

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14日現在

機関番号：22701

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21570230

研究課題名（和文） 線虫の軸索ガイダンス分子およびその受容体の局在機構

研究課題名（英文） Localization mechanisms of axon guidance molecules and their receptors in *C. elegans*

研究代表者

小倉 顕一（OGURA KEN-ICHI）

横浜市立大学・医学部・助教

研究者番号：20326028

研究成果の概要（和文）：軸索ガイダンス分子、および、その受容体には特異な局在機構が存在し、それが軸索走行の多様性を生み出しているという仮説が提唱されている。しかしながら、軸索ガイダンス分子、および、その受容体の局在機構はほとんど明らかとなっていない。今回、我々は、モデル生物である線虫 *C. elegans* を用いて、軸索ガイダンス分子 UNC-6/Netrin およびその受容体である UNC-5 の局在制御分子を同定した。

研究成果の概要（英文）：A hypothesis that localizations of axon guidance molecules and their receptors cause variability of neural networks is proposed. However, the molecular mechanisms are largely unknown. By using a model organism *C. elegans*, we found molecules that regulate localization of an axon guidance molecule UNC-6/Netrin and its receptor UNC-5.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：発生生物学

キーワード：発生遺伝、軸索ガイダンス

1. 研究開始当初の背景

研究構想：

脳をはじめとする神経回路網は、神経細胞が他の神経細胞や筋肉細胞へと正確に軸索を伸長し、それらと正確に接合することにより形成される。軸索ガイダンス分子は、伸長する軸索に対し位置情報を提示し、その位置情報は、軸索先端の成長円錐に存在する軸索ガイダンス分子受容体により受容される。

Netrin、Slit、Semaphorin 等の軸索ガイダンス分子、および、それらの受容体が同定されつつあるが、神経細胞の多種多様な軸索走行パターンは、軸索ガイダンス分子、および、その受容体の多様性だけでは、到底説明できない状況にある。この状況を打開する仮説の1つは、軸索ガイダンス分子、および、その受容体には特異な局在機構が存在し、それが軸索走行の多様性を生み出しているという

ものである。事実、近年、この仮説を裏付ける報告が出始めている。しかしながら、軸索ガイダンス分子、および、その受容体の局在機構はほとんど明らかとなっていない。本研究では、モデル生物である線虫 *C. elegans* を用いて、それらの局在機構の解明を目指す。

背景：

(1) 軸索ガイダンス分子受容体 UNC-5 の局在制御分子として、UNC-51 と UNC-14 を同定。我々は、線虫 *C. elegans* において、進化的に保存された軸索ガイダンス分子 UNC-6/Netrin の受容体である UNC-5 の細胞内局在が、UNC-51 と UNC-14 によって特異的に制御されていることを明らかにした (Ogura and Goshima, *Development*, 133 : 3441-3450, 2006)。UNC-51 は *S. cerevisiae* のオートファジー (代謝的小胞輸送) に必要な Atg1 に相同なセリン/スレオニンキナーゼであり (Ogura et al., *Genes Dev.*, 8:2389-2400, 1994)、その結合分子である UNC-14 は、小胞輸送に重要な Rab, Rap 等 GTPase の結合に重要と考えられる RUN ドメインを有する分子である (Ogura et al., *Genes Dev.*, 11:1801-1811, 1997)。しかしながら、UNC-51 と UNC-14 の分子機能はほとんどわかっていない。これらの機能を調べる目的で、UNC-51、UNC-14 と結合する分子、LET-92/PP2A-C と UNC-73 (Rac/Rho GEF) 得た。一方、UNC-51 の機能を解明するため、*unc-51* 変異体の表現型を抑制する抑制変異体の分離を行った。現在までに 12 アリールの抑制変異体を得ている。これら抑制変異体の原因遺伝子産物は UNC-51 の活性を制御している分子である可能性が高い。

(2) 軸索ガイダンス分子受容体 UNC-5 の局在制御分子として、オートファジー関連システインプロテアーゼ ATG-4.2/Atg4 の同定。

軸索ガイダンス分子受容体 UNC-5 の局在機構は軸索ガイダンスにおいて重要と考えられるが、その局在機構はほとんどわかっていない。UNC-5 の局在機構を解明するため、UNC-5::GFP の局在異常となる変異体のスクリーニングを行った。その結果、UNC-5::GFP が神経細胞体に蓄積する変異体 *gh35* を得た。原因遺伝子を同定したところ、*gh35* の原因遺伝子は、オートファジー関連システインプロテアーゼをコードする *atg-4.2/Atg4* であることがわかった (和賀ら、投稿準備中)。我々は既に、UNC-5 の局在を制御する分子としてオートファジー関連キナーゼ UNC-51/Atg1 を同定しているが、*C. elegans* に存在する他のオートファジー関連分子の RNAi によるノックダウンでは UNC-5::GFP の局在が異常は観

察されない。これらのことから、ATG-4.2/Atg4 と UNC-51/Atg1 は、従来のオートファジー機構ではなく、新規の分子機構により UNC-5 の局在を制御していることが予想される。

(3) キネシン様分子 VAB-8 が UNC-73(Rac/Rho GEF) を介し、軸索ガイダンス分子受容体 SAX-3/Robo の発現量を増強することを発見。

我々は、キネシン様モーター分子 VAB-8 が UNC-73(Rac/Rho GEF) を介し、軸索ガイダンス分子 SLT-1/Slit の受容体である SAX-3/Robo の発現量を増強させることを明らかにした (Watari-Goshima N., Ogura K., Wolf F. W., Goshima Y., Garriga G., *Nat. Neurosci.*, 10:169-176, 2007)。しかしながら、VAB-8/kinesin と UNC-73(Rac/Rho GEF) がどのような分子機構により SAX-3/Robo の発現量を制御しているのか、全くわかっていない。

(4) AVM 神経細胞の軸索ガイダンスにおける UNC-51、UNC-14 の機能関与の発見。

遺伝的な解析の結果、AVM 神経細胞の軸索ガイダンスに関して、UNC-51、UNC-14 はともに UNC-6/Netrin の遺伝的経路を抑制し、SLT-1/Slit の遺伝的経路を促進していることがわかった。UNC-51、UNC-14 は UNC-6/Netrin 受容体である UNC-5 の局在を制御することから、AVM 神経細胞においても、軸索ガイダンス分子受容体の局在を制御している可能性が高い。

(5) 軸索ガイダンス分子 UNC-6/Netrin の局在異常変異体の同定、解析。

軸索ガイダンス分子 UNC-6/Netrin は、軸索の誘引、反発両作用を持ち、その局在、分泌制御は軸索ガイダンスにおいて重要である。しかしながら、その制御機構は全くわかっていない。我々は、蛍光タンパク質である Venus との融合分子 Venus::UNC-6 を発現する *C. elegans* を作製した。Venus::UNC-6 は、腹側の神経細胞、筋肉および陰門前駆細胞で発現する。Venus::UNC-6 の局在異常の変異体をスクリーニングした結果、*unc-51* を含め、その局在に必要な遺伝子を 13 個同定した。

2. 研究の目的

我々は、進化的に保存された軸索ガイダンス分子 UNC-6/Netrin の細胞内局在が、UNC-51/Atg1、UNC-14 によって制御されていること、UNC-6/Netrin 受容体である UNC-5 の細胞内局在が、UNC-51/Atg1、UNC-14、ATG-4.2/Atg4 によって特異的に制御されていることを明らかにした。一方、キネシン様

分子 VAB-8 が UNC-73 (Rac/Rho GEF) を介し、軸索ガイダンス分子受容体 SAX-3/Robo の発現量を調節することを見い出した。しかしながら、UNC-51/Atg1、ATG-4.2/Atg4、UNC-14、VAB-8/kinesin、UNC-73 (Rac/Rho GEF) がどのような分子機構で軸索ガイダンス分子、その受容体の局在を制御しているのかわかっていない。本研究では、これらの分子の機能解明を目指す。一方、我々は、軸索ガイダンス分子 UNC-6/Netrin の局在異常となる変異体を多数分離した。これらの変異体を解析することにより軸索ガイダンス分子の局在機構を解明し、軸索ガイダンスの新規基本原理の解明を目指す。

3. 研究の方法

(1) UNC-51、UNC-14 と相互作用する分子の機能解析。

1-1. LET-92/PP2A-C の機能解析。

UNC-51、UNC-14 と相互作用する分子として ser/thr protein phosphatase 2A の触媒サブユニット (PP2A-C) を得た。我々は *C. elegans* の PP2A-C は *let-92* にコードされていること、および、UNC-51 と LET-92/PP2A-C に遺伝的相互作用があることを明らかにした。UNC-51 が ser/thr kinase であることから、UNC-51 と LET-92/PP2A-C 両分子によるリン酸化活性のバランスが機能上重要と考えられる。一方、PP2A は 3 量体を形成するが、PP2A の調節サブユニット A (PAA-1/PP2A-A) および調節サブユニット B (SUR-6/PP2A-B) をコードする遺伝子 *paa-1/PP2A-A*、*sur-6/PP2A-B* に関しても、UNC-51 との間で遺伝的相互作用を見い出した。PAA-1/PP2A-A、SUR-6/PP2A-B は LET-92/PP2A-C を介して、UNC-51 の機能を制御していると考えられる。UNC-51 は軸索ガイダンス分子受容体 UNC-5 の局在を制御することから、UNC-51 と PP2A が協調して UNC-5 の局在を制御している可能性が高い。PP2A と UNC-5 との遺伝的、物理的な相互作用、共局在等を調べ、PP2A と UNC-5 局在制御との機能関連を調べる。

1-2. UNC-73 (Rac/Rho GEF) の機能解析。

UNC-51、UNC-14 と相互作用する分子として UNC-73 (Rac/Rho GEF) を得た。我々は、UNC-51 と UNC-73 (Rac/Rho GEF) の間に遺伝的相互作用を見い出した。また、UNC-73 (Rac/Rho GEF) は軸索ガイダンス分子 UNC-6/Netrin 受容体 UNC-5 と結合するとともに、UNC-5 と遺伝的に相互作用することを見い出した。これらの結果は、UNC-51、UNC-73 (Rac/Rho GEF)、UNC-5 が協調して軸索ガイダンスを制御していることを示す。しかしながら、*unc-73* 変異体で

は、*unc-51* 変異体で観察されるような UNC-5 の細胞体への蓄積異常は観察されない。最近、HSN 神経細胞で、別の UNC-6/Netrin 受容体 UNC-40 が成長円錐内の伸長方向に局在することが示された。UNC-73 (Rac/Rho GEF) は、UNC-40 と結合することから、成長円錐内における UNC-5、UNC-40 の局所的な局在形成に重要な役割を演じているのかもしれない。この可能性を検証するため、*unc-73* 変異体の HSN 成長円錐における軸索ガイダンス分子受容体の局在を調べる。

(2) *unc-51* 抑制変異体の原因遺伝子のクローニング。

unc-51 抑制変異体を 12 アリール得ている。これらの変異体は全てドミナントであるため、相補性検定を行うことができない。従って、これらのアリールに関して、原因遺伝子の数を判定することができない。変異部位の遺伝的マッピングを行ったところ、少なくとも 2 遺伝子座はあることがわかった。原因遺伝子のポジショナルクローニングを行うとともに、機能解析を行う。

(3) 軸索ガイダンス分子受容体 UNC-5 の局在制御分子 ATG-4.2/ATG4 の機能解析。

我々は、オートファジー関連システインプロテアーゼである ATG-4.2/ATG4 が、軸索ガイダンス分子受容体 UNC-5 の局在を制御することを明らかにした。ATG-4.2/ATG4 がどの細胞で発現するのか、UNC-5 と共局在するのか、その制御は UNC-5 特異的なのか、UNC-5 との遺伝的相互作用はあるのか等、検討する。一方、ATG-4.2/ATG4 と相互作用する分子を同定、解析する。

(4) 軸索ガイダンス分子受容体 SAX-3 の発現調節因子 VAB-8/kinesin の機能解析。

我々は、キネシン様分子 VAB-8 を過剰発現させると、UNC-73 (Rac/Rho GEF) を介し、軸索ガイダンス分子受容体 SAX-3 の発現量が増強し、それが、軸索の伸長極性を反転させることを見い出した。UNC-73 (Rac/Rho GEF) は、VAB-8/kinesin、SAX-3 と物理的に相互作用することから、この制御は SAX-3 の転写による制御ではなく、SAX-3 の輸送経路の制御であると考えられる。しかしながら、その分子機構は全くわかっていない。

(5) 他の軸索ガイダンス分子受容体の局在における UNC-51、UNC-14 の機能関与の検討。

我々は、AVM 神経細胞の軸索ガイダンスに関して、UNC-51、UNC-14 はともに UNC-6/Netrin の遺伝的経路を抑制し、SLT-1/Slit の遺伝的経路を促進していることがわかった。UNC-51、UNC-14 は UNC-6/Netrin 受容体である UNC-5 の局在を制

御することから、AVM 神経細胞においても、軸索ガイダンス分子受容体の局在を制御している可能性が高い。UNC-6/Netrin 受容体 UNC-40、SLT-1/Slit 受容体 SAX-3, EVA-1、UNC-6/Netrin シグナルの抑制因子である受容体型チロシンフォスファターゼ CLR-1 の局在を調べ、UNC-51、UNC-14 の機能関与を検討する。

