

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 12 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009 年度～2011 年度

課題番号：21370096

研究課題名（和文） ショウジョウバエ中枢神経系形成を制御するシグナルネットワーク

研究課題名（英文） Gene networks underlying development of the Drosophila central nervous system

研究代表者

多羽田 哲也 (Tabata Tetsuya)

東京大学・分子細胞生物学研究所・教授

研究者番号：10183865

研究成果の概要（和文）：

ショウジョウバエの脳をモデルとして、中枢神経の形成機構を研究した。視覚中枢のラミナ神経節およびメダラ神経節は同じ神経表皮に由来するものの全く異なったメカニズムで分化増殖することを明らかにした、また嗅覚中枢のキノコ体の形成には、平面細胞極性およびアクチン再構成に関わる遺伝子群が機能すること、さらに機能スクリーニングにより、機能未知の遺伝子の働きが必要であることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

The molecular mechanisms underlying development of Drosophila lamina and medulla optic ganglia have been studied. We have identified (1) cell surface molecules that are required for recognition between lamina precursor cells and retinal axons, (2) coordinated sequential action of the EGFR and Notch signaling pathways that induce medulla neuroblasts formation in a precisely ordered manner. We have also identified genes involved in planar cell polarity and actin remodeling as important players that regulate axon elongation and guidance of the mushroom body, the center of the olfactory memory formation.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	7,800,000	2,340,000	10,140,000
2010 年度	3,500,000	1,050,000	4,550,000
2011 年度	3,500,000	1,050,000	4,550,000
総計	14,800,000	4,440,000	19,240,000

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：ショウジョウバエ、視覚中枢、嗅覚中枢、キノコ体、EGF、Notch、PCP、アクチン

## 1. 研究開始当初の背景

近年の解析技術の進歩および、情報の深化にともない、複雑な3次元構造を作り上げる機構を細胞レベルで研究の対象とすることが可能となってきた。脳神経系は複雑精緻な構造を持つ器官の最たるもので、発生メカニズムの解明はその神経系の機能発現の解明にも寄与する。

脳機能を支える神経回路パターンの基本はゲノムにコードされており、それは発生過程を通して具現化される。神経回路パターンは長い進化の過程で脳機能による淘汰のフ

ィードバックを受けており、神経回路の発生メカニズムは、脳の機能発現を最適化するようにデザインされているはずである。そして、その情報はゲノムという形に統合されコードされている。言い換えれば、ゲノムに見ることができる脳の働きは、どのような神経回路をデザインし、そこにどのような神経細胞を配置するかという発生プログラムであり、そこには、ついには、私たちの今日の思考、感情を産み出す脳を形作るにいたった進化の痕跡が蓄積されているはずである。その機構の解明のためにはゲノミクスを基盤として、一細胞レベルの精度で発生システム全体

の形成メカニズムを解析することが必要であり、高度な遺伝子操作が可能な小さなゲノムが有用である。ショウジョウバエの脳は理想的なモデルシステムであるといえる。

本研究ではショウジョウバエの視覚系形成メカニズムの研究を行ってきた。その過程で、この神経系は複雑な3次元の構造でありながら1細胞レベルの解像度で、全体を一望できること、さらには以下に述べるように、神経芽細胞の形成および神経回路形成において、重要な新たな知見を得ることができることから、細胞レベルの精度で複雑なネットワーク形成の発生生物学を理解するための優れた系であることを再認識するにいたった。また、嗅覚記憶のセンターとして機能するキノコ体 (mushroom body) の形式機構についても研究を行った。

## 2. 研究の目的

### (1) 視覚中枢

一次 (ラミナ) および二次の視覚中枢 (メダラ) は、視細胞軸索と直接シナプスを形成することから視細胞の2次元的な配列をトポグラフィカルに再現する規則正しい構造 (retinotopic map) をしており、その形成機構はそのまま機能を保証しているといえる。両者は共通の神経表皮から形成されるにもかかわらず全く異なる発生様式をとる。本申請ではこの2つの神経節が retinotopic map を形成するメカニズムを探る。

### (2) 嗅覚中枢

匂い記憶学習のセンターである Mushroom Body (MB) は3機能ドメインから成り立っており、この順序で分化が進み、それぞれ記憶の獲得、固定、読み出しに働くと考えられている。この機能ドメインの発生機構は、進化上、記憶を獲得した状況をゲノムに記録していると考えられる。機能ドメインが順に発生する過程には Chinmo と呼ばれる転写因子が機能することが知られている (Zhou et al., 2006) が、具体的メカニズムは不明である。この機序を中心に MB の形成機構を明らかにする。

## 3. 研究の方法

### (1) ラミナ神経節の形成

視神経の投射により供給されるヘッジホッ

グによって神経表皮細胞は神経前駆細胞へ分化し、Sim 転写因子を発現するようになる。Sim の働きにより前駆細胞が視神経軸索を特異的に認識し、会合することによりラミナカラムを形成することを明らかにした (Umetsu et al., Development, 2006)。Sim のターゲットを同定することにより、ラミナカラムを形成するメカニズムを明らかにする。

### (2) メダラ神経節の形成

視覚中枢の神経表皮の近位から遠位へ向かい、proneural wave が進行し、proneural 遺伝子 *1(1)sc* の一過性の発現を誘導し、それがメダラ神経芽細胞の分化を誘導する。この proneural wave の進行は JAK/STAT シグナルが抑制していることを見出した (Yasugi et al., 2008)。本研究の焦点は proneural wave の分子実体を明らかにすることにある。

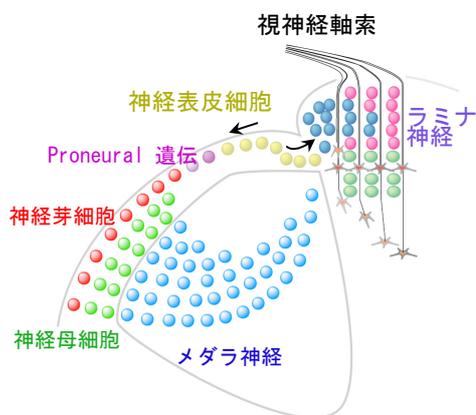
### (3) 嗅覚中枢形成の分子メカニズム

匂い記憶学習のセンターである Mushroom Body (MB) は、3機能ドメインから成り立っており、それぞれ記憶の獲得、固定、読み出し等に働くと考えられている。この形成機構を包括的に明らかにするために、各発生時期から RNA を調整し、cDNA を合成し、全ての配列を解読すること (RNA-seq) により、それぞれの機能ドメインで発現している遺伝子を同定し、機能解析を行う。これに先立ち、平面細胞極性に働く遺伝子群、機能未知の遺伝子の解析を初めているのでこれらを継続して行う。

## 4. 研究成果

(1) ショウジョウバエのラミナ神経の分化において、視神経の投射により供給されるヘッジホッグによって神経表皮細胞はラミナ神経前駆細胞へ分化し、Sim 転写因子を発現するようになる。次に、Sim の働きにより前駆細胞が視神経軸索を特異的に認識し、会合することによりラミナカラムを形成する。ラミナカラムは5種のラミナ神経が、将来シナプスを形成することになる1セットの視神経軸索を包むような構造を作ることによって形成される単位で、retinotopic map を形成する基礎となる。Sim のターゲットとして IgG ファミリーに属する Hibris を同定した。Hibris の変異では Sim 変異と同様に、前駆細胞と視神経軸索の相互作用が阻害されてラミナカラムが形成されない。視神経軸索側に Hibris と同様な構造を持つ Roughest が発現していることを見出した。Roughest 変異でも同様にラミナカラム形成が阻害されることから Roughest は Hibris のパートナーであることが強く示唆された。事実、ラミナ前駆細胞における Hibris は視神経軸索との接触面に集積しており、Roughest 変異によりその集積が見られなくなることから、両者は直接コンプレックスを作っていると考えられる。

(2) メダラ神経形成において、神経表皮の近位から遠位へ向かい、proneural wave が進行し、proneural 遺伝子 *1(1)sc* の一過性の発現を誘導し、それがメダラ神経芽細胞の分化を誘導する。proneural wave を進行させる分子実体を捜している過程で EGF シグナルを同定した。このシグナルの主たるリガンド Spitz は神経上皮全体で発現している。Spitz



