

平成 22 年 6 月 2 日現在

研究種目：若手研究 (B)
研究期間：2008～2009
課題番号：20700319
研究課題名 (和文) 神経層構造において、軸索ソーティングを制御する分子基盤の解析
研究課題名 (英文) Mechanisms underlying axon sorting in neural layer formation
研究代表者
来栖 光彦 (KURUSU MITSUHIKO)
国立遺伝学研究所・構造遺伝学研究センター・助教
研究者番号：50413985

研究成果の概要 (和文)：

N-cadherin は、神経回路の形成過程において多面的に働くことが知られているが、それら個々の機能が単一の神経回路でどのような制御の基に発揮されるのかについてはほとんど解析されていない。本研究では、(1) ショウジョウバエ N-cad が学習中枢キノコ体と運動神経回路のどちらにおいても、軸索ガイダンスとシナプス成長のステップで異なる役割を発揮すること、(2) これら機能的多面性は、神経細胞の成熟過程における N-cad の発現変化に関係すること、(3) この発現変化が細胞自律的に制御され、且つ、陽イオンの細胞内流入によって誘導されることを明らかにした。

研究成果の概要 (英文)：

Although N-cadherin has been known to exert multiple roles in neural circuit formation, it remains unclear how such functions are achieved during differentiation of a given neuronal cell. Here we demonstrate that *Drosophila* N-cadherin is indeed required for the different processes such as axon guidance and synaptic growth in both mushroom body and motoneurons. We also show that these functions are executed by spatiotemporal regulation of N-cad expression during neuronal differentiation. Interestingly, this change in the expression of N-cad is cell-autonomously controlled and mediated by cation influx.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2009 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：神経解剖学・神経病理学

キーワード：ショウジョウバエ、運動神経、キノコ体、培養細胞、N-cadherin、TRPA1、シナプス

1. 研究開始当初の背景

中枢神経系の多くは、分担された機能に応じて特殊化した神経構造を持つ。このような神経構造は、位相的な配線地図を形作ることが知られているが、この位相性は異なる性質を持つ細胞群が規則的に配置することや神経細胞が一定の規則で投射することで成り立っている。本研究は、このような位相性がどのような分子基盤によって作られるのか探索することを出発点としている。これまでショウジョウバエの脳中枢回路キノコ体に着目し、その位相的な神経層を構築する分子基盤の理解を目的に研究してきた。

キノコ体の層構造では、新生神経から伸長する幼若な繊維群が互いに集束し、軸索束の中核領域へ投射するが、発生が進むにつれ外縁領域へ移動し、結果として年輪のような層構造が形成される。このことから、キノコ体の軸索層構造の確立には、新生神経の軸索群が選択的に収束し、軸索層の中核領域へ投射することが必須であると考えられる。これまで、このような投射を規定するためには新生神経で発現するガイダンス分子が重要であろうと予測し、これら制御分子を探索した結果、複数の細胞接着分子や受容体を同定した。これらの中でも、N-cadherinは、新生神経において発現レベルが高く、成熟神経ではその発現が低い。この発現レベルのタイミングを乱すと、新生神経の軸索の投射パターンや樹状突起の成長が大きく乱される結果となった。このことから、キノコ体神経回路の形成には、N-cad の発現分布が神経細胞の成熟過程において時間的に制御されなければならない。本研究では、このような N-cad の発現分布がどのように制御されているのかについて探索することを目的とした。

2. 研究の目的

多くの細胞接着分子や受容体が神経突起の伸長過程からシナプスの成長過程までの各段階において多面的に関与することが報告されている。しかしながら、それら多面的な機能がどのようにして発揮されるのかについてはほとんど注目されていない。これまでの解析によって、キノコ体における N-cad の発現は、幼若神経では高レベルに発現し軸索に沿って一様に分布するが、神経細胞の成熟過程で下方制御されることによって成熟神経では低レベルに発現することを見出している。さらに、このような N-cad の時間的な発現変化がキノコ体の軸索層構造や投射パターンの形成からシナプス成長まで重要であることを明らかにした。本研究では、N-cad の発現変化がどのようなメカニズムによって制御されるのかについて重要な知見を得るべく以下の実験を行う。(1) N-cad の発現レベルの異なるキノコ体幼若神経と成熟神経がどのような構造的・機能的特徴を持つのか調べる。(2) N-cad の発現変化はキノコ体特異的な現象なのか、他の神経回路においても普遍的に見られるのか検証するために、運動神経回路における N-cad の発現パターンを明らかにする。(3) N-cad の発現変化が運動神経回路においても確認された場合は、その機能的役割を明らかにする。(4) N-cad の時空間的な発現変化は、細胞自律的に制御されているのか、非自律的に制御されているのか検証する。(5) N-cad の発現変化が陽イオンの流入によって制御されているのか検証する。(6) N-cad の発現レベルの調節が、転写制御によって制御されているのか、転写後に制御されて

