

令和元年5月28日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K18536

研究課題名(和文)細胞接着分子Dscam1による細胞自律的な軸索分枝形成のメカニズム

研究課題名(英文) Mechanisms of axon collateral formation by cell-intrinsic Dscam1-Dscam1 interactions

研究代表者

木瀬 孔明 (Kise, Yoshiaki)

東京大学・大学院理学系研究科(理学部)・特任助教

研究者番号：70769611

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、Dscamが細胞自律的に軸索分枝を形成する分子機構を明らかにすることを目的とした。まず始めにDscamと生化学的に相互作用する分子をスクリーニングし、2つの細胞骨格制御因子を同定した。機能損失変異と強制発現の解析によって、これらの分子が軸索分枝形成の制御因子であることも明らかになった。さらにDscamとそれら2分子の関係を遺伝学的に解析した結果、3者が同一のシグナル経路で軸索分枝形成に寄与していることが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

軸索側枝形成には、既存の主軸索の特定の地点から軸索が新たに形成され、それぞれが異なる目的地へ投射される必要がある。申請者らは、(1) Dscamが軸索側枝形成のマスター因子であること、(2) Dscamシグナルの時空間制御が軸索側枝形成に必要であることをこれまでに見出してきた。本研究では、これまで不明だったDscamシグナルの分子機構を明らかにすることができた。本成果は、軸索側枝形成の分子機構の解明に大きく貢献するばかりでなく、損傷を負った軸索に対してDscamシグナルを時空間操作することによって軸索側枝の形成を誘導し、軸索を再生させることができる可能性を提示することができた。

研究成果の概要(英文)：This project aims to reveal molecular mechanisms of axon collateral formation controlled by cell-intrinsic Dscam-Dscam interactions. We have identified two cytoskeleton regulators which interact with Dscam biochemically. Loss-of-function and gain-of-function analysis have shown that these two molecules are required for axon collateral formation. Furthermore, epistasis and genetic analysis indicate that Dscam and these two molecules are in the same signaling pathway required for axon collateral formation.

研究分野：神経回路形成

キーワード：軸索分枝

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

神経細胞は、情報の伝達を担う軸索に分枝を形成して複数の下流領域に神経接続することによって複雑な神経回路を構築し、外的環境や内的状態に応じた適切な脳機能を実現する。軸索分枝形成において、軸索ガイダンス因子や成長因子といった外的因子による分子機構の関与が明らかにされている。一方で我々は、2万通りものアイソフォームの多様性を持つ接着分子である Dscam1 が細胞自律的にホモフィリック相互作用することによって軸索分枝形成を全般的に制御することを示し、本研究分野において全く新たな概念を提唱した。さらに Dscam1 のアイソフォーム多様性が、軸索成長円錐における Dscam1 シグナルの活性を適切なレベルに調整することによって、軸索分枝が形成されることを明らかにした(He & Kise et al, Science, 2014)。

2. 研究の目的

本研究は以上の背景を踏まえて、Dscam1 が細胞自律的に軸索分枝を形成する分子機構を明らかにすることを目的とする。具体的には、細胞自律的な Dscam1-Dscam1 相互作用によって引き起こされる Dscam1 の下流のシグナル伝達の分子機構を明らかにすることによって、軸索分枝パターン形成のメカニズムに迫る。

3. 研究の方法

(1) Dscam1 の新規結合タンパク質の同定

Dscam1 の細胞内ドメインに結合するタンパク質を生化学的に同定するために、HA-Flag タグ付きの Dscam1 を安定に発現する神経細胞由来の細胞株を樹立した。その細胞ライセートを HA 抗体、Flag 抗体で免疫沈降し、免疫沈降物を質量分析で解析し、Dscam1 の新規結合タンパク質を同定した。一方、Dscam1 細胞内ドメインのアミノ酸配列を解析することによって、複数の Dscam1 結合タンパク質の候補も得られた。

(2) Dscam1 結合タンパク質の軸索分枝形成における役割の遺伝学的解析

(1) で同定、予測した Dscam1 結合タンパク質の軸索分枝形成における役割を、ショウジョウバエの機械感覚受容神経細胞の軸索分枝パターン形成をモデルシステムとして用い、遺伝学的な解析を行った。具体的には、変異体クローンおよび RNAi ノックダウンの表現型と、強制発現の表現型を解析した。

(3) 軸索分枝形成における Dscam1 とその結合タンパク質との関係の遺伝学的解析

Dscam1 の結合タンパク質が、軸索分枝形成において Dscam1 の下流で機能しているのかを検証するために、Dscam1 との二重変異体を作成し、その表現型を観察した。

(4) 軸索分枝形成を制御する新規分子のスクリーニング

Dscam1 の下流または Dscam1 と並行して軸索分枝形成に関わる分子の候補としてリン酸化酵素に着目し、その網羅的 RNAi スクリーニングを行った。表現型が見られた分子について、Dscam1 との相関を含めた機能解析を遺伝学的に行った。

4. 研究成果

(1) Dscam1 の新規結合タンパク質の同定

Dscam1 の結合タンパク質を質量分析によって複数同定することに成功した(図1)。その中には細胞骨格制御因子やシナプス関連因子が含まれていた。

(2) Dscam1 結合タンパク質の軸索分枝形成における役割

(1) で同定した結合タンパク質について、MARCM 法による変異体クローン作製または RNAi ノックダウンを行い、軸索分枝形成における表現型を観察した。そのうち、2つの細胞骨格制御因子(A, B)について軸索分枝形成が抑制される表現型が得られた。2つの遺伝子を同時にノックアウトすると、表現型がさらに強くなった(図2B)。逆に、両者を過剰発現させると、Dscam1 変異体と非常に似た表現型が得られた(図2C)。

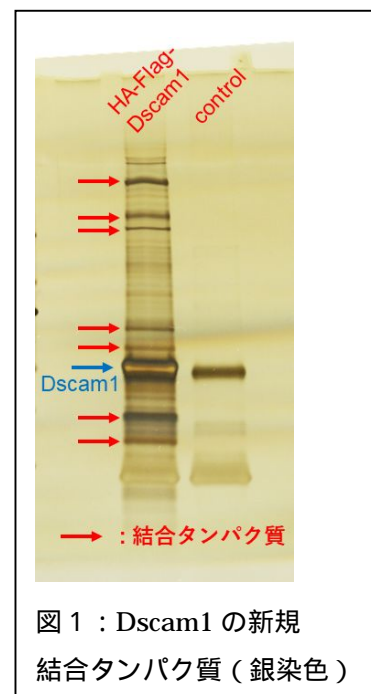


図1 : Dscam1 の新規結合タンパク質 (銀染色)

(3) Dscam1 と結合タンパク質との遺伝学的関係

Dscam1 と細胞骨格制御因子 A、B との 3 重変異体を作成し、表現型を観察したところ、A、B の 2 重変異体と同等の表現型であった(図 2D)。このことは、分子 A、B が Dscam1 の下流で軸索分枝形成に働くことを強く示唆している。また A、B のダブルヘテロ変異体のバックグラウンドで Dscam1 のアイソフォーム多様性を減少させると、アイソフォーム多様性減少による軸索分枝形成抑制の表現型がより強くなった(図 3)。このことは、分子 A、B が Dscam1-Dscam1 相互作用依存的に軸索分枝形成を制御することを強く示唆している。

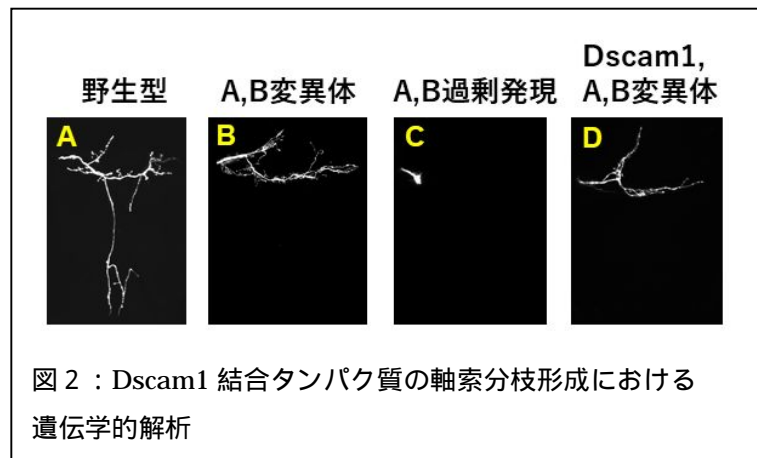


図 2 : Dscam1 結合タンパク質の軸索分枝形成における遺伝学的解析

(4) 軸索分枝形成を制御する新規分子のスクリーニング

軸索分枝形成を制御するリン酸化酵素の RNAi スクリーニングを行った結果、2 つのリン酸化酵素を同定することに成功した。そのうちのひとつが Dscam1 と協調して軸索分枝形成を制御することが分かった。今後さらに解析を進め、論文にする予定である。もう一つのリン酸化酵素のノックアウトでは、軸索が退縮していくことから、軸索の安定化に必要な分子であることが分かった。さらにその機能は哺乳類でも保存されていた。その成果を論文にまとめている。

