

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

2012年 6月 4日現在

機関番号：63801

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21370100

研究課題名（和文） 受容体による軸索ガイダンス分子の提示と抑制：軸索誘導の新原理

研究課題名（英文） Presentation and suppression of axon guidance molecules by their receptors: a new principle of axon guidance

研究代表者

広海 健 (HIROMI YASUSHI)

国立遺伝学研究所・個体遺伝研究系・教授

研究者番号：70291888

研究成果の概要（和文）：

軸索ガイダンス分子 Netrin の受容体が Netrin 分布に及ぼす影響をショウジョウバエを用いて解析した。誘引性受容体 Frazzled/DCC が Netrin を軸索膜上に提示するのに対し、反撥性受容体 Unc5 は Netrin 提示を抑制することを示し、抑制活性に必要なドメインを同定した。先行軸索が発現する Unc5 は提示抑制活性を用いて後続軸索のためのガイダンス場を作っていた。軸索ガイダンス受容体の軸索誘導活性（誘引 vs. 反撥）とリガンド分布制御活性（提示 vs. 抑制）の機能相関を軸索誘導の新しい原理として提唱する。

研究成果の概要（英文）：

We analyzed how the distribution of an evolutionarily conserved axon guidance molecule Netrin could be influenced by its receptors. While the attractive receptor Frazzled/DCC presents Netrin on the axonal membrane, repulsive receptor Unc5 suppressed Netrin presentation. This suppressive activity exerted by pre-existing neurons creates a Netrin-less guidance field for the follower axons that are repelled by Netrin. We propose that a linkage between the guidance function of a receptor and its effect on ligand could be a new principle for axon guidance.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	5,400,000	1,620,000	7,020,000
2010年度	4,900,000	1,470,000	6,370,000
2011年度	4,200,000	1,260,000	5,460,000
総計	14,500,000	4,350,000	18,850,000

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：軸索ガイダンス分子，軸索誘導，ショウジョウバエ，ネトリン，Unc5

1. 研究開始当初の背景

神経回路を形成するために必要な軸索ガイダンス情報を提供するのには細胞外に提示された軸索ガイダンス分子の分布である。現在、この分布は作用距離に基づいた「長距離性 vs. 接触依存性」という分類と、ガイダン

ス分子に対する反応に基づいた「誘引性 vs. 反撥性」という分類とで整理されている。このうち最も着目されてきたのが長距離性の誘引および反撥作用であり、いくつかの進化的に保存された分泌性のタンパク質が「軸索ガイダンス分子」として同定されている。

ガイドランス分子の濃度勾配を人工的に作ると神経軸索は誘引あるいは反撥性の応答を示すので、ガイドランス分子は生体内でも局所的濃度差を持って分布していると考えられている。しかし、複雑な神経回路形成のためには軸索ガイドランス分子は正しい時期に正しい場所に分布する必要があり、自由拡散とは異なる能動的な配置機構の同定が求められていた。

軸索ガイドランス分子の分布を規定する能力を持つ分子の一つは軸索ガイドランス分子の受容体である。一般に、軸索ガイドランス受容体はガイドランスシグナルの「受け手」としてシグナルの受容と下流へのシグナル伝達に関わっていると考えられている。しかし、ガイドランス受容体がシグナルの受け手側だけでなく、送り手側でも機能すると考えられる知見もいくつか得られている。たとえば、これまでに見いだされたガイドランス受容体は例外なく軸索先端の成長円錐だけでなく、軸索の「柄」の部分にも局在している。これは、成長円錐でのシグナル受容体としての働きに加えて、軸索ガイドランス受容体は軸索柄においても何らかの機能を果たしていることを示唆している。また、多くの軸索ガイドランス受容体は軸索内区画（遠位部あるいは近位部）に局在しているため、神経回路形成の場において高度の位置情報を提供できる可能性を秘めている。

軸索ガイドランス受容体の軸索内局在の重要性を示す一例は受容体によるリガンド提示である。われわれはショウジョウバエにおいてガイドランス受容体 **Frazzled/DCC** は軸索柄に局在することによってリガンドである **Netrin** を軸索柄上に局在させる働きを持つことを示してきた。**Frazzled** の働きによって局在した **Netrin** は他の軸索のガイドランスシグナルとなるので、**Frazzled** はガイドランスシグナルの「送り手側」でリガンドを「提示」することによって細胞非自律的なガイドランス作用を提供していると言える。**Netrin** と **Frazzled** はともに進化的に保存されたリガンド・受容体のセットであり、リガンド提示機構はこのガイドランス受容体の共通な機能である可能性が高い。

軸索柄上にリガンドが提示されれば、後続の軸索はそれを道筋情報として利用でき

る。それゆえ、受容体によるリガンド提示は、リガンドに対して誘引性の反応を示す受容体を発現する複数の軸索が同じ道筋を走行するのに最も有効であると考えられる。一方、ガイドランス分子には反撥性の細胞行動を指令するものも多く存在する。反撥性受容体を発現する軸索は先行軸索がリガンドを提示していればそれに妨げられて同じ道筋をたどることはできなくなる。従って、反撥性受容体はそのリガンドの分布に対して誘引性の受容体とは異なる作用を持つことが予想される。

2. 研究の目的

本研究ではショウジョウバエ胚中枢神経系を用いて **Netrin** の反撥性の受容体である **Unc5** のリガンドに対する作用とその生理学的意義を解明することを目的とした。**Unc5** は **Netrin** を提示を抑制するという予備的知見に基づき、以下の観点から解析を行った。

- (1) **Netrin** 提示抑制は細胞自律性か？
- (2) **Unc5** はどのような分子機構で **Netrin** の提示抑制を行うか？
- (2) **Unc5** による **Netrin** 提示抑制は軸索ガイドランスにどのように利用されているか？

3. 研究の方法

ショウジョウバエ胚中枢神経系を使った実験系を用いて **Unc5** が **Netrin** の提示を抑制する機構とその意義を明らかにする。

- (1) **Netrin** 提示抑制の細胞自律性
Frazzled が提示する **Netrin** を抑制するには、提示する細胞の外から作用する可能性と、**Frazzled** 発現細胞の内でも作用する可能性が考えられる。**frazzled** 変異系統と **GAL4/UAS** システムを組み合わせ、**Unc5** の作用細胞を同定する。
- (2) 提示抑制の分子機構
Unc5 の分子解剖により、**Frazzled** によって提示された **Netrin** 提示抑制に必要な・十分なドメインを同定する。また、**Frazzled** が **Unc5** による提示抑制を受けるに必要な領域を同定する。
- (2) **Unc5** による細胞非自律的軸索ガイド機能
Unc5 による **Netrin** 提示抑制が神経回路形

成にどのように寄与しているかを解析するため、複数の軸索が **Unc5** 依存的軸索走行するモデル系を作り、先行軸索における **Unc5** の欠損が後続軸索に与える影響を調べる。

4. 研究成果

(1) **Unc5** の **Netrin** 提示抑制の細胞自律性

ショウジョウバエ胚の中樞神経系を用いて **Unc5** の **Netrin** の提示抑制機能について解析した。この系では **Netrin** の誘引性受容体である **Frazzled** が **Netrin** を軸索表面に提示し、他の軸索に対するガイダンス情報を提供している。特定の神経細胞でのみ **Frazzled** によって **Netrin** が提示されている実験系を構築し、**Unc5** が **Netrin** 提示を抑制できる条件を探った。その結果、**Unc5** の提示抑制作用は **Frazzled** 発現細胞において発揮される、つまり細胞自律的であることが明らかになった。

(2) **Unc5** の **Netrin** に対する作用の分子基盤

Frazzled と **Unc5** のキメラを利用して、強制発現実験によって **Netrin** 提示抑制を引き起こす領域を解析した。その結果、**Unc5** 特異的な **Netrin** 提示抑制作用は細胞外ドメインによって担われていることが明らかになった。細胞外ドメインの分子解剖を行い、**Netrin** 提示抑制に十分なモチーフを同定した。さらに、**Unc5** は細胞内ドメインを欠く **Frazzled** によって提示された **Netrin** も抑制することが判明した。これは、**Unc5** が既知の **Frazzled-Unc5** の相互作用とは異なる様式で **Frazzled** の提示作用を抑制している。

(3) **Unc5** による **Netrin** 提示抑制の生理的意義

unc5 変異系統を用いて **Unc5** が存在しないときに他の軸索のガイダンスにどのような細胞非自律的な影響が出るか調べた。ショウジョウバエ胚中樞神経系では、**Unc5** は中枢から末梢への出口の一つである **SNt** と呼ばれる軸索束で高発現している。*unc5* 変異系統では **SNt** 領域に **Netrin** の異所的局在が生じ、この状況下では、**Unc5** を発現する後続軸索が正常に **SNt** 経路を伸長できないことを見いだした。先行軸索が発現する **Unc5** が

その **Netrin** 提示抑制活性を用いて後続軸索のためのガイダンス場を作っていると考えられる (図 1)。

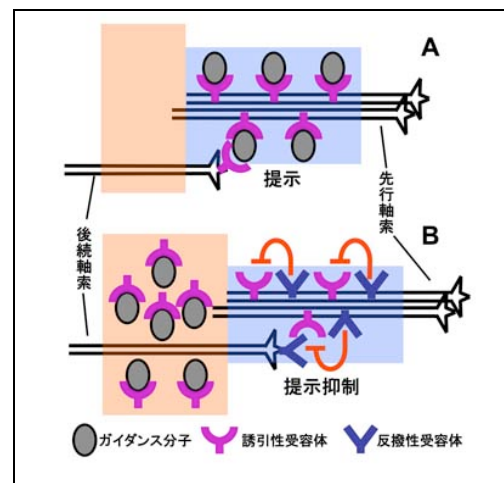


図 1 受容体によるガイダンス分子の提示 (A) と提示抑制 (B) が軸索ガイダンス情報を創る。誘引性の先行軸索が提示したガイダンス分子が後続軸索の走行可能領域 (水色) の情報となる。反撥性の軸索は提示を抑制して反撥場 (オレンジ) から脱出を可能にする。