(6) 軸索ガイダンス分子受容体 UNC-5 の局在機構の解析。

UNC-5 と結合する分子を同定し、RNAi、変異体等を用いて、UNC-5 の局在との機能関連を調べる。一方、UNC-5::GFP の局在の異常となる新規変異体を分離する。UNC-5 にはサイレンス機構、すなわち、UNC-5 があっても、そのリガンド UNC-6/Netrin に応答しない場合があるが、我々は、UNC-5 の小胞への局在機構が UNC-5 のサイレンス機構と関連していると考えている。UNC-5 の小胞局在機構を明らかにするため、UNC-5 の小胞局在に必要なドメインを同定する。

(7) 軸索ガイダンス分子 UNC-6/Netrin の局在異常変異体の解析、原因遺伝子のクローニング。

UNC-6/Netrin の局在・分泌機構を明らかにするため、その局在の異常となる変異体のスクリーニングを行った。その結果、UNC-6/Netrin の局在を制御する 13 遺伝子を同定した。

(A) 神経細胞体に蓄積 (4 遺伝子) : *unc-51(e369)*、*unc-14(e57)*、*gh34*、*unc-104(e1265)*、*gh23*

(B) 筋肉に蓄積 (7 遺伝子) : *unc-68(e540)*、*r1162*、*gh21*、*gh22*、*gh28*、*gh29*、*gh32*、*gh37*、*unc-18(e234)*、*gh26*、*gh33*、(*gh27*、*gh38*)、*syd-1(ju82)*、*rpm-1(ju44)*

(C) 陰門前駆細胞に蓄積 (1 遺伝子) : (*gh25*)

(D) 発現する全ての細胞で細胞体に蓄積 (1 遺伝子) : (*gh36*)

unc-51、*unc-14* 変異体で Venus::UNC-6 が神経細胞体に蓄積することから、UNC-51、UNC-14 は UNC-6/Netrin 受容体 UNC-5 のみならず、そのリガンドである UNC-6/Netrin の細胞内局在をも制御することがわかった。また、*unc-104/kinesin* 変異体でも UNC-6/Netrin は神経細胞体に蓄積する。UNC-6/Netrin は細胞体で合成された後、おそらく、UNC-51、UNC-14、UNC-104/kinesin を介する経路で細胞体から軸索へと運搬されるのではないかと考えられる (朝倉ら、投稿準備中)。同様の表現型を示す変異体に *gh23* があり、この原因遺伝子産物も UNC-51、UNC-14、UNC-104/kinesin を介する経路で働

いている可能性が高い。*gh23* の原因遺伝子を同定し、機能解析を行う。

unc-68 遺伝子は細胞内カルシウムチャンネルであるリアノジン受容体をコードするが、この変異体では Venus::UNC-6 が腹部の筋肉に蓄積する異常が観察される。このことから、リアノジン受容体による細胞内カルシウムの制御が筋肉細胞における UNC-6/Netrin の局在に重要と考えられる。一方、*unc-18* 変異体でも Venus::UNC-6 が腹部の筋肉に蓄積する。UNC-18 は神経細胞においてシナプス小胞の放出に関わる分子であり、解析の結果、Venus::UNC-6 の筋肉での局在に関しても神経細胞で機能することがわかった。*syd-1(ju82)*、*rpm-1(ju44)* 2 重変異体では、シナプス形成が著しく異常になるが、この 2 重変異体においても Venus::UNC-6 が腹部の筋肉に蓄積する。一方、アセチルコリンや、GABA 等の放出異常の変異体、シナプス小胞の放出に関する他の変異体においては、Venus::UNC-6 の異常がみられない。これらのことから、神経細胞のシナプスから UNC-18 を介して筋肉細胞に何らかの未知の因子が未知の機構により放出され、それが筋肉細胞からの UNC-6/Netrin の分泌を促していると考えられる。UNC-68/リアノジン受容体による細胞内カルシウム制御もこの経路に関与しているのかもしれない。*gh26*、*gh33*、(*gh27*、*gh38*) 変異体においては同様の表現型が観察されることから、これらの原因遺伝子産物は、その未知の因子、あるいは、その受容体かもしれない。*gh26*、*gh33*、(*gh27*、*gh38*) の原因遺伝子を同定し、機能解析を行う。

4. 研究成果

軸索ガイダンス分子、および、その受容体には特異な局在機構が存在し、それが軸索走行の多様性を生み出しているという仮説が提唱されている。しかしながら、軸索ガイダンス分子、および、その受容体の局在機構はほとんど明らかとなっていない。今回、我々は、モデル生物である線虫 *C. elegans* を用いて、軸索ガイダンス分子 UNC-6/Netrin およびその受容体である UNC-5 の局在制御分子を同定した。

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 5 件)

① Localization mechanisms of the axon guidance molecule UNC-6/Netrin and

its receptors, UNC-5 and UNC-40, in *Caenorhabditis elegans*. Ogura K, Asakura T, Goshima Y. *Dev Growth Differ*. 2012 Apr;54(3):390-7. doi:10.1111/j.1440-169X.2012.01349.x. (査読有)

- ② A seven-transmembrane receptor that mediates avoidance response to dihydrocaffeic acid, a water-soluble repellent in *Caenorhabditis elegans*. Aoki R, Yagami T, Sasakura H, Ogura K, Kajihara Y, Ibi M, Miyamae T, Nakamura F, Asakura T, Kanai Y, Misu Y, Iino Y, Ezcurra M, Schafer WR, Mori I, Goshima Y. *J Neurosci*. 2011 Nov 16;31(46):16603-10. (査読有)
- ③ Mutation in a mitochondrial ribosomal protein causes increased sensitivity to oxygen with decreased longevity in the nematode *Caenorhabditis elegans*. Fujii M, Shikatani K, Ogura K, Goshima Y, Ayusawa D. *Genes Cells*. 2011 Jan;16(1):69-79. doi:10.1111/j.1365-2443.2010.01469.x. Epub 2010 Dec 13. (査読有)
- ④ Protein phosphatase 2A cooperates with the autophagy-related kinase UNC-51 to regulate axon guidance in *Caenorhabditis elegans*. Ogura K, Okada T, Mitani S, Gengyo-Ando K, Baillie DL, Kohara Y, Goshima Y. *Development*. 2010 May;137(10):1657-67. Epub 2010 Apr 14. (査読有)
- ⑤ Genes required for cellular UNC-6/netrin localization in *Caenorhabditis elegans*. Asakura T, Waga N, Ogura K, Goshima Y. *Genetics*. 2010 Jun;185(2):573-85. Epub 2010 Apr 9. (査読有)

[学会発表] (計8件)

- ① The secretory mechanism of an axon guidance molecule UNC-6/Netrin. Wataru Okubo, Taro Asakura, Kumiko Fujita, Kazunori Hanaoka, Yoshio Goshima, Ken-ichi Ogura, 第34回 日本分子生物学会年会、2011年12月16日、パシフィコ横浜。
- ② A vesicular transport mechanism regulates UNC-6/Netrin. Taro Asakura, Ken-ichi Ogura, Kumiko Fujita, Yoshio Goshima, 第34回 日本分子生物学会年会、2011年12月16日、パシフィコ横浜。
- ③ A copine like protein CPNA-2 regulates neural localization of UNC-6/Netrin in *Caenorhabditis*

elegans. Taro Asakura, Kumiko Fujita, Yoshio Goshima and Ken-ichi Ogura, 18th International C. elegans Meeting, 2011.06.24. UCLA .

- ④ Isolation and characterization of unc-51 suppressor mutants in *C. elegans* Ken-ichi Ogura, Hiroshi Matsuoka and Yoshio Goshima, 第33回 日本分子生物学会年会、2010年12月8日、神戸ポートアイランド。
- ⑤ UNC-104/KIF1A regulates the transport of UNC-6/Netrin in neurons Taro Asakura, Kumiko Fujita, Yoshio Goshima and Ken-ichi Ogura, 第33回 日本分子生物学会年会、2010年12月8日、神戸ポートアイランド。
- ⑥ Genes required for localization of UNC-6/Netrin and/or UNC-5 in *Caenorhabditis elegans*. Taro Asakura, Naoko Waga, Ken-ichi Ogura and Yoshio Goshima, 17th International C. elegans Meeting, 2009.06.26, UCLA .
- ⑦ オートファジー関連分子 Atg-4.2 は軸索ガイダンス分子 UNC-6/Netrin 受容体 UNC-5 の細胞内局在を制御する ○朝倉太郎, 小倉 顕一, 和賀 真子, 岡田 貴子, 五嶋良郎、第32回 日本分子生物学会年会、2009年12月10日、パシフィコ横浜。
- ⑧ 線虫 *C. elegans* の筋肉形成異常変異 unc-22、unc-15 は unc-51 変異体の軸索ガイダンス異常を抑制する。小倉 顕一、五嶋 良郎、第32回 日本分子生物学会年会、2009年12月10日、パシフィコ横浜。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小倉 顕一 (OGURA KEN-ICHI)

横浜市立大学・医学部・助教

研究者番号: 20326028

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

五嶋 良郎 (GOSHIMA YOSHIO)

横浜市立大学・医学研究科・教授

研究者番号: 00153750