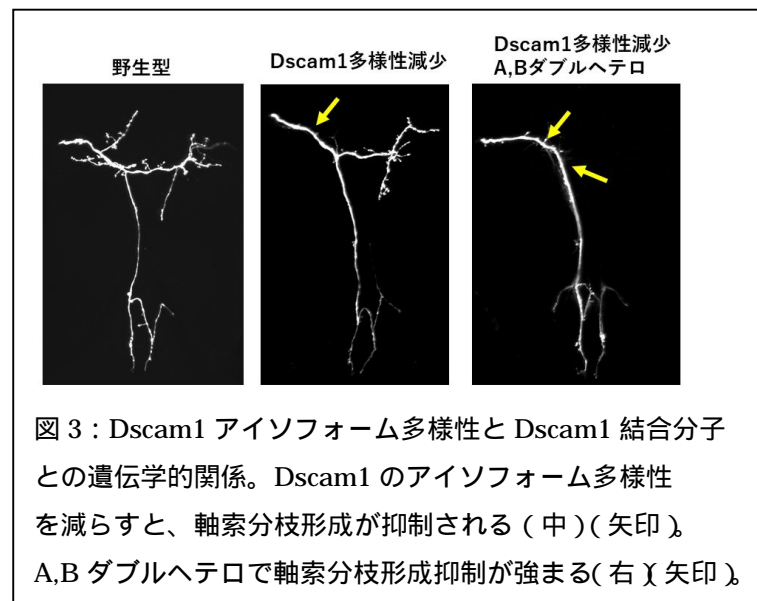


図 3 : Dscam1 アイソフォーム多様性と Dscam1 結合分子との遺伝学的関係。Dscam1 のアイソフォーム多様性を減らすと、軸索分枝形成が抑制される(中)(矢印)。A,B ダブルヘテロで軸索分枝形成抑制が強まる(右)(矢印)。

(5) Dscam1 の核移行とシナプス形成

(1) の Dscam1 の結合タンパク質の中で、シナプス関連分子が存在した。マウス DSCAM の結合タンパク質も並行して探索したところ、Ipo5 を同定した。DSCAM の細胞内ドメインが セクレターゼによって切断され、Ipo5 と共に核移行する。そしてシナプス形成に必要な分子の転写制御を担うことが明らかになった。本成果を論文として発表した (Sachse et al, EMBO J, 2019)(図 4)。

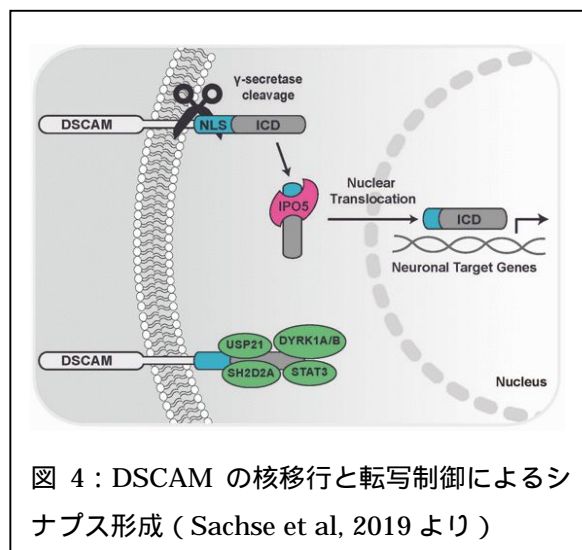


図 4 : DSCAM の核移行と転写制御によるシナプス形成 (Sachse et al, 2019 より)

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

1. Nuclear import of the DSCAM-cytoplasmic domain drives signaling capable of inhibiting synapse formation.

Sachse SM, Lievens S, Ribeiro L, Dascenco D, Masschaele D, Horre K, Misbaer A, Vanderroost N, De Smet AS, Salta E, Erfurth ML, Kise Y, Nebel S, Van Delm W, Plaisance S, Tavernier J, De Strooper B, De Wit J, Schmucker D.

EMBO J, 38(6), 2019.

査読あり

DOI 10.15252/embj.201899669

〔学会発表〕(計 2 件)

1. Kise Y, Izadifar A, Schmucker D, Emoto K (2018)
Molecular signaling pathways regulating axon branching via Dscam1
The 41st Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society in 2018 at Kobe
2. Studying diversity and functions of clustered protocadherins in *Xenopus tropicalis*.
Huang Z, Kise Y, Chen C, Sun W, Etlioglu E, Ulbrich M, Chen W, Schmucker D.
Cold Spring Harbor Laboratory Meeting on Axon guidance, Synapse formation & Regeneration,
2016

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：Schmucker, Dietmar

ローマ字氏名： Schmucker, Dietmar

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。