いるのか検証する。

3. 研究の方法

ショウジョウバエ系統: N-cadの null 変異体に N-cad[M19]を使用した。ハイボルフ変異体には、N-cad[M12], N-cad[18Astop]を使用した。

組織染色: 脳の解剖は PBS で行い、固定液には 4%PFA を使用した。神経筋接合部の解剖は HL-3 溶液で行い、固定液には 3.8%ホルマリンを使用した。GluRIIA 抗体染色の固定には、ブアン液を用いた。電子顕微鏡解析に必要な脳は、PBS 中で解剖後、直ちに PFA で固定した。Rabbit anti-Synapsin (1:10), rat anti-N-cad (1:20), goat anti-HRP (1:200), NC82 (1:100), mouse anti-GluRIIA (1:100), mouse anti-FasII (1:10), mouse anti-Neurotactin (1:10), rabbit anti-GFP (1:100)を一次抗体に使用。2次抗体には、DL488-, Cy3-, DL649-conjugated secondary antibodies (1:1000)を使用。

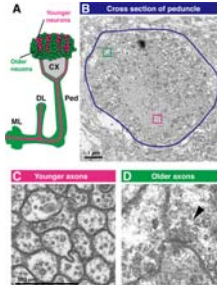
神経細胞の初代培養: Katsuki et al., 2009 Neuronに記載されている方法を採用した。細胞の解離には、トリプシンを用いた。stage 10-11の胚からの細胞を培養した。培養には、Schneider's Drosophila medium with 10% FBSを用いた。

神経活動操作: 温度依存的に陽イオンを細胞内へ流入させるために、UAS-TRPA1 (II) 系統を用いた。キノコ体特異的な発現には、OK107-Gal4 系統を利用した。F1 個体は、18°C で 3 齢幼虫まで成長させた後、飼育温度を 29°C に上昇させて TRPA1 を活性化させた。

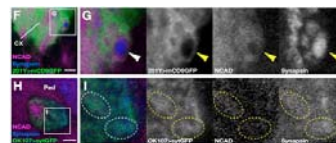
4. 研究成果

(1) キノコ体幼若神経と成熟神経の構造的特徴

幼虫期のキノコ体軸索束は、中核部に新生神経の軸索が配置し、外縁部に古い神経軸索が配置する(A)。これら神経軸索の解剖学的、機能的特徴を定義するために透過型電子顕微鏡を用いて微細構造を観察した。軸索束の切片を観察すると、外縁部では、直径約 200-500nm まで様々なサイズの軸索が確認された。これら外縁部の軸索は、ミトコンドリアや T-bar (arrowhead in D)を持つ傾向にあった(B and D)。このことから、外縁部に配置する古い神経細胞は、機能的に成熟していることが示唆される。一方、軸索束の中核部には、直径が約 200nm 程の細い繊維が占有している。ミトコンドリアが確認できる軸索切片は外縁部に比べて少なく、T-bar も確認できなかった(B and C)。このことから、中核部に位置する幼若神経は、機能的に未成熟であることが明らかとなった。



N-cad は幼若神経では高レベルに発現し一様に局在しているように観察されるが、成熟神経が占有する外縁部においては、発



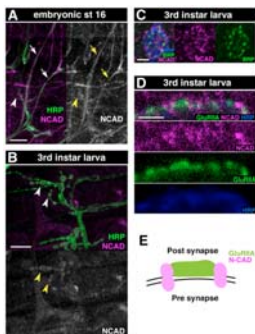
現レベルが低下し、局在も一様

ではなく点状に観察できる。成熟神経における N-cad の局在がシナプスで確認できるのか検証するために、N-cad シグナルとシナプスマーカーとの位置関係を比較した。シナプスマーカーにはシナプシン抗体を用いた(H-I)。成熟神経が占有する外縁領域において、シナプシン抗体と N-cad 抗体の

シグナルの領域が重なるように観察されたことから、N-cad はシナプス近傍に局在すると考えられる(H-I)。また、キノコ体入力部 calyx においてもシナプス前部の synapsin シグナルを囲むように N-cad のシグナルが確認された(F-G)。ことから、Ncad はキノコ体の入出力どちらにおいてもシナプス近傍に局在していることが明らかとなった。

(2) 運動神経回路における N-cad の発現パターン

N-cad の発現変化がキノコ体で特異的にみられる性質なのか、あるいはその他の神経回路に



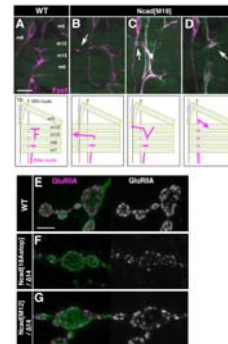
においても同様に観察されるのか検証した。この解析では運動神経回路に着目し、N-cad の発現局在を胚期の軸索伸長期と幼虫期の完成された回路で観察した。

その結果、軸索伸長期の運動神経では、N-cad が軸索束に沿って一様に分布すること、軸索成長円錐やターゲットとなる筋肉でも局在することが明らかとなった(A)。一方、3 齢幼虫期の完成された運動神経では、軸索上の発現レベルは低下するが、synaptic boutons で強い発現が確認できた(B)。このような運動神経の発現レベルの変化は、キノコ体で見られる発現変化に極めて類似していると考えられる。

次に、3 齢幼虫期の N-cad の局在を高解像度で観察した。N-cad はシナプス前部においては NC82 によって可視される神経伝達物質放出部位の近傍に局在し(C)、高受容部ではグルタミン酸受容体の近傍に分布することが明らかとなった(D and E)。このようなシナプス近傍部の局在パターンは、キノコ体や脊椎動物で明らかにされている局在を想起させる。

(3) 運動神経における N-cad の役割

運動神経における N-cad の発現が、神経回路形成の素過程においてどのような役割をもつのか検証した。胚期の軸索伸長期では、個々の運動神経は特定のルートを通り適切な筋肉へと投射する(A)。N-cad タンパクが完全に欠損する変異体は、運動神経が適切なルートを選択できない(D)、間違った相手と接続してしまう(B and C)、等の軸索誘導や標的認識に異常を来す表現型を示した。

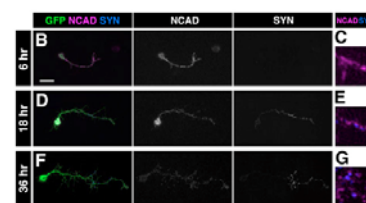


次にシナプス領域での役割を探索するため、N-cad のハイポモルフ変異体を検証した。Nu11 変異体は、胚性致死を示すのに対して、ハイポモルフ変異体は致死を示さず、幼虫を解析できる。

ガイドランス異常を伴わないハイポモルフ変異体の運動神経 bouton は、野生型に比べてグルタミン酸受容体の集積度が低下していた(E-G)。以上の結果から、N-cad は幼弱神経の軸索ガイドランスを制御するとともに、成熟神経の受容体集積度を制御していることが明らかとなった。

(4) N-cad の細胞自律的な発現制御

N-cad の時空間的な変化が、細胞自立的

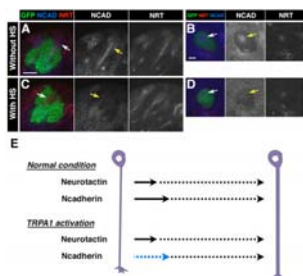


に制御されているのか、それとも外部からの

刺激によって制御されているのか検証した。ショウジョウバエ神経を低密度で初代培養し、N-cad の発現を追跡した結果、単一神経細胞が in vivo と同じように N-cad の発現を経時的に変化させることを突き

止めた。培養後 6 時間の神経は、N-cad の発現レベルが高く、神経突起に一様に分布していた (B)。この期間の神経は Synapsin の発現がなく、未成熟な神経であるといえる (B-C)。18 時間では、N-cad の発現レベルが若干低下し、遠位領域では点状の局在を示した (D)。これら神経では Synapsin の発現が確認されることより、成熟段階に移行していると考えられる。高解像度の観察から Synapsin と一部の N-cad の点状局在は隣接していることが明らかとなった (E)。36 時間では、極度に低下した N-cad のシグナルと点状のシグナルが確認できる (F)。Synapsin は遠位に局在し、一部の N-cad と隣接していることがはっきりと示された (G)。このように単一神経培養が *in vivo* に極めて類似した発現変化を示したことから、神経成熟過程における N-cad 発現変化は細胞自律的に制御されていると結論できる。

(5) 陽イオンの流入による N-cad 発現の下方制御



神経細胞の成熟過程において細胞内部のどのようなシグナルが N-cad の発現変化の引き金となるのか？

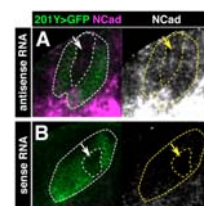
神経細胞の発達過程において、成熟していない神経でもイオンチャネルは発現し、自発的で一過的なイオンの流入が生じることが知られている。特に Calcium transient は神経の成長と分化を調節することが知られるようになって来た。この解析では、幼若神経において強制的な陽イオンの流入が N-cad の発現変化の引き金になる可能性を検証した。ショウジョウバエでは、TRPA1 受容体が温度依存的に非選択的に陽イオンを流入させるツールとして使われている。このような特性を持つ TRPA1 をキノコ体で強制発現させ、

制限温度と許容温度下でキノコ体を発生させた時に、N-cad の発現にどのような変化が生じるのかを観察した。許容温度で飼育したショウジョウバエのキノコ体は、野生型と同様に幼若神経が N-cad を強く発現し、成熟神経では弱く発現する (A and B)。一方、幼虫期のある時期に制限温度に移行させると 6-9 時間の間に N-cad のシグナルが減少し成熟神経と同じくらいのレベルにまで減少していた (C and D)。

以上の結果から以下のシナリオが一つの可能性として推測できる。幼若神経の成熟過程のあるポイントで陽イオンが流入する結果、これまで高発現していた N-cad の発現は弱い発現に変化する。この人工的実験からは、陽イオンが N-cad をシナプス近傍へと局在させることまで制御しているかどうかは判定できない。なぜならば、幼若神経はシナプス構造を保持していないからである。次に、どのような陽イオンが N-cad 発現制御の候補として考えられるのだろうか？細胞内シグナルを伝えるイオンとして知られる Ca イオンが、主要な候補に挙げられるであろう。神経細胞の成長過程における Ca transient が N-cad の発現変化のドライビングフォースになり得るかどうかは、今度の研究課題として残る。

(6) 転写後の修飾に基づく N-cad 発現レベルの制御

幼弱神経と成熟神経間の N-cad の発現レ



ベルの違いが転写レベルで制御されているのか検証した。in situ hybridization によって RNA の発現を検出した結果、幼弱神経と成熟神経では、N-cad

の結果、幼弱神経と成熟神経では、N-cad

のシグナル量に大きな違いを見出すことができなかった。これら細胞間の N-cad タンパクの発現量の違いは、翻訳やタンパク分解によって制御されているのかもしれない。どのようなメカニズムによって N-cad タンパクの発現量が制御されているのか解明することが、今後の研究課題として残される。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 4 件)

- ①. Hong, W., Zhu, H., Potter, C.J., Barsh, G., Kurusu, M., Zinn, K., and Luo, L. Leucine-rich repeat transmembrane proteins instruct discrete dendrite targeting in an olfactory map. *Nature Neurosci.* 12(12), 1542-1550 (2009). 査読有り
- ②. Furukubo-Tokunaga, K., Adachi, Y., Kurusu, M., and Walldorf, U. Brain patterning defects caused by mutations of the twin of eyeless gene in *Drosophila melanogaster*. *Fly (Austin)*. 3(4), 263-269 (2009). 査読有り
- ③. Kurusu, M., Maruyama, Y., Adachi, Y., Okabe, M., Suzuki, E., and Furukubo-Tokunaga, K. A conserved nuclear receptor, Tailless, is required for efficient proliferation and prolonged maintenance of mushroom body progenitors in the *Drosophila* brain. *Developmental Biology*. 326(1), 224-236 (2009). 査読有り
- ④. Kurusu, M., Cording, A., Taniguchi, M., Menon, K., Suzuki, E., and Zinn, K. A screen of cell-surface molecules identifies leucine-rich repeat proteins as key mediators of synaptic target selection. *Neuron*. 59(6), 972-985 (2008). 査読有り

[学会発表] (計 3 件)

- ①. 来栖光彦, Spatiotemporal change in the expression of cell-adhesion molecule during neural differentiation is crucial for the neural circuit formation. 日本分子生物学会, 2009 年 12 月 19 日, パシフィコ横浜

- ②. 来栖光彦, N-Cadherin regulates birth order-dependent axonal fasciculation, axon growth, and dendritic terminal morphology during the development of *Drosophila* mushroom body. Japan *Drosophila* Research Conference, 2009 年 7 月 7 日, ヤマハリゾートつま恋

- ③. 来栖光彦, ショウジョウバエ神経-筋結合部位を利用した軸索の標的認識、シナプス形成を制御する細胞表面タンパク質の探索と機能解析, 日本分子生物学会, 2008 年 12 月 10 日, 神戸ポートアイランド

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

<http://www.nig.ac.jp/hot/2009/kurusu0902-j.html>

<http://www.nig.ac.jp/hot/2008/kurusu0810-j.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

来栖 光彦 (KURUSU MITSUHIKO)

国立遺伝学研究所・構造遺伝学研究センター・助教

研究者番号 : 50413985