

平成23年 5月30日現在

研究種目：特定領域研究
研究期間：2005～2009
課題番号：17024025
研究課題名（和文）樹状突起のパターン形成：分岐の複雑度や受容野のサイズを調節・維持する分子機構
研究課題名（英文）Patterning dendritic arbors: molecular mechanisms controlling branching and arbor size
研究代表者
上村 匡 (UEMURA TADASHI)
京都大学・大学院生命科学研究科・教授
研究者番号：80213396

研究成果の概要（和文）：

樹状突起はシナプス入力または感覚入力を受け取る神経突起である。本研究ではまず、特定のサブクラスニューロンにおいて、そのクラスに特徴的な突起パターンの形成を担う転写調節因子を発見した。また、初期エンドソームの積み降ろしの調節により突起の分岐が制御されることを明らかにした。さらに、新規のミトコンドリアタンパク質が、正常な樹状突起形成および突起の縮退・変性を抑制する役割を果たすことを示した。

研究成果の概要（英文）：

Dendrites allow neurons to integrate information from sensory or synaptic inputs. The spatial disposition and local density of branches within the arbor limit the number and type of inputs. We have shown that a group of transcriptional regulators are expressed selectively in subclasses and that they exert their cell-autonomous functions to control formation of the class-specific arbors. Our genetical as well as in vivo cell-biological approaches have revealed an important link between microtubule motors and organelles, such as endosomes, in controlling branch density and spatial disposition of branches within dendritic arbors. Finally we have found that a novel family of mitochondrial proteins is important for preventing breakage of dendritic branches.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2005年度	25,136,000	0	25,136,000
2006年度	21,500,000	0	21,500,000
2007年度	20,400,000	0	20,400,000
2008年度	29,713,050	0	29,713,050
2009年度	21,200,000	0	21,200,000
総計	117,949,050	0	117,949,050

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・発生生物学

キーワード：樹状突起・神経細胞・ショウジョウバエ・細胞骨格・Rhoファミリー・

分子遺伝学

1. 研究開始当初の背景

軸索ガイダンスの研究の進展に比べて、

樹状突起のパターン形成に関しては多くの問題が明らかにされていない。軸索はニュー

一ロンのクラス間で形態上の差異が小さいため、多数の軸索を集団として扱う実験系を用いて研究が発展してきた。しかし、クラス毎に形状が大きく異なり、狭い空間内で複雑に分岐する樹状突起のパターン形成を研究するには、一細胞の解像度で突起を可視化する必要がある。そこで我々は、ショウジョウバエの dendritic arborization (da) neuron を主な解析系とし、その樹状突起を一細胞レベルで観察できる系を作り上げた。

2. 研究の目的

樹状突起はシナプス入力または感覚入力を受け取る神経突起である。軸索に比べ、樹状突起のパターンはニューロンのクラス毎に著しく異なり、この多様性は各クラスに特有の生理機能を反映していると考えられている。本研究では、樹状突起の分岐の複雑度、伸長、そして安定性がどのように調節されるのかに注目する。そしてクラス毎に特徴的なパターンを形成させる仕組みを追いつつ、その仕組みと、複数のクラスに共通に用いられる機構との接点を探り、樹状突起形成を調節する遺伝子プログラムを解明することを目指す。

3. 研究の方法

ショウジョウバエの dendritic arborization (da) neuron を主な解析系とし、その樹状突起を一細胞レベルで観察できる系を作り上げた。特定のクラスの da neuron で発現する遺伝子を分離したので、その中から、各クラスに特徴的な突起のパターン形成に関わる遺伝子を発見した。このアプローチと並行して、突起の分岐や伸長の異常を指標とする遺伝学的なスクリーニングを行い、原因遺伝子を同定しそれぞれの機能を調べた。そして、ショウジョウバエを用いた解析で得られた結果が、哺乳類のニューロンにも適用できるかどうかを検証した。さらに、実験から発見した現象をベースにした数理モデルを構築し、突起形成を担うシステム全体の特性を明らかにすることを目指した。

4. 研究成果

(1) 樹状突起パターンの多様性を支える転写調節因子群の発見と、標的遺伝子の探索

幼虫期において、da neuron は樹状突起の分岐がより複雑な順番に、そして受容野のサイズがより大きな順番に、クラス I からクラス IV までに分類されている。我々は本研究の開始時点で、BTB domain-Zinc finger タンパク質である Abrupt (Ab) が、クラス I ニューロンに特徴的なくし状の単純な突起形成に果たす役割を明らかにしていた (Sugimura et al., *Neuron*, 2004)。本研究ではクラス

IV ニューロンで選択的に発現する、Early B-Cell Factor (EBF) ファミリーに属する Knot (Kn) に着目した。機能喪失表現型の解析、そして異所発現実験の両方の結果から、Kn がクラス IV ニューロンにおいて細胞自律的に機能し、特徴的な高度に分岐した突起形成を賦与することを明らかにした。さらに、Ab と Kn は少なくとも部分的に独立して樹状突起形成に働くこと、そして Kn の標的遺伝子の候補の一つとして、クラス IV ニューロンで発現する上皮型ナトリウムチャンネル遺伝子を見出した (Hattori et al., 2007)。

(2) 突起形成を調節する細胞間相互作用の分子の実体

da neuron とグリア細胞、および da neuron と表皮細胞との相互作用が、樹状突起の正常なパターン形成と軸索分岐の抑制に必要であり、かつグリア細胞の突起伸長も調節することを明らかにした。これらの細胞間相互作用において、免疫グロブリンスーパーファミリーの中の、L1 ファミリーに属する Neuroglian (Nrg) と、Nrg を細胞骨格にアンカーさせる Ankyrin (Ank) が、多面的な役割を果たす (Yamamoto et al., 2006)。

一つのニューロンから伸長する樹状突起は、互いに避け合い絡まることはない。同一ニューロンの樹状突起はこのような “self-avoidance” を示す一方で、異なるクラスに属するニューロンの突起どうしは避け合うことなく、同じ受容野に共存する。この self-avoidance に、Down’s syndrome Cell Adhesion Molecule (Dscam) を介する突起間の反発作用が必要であることを示した。Dscam 遺伝子からは、3 万個以上の isoform が作られると予想されている。異なるクラスに属するニューロンが受容野を共有できるのは、クラス毎に異なる Dscam isoform が発現しているためであるらしい (Hughes et al., 2007)。

最も複雑な分岐パターンを持つクラス IV ニューロンは、同一細胞に由来する樹状突起同士が反発して避け合うこと (姉妹樹状突起の交差忌避) で空間充填的 (space-filling) なパターンを獲得する。本研究室で発見された 7 回膜貫通型カドヘリン Flamingo (Fmi) の機能減弱型変異体では、この樹状突起の相互忌避に異常があることを発見した。Fmi の下流の分子経路を解明する目的で結合分子を探索したところ、LIM-PET ドメインタンパク質 Espinas (Esn) を単離した。esn ノックアウト系統のクラス IV ニューロンの樹状突起においては、fmi 変異体と同様に、姉妹樹状突起の交差忌避異常が生じていた。そして、esn ノックアウト個体のクラス IV ニューロン特異的に esn を発現させたところ、交差頻度を野生型と同程度まで回復させることができた。

さらに Esn のドメイン解析から、Fmi と Esn の分子間結合が、突起間の忌避に必要であることが示された。以上の結果より、Esn が Fmi に結合し樹状突起の自己忌避の調節を行っていることを明らかにした (Usui et al., under revision)。

(3) 樹状突起形成と維持を支えるオルガネラおよび細胞骨格のダイナミクス

突然変異体のスクリーニングから、ダイニン軽中鎖をコードする遺伝子の突然変異を分離した。その表現型の解析から、ダイニンモーターが樹状突起を分岐させる活性を持つ分子複合体、あるいはオルガネラを輸送する仮説を立てた。積荷の候補を探索し、Rab5 を含む初期エンドソームが分岐形成に必要な積荷であることを示した。さらに、樹状突起と軸索のそれぞれにおける微小管極性を生体内で明らかにした。我々の結果は、ダイニン複合体が初期エンドソームの積み降ろしを調節することで、細胞体から突起末端に向かう分岐パターンが形作られる可能性を示している (Rolls et al., 2007; Satoh et al., 2008)。また、がん抑制遺伝子 DLC1 (deleted in liver cancer 1) のショウジョウバエホモログが、生体内において Rho1 の活性を負に調節することにより樹状突起ガイダンスを制御していることを示した (Sato et al., 2010)。

樹状突起の形成とその維持に、ミトコンドリアの機能が重要な役割を果たす結果も得た。Prel1 (protein of relevant evolutionary and lymphoid interest) は進化的に高度に保存されたミトコンドリアタンパク質であるが、その機能はほとんどわかっていない。ショウジョウバエの培養細胞を用い、*preli* 遺伝子の発現を抑制すると、ミトコンドリアが断片化し、クリステ構造が崩壊した。この時、チトクローム *c* オキシダーゼ活性や、ミトコンドリアの膜電位、細胞内の ATP 量が低下していた。*preli* 機能喪失神経細胞では、樹状突起パターンは著しく単純化した。また、野生型神経細胞と比べて樹状突起や軸索に分布するミトコンドリアが大幅に減少し、細胞体内では断片化したミトコンドリアが観察された。さらに、幼虫期の *preli* 機能喪失細胞では樹状突起の太い枝がその付け根付近で切断され、成虫期では加齢と共に樹状突起の縮退が観察された。これらの表現型は、ショウジョウバエ Bcl ファミリーに属する anti-apoptotic 分子である Buffy の発現によって回復した。以上の結果から、Prel1 タンパク質はミトコンドリアの機能維持に積極的に働きかけ、正常な樹状突起形成および突起の縮退・変性を抑制することが明らかにされた (Tsubouchi et al., 2009)。

(4) ほ乳類神経細胞の樹状突起形成機構へ

の発展

以前我々は、7回膜貫通型カドヘリンファミリーを発見し、da neuron とほ乳類ニューロンのいずれにおいても、7回膜貫通型カドヘリンが樹状突起の伸長を制御することを示していた (Shima et al., *Developmental Cell* 2004)。しかし、分子レベルでの作用機序は明らかではなかった。今回、二つのほ乳類7回膜貫通型カドヘリン (Celsr2 と Celsr3) が、ホモフィリックな結合により異なる様式で活性化され、3量体 G タンパク質との共役を介して突起伸長を調節する仮説を支持する結果を得た (Shima et al., 2007)。また、ショウジョウバエ7回膜貫通型カドヘリン Flamingo (Fmi) の構造-機能解析により、未同定のリガンドとヘテロフィリックに結合して突起伸長を負に調節する局面があることが示唆された (Kimura et al., 2006)。

(5) 空間充填型突起パターンを形成する自己組織化モデル

クラス IV ニューロンや脊椎動物の網膜の神経節細胞などは、受容野全面をほぼ一様に覆い、かつ同種細胞間で重複の少ない空間充填型樹状突起を形成する。我々の以前の実験結果は、空間充填型樹状突起の発生が自己組織化機構により調節されていることを支持していた (Sugimura et al., *Journal of Neuroscience*, 2003)。今回、実験結果を再現できる二変数 (Activator と Suppressor) 反応拡散モデルを構築した。細胞内の Activator は樹状突起の成長を制御する。Suppressor は Activator から合成され、細胞外空間を拡散して突起間の抑制性の相互作用を担う。シミュレーションの結果、我々のモデルは突起の伸長と分岐をコントロールして、空間充填型樹状パターンを自律的に形成した。さらに、シミュレーションで得られたパターンを“突起整列度”という統計量で分類できること、そしてこの統計量は細胞内部の Activator の分布を反映していることを発見した (Sugimura et al., 2007)。従って、この統計量から現実のニューロンの形態を分類し、さらに、その突起パターンから突起内の Activator の分布を予測しうる。

また、我々はさらにモデルの変更を試み、これまでの知見から提唱された樹状突起間反発作用についての仮説を検証した。その結果、これまで批判を受けてきた「拡散性抑制因子仮説」に基づいた数理モデルが、野生型に見られる正常な樹状突起パターンと変異体に見られる異常な樹状突起パターンの両方を定性的に再現できることを明らかにした (Shimono et al., 2010)。この結果は、成体においても樹状突起パターン形成が拡散性の抑制因子によって制御されている可能性を示している。

(6) 樹状突起のリモデリングと個体の一生を通じた維持機構の解明に向けて
初期発生においていったん作られた神経回路は動物の様々な行動を支えるために作り変えられる。この神経回路の再編成の一つの様式として、樹状突起あるいは軸索のパターンを作り変える方法がある。一部の da neuron は、蛹期(変態期)において幼虫型から成虫型へと樹状突起パターンを作り変えることが知られていたため、樹状突起のリモデリングを研究する優れたモデル系となることが予想された。しかし、幼虫期の da neuron の中でどの neuron が成虫期まで生き残るのか、そして生き残った neuron は新たにどのような形態の樹状突起を展開するのかといった基本的な情報がほとんど欠落していた。

そこで我々は、まず成虫期の da neuron を解剖学的に同定し、成虫の腹部には半体節あたり6つの da neuron が存在し、そのうち5つは幼虫期の da neuron の生き残りであることを明らかにした。また、その中の一つの da neuron は蛹期を生きのびて、羽化後数日の間に放射状から格子状へとその樹状突起パターンを作り変えた後、その形態を個体の一生を通して維持することを明らかにした(Shimono et al., 2009)。以上の観察結果は、成虫期 da neuron は樹状突起のリモデリングだけでなく、加齢に伴う神経突起の変性を一細胞レベルで感度よく検出できる系としても有用ではないかと考えた。実際、ミトコンドリア機能を低下させると、加齢に伴う樹状突起の変性を検出できた(Tsubouchi et al., 2009)。我々は大規模な突然変異スクリーニングを実現するために、ショウジョウバエで発達したモザイク法を改良し、da neuron において簡便にかつ効率よく遺伝子の機能をノックアウトするシステムを作製した。

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10件) 全て査読あり

- ① Sato, D., Sugimura, K., Satoh, D., & Uemura, T. Crossveinless-c, the *Drosophila* homolog of tumor suppressor DLC1, regulates directional elongation of dendritic branches via down-regulating Rho1 activity. *Genes to Cells* **15**, 485-500 (2010).
- ② Shimono, K., Sugimura, K., Kengaku, M., Uemura, T., & Mochizuki, A. Computational Modeling of Dendritic Tiling By Diffusible Extracellular Suppressor. *Genes to Cells* **15**, 137-149 (2010).
- ③ Tsubouchi, A., Tsuyama, T., Fujioka, M., Kohda, H., Okamoto-Furuta, K., Aigaki, T., & Uemura, T. 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 (2009).
- ④ Shimono, K., Fujimoto, A., Tsuyama, T., Yamamoto-Kochi, M., Sato, M., Hattori, Y., Sugimura, K., Usui, T., Kimura, K., & Uemura, T. Multidendritic sensory neurons in the adult *Drosophila* abdomen: origins, dendritic morphology, and segment- and age-dependent programmed cell death. *Neural Development* **4**, e37 (2009).
- ⑤ Satoh, D., Sato, D., Tsuyama, T., Saito, M., Ohkura, H., M. Rolls, M., Ishikawa, F., & Uemura, T. Spatial Control of Branching within Dendritic Arbors by Dynein-Dependent Transport of Rab5-Endosomes. *Nature Cell Biology* **10**, 1164-1171(2008).
- ⑥ Sugimura, K., Shimono, K., Uemura, T., & Mochizuki, A., Self-organizing Mechanism for Development of Space-filling Neuronal Dendrites. *PLoS Computational Biology* **3**, e212 (2007).
- ⑦ Shima, Y., Kawaguchi, S., Kosaka, K., Nakayama, M., Hoshino, M., Nabeshima, Y., Hirano, T., & Uemura, T. Opposing roles in neurite growth control by two 7-pass transmembrane cadherins. *Nature Neuroscience* **10**, 963-969 (2007).
- ⑧ Hattori, Y., Sugimura, K., & Uemura, T. Selective expression of Knot/Collier, a Transcriptional Regulator of the EBF/Olf-1 Family, Endows the *Drosophila* Sensory System with Neuronal Class-specific Elaborated Dendritic Patterns. *Genes to Cells* **12**, 1011-1022 (2007).
- ⑨ M. Rolls, M., Satoh, D., J Clyne, P., L Henner, L., Uemura, T., & Q Doe, Q. Polarity and intracellular compartmentalization of *Drosophila* neurons. *Neural Development* **2**, 7-21 (2007).
- ⑩ Yamamoto, M., Ueda, R., Takahashi, K., Saigo, K., & Uemura, T. Control of axonal sprouting and dendrite branching by the Nrg-Ank complex at the neuron-glia interface. *Current Biology* **16**, 1678-1683 (2006).

〔学会発表〕(計6件) いずれも代表者による
海外招待講演

- ① Logic of shaping cells in development -Roles of seven-pass transmembrane cadherin, Thursday Seminar at Max Planck Institute of Cell Biology and Genetics at Dresden, November 30, 2006.
- ② Dendrite morphogenesis. West China Developmental & Stem Cell Institute in Sichuan University, August 25, 2008.
- ③ Diverse morphologies of dendritic arbors in “Neuronal morphogenesis and pathfinding” (session organizer) in International Society for Developmental Neuroscience at Asilomar, June 1-3, 2008.
- ④ Dendrite morphogenesis: Distinct dependency on mitochondrial fusion/fission and endosomal trafficking. “Dendrites: Development and Plasticity” at Janelia Farm/HHMI, March 31-April 2, 2008.
- ⑤ Diverse morphologies of dendritic arbors: Distinct dependency on organelle dynamics. Yale University, March 27-28, 2008.
- ⑥ Roles of organelle dynamics in shaping cells (one of plenary talks) in 50th Drosophila Research Conference at Chicago, March 3-4, 2009.

〔その他〕

新聞報道：

- ①. 京都新聞・平成19年5月17日(木)・朝刊「生命科学は今：細胞のデザイン」
- ②. 京都新聞・平成20年9月1日(月)・夕刊「神経細胞 分岐過程を解明」
- ③. 京都新聞・平成21年12月26日(土)・夕刊「神経切断防ぐ遺伝子」

ホームページ：

<http://www.lif.kyoto-u.ac.jp/labs/cellpattern/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

上村 匡 (UEMURA TADASHI)

京都大学・大学院生命科学研究科・教授

研究者番号：80213396

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし