

## 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25年5月27日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(A)

研究期間：2010～2012

課題番号：22247034

研究課題名（和文） 成体型神経回路へのリモデリングと一生を通じた維持機構の解明

研究課題名（英文） Mechanisms that regulate remodeling and life-long maintenance of adult-type neural circuits

研究代表者

上村 匡 (UEMURA TADASHI)

京都大学・大学院生命科学研究所・教授

研究者番号：80213396

研究成果の概要（和文）：

発生初期においていったん形成された神経回路は、一部の神経突起の刈り込みと再伸長を経てリモデリングされた後、成体において長期間安定に維持され機能し続ける。この神経細胞のリモデリングと維持を支える遺伝子プログラムを探索した結果、成体の体の大きさに合わせて樹状突起のサイズを調節する遺伝子を発見した。この遺伝子は動物に広く保存されており、成体新生において神経細胞のサイズを調節する未知のメカニズムの解明が期待できる。

研究成果の概要（英文）：

For the establishment of functional neural circuits that support a wide range of animal behaviors, initial circuits formed in early development have to be reorganized. One way to achieve this is local remodeling of the circuitry hardwiring. We genetically investigated the underlying mechanisms of this remodeling, and discovered a gene that scales the size of dendritic arbors with that of the adult body.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
平成22年度	13,300,000	3,990,000	17,290,000
平成23年度	9,000,000	2,700,000	11,700,000
平成24年度	9,500,000	2,850,000	12,350,000
総計	31,800,000	9,540,000	41,340,000

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：神経回路・樹状突起・リモデリング・神経変性・次世代シーケンサー・ショウジョウバエ

## 1. 研究開始当初の背景

発生初期においていったん形成された神経回路は、一部の神経突起の刈り込みと再伸長を経てリモデリング（「モデルチェンジ」）された後、成体において長期間安定に維持され機能し続ける（神経回路の「長寿」）。この再編成に伴い新たな機能を付加された回路が長期間働き続けることにより、動物の様々な行動様式の変化が支えられている。しかし初期発生における神経回路形成に比べて、リモデリングと維持の機構には不明な点が多

い。

## 2. 研究の目的

本研究では、この神経細胞の「モデルチェンジ」と「長寿」を支える遺伝子プログラムを明らかにする。

## 3. 研究の方法

ショウジョウバエ末梢神経系の dendritic arborization (da) neuron の一部では、蛹期において幼虫型の樹状突起が除去されて新

たに成虫型の樹状突起を再伸長する。すなわち大規模な樹状突起のリモデリングが起こるため、樹状突起パターンのリモデリングを調節する機構を研究する有用なモデル系となる。この系を用いて、リモデリングや加齢に伴う神経突起の異常を、簡便に感度よく検出でき、かつ神経細胞で働く遺伝子の網羅的な探索が可能な実験系を構築した。

#### 4. 研究成果

約 1,500 系統の変異体系統を対象にした遺伝学的なスクリーニングを行った。その一方で、他のモデル系において神経変性に対抗する働きが知られている経路に着目し、その経路を欠損させる突然変異の表現型も調べた。

##### (1) オートファジー経路の関与について

オートファジー経路に属する *atg5* の突然変異体マウスでは神経変性が起こることが報告されており (Hara et al., 2006)、オートファジー経路が神経細胞内において維持の役割を持っていることが期待された。そこで、オートファジー経路が *da neuron* の樹状突起パターンの維持に関与しているかを検証した。まず、*atg1* の塩基配列をターゲットとした二重鎖 RNA を *da neuron* 特異的に発現させることで RNAi によるノックダウンを行い、その個体において突起パターンの観察を行った。観察の結果、加齢個体において突起パターンに目立った異常は見られなかった。同じくオートファジー経路に属する *atg5* をノックダウンした