は不活性な前駆体として発現し、Rhomboid による切断を受けて活性のあるリガンドとなる。Rhomboid は proneural wave で発現していること、この Rhomboid の発現は EGF シグナルに依存していることがわかった。Proneural wave では Rhomboid が発現し、そこで Spitz を活性化する。活性型 Spitz は分泌され隣の上皮細胞にシグナルを送るとそれは 1(1)sc を発現し、神経芽細胞となる。同時に、Rhomboid の発現も誘導するので、EGF シグナルの連鎖が起こり proneural wave が進行していくことを明らかにした。

### (3) MB 形成に機能する遺伝子 sickie の解析

発現解析を通して、MB のアクソン投射に必須の遺伝子を同定し、その機能がアクチン骨格のリモデリングにあると思われる遺伝子 sickie を単離した。sickie 変異では軸索の伸長、分岐に異常が観察される。アクチンリモデリングに機能する Abelson キナーゼとの遺伝学的相互作用が観察された。またアクチンの解離を制御している Cofilin や Cofilin の活性化因子の変異によって sickie 変異が部分的に抑圧されること、また、Cofilin の不活性化因子の変異によって sickie 変異が増強されることから sickie はアクチンリモデリングに機能することが示唆された。そこで、さまざまな遺伝子の多重変異体を作成して、その表現型の解析を行うことによってこのことを確認した。

(4) MB 形成に機能する PCP 因子群の解析  
平面内細胞極性 (Planar Cell Polarity: PCP) を制御する因子群が MB の軸索形成に関与することを示した。さらに、キノコ体の軸索形成への Wnt の関与を検討するために、Wnt 遺伝子の変異体を解析し、Wnt5 変異体において MB の形成異常を見いだした。Wnt5 と PCP 制御因子の間に遺伝学的相互作用が見られたことから、Wnt5 を PCP 経路のリガンドであると提唱した。Wnt5 はキノコ体の樹状突起で形成されるカリックスに局在する。カリックスにおいて Wnt5 の発現を回復することで Wnt5 変異体の表現型がレスキューされたことから、カリックスに局在する Wnt5 がキノコ体の軸索形成に重要であることが示された。また、Wnt5 変異体のクローン解析やキノコ体特異的な RNAi の誘導による Wnt5 のノックダウン実験により、カリックスに局在する Wnt5 の少なくとも一部はキノコ体から分泌されるものであることを示した。

(5) MB の軸索投射を制御する遺伝子の同定  
MB に特異的に shRNA を発現させ、発生が異常になるものをスクリーニングした。1200 以上の遺伝子のスクリーニングを行い、いくつかの候補を得た。その中で、変異により軸索投射に異常が見られる遺伝子 DIP2 を同定した。データベースによると転写因子であることが示唆されているが、実際に細胞内局在を調べると細胞膜付近に局在するようである。典型的な膜貫通ドメインを持たないので、何らかの因子と複合体を形成しているのであろう。新たな軸索誘導機構の解明の端緒となるかもしれない。

## 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 5 件)

1. Hasegawa\*, E., Kitada\*, Y., Kaido, M., Takayama, R., Awasaki, T., Tabata, T. and Sato, M.

Concentric zones, cell migration and neuronal circuits in the *Drosophila* visual center.

査読：有 Development, 138, 983-993, 2011.  
\* equal contribution.

2. Kawamori, H., Tai, M., Sato, M., Yasugi, T., Tabata, T.

The Fat/Hippo pathway regulates the progress of neural differentiation signaling in the *Drosophila* optic lobe.

査読：有 Dev. Growth Diff, 53, 653-667, 2011.

3. Shimizu, K., Sato, M. and Tabata, T.

The Wnt5/Planar cell polarity pathway regulates axonal development of the *Drosophila* mushroom body neuron.

査読：有 J. Neuroscience, 31, 4944-4954, 2011.

4. Sugie, A., Umetsu, D., Yasugi, T., Fischbach, K.-F. and Tabata, T.

Recognition of pre- and postsynaptic neurons via nephrin/NEPH1 homologs is a basis for the formation of the *Drosophila* retinotopic map.

査読：有 Development, 137, 3303-3313, 2010.

5. Yasugi, T., Sugie, A., Umetsu, D. and Tabata, T.

Coordinated sequential action of EGFR and Notch signaling pathways regulates proneural wave progression in the *Drosophila* optic lobe.

査読：有 Development, 137, 3193-3203, 2010.

### [学会発表] (計 21 件)

1. Tabata, T.

Cellular and molecular mechanisms underlying neural formation in *Drosophila* visual system development.

International Symposium on *Drosophila* Bio-Resource: - Pioneering life science research with *Drosophila* Genetic Resources, 2010/3/17-18, Kyoto

2. Shimizu, K., Sato, M. and Tabata, T.  
Roles of Wnt Signal in Development of *Drosophila* Mushroom Body.

International Symposium on *Drosophila* Bio-Resource: - Pioneering life science research with *Drosophila* Genetic Resources, 2010/3/17-18, Kyoto

3. Abe, T., Maeyama, Y., Yasugi, T., Murakami, S. and Tabata, T.

Sickie, a Neuron navigator homolog, is required for the axonal development of Drosophila mushroom body neurons.

International Symposium on Drosophila Bio-Resource: - Pioneering life science research with Drosophila Genetic Resources, 2010/3/17-18, Kyoto

4. Nitta, Y., Shimizu, K., Ohtsubo, M. and Tabata, T.

RNA interference screening for genes involved in the development of Drosophila mushroom body.

International Symposium on Drosophila Bio-Resource: - Pioneering life science research with Drosophila Genetic Resources, 2010/3/17-18, Kyoto

5. Tabata, T., Murakami, S.

Mechanisms underlying Drosophila memory formation.

第33回日本分子生物学会・第83回日本生化学会大会合同大会, 2010/12/7-10, 神戸ポートアイランド

6. Yasugi, T., Umetsu, D. and Tabata, T. EGFR and Notch Signaling Regulates the Progression of the Proneural Wave in the Drosophila Optic Lobe Development.

第32回日本分子生物学会, 2009/12/9-12, 横浜

7. Sugie, A., Fischbach, K.-F. and Tabata, T.

Neph1/Nephrin homolog proteins play a role in the specific interaction between pre- and post-synaptic neurons during development of Drosophila visual system. 第32回日本分子生物学会, 2009/12/9-12, 横浜

8. Tabata, T.,

Spatio-temporal regulation of DER and Notch signaling pathways organizes the proneural wave progression in medulla neuroblast development.

Neurobiology of Drosophila, 2009/9/29-10/3, Cold Spring Harbor Laboratory, U.S.A

9. Yasugi, T., Umetsu, D., Murakami, S., Sato, M., and Tabata, T.

Role for the EGFR and JAK/STAT Signaling Pathway in the Drosophila Optic Lobe Development.

16th International Society of Developmental Biologists Congress 2009, 2009/9/6-10, Edinburgh, UK

10. Sugie, A., Fischbach, K.-F. and Tabata, T.

Identification of cell surface molecules

underlying the specific interaction between pre- and post-synaptic neurons during development of Drosophila visual system.

ショウジョウバエ研究会第9回研究会, 2009/7/6-8, 静岡

11. Kawamori, H., Tai, M., Sato, M. and Tabata, T.

Atypical protocadherin Fat contributes to the neurogenesis of medulla neurons in the Drosophila Optic Lobe.

第61回日本細胞生物学会大会, 2009/6/2-4, 名古屋

12. Tabata, T., Yasugi, T., Sugie, A., Umetsu, D. and Fischbach, K.-F.

Cellular and molecular mechanisms underlying neural circuit formation in Drosophila visual system development. Neural development, 42<sup>nd</sup> Annual meeting for the Japanese Society of Developmental Biologists. 2009/5/28-31, Niigata

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

多羽田 哲也 (Tabata Tetsuya)  
東京大学・分子細胞生物学研究所・教授  
研究者番号: 10183865

##### (2) 研究分担者

( )

研究者番号:

##### (3) 連携研究者

( )

研究者番号: