

平成 21 年 6 月 8 日現在

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2006～2008

課題番号：18687901

研究課題名（和文）ニューロンの受容領域を制御する細胞内シグナル伝達機構の解明

研究課題名（英文）Studies on the signaling network that regulates dendritic fields.

研究代表者

榎本 和生 (EMOTO KAZUO)

国立遺伝学研究所・新分野創造センター・准教授

研究者番号：80300953

研究成果の概要：樹状突起は、他の神経細胞もしくは感覚受容器からの情報入力を担っており、外部情報を的確に受容する為には、樹状突起が適切な空間に配置されることにより、受容領域を正確にカバーすることが重要である。申請者は、リン酸化酵素 Ndr キナーゼ・ファミリーが、樹状突起の維持・管理機構において中心的な役割を果たしていることを世界に先駆けて示した。さらに、ダウン症原因因子の 1 つである接着分子 Dscam (Down's Syndrome-associated Adhesion Molecule) が Ndr キナーゼと協調して機能することを見出した。

交付額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|---------|------------|-----------|------------|
| 2006 年度 | 11,300,000 | 0 | 11,300,000 |
| 2007 年度 | 6,200,000 | 1,860,000 | 8,060,000 |
| 2008 年度 | 6,400,000 | 1,920,000 | 8,320,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 23,900,000 | 3,780,000 | 27,680,000 |

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・細胞生物学

キーワード：Ndr キナーゼ、樹状突起、ニューロン、受容領域、タイル化

1. 研究開始当初の背景

我々の脳では、軸索と樹状突起という機能・形態的に異なる 2 種の神経突起を介して、1000 億個もの神経細胞がネットワークを形成している。樹状突起は、他の神経細胞もしくは感覚受容器からの情報入力を担っており、外部情報を的確に受容する為には、樹状突起が適切な空間に配置されることにより、受容領域を正確にカバーすることが重要である。ダウン症候群や脆弱 X 症候群など精神遅滞疾患患者の脳においては、樹状突起の退縮が頻繁に観察される

ことから、樹状突起の維持・管理機構の破綻に起因する神経シグナル伝達異常が精神疾患発症の主因である可能性が指摘されている。しかし、簡便かつ生体内での現象を忠実に反映する解析手段が確立されていない為に、樹状突起の維持・管理を行なう分子基盤はほとんど明らかにされていなかった。

2. 研究の目的

私達は、リン酸化酵素 Ndr キナーゼが、受容領域の維持・管理機構において中心的な役割を果たしていることを世界に先駆けて示

した。本研究では、Ndr キナーゼ・ファミリーの脳神経系における機能、及び、その機能異常と精神遅滞疾患との関連を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) Ndr キナーゼを中心とする細胞内シグナル伝達経路の解明

Ndr キナーゼは、脳神経系に強く発現するリン酸化酵素であるが、その制御機構や基質についてはほとんど情報が無い。本研究では、主として生化学的手法を用いて、Ndr キナーゼの上流または下流に位置する分子群を同定し、シグナル伝達系の全容解明を目指す。申請者らは、これまでに、神経細胞内においてNdr キナーゼが、少なくとも5個の蛋白質と安定な複合体を形成していることを見出している(未発表)。これらの分子はNdr キナーゼの基質もしくは制御因子である可能性が高い。そこで、Ndr キナーゼ複合体を生化学的に精製し、マスペクトル法を用いて個々の分子を同定する。

(2) Ndr キナーゼの機能異常と精神遅滞疾患発病との関連解明

ダウン症候群は、ヒト21番染色体の分配異常に起因する精神疾患であり、樹状突起の退縮が発症の主因であると考えられている。その原因分子としては、神経細胞特異的に発現する接着分子 Dscam (Down's Syndrome-associated Cell Adhesion Molecule) が想定されているが、Dscam の神経機能はほとんど明らかにされていない。最近、Dscam の細胞内ドメインに特異的に結合する蛋白質として Ndr キナーゼが同定された(私信・未発表)。従って、Dscam は Ndr キナーゼ・シグナルを介して樹状突起の維持・管理を行っている可能性が考えられる。本研究では、ダウン症と Ndr キナーゼ・シグナルとの機能関連に注目して研究を進める。具体的には、*in vitro* キナーゼ・アッセイ法を用いて、①Dscam 細胞内ドメインが Ndr キナーゼ活性に与える影響、②Ndr キナーゼによる Dscam 細胞内ドメインのリン酸化、について検討する。一方で、ダウン症モデルマウスを用いて、Ndr キナーゼの発現量、脳内分布、酵素活性の変化について検討を行なう。

(3) 樹状突起の維持・管理に必須な遺伝子群の網羅的同定：誘導型 RNAi システムを用いた解析

誘導型 RNAi とは、個々の遺伝子に対する RNAi コンストラクトを組み込んだショウジョウバエ系統のことであり、

Gal4/UAS システムと併用することにより、時期および細胞特異的に特定の遺伝子の機能を抑制することが可能となる。本システムを用いる事により、数ヶ月以内に全ショウジョウバエ遺伝子の神経機能を解析する事が理論上可能である。本研究では、各々の遺伝子に対応する RNAi コンストラクトを、神経細胞 (post-mitotic neuron) 特異的に発現させて、樹状突起の維持・管理に対する影響を解析する。同定した分子群については、Ndr キナーゼとの機能相関に注目して解析を進める。

4. 研究成果

(1) ダウン症候群関連分子 Dscam の樹状突起形成における機能解明

まず、Dscam 変異体を用いてクローナル解析を行ったところ、感覚ニューロン樹状突起の領域形成に異常が生じることを見出した (Neuron 2007)。タイムラプス法により詳細な解析を行ったところ、通常、樹状突起同士はほとんど混じり合う(交差する)ことはないが、Dscam 変異体では、突起同士が顕著に交差し合い、樹状突起の形成が不全となることが分かった(図1)。従って、Dscam は樹状突起間に生じる反発運動に必須である事が示された。続いて、Dscam と Ndr キナーゼとの機能相関について生化学的手法を用いて検討したところ、Dscam が Ndr キナーゼの活性を顕著に増加させることを見出した。従って、Dscam は Ndr キナーゼ・シグナルの上流に位置し、Ndr キナーゼ・シグナルを介して樹状突起の形態形成を制御している可能性が考えられた。

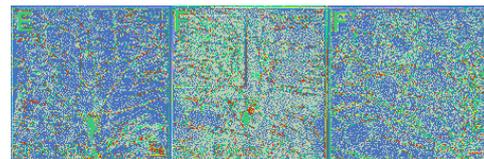


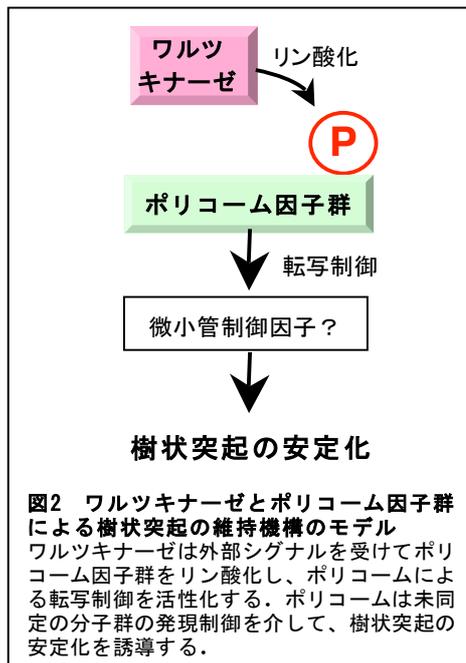
図1 Dscam 変異体に見られる樹状突起動態の異常

野生型の感覚ニューロン (E) では突起間の交差は全く見られないが、Dscam 変異体の感覚ニューロン (F, F') では交差もしくは絡まりが顕著に増加する(矢頭)。F' は F の四角内の拡大図。

(2) Ndr キナーゼを中心とする細胞内シグナル伝達経路の解明

Ndr キナーゼと強い遺伝相関をしめすショウジョウバエ変異体5株を単離した。続いて、最も強い相関を示す変異体の原因遺伝子同定を行い、ポリコム転写制御因子群

(PcG)であることを明らかにした (**Genes Dev.** 2007)。PcGはヒストンのメチル化修飾を介して遺伝子発現を負に制御するエピジェネティック制御因子であり、脳神経系では神経前駆体細胞からのニューロン分化制御に関与する可能性が指摘されているが、神経形態制御能については全く知られていない。私達は、Ndr キナーゼと Pc が神経細胞内で複合体を形成していること、Ndr キナーゼが PcG のヒストンメチル化活性を制御することにより、樹状突起の安定性を制御することを示した (**Genes Dev.** 2007)。本解析結果から、PcG が樹状突起維持において主要な機能を果たしていることが初めて示された。



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 8 件)

- ① Soba, P., Zhu, S., Emoto, K., Younger, S., Yang, S.J., Yu, H.H., Lee, T., Jan, L.Y., and Jan, Y.N.: *Drosophila* sensory neurons require Dscam for dendrite self avoidance and proper dendritic organization. **Neuron** 54: 403-416 (2007). (査読有)
- ② Parrish, J. Z., Emoto, K., Jan, L., and Jan, Y. N.: Polycomb genes interact with the tumor suppressor *hippo* and *warts* in the maintenance of *Drosophila* sensory neuron dendrites. **Genes Dev.** 21: 956-972 (2007).

(査読有)

- ③ Parrish, J. Z.* Emoto, K.*, Kim, M. D., and Jan, Y. N.: Mechanisms that regulate establishment, maintenance, and remodeling of dendritic fields. (*equal contribution) **Annu. Rev. Neurosci.** 30: 399-423 (2007). (査読有)
- ④ Emoto, K., Parrish, J. Z., Jan, L., and Jan, Y. N.: The tumour suppressor Hippo acts with the NDR kinases in dendritic tiling and maintenance. **Nature** 443: 210-213 (2006). (査読有)
- ⑤ 榎本和生: 「神経突起のパターン形成」特集: 神経系の発生とその異常 **BRAIN and NERVE** 60: 351-364 (2008). (査読無)
- ⑥ 榎本和生・小池(熊谷)牧子: Special Review 「ニューロン受容領域のタイル化を制御するリン酸化シグナルネットワーク」細胞工学 26: 806-810 (2007). (査読無)
- ⑦ 榎本和生: 「ニューロンはいかにして固有の受容領域を獲得し、それを維持・管理するのか?」蛋白質核酸酵素 54: 842-852 (2007). (査読無)
- ⑧ 榎本和生: 「癌抑制遺伝子群の新たな神経機能の発見: ニューロンの受容領域を維持・管理する分子メカニズム」実験医学 24: 2985-2988 (2006). (査読無)

[学会発表] (計 6 件)

- ① Emoto, K.: How do neurons establish and maintain their unique dendritic fields? **NAIST International Symposium "Cell Signaling"** 2008.11.3-5, Nara
- ② Emoto, K.: The cellular and molecular basis for membrane morphogenesis. **UK-Japan Frontier of Science Symposium** 2008. 10.3-6 Tokyo
- ③ Emoto, K., Yasunaga, K.-I., Suzuki, E.: "Dendrite remodeling in adult *Drosophila* sensory neurons" 第 31 回日本神経科学学会年会 (Neuro2008) 2008.7.9-11 東京
- ④ Emoto, K.: The molecular mechanisms that regulate establishment, maintenance, and remodeling of dendritic fields. **The 1st iCeMS Symposium** 2008.2.20-22, Kyoto

- ⑤ 榎本和生：“ニューロン受容領域を決定・維持するキナーゼシグナル・ネットワーク” 第80回日本生化学会・第30回日本分子生物学会合同年会（BMB2007）ワークショップ「From shape to function：ニューロンの形態形成と可塑的变化を司る分子基盤」2007.12.11-15 横浜
- ⑥ Kazuo Emoto：“The kinase signaling network that regulates establishment and maintenance of dendritic fields” 第30回日本神経科学会年会（Neuro2007）2007.9.10-12 横浜

[その他]

ホームページ等

<http://www.nig.ac.jp/section/emoto/emoto-j.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

榎本 和生 (EMOTO KAZUO)

国立遺伝学研究所・新分野創造センター・准教授

研究者番号：80300953