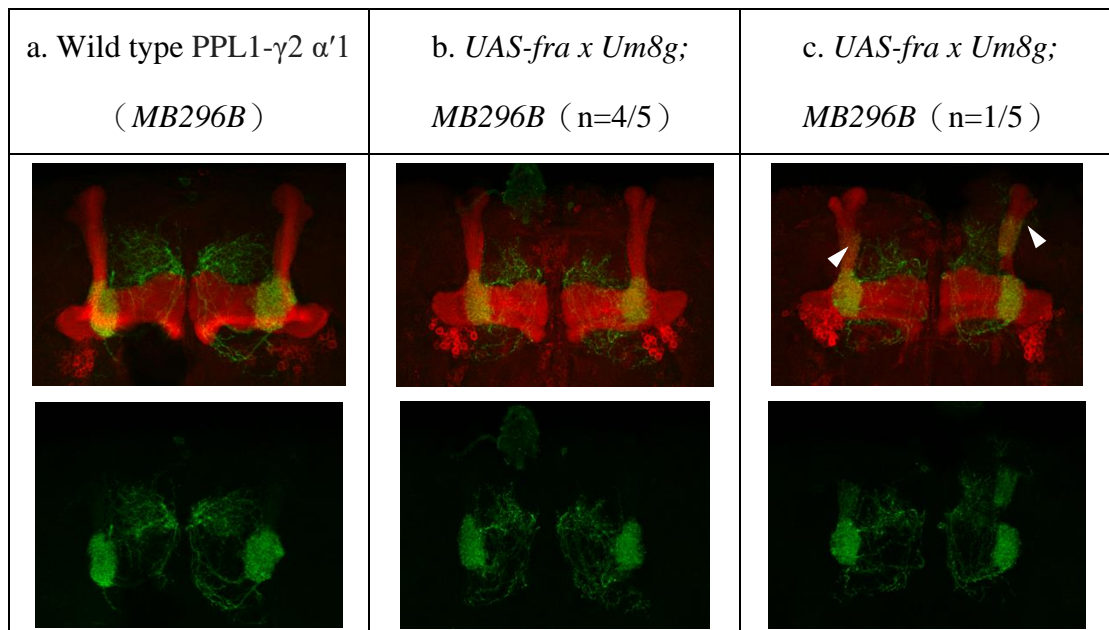


圖 13、基因 *frazzled* 過度表現對果蠅腦 PPL1- $\gamma$ 2  $\alpha'$ 1 神經細胞發育的影響

## 2. *UAS-fra x Um8g; MB091C* (MBON- $\alpha$ '2 神經細胞)

如圖 14 所示 MBON- $\alpha$ '2 是一種 MBON 神經細胞，其樹突應被支配到蕈狀體的  $\alpha$ '2 區。我用 *MB091C* 驅使 *Um8g* 和 *UAS-fra* 在此細胞裡的表現，觀察 MBON- $\alpha$ '2 神經細胞在蕈狀體支配的改變。

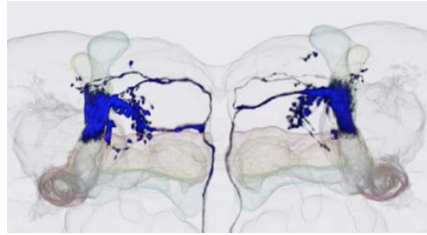


圖 14、MBON- $\alpha$ '2 神經細胞支配圖 [Aso, Y., et al. 2014]

根據圖 15 的 a 與 b，在 MBON- $\alpha$ '2 裡過度表現 *frazzled* 基因，神經細胞沒有明顯的異常表現。

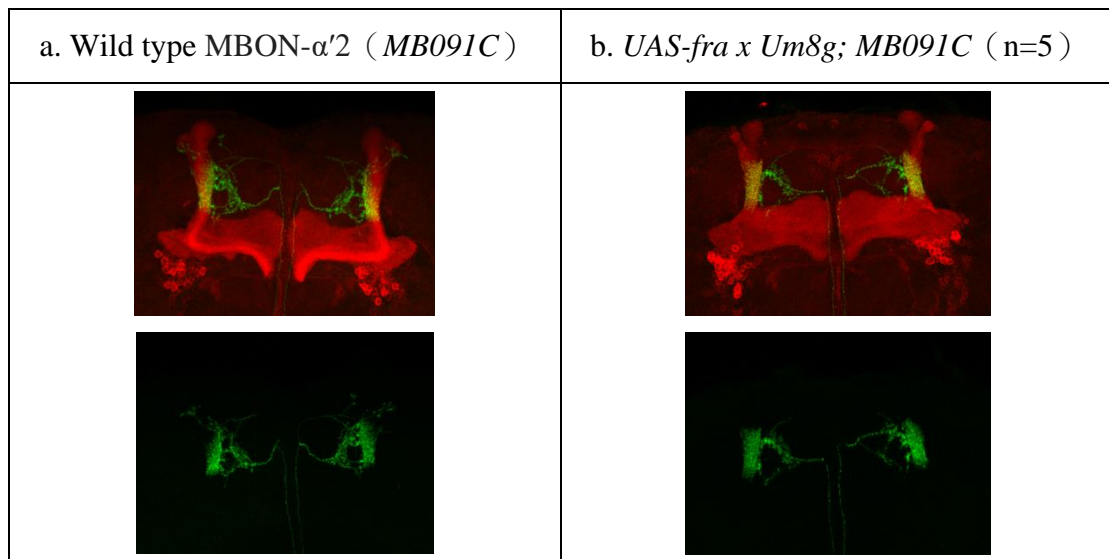


圖 15、基因 *frazzled* 過度表現對果蠅腦 MBON- $\alpha$ '2 神經細胞發育的影響

### 3. *UAS-fra x Um8g; MB093C* (MBON- $\alpha$ 3 神經細胞)

如圖 16 所示 MBON- $\alpha$ 3 是一種 MBON 神經細胞，其樹突應被支配到蕈狀體的  $\alpha$ 3 區。我用 *MB093C* 驅使 *Um8g* 和 *UAS-fra* 在此細胞裡的表現，觀察 MBON-  $\alpha$ 3 神經細胞在蕈狀體支配的改變。

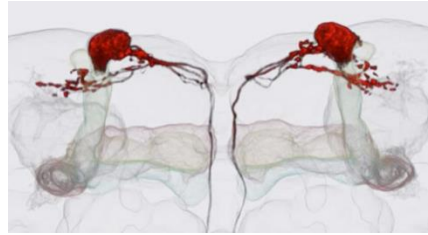


圖 16、MBON- $\alpha$ 3 神經支配圖 [Aso, Y., et al. 2014]

根據圖 17 的 a 與 b，圖 b 白色箭頭處可得知若基因 *frazzled* 在 MBON-  $\alpha$ 3 細胞裡表現，會有神經被異常支配到蕈狀體  $\alpha$ 2 和  $\alpha$ 1 區。

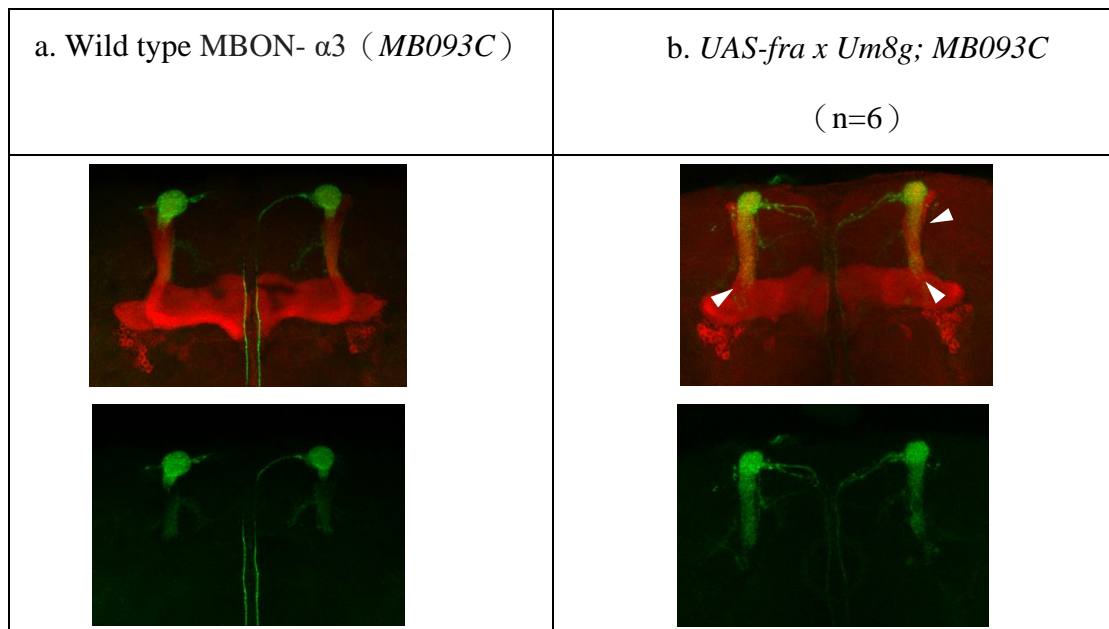


圖 17、基因 *frazzled* 過度表現對果蠅腦 MBON-  $\alpha$ 3 神經細胞發育的影響

#### 4. *UAS-fra x Um8g; MB399C* (MBON- $\beta 2\beta'2a$ 神經細胞)

如圖 18 所示 MBON- $\beta 2\beta'2a$  是一種 MBON 神經細胞，其樹突應被支配到蕈狀體的  $\beta 2$  及  $\beta'2a$  區。我用 *MB399C* 驅使 *Um8g* 和 *UAS-fra* 在此細胞裡的表現，觀察 MBON- $\beta 2\beta'2a$  神經細胞在蕈狀體支配的改變。

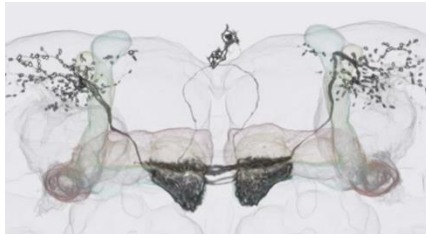


圖 18、MBON- $\beta 2\beta'2a$  神經細胞支配圖 [Aso, Y., et al. 2014]

根據圖 19 的 a 與 b，由圖 b 上白色箭頭處可得知若基因 *frazzled* 在 MBON- $\beta 2\beta'2a$  細胞裡表現，會有異常神經支配於  $\alpha'1$ 、 $\beta 1$ 、 $\beta'1$  區。

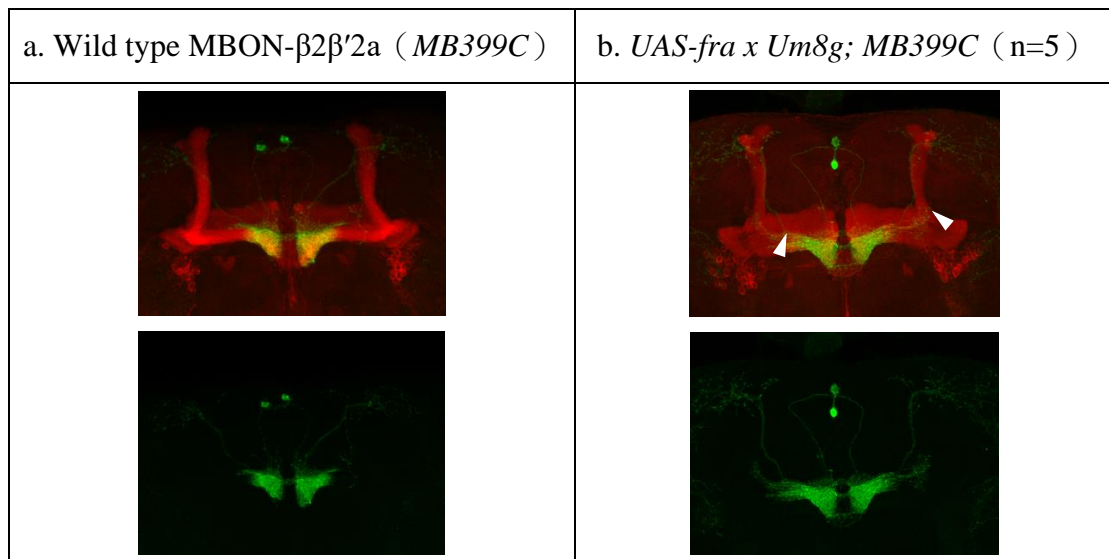


圖 19、基因 *frazzled* 過度表現對果蠅腦神經 MBON- $\beta 2\beta'2a$  發育的影響

## 5. UAS-fra x Um8g; MB027B (神經 MBON- $\alpha$ '3ap 和 MBON- $\alpha$ '3m)

如圖 20 所示 MBON- $\alpha$ '3ap 和 MBON- $\alpha$ '3m 是兩種 MBON 神經細胞，其樹突應被支配到蕈狀體的  $\alpha$ '3 區。我用 MB027B 驅使 *Um8g* 和 *UAS-fra* 在此兩種細胞裡的表現，觀察 MBON- $\alpha$ '3ap 和 MBON- $\alpha$ '3m 神經細胞在蕈狀體支配的改變。

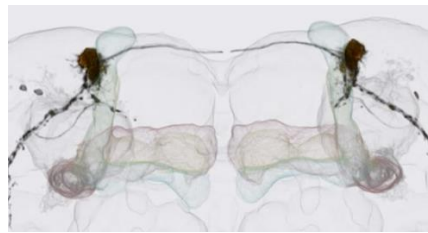


圖 20、MBON- $\alpha$ '3ap 和 MBON- $\alpha$ '3m 神經細胞支配圖 [Aso, Y., et al. 2014]

根據圖 21 的 a 和 b，由圖 b 上白色箭頭處可得知若基 *frazzled* 在 MBON- $\alpha$ '3 細胞裡表現，神經支配不受影響。

圖 21 的 c 可能因為蕈狀體在發育過程中，神經分化出現異常，或誤被修剪，導致左邊的  $\alpha$  和  $\alpha'$  葉的缺失，神經於是向下伸長到  $\beta$ 、 $\beta'$  及  $\gamma$  葉。這表示當原本神經支配的目標被移除時，它生長的途徑會有所改變，意味著神經生長的時候，會有區域間的彼此競爭，並有其中一區佔有優勢，神經才會有其正常的結構。當長期佔有競爭優勢的那個區域發生突變，神經被導向至其他區，就會出現異常的表型。

六組實驗組中，有五個結果如圖 b，只有一組如圖 c，推測圖 c 之結果不是由過度表現 *frazzled* 造成，是果蠅本身的突變所導致的情況。



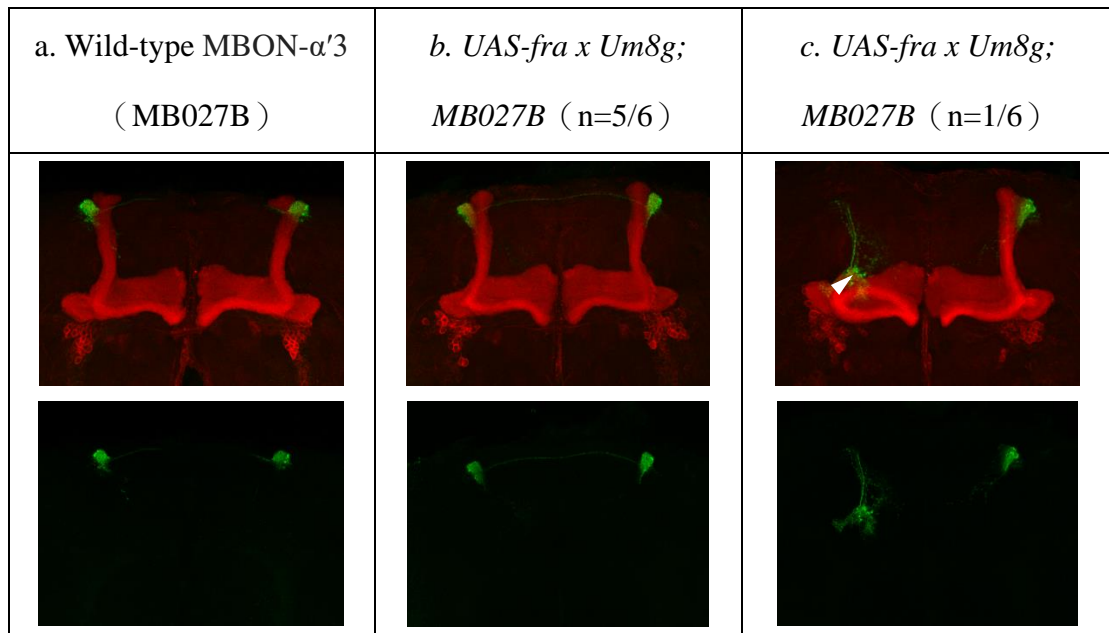


圖 21、基因 *frazzled* 過度表現對果蠅腦神經 MBON- $\alpha'3ap$  和 MBON- $\alpha'3m$  發育的影響

## 二、討論

我們利用研究室中現有的果蠅基因-神經型態資料庫，先篩選出和神經突（軸突與樹突）分化和發育可能有關的基因，包括：*frazzled*、*dally*、*oct $\beta$ 2r*、*sifr*。我們使用果蠅 GAL4-UAS 系統，透過觀察神經細胞綠色螢光蛋白的表現，去確認神經突導向的情形。本研究使用的基因技術包括 RNA 干擾和基因過度表現。在 RNA 干擾的部分，由干擾果蠅腦部 PPL1- $\alpha'2\alpha 2$  細胞內的上述基因，我們觀察到基因表現降低對神經細胞軸突導向與支配的影響，包括失去神經支配與異常神經支配。其中，*dally*、*oct $\beta$ 2r* 基因在降低表現後，PPL1- $\alpha'2\alpha 2$  細胞皆分別呈現兩種類型的變異：失去神經支配與異常神經支配；而 *sifr* 基因在兩種不同 RNA 干擾序列下，表現兩種相異之結果，一是和 wild type 的神經突型態相似、另一則是失去神經支配。惟獨 *frazzled* 基因在被干擾之後，對軸突型態的影響較為單一，PPL1- $\alpha'2\alpha 2$  在  $\alpha 2$  區失去神經支配，其變異在型態上較易觀察。所以我選擇關注 *frazzled* 基因，進行過度表現的實驗，觀察到神經

突命運受此基因的影響，和 wild type 比較起來，會出現異常的導向。

基因 *frazzled* 命名的來由是，具有此基因的突變種在乙醚麻醉復醒之後，會呈現明顯的顫抖。Frazzled 蛋白是脊椎和無脊椎動物神經細胞表面的 Netrin 受體 (receptor)。Netrin 是一種分泌蛋白，在結構上和細胞外的基質相似，生理上的作用是可以作用為一個軸突引導趨化線索 (chemotropic axon guidance cue)，是一種可引導神經突的成長與方向的分子，普遍存在於各種物種，包括線蟲、果蠅、青蛙、小鼠、和人類，Frazzled 和 Netrin 結合之後，可以決定神經突的移動方向，並且影響神經發展 以及後續功能 [Hiramoto, M. et al. 2000]。目前的果蠅 Frazzled 蛋白的功能，雖然還未完全明確地了解，但比較一致的論點是，Frazzled 蛋白調節了胚胎期的神經軸突如何通過中線 (midline) 成長的方向，影響了早期神經索的結構以及相關功能，特別和三個部分的發育有關：1. 胚胎腹神經索 (ventral nerve cord) 連合 (commissural) 神經軸突：和 Netrin 結合，協助神經軸突途徑導向 (axon guidance)，以便在正確的位置形成突觸的過程 [Neuhaus-Follini, A. and Bashaw, G. J. 2015]；2. 蛹的視網膜與延髓：視受體軸突有適當的生長錐結合 (growth cone attachment)，影響視覺系統的發育 [Akin, O. and Zipursky, S. L. 2016]；3. 成體在延髓和層膠細胞 (lamina glia cell)：也是影響視覺系統的功能 [Timofeev, K. et al. 2012]。

簡而言之，Frazzled 蛋白在神經突的導向與扮化極為重要的角色，這也和我們的結果發現是一致的。過去研究顯示，神經細胞的生長椎會沿著特別途徑移動找到正確的位置，進行神經支配，這個過程受到物理性接觸和化學性吸引，而產生前進或後退。我們推測 *frazzled* 基因表現異常，其產生的蛋白缺損，無法和軸突引導趨化因子 Netrin 適當結合，則神經突就會異常導向，並且在我們的組織染片上呈現出失去神經支配。因此，基因表現的調控對果蠅神經系統的發育和分化是極為重要的。

同時，我發現到不同基因對同一神經細胞，在表現被干擾時，會發生不同的神經支配結果。然而，即使同個基因在不同 RNA 干擾基因序列下，也可能

產生不同結果 (如本研究中之 *sifr* 基因)，這可能暗示，支配或改變不同區段的 RNA 的表現，都可能造成基因表現的差異，影響到實驗結果。因此，RNA 的表現如何被操控，其背後應有更精緻複雜的機制，比如某個區段和另一個區段的 RNA，在生物功能的影響上應有差異。這值得我深入探討。

此外，我也觀察到一個有趣的現象，也就是神經系統中，不同腦葉中似有神經突會擇優而存的現象。在我們研究中，原本神經支配的目標若被移除時，神經生長的途徑會有所改變，這可能意味著神經生長的時候，可能不同區域提供的條件不一時，會造成彼此競爭，並有其中一區佔有優勢，神經才會有其正常的結構。當長期佔有競爭優勢的那個區域若發生突變或功能缺失，神經生長的方向則會被顯著改變，被吸引到其他區域，然後出現異常的表型。

### 三、研究限制與困難

- (一) 技術問題：果蠅腦的小巧，大約 2.5mm 左右，顯微鏡下操作解剖，容易受及手部功能不穩定之影響。克服方式：在一長段時間內耐心不斷反覆練習手眼協調，以求取精準性。
- (二) 實驗時間安排問題：研究室採用之果蠅株需要從國外訂購，送到實驗室需要兩週以上的時間，並且需待果蠅恢復健康，方能繁衍數代子代備用。此外，搜集處女蠅和培養果蠅需時大約二到三週，一組實驗的解剖與染色需要連續三天，總共七小時左右。克服方式：精確估計果蠅孵化、羽化所需要的日數，以及預先熟習實驗步驟，再安排實驗。
- (三) 研究中使用之 RNA 干擾序列，在每個基因可能因為設計的序列不一而影響實驗結果。未來 RNA 干擾序列和神經突作用，應該進行系統性的檢視。
- (四) 本研究中解剖的果蠅數目有限，科學結果應該需要更大樣本數重複驗證。

## 肆、 結論與未來應用

### 一、 結論

我將本研究的結果製給簡圖如圖 22。我們發現，透過 GAL4-UAS 技術操弄基因表現下降或增加，果蠅腦部的神經突會產生異常的導向與神經支配。其中特別是 *frazzled* 基因，在表現異常下，造成神經支配的失去。因此，這些資料顯示，果蠅腦部的神經系統在分化或發育上，基因扮演極為重要的角色。

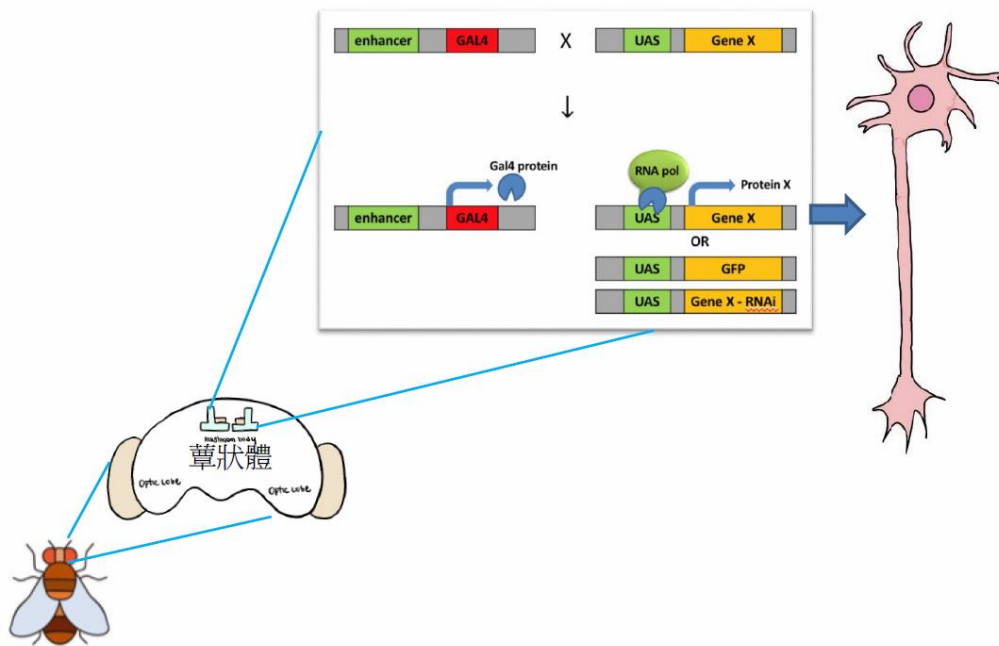


圖 22：透過 GAL4-UAS 系統，觀察染色後之綠色螢光蛋白，果蠅腦部蕈狀體的基因表現改變（RNA 受干擾而降解或過度表現）的時候，我們發現神經突導向和支配有所變化（神經支配失去或異常）。（作者自繪）

### 二、 未來應用

果蠅的相關研究，對於基因如何去調控神經發育，提供了初步的資訊，讓學者解開了演化上有關神經軸突如何分化與導引的奧秘，了解神經發展的途徑

受到什麼機制決定。因為果蠅胚胎的快速發育，神經細胞的組織明確，細胞數量較寡，目前分生技術的快速發展可操弄個別或少數神經細胞，果蠅的胚胎神經系統的研究可讓科學家得以對基因功能有更高度的準確剖析。未來如果可以搭配行為上面的觀察，預期可以連結基因-神經型態-行為的關聯性，而且這些資訊也將提供了對其他生物，包括人類，神經系統如何發育和分化的知識背景，也有助於理解疾病的機制，以及更遠的未來運用於預防。

## 伍、 參考資料

- 歐宇甜 與 林洵安 (2019). 研之有物, <https://research.sinica.edu.tw/lin-suewei-fly-brain-thirst-hunger/>
- Akin, O. & Zipursky, S. L. (2016). Frazzled promotes growth cone attachment at the source of a Netrin gradient in the *Drosophila* visual system. *Elife*, 5,
- Aso, Y., Hattori, D., Yu, Y., Johnston, R. M., Iyer, N. A., Ngo, T. T., Dionne, H., Abbott, L. F., Axel, R., Tanimoto, H. & Rubin, G. M. (2014). The neuronal architecture of the mushroom body provides a logic for associative learning. *Elife*, 3, e04577.
- Griffith, L. C. (2014). A big picture of a small brain. *Elife*, 3, e05580.
- Heigwer, F., Port, F. & Boutros, M. (2018). RNA Interference (RNAi) Screening in *Drosophila*. *Genetics*, 208, 853-874.
- Hiramoto, M., Hiromi, Y., Giniger, E. & Hotta, Y. (2000). The *Drosophila* Netrin receptor Frazzled guides axons by controlling Netrin distribution. *Nature*, 406, 886-9.

- Lin, S., Oswald, D., Chandra, V., Talbot, C., Huetteroth, W. & Waddell, S. (2014). Neural correlates of water reward in thirsty *Drosophila*. *Nat Neurosci*, 17, 1536-42.
- Lin, S. W., Senapati, B. & Tsao, C. H. (2019). Neural basis of hunger-driven behaviour in *Drosophila*. *Open Biology*, 9,
- Neuhaus-Follini, A. & Bashaw, G. J. (2015). Crossing the embryonic midline: molecular mechanisms regulating axon responsiveness at an intermediate target. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol*, 4, 377-89.
- Prelich, G. (2012). Gene overexpression: uses, mechanisms, and interpretation. *Genetics*, 190, 841-54.
- Rodriguez, A. V., Didiano, D. & Desplan, C. (2012). Power tools for gene expression and clonal analysis in *Drosophila*. *Nature Methods*, 9, 47-55.
- Setten, R. L., Rossi, J. J. & Han, S. P. (2019). The current state and future directions of RNAi-based therapeutics. *Nat Rev Drug Discov*, 18, 421-446.
- Timofeev, K., Joly, W., Hadjieconomou, D. & Salecker, I. (2012). Localized netrins act as positional cues to control layer-specific targeting of photoreceptor axons in *Drosophila*. *Neuron*, 75, 80-93.

## 【評語】 050018

1. 此作品利用 RNAi 及 gene over expression 的方式來探討果蠅 mushroom body 內的神經元生長相關的基因表現與其所造成的神經元生長上的影響。實驗方法適當，相關資訊的描述很詳細。影像的呈現可以更加細緻，並針對神經細胞 profile 的特徵有更細緻的比較，並量化所得的結果。
2. Frazzeled 基因表現所造成的神經生長已經明確證實，建議可針對其影響果蠅的學習記憶相關功能做行為實驗探討之。