

平成 30 年 5 月 18 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04375

研究課題名(和文) Strip-Hippoシグナル経路を軸とした神経シナプス制御の分子基盤

研究課題名(英文) Molecular mechanism underlying Strip-Hippo pathway regulates neural synapse formation

研究代表者

千原 崇裕 (CHIHARA, Takahiro)

広島大学・理学研究科・教授

研究者番号：00431891

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、がん抑制シグナル経路として知られるHippoシグナル経路による神経機能調節メカニズムの解明を目指した。ショウジョウバエ神経系におけるHippoシグナル経路に関わる因子の遺伝学的探索を行い、進化的に保存されたアミノ酸トランスポーターHiAT (Hippo-interacting Amino acid Transporter)を見出した。また、HippoキナーゼおよびHiATは、シナプス形成および個体活動量に影響を与えることも明らかにした。

研究成果の概要(英文)：In this study, we tried to reveal the molecular mechanism underlying hippo pathway regulates neural function. By using Drosophila genetic screen, we identified the evolutionarily conserved amino acid transporter, HiAT (Hippo-interacting Amino acid Transporter) as a regulator of hippo pathway in neuronal synapse formation. Furthermore, we found that HiAT and hippo kinase can affect animal locomotor activity.

研究分野：発生生物学

キーワード：神経発生 シナプス Hippo ショウジョウバエ

1. 研究開始当初の背景

Hippo シグナル経路は細胞増殖、細胞死、細胞分化を制御し、個体発生、ガン形成において重要な役割を果たす。最近 10 年ほどで Hippo シグナル経路の構成因子の同定・解析は爆発的に進み、Hippo シグナル経路の主要構成因子が続々と単離・解析されてきた。例えば、hippo (MST1/2), warts(Lats1/2)などのキナーゼ群、Savador (Sav1)などの足場タンパク質、及び転写制御因子として働く Yorki (YAP/TAZ) が同定されている (括弧内は哺乳類オルソログ)。しかし、これらの研究の殆どは、「細胞増殖過程」の Hippo シグナル経路の機能を解析するものであり、神経細胞などの「最終分裂後の細胞」における Hippo シグナル経路の機能は殆ど分かっていなかった。

以前私は、脳神経回路の発生過程における軸索・樹状突起のターゲティング分子機構を解明する目的でショウジョウバエ嗅覚神経系をモデル系として遺伝学的モザイクスクリーニングを行ってきた (*Nat Neurosci*, 10, 828-837, 2007; *J Neurosci*, 30, 9939-9946, 2010; *Nat Neurosci*, 16, 683-691, 2013)。その過程で、進化的に保存された新奇タンパク質 Strip を見出し、Strip がエンドソームの細胞内輸送と成熟を制御することで軸索伸長を調節することを報告している (*Nat Commun* 5, 5180, 2014)。また、Strip に関して解析を進めた結果、Strip が神経軸索の前シナプス部位に局在していることを見出し、解析系を「ショウジョウバエ幼虫の神経筋接合部 (Neuromuscular junction: NMJ)」へ移し、更に Strip 機能解析を進めたところ、以下に示す結果を得た。まず、Strip はブートンと呼ばれる神経シナプス構造体の中に点状に局在することが分かった。この時、Strip は STRIPAK と呼ばれる PP2A 脱リン酸化酵素複合体の構成因子として働き、Strip ノックダウンは Hippo キナーゼの活性化を引き起こすことが明らかになった。また、神経で Strip をノックダウンすると、シナプスブートン構造の過形成を引き起こし、この表現型は Hippo 遺伝子のコピー数を減らすことによって消失した。更に、Hippo シグナル経路の下流因子として知られる「bantam microRNA」はシナプス形成を負に制御することも明らかになった。これらの実験結果から Hippo シグナル経路が神経系で機能することが分かってきたが、その分子機構については不明な点が多かった。

2. 研究の目的

私は以上のような状況を鑑み、「最終分裂後の細胞：神経細胞のシナプス形成」における Hippo シグナル経路の生理機能解明を目的とした。特に、生体内 Hippo シグナル研究基盤を整備し、シナプス形成における Hippo シグナル経路に関わる分子群を網羅的に同定・解析することで、神経系における Hippo

の機能理解へと繋げることも目指した。

3. 研究の方法

シナプス形成における Hippo シグナル経路に関わる分子群をゲノムワイドに探索する目的で、独自に見出した Strip 分子 (Hippo キナーゼ活性抑制因子) を利用した遺伝学的スクリーニングを行った。得られた新奇 Hippo シグナル制御因子に関し、既存の Hippo 関連因子との遺伝学的相互作用、また動物個体行動に関する影響をしらべた。

4. 研究成果

(1) 運動神経における Hippo シグナル経路を構成する因子探索に向けた遺伝学的スクリーニング系の構築

運動神経特異的に *strip* をノックダウンするとショウジョウバエは蛹期致死性を示し、*hippo* のノックダウンによりこの致死性は消失する。従って、この系において *hippo* と同方向に働く遺伝子があるとすれば、その欠損によっても同様に致死性が消失する可能性がある。そこで本研究では「運動神経における *strip* ノックダウンに伴う致死性を抑制することができるか否か」という指標のもとに Strip-Hippo 経路の新規遺伝子の探索を試みた。致死性は解剖等の手間をかけずに判断できるため、大規模なスクリーニングを行うのに適している。

まず運動神経特異的に *strip* をノックダウンすることのできるスターターラインの作成を目指した。しかし、そのような個体は蛹期致死性を示してしまい、系統を維持することができない。よって、致死性を抑えるために、tubulin プロモーターを用いて全身に Gal80 を発現させた。Gal80 は Gal4 に結合し Gal4 の転写活性を抑制する。これによって UAS 以下の *strip-shRNA* (*strip* をノックダウンする short-hairpin RNA) の発現が抑えられ、個体は生存することが可能になる。このスターターラインと別の系統を交配することで、次世代 (F1) において運動神経特異的に *strip* をノックダウンした状態を作り出すことができる。

(2) 遺伝学的スクリーニングによる HiAT (Hippo-interacting amino acid transporter) の同定

作成したスターターラインを、ゲノムの一部を欠損した系統である Dros Del Core Deletion Kit ショウジョウバエ系統と交配した。Dros Del Core Deletion Kit はショウジョウバエゲノムの一部領域を欠損した系統群であり、205 系統からなる。これを用いることでショウジョウバエゲノムの約 77% について、そのゲノム領域の欠損による影響を評価することができる。スターターラインと Dros Del Core Deletion Kit のショウジョウバエを交配すると、F1 ではゲノムの一部が欠損した遺伝学的背景を持ち、更に運動神経特異的に *strip* がノックダウンされた個体を得

ることができる。このようにして、スターターラインと Dros Del Core Deletion Kit に含まれる 192 系統 (残る 13 継投については系統自身の脆弱性から実施できなかった) とを交配し、*strip* を運動神経特異的にノックダウンした際に生じる蛹期致死性を抑制できる系統を探索した。スクリーニングでは、3 匹以上の生存個体を生じ、かつ 10% 以上の生存率を示した 25 系統を致死性を抑制することのできる系統として判定した。ポジティブコントロールとして *hippo* 遺伝子を含むゲノム領域欠損系統を、ネガティブコントロールとして野生型系統をそれぞれスターターラインと交配し、生存率を測定した。

上記 25 系統において *strip* ノックダウン致死性を抑制した責任遺伝子の同定を目指した。比較的広いゲノム領域を欠失した系統に関しては、更に小さなゲノム領域を欠失した系統を用いて候補ゲノム領域の絞り込みを行った。比較的狭いゲノム領域を欠失した系統に関しては、候補領域内に含まれる遺伝子に対する RNAi 系統をスターターラインと交配し、その蛹期致死性を観察した。その結果、運動神経において Hippo シグナル経路と遺伝学的相互作用する可能性の高い 10 個の遺伝子を同定した。そのうち最も効果が強いものとして一種のアミノ酸トランスポーターを同定した。ここでは、このアミノ酸トランスポーターを HiAT (Hippo-interacting Amino acid Transporter) と呼ぶこととする。

(3) HiAT は運動神経シナプス形成において、Strip-Hippo シグナル経路と相互作用する

運動神経特異的に *strip* をノックダウンすると、蛹期致死性のみならずシナプスの形成異常も引き起こされる。野生型ではシナプス構造 (ブートン) が数珠状に連なっているのに対し、*strip* をノックダウンした神経筋接合部 (NMJ: Neuromuscular junction) ではサテライトブートンと呼ばれる、軸から外れた小さなブートンが増加する。HiAT が NMJ ブートン形成における Strip-Hippo シグナル経路に影響を与えるかを確かめる目的で、運動神経特異的に *strip* と *hiat* を同時にノックダウンした。その結果、*hiat* のノックダウンは *strip* ノックダウンによって生じたサテライトブートンの増加を抑制した。

(4) Hippo と HiAT は個体活動量の制御に関わる

上記のように神経系において Hippo, HiAT が機能することが分かったので、それら生理機能を調べる目的でサーカディアンリズムに対する影響を調べた。これまで Hippo の抑制因子である *strip* がショウジョウバエサーカディアンリズムの調節に重要な役割を担うことが報告されている。今回、サーカディアンリズムの測定には DAM (*Drosophila* activity monitor) システムを用い、12 時間おきの明暗条件 (LD 条件) と恒暗条件 (DD 条

件) において *hippo*, *hiat* のノックダウン効果を調べた。サーカディアンリズム生成に重要な時計神経で *hippo* もしくは *hiat* をノックした場合、個体のサーカディアンリズムには影響が現れなかった。しかし意外なことに、*hippo* もしくは *hiat* のノックダウンは個体活動量全体を増加させる傾向が観察された。

本研究により、運動神経特異的な *strip* のノックダウンによるサテライトブートン形成にアミノ酸トランスポーター-HiAT が関与することが明らかになった。また、*strip* のノックダウンによるサテライトブートンの形成が *hiat* のノックダウンによって抑制されたことから、HiAT は Strip の下流で働くと考えられる。更に、個体活動量においても Hippo キナーゼと HiAT は同様のシグナル経路で機能することが示唆された。

では、HiAT はどのような機構でサテライトブートンや個体活動量を制御しているのだろうか。HiAT はそのタンパク質二次構造から、SLC36 ファミリーに属するアミノ酸トランスポーターであると推測される。このファミリーには他に 8 つの遺伝子が含まれており、その内 Pathetic という分子は神経樹状突起の形成に関与する。しかし HiAT の機能については、これまで全く報告はない。

通常、アミノ酸トランスポーターはアミノ酸を取り込むことで細胞内のアミノ酸濃度を上昇させる。また細胞内アミノ酸濃度の上昇は、その下流で mTORC2 を活性化させる。TORC2 はショウジョウバエ NMJ の成長を抑制すること知られており、もし HiAT が細胞内にアミノ酸を取り込むことで細胞内アミノ酸濃度を上昇させているのであれば、HiAT ノックダウンによって TORC2 は不活性化され、NMJ の成長は促進されるはずである。しかし本研究では *strip* ノックダウンによる NMJ の過剰成長が HiAT のノックダウンによって抑制された。これは HiAT 下流に TORC2 以外の別の経路が存在し、それがサテライトブートンの形成に関与していることを示唆している。今後は、Hippo キナーゼと HiAT の生化学的關係を詳細に解析することで、神経系における Hippo シグナル経路の作動基盤を明らかにしていく予定である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 9 件)

Anzo M, Sekine S, Makihara S, Chao K, Miura M, Chihara T.* "Dendritic Eph organizes dendridendritic segregation in discrete olfactory map formation in *Drosophila*." *Genes Dev* 31:1054-1065 (2017) 査読有

DOI:10.1101/gad.297424.117

Sakuma C and Chihara T.* “ Role of the STRIPAK complex and the Hippo pathway in synaptic terminal formation ” *Neural Regen Res* 12: 578-579 (2017) 査読有
DOI:10.4103/1673-5374.205089

Sakuma C, Saito Y, Umehara T, Kamimura K, Maeda N, Mosca TJ, Miura M, Chihara T.* “ The Strip-Hippo Pathway Regulates Synaptic Terminal Formation by Modulating Actin Organization at the *Drosophila* Neuromuscular Synapses. ” *Cell Rep* 16: 2289-97 (2016) 査読有
DOI:10.1016/j.celrep.2016.07.066

Okumura M, Chihara T.* “ Function of pioneer neurons specified by the basic helix-loop-helix transcription factor atonal in neural development. ” *Neural Regen Res* 11: 1394-1395 (2016) 査読有
DOI:10.4103/1673-5374.191201

Kashio, S., Obata, F., Zhang, L., Katsuyama, T., Chihara, T. and Miura, M. “ Tissue non-autonomous effects of fat body methionine metabolism on imaginal disc repair in *Drosophila* ” *Proc Natl Acad Sci U S A* 113:1835-1840 (2016) 査読有
DOI:10.1073/pnas.1523681113

Okumura, M., Kato, T., Miura, M. and Chihara, T.* “ Hierarchical axon targeting of *Drosophila* olfactory receptor neurons specified by the proneural transcription factors Atonal and Amos ” *Genes Cells* 21:53-64 (2016) 査読有
DOI:10.1111/gtc.12321

Sakuma, C., Okumura, M., Umehara, T., Miura, M. and Chihara, T.* “ A STRIPAK component Strip regulates neuronal morphogenesis by affecting microtubule stability ” *Sci Rep* 5:17769 (2015) 査読有

DOI:10.1038/srep17769

Okumura, M., Miura, M. and Chihara, T.* “ The roles of tubulin-folding cofactors in neuronal morphogenesis and disease ” *Neural Regen Res* 10: 1388-1389 (2015) 査読有
DOI:10.4103/1673-5374.165226

Okumura, M., Sakuma, C., Miura, M. and Chihara, T.* “ Linking cell surface receptors to microtubules: Tubulin folding cofactor D mediates Dscam functions during neuronal morphogenesis ” *J Neurosci* 35:1979-1990 (2015) 査読有
DOI:10.1523/JNEUROSCI.0973-14.2015

〔図書〕(計1件)

スタンフォード神経生

物学 (Principles of Neurobiology)

2017 著 Liqun Luo, 監訳 柚崎通介、岡部繁男: 第6章 嗅覚、味覚、聴覚、体性感覚 (計68ページ) 翻訳

〔その他〕

ホームページ等

<http://chihara-lab.hiroshima-u.ac.jp>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

千原 崇裕 (CHIHARA, Takahiro)
広島大学大学院理学研究科・教授
研究者番号: 00431891