

機関番号：12601

研究種目：若手研究（A）

研究期間：2007～2009

課題番号：19687014

研究課題名（和文） 脳内1細胞モザイク解析法による神経細胞の極性獲得・制御機構の解明

研究課題名（英文） Elucidating the molecular mechanisms of neuronal polarity with genetic mosaic methods

研究代表者

千原 崇裕 (CHIHARA TAKAHIRO)

東京大学・大学院薬学系研究科・講師

研究者番号：00431891

研究成果の概要（和文）：

脳のような複雑な神経ネットワークを形成する神経細胞は、それぞれ「軸索」、及び「樹状突起」といった高度に極性化した構造を有している。本研究では、神経細胞の極性化機構を明らかにする目的でショウジョウバエを用いた遺伝学的研究を行った。研究代表者が独自に獲得した神経極性、回路形成に関わる変異体の解析を進めることによって、神経極性形成・回路形成における「膜蛋白質の糖鎖修飾の重要性」を見出した。

研究成果の概要（英文）：

To form functional neural circuits like brain, each neuron must possess extremely polarized cellular structures, dendrites and an axon. In this study, we utilized various *Drosophila* molecular genetic methods to elucidate the molecular mechanisms for neuronal polarization in vivo. Molecular genetic analyses of several mutants defective in neuronal polarization and circuit formation revealed the importance of sugar modification on cell surface proteins.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	6,900,000	2,070,000	8,970,000
2008年度	6,300,000	1,890,000	8,190,000
2009年度	6,300,000	1,890,000	8,190,000
総計	19,500,000	5,850,000	25,350,000

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：形態形成・神経極性・神経発生生物学

1. 研究開始当初の背景

脳のような複雑な神経ネットワークを形成する神経細胞は、それぞれ「軸索」、及び「樹状突起」といった高度に極性化した構造を有している。「軸索」は、細胞体から伸びた一本の細胞質突起で、一般に神経情報の出力を担っている。一方、「樹状突起」は、無数の細胞質突起から構成される複雑な構造を有しており、神経情報の入力を行っている。よって、神経ネットワークの形成機構を理解するためには、「軸索」及び「樹状突起」の極性化機構、形態制御機構、及びその相互連

関を解明する必要がある。

2. 研究の目的

これまでも数多くの研究者が神経細胞の形態形成に関する研究を行ってきた。しかし、その殆どは「軸索」、特に軸索がどのようにして目的の場所へ到達するか？といった「軸索ガイダンス」に関するものであり、「樹状突起の形態形成」に関する研究は殆ど行われていない。また神経極性研究に関してはその殆どの報告が *in vitro*（培養細胞）レベルの研究であり、*in vivo*（生体内）における神

経極性研究は非常に少ない。これら研究進展の隘路として、*in vivo* (脳内) において、(1)「1つの神経細胞」の軸索・樹状突起、双方の形態を観察・比較する事が困難(2)樹状突起を高解像度で解析すること(低バックグラウンドで1細胞のみをラベル)が困難(3)樹状突起はそのあまりに複雑な構造のため、実験的に定性・定量化する事が困難などという点が挙げられる。そこで本研究では、上記問題点を克服するためにショウジョウバエの遺伝学を最大限に活用し、脳内における神経極性獲得・形態制御機構の解明を目指した。

3. 研究の方法

脳から神経細胞を取り出して培養した場合、その細胞は既に「脳内」とは違った環境に曝されており、本来獲得すべき神経形態を示さない。よって神経の極性・形態形成機構を理解するには「脳内」において、しかも非常に細く複雑な樹状突起の形態を観察するために「1細胞のみ」をラベルする必要がある。研究代表者は、これらの条件を満たすモデル系として、ショウジョウバエ嗅覚系神経: Projection Neuron (以下PNと省略)を採用し、さらに MARCM 法を活用した。MARCM法とは、体細胞分裂時に染色体組換えを誘導することにより、生体内の1細胞をラベルし、更に「そのラベルされた細胞」のみを突然変異ホモ接合体にする事を可能にする方法である(*Neuron* 22, 451-461, 1999)。これにより、脳内において1つの神経細胞の樹状突起・軸索、双方の形態を詳細に解析する事が可能になる。事実、この方法を用いて、「1つのPN樹状突起は、嗅覚葉内の1つの糸球体へ投射する事(*Nature* 414, 204-208, 2001)」及び、「樹状突起と軸索の形態に強い相関がある事(*Cell*, 109, 243-255, 2002)」が研究協力者の Liqun Luo 教授によって報告されている。このように脳内における1細胞モザイク解析が可能で、且つ樹状突起・軸索の形態を定性・定量化できるPNは、神経極性・形態形成を研究する上で非常に有用なモデル系と成りうる。