本研究の結果から、軸索ガイダンス受容体はリガンドに反応して「誘引と反撥」という軸索伸長反応の応答性を持つと同時に、リガンドに対して「提示と抑制」という 2 種類の分布調節能力を持つことが明らかになった。**Frazzled** と **Unc5** という 2 つの **Netrin** 受容体の場合、これら 2 つの能力は、[誘引=提示]、[反撥=抑制] という組み合わせになっており、この調和のとれた組み合わせが多くの軸索の協調的伸長や軸索束化を司っていると考えられる。2 つの能力の組み合わせを変えると別の細胞現象も可能だろう。たとえば、樹状突起のタイリング (多くの突起が交差することなく均一に分布する現象) も、[反撥=提示] という組み合わせで説明できる。受容体による軸索ガイダンス分子の提示と抑制は、神経回路形成の新しい原理になる可能性が高い。

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 3 件 査読有り)
 ① Katsuki T., Joshi R., Ailani D., **Hiroimi Y.** Compartmentalization within neurites: its mechanisms and implications. **Dev Neurobiol**, 71, 458-473 (2011).
 doi: 10.1002/dneu.20859

②Katsuki T., Ailani D., Hiramoto M., Hiromi Y. Intra-axonal patterning: intrinsic compartmentalization of the axonal membrane in *Drosophila* neurons. **Neuron**, 64, 188-199 (2009). doi:10.1016/j.neuron.2009.08.019

③Liu Q.X., Hiramoto M., Ueda H., Gojobori T., Hiromi Y., Hirose S. Midline governs axon pathfinding by coordinating expression of two major guidance systems. **Genes Dev**, 23, 1165-70 (2009). doi: 10.1101/gad.1774209

[学会発表] (計 9 件)

①広海健. 極性からパターンへ:神経突起の区画化と神経回路形成. 生理学会合同シンポジウム「細胞極性の原理と生理機能」第 117 回日本解剖学会総会・全国学術集会, 2012 年 3 月 26 日-28 日, 甲府

②Joshi, R., Katsuki, T., DeFalco, T., Hiromi, Y. “Intra-axonal compartmentalization” of guidance receptors in drosophila neurons. Society for Neuroscience, 2011 年 11 月 11 日-16 日, Washington, DC.

③Joshi, R., Katsuki, T., DeFalco, T., Hiromi, Y. “Intra-axonal compartmentalization” of guidance receptors in drosophila neurons. Assembly, Plasticity, Dysfunction and Repair of Neural Circuits, 2011年10月17日-20日, Suzhou.

④Hiromi, Y. Intra-axonal compartmentalization of axon guidance receptors: its mechanism and roles in axon guidance. シンポジウム「Gradients of guidance cues in axon and dendrite patterning」第34回日本神経科学大会 2011 年 9 月 11 日-14 日, 横浜

⑤Hiromi, Y. Intra-axonal patterning. JSDB-GfE Joint Meeting, 2011 年 3 月 23 日-26 日, Dresden.

⑥Hiromi, Y. Generation of pattern within the axonal membrane, The 13th International Membrane Research Forum, 2010 年 3 月 17 日-18 日, Kyoto.

⑦Katsuki, T., Ailani, D., Joshi, R., Defalco, T., Hiramoto, M., Hiromi Y. Intra-axonal patterning: intrinsic compartmentalization

of the axonal membrane in *Drosophila* neurons. The 9th Japanese *Drosophila* Research Conference, 2009 年 7 月 6 日-8 日, Kakegawa.

⑧Joshi, R., Katsuki, T., DeFalco, T., Hiromi, Y. Molecular addresses: motifs involved in compartment-specific localization of guidance receptors in *Drosophila* axons. The 9th Japanese *Drosophila* Research Conference, 2009 年 7 月 6 日-8 日, Kakegawa.

⑨Ailani D., Katsuki T., Hiromi Y. Differential Trafficking Pathways Regulate the Localization of Axon Guidance Receptors in *Drosophila* neurons. The 9th Japanese *Drosophila* Research Conference, 2009 年 7 月 6 日-8 日, Kakegawa.

[その他]
ホームページ等
<http://www.nig.ac.jp/labs/DevGen/hiromi.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

広海 健 (HIROMI YASUSHI)

国立遺伝学研究所・個体遺伝研究系・教授
研究者番号：70291888

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

浅岡 美穂 (ASAOKA MIHO)

国立遺伝学研究所・個体遺伝研究系・助教
研究者番号：40370118