これまで研究代表者は、このモデル系を用いて「神経極性・樹状突起形成に重要な遺伝子の探索」を目的に、遺伝学的モザイクスクリーニングを独自に考案し、実施した。具体的には、突然変異誘導化学物質EMSを用いて劣性致死の突然変異体系統を作成する。次にMARCM法を用いて、それら突然変異のホモ接合PNクローン細胞を脳内に誘導し、その神経形態を正常型と比較検討した。1,821系統の突然変異体をスクリーニングした結果、興味深い表現型を示す4系統の回収に成功した。このうちの1つの変異体解析を更に進めた

結果、「軸索と樹状突起はミトコンドリア傷害に対する感受性が異なる」ことを明らかにしている。この結果は、樹状突起と軸索の性質の違いを脳内において1細胞レベルの解像度で示した研究として関連学会発表にて大きな反響を受けた(*Nature Neuroscience*, under revision)。本研究では、上記4つの変異体のうちの2つ、神経極性に影響がある変異体、及び樹状突起ガイダンスに影響がある変異体の解析を行った。

研究代表者は前述スクリーニングから「軸索が欠損し、逆に樹状突起が倍化している変異体」を回収し、*dogi*(*doubled glomeruli*)と名付けた。この表現型から、*dogi*は神経極性形成に関わる変異体であることが予想できる。これまで*in vivo*で神経極性に影響を与える変異体の報告は殆どないことから、この変異体の解析は*in vivo*神経極性研究を行う上での分子的基盤研究に成りうると思われる。更に原因遺伝子のマッピングの結果、*dogi*変異体の原因遺伝子は、線虫からヒトまで高度に保存された遺伝子であることが明らかになった。またDogi蛋白質の一次構造解析から、細胞極性制御因子aPKCとの結合が予測されている。これら結果を踏まえると、*dogi*遺伝子は、進化的に保存された、神経極性形成に必須の遺伝子であると推測できる。

研究代表者は更に、*meigo* (*medial glomeruli*) 変異体の原因遺伝子同定と機能解析も行う。*meigo*変異体も*dogi*変異体と同様に、研究代表者のスクリーニングから回収された変異体であり、「すべての樹状突起が正中線側へ投射し、側方へ投射しない」という興味深い表現型を示す。すなわち「樹状突起ガイダンス」に異常が見られる変異体である。申請者は、この変異体を解析することによって、軸索ガイダンスと樹状突起ガイダンスの類似性と相違点などを解析できるものと考えている。

*dogi*変異体と*meigo*変異体。本研究では、この二つの変異体、原因遺伝子、及びその遺伝子産物の機能解析を脳内1細胞モザイク解析法を活用することにより、神経極性、形態形成研究の分子的基盤の解明を目指した。

4. 研究成果

PN樹状突起の投射位置に異常を来す変異体*dogi*(*doubled glomeruli*)と*meigo*(*medial glomeruli*)変異体の表現型解析、責任遺伝子の機能解析を行った。

*dogi*変異体:

PNを*dogi*変異ホモ接合体にすると、PN樹状突起、及び軸索に特徴的な投射異常が現れること、及び*dogi*変異体の原因遺伝子は進化的に保存された新規の遺伝子であることを明らかにした。また、Dogi蛋白質を特異的に認識する抗体の作成、及び、Dogiを強制発現

させるための UAS-Dogi トランスジェニック ショウジョウバエの作出し、Dogi 蛋白質が PN において細胞自律的に機能していることを示すことに成功した。更に、Dogi の生理機能を明らかにする目的で、Dogi 蛋白質と結合する分子を Yeast two-hybrid 法を用いて探索した。その結果、6つの蛋白質を同定することに成功した。GST プルダウン法を用いてこれらの蛋白質結合の再確認にも成功した。これら結合候補蛋白質をコードする遺伝子の変異体や過剰発現系統を用いることにより、Dogi 蛋白質とこれら結合蛋白質が生体内で複合体を形成し、樹状突起の形態形成に関与する可能性をサポートする遺伝学的相互作用を検出している。以上、神経極性・神経回路形成を制御する新規 *dogi* 遺伝子の機能解析、及びその分子機構を解明する研究を確実に進展させることができた。

*meigo*変異体:

PN を *meigo* 変異ホモ接合体にすると、すべての樹状突起投射が脳の正中線側にシフトするという興味深い表現型を示した。この表現型の原因となる突然変異を同定する目的で、遺伝学的マッピングを行い、樹状突起投射異常の原因遺伝子 (*meigo* 遺伝子と命名) の同定に成功した。*meigo* 遺伝子は、進化的に保存された糖核酸トランスポーター (Meigo) をコードする遺伝子である。糖核酸トランスポーターは小胞体・ゴルジ体に存在し、細胞質の糖核酸を小胞体やゴルジ体内腔へ輸送する。輸送された糖核酸は、膜分子・分泌分子などの糖修飾に用いられる。よって、*meigo* 変異体では、何らかの膜蛋白質の糖修飾が異常になっている可能性がある。研究代表者は、*meigo* 変異体との遺伝学的相互作用を利用したスクリーニングを考案し、*meigo* 変異体で機能異常になっている膜分子を探索し、いくつかの候補を得ている。この *meigo* 変異体を用いた解析により、神経細胞の極性化、樹状突起形態形成における膜分子の糖鎖修飾の重要性を示すことができた。今後は更に *meigo* 変異体の遺伝生化学的解析を進めていく予定である。

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4件)

- ① Joy S. Tea, Takahiro Chihara and Liqun Luo. Histone deacetylase Rpd3 regulates olfactory projection neuron dendrite targeting via the transcription factor Prospero. *The Journal of Neuroscience*. 30, 9939-46 (2010) 査読有り

- ② Suewei Lin, Sen-Lin Lai, Huang-Hsiang Yu, Takahiro Chihara, Liqun Luo and Tzumin Lee. Lineage-specific effects of Notch/Numb signaling in post-embryonic development of the *Drosophila* brain. *Development*. 137, 43-51 (2010) 査読有り

- ③ Sayaka Sekine, Masayuki Miura and Takahiro Chihara. Organelles in developing neurons: Essential regulators of neuronal morphogenesis and function. *The International Journal of Developmental Biology*. 53, 19-27 (2009) 査読有り

- ④ Takahiro Chihara, David Luginbuhl and Liqun Luo. Cytoplasmic and mitochondrial protein translation in axonal and dendritic terminal arborization. *Nature Neuroscience*. 10, 828-837 (2007) 査読有り

[学会発表] (計20件)

- ① Chisako Ando, Liqun Luo, Masayuki Miura and Takahiro Chihara. Neuronal wiring in the olfactory system requires a novel targeting molecule, Dogi. The 13th European *Drosophila* neurobiology conference. Sep 1-5, 2010. Manchester, UK

- ② Sayaka Sekine, Liqun Luo, Masayuki Miura and Takahiro Chihara. Dendritic and axonal targeting along medial to lateral axis in the antennal lobe are regulated by Meigo, a putative UDP-sugar transporter. The 51st Annual *Drosophila* Research Conference. Apr 7-11, 2010. Washington DC, USA

- ③ Takahiro Chihara. 脳内単一脳細胞モザイク解析法を用いて神経回路形成を理解する Symposium on "Biological Sciences" at Kumamoto University. Oct 16, 2009. Kumamoto, Japan

- ④ 千原崇裕 ショウジョウバエ脳内の樹状突起ターゲティングを支える分子基盤国立遺伝学研究所研究会「モデル生物における神経系の遺伝学 - 発生から行動まで-」2009年3月27日、三島・静岡県

⑤ Chisako Ando, Liqun Luo, Masayuki Miura and Takahiro Chihara. Evolutionarily conserved protein, Dogi regulates dendritic targeting and axonal guidance of Drosophila olfactory projection neurons. 50th Annual Drosophila Research Conference. March 4-8, 2009. Chicago, USA

⑥ 千原崇裕 嗅覚系二次神経の軸索・樹状突起ガイダンスを制御する分子機構 金沢大学革新脳科学COEシンポジウム Neurobiology of Drosophila 2008年8月21日 金沢・石川県

⑦ Takahiro Chihara, Joy S. Wu and Liqun Luo. Histone deacetylase 1 (Rpd3) in dendritic targeting of Drosophila olfactory projection neurons. 49th Annual Drosophila Research Conference. April 2-6, 2008. San Diego, USA

⑧ Takahiro Chihara, Joy S. Wu, David Luginbuhl, Masayuki Miura and Liqun Luo. Genetic mosaic analysis in Drosophila brain reveals specialized functions of house-keeping genes in neuronal morphogenesis. BMB2007 (第30回日本分子生物学会年会・第80回日本生化学会大会・合同大会) 2007年12月11~15日 パシフィコ横浜・神奈川県

⑨ Takahiro Chihara, David Luginbuhl and Liqun Luo. Genetic analysis of dendritic morphogenesis: Neuronal polarity, targeting and maintenance. The 8th Japanese Drosophila Research Conference. July 2-4, 2007. Awaji Yumebutai International Conference Center, Hyogo, Japan

[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：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]

ホームページ等

<http://www.f.u-tokyo.ac.jp/~genetics/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

千原 崇裕 (CHIHARA TAKAHIRO)

東京大学 大学院薬学系研究科・講師

研究者番号：00431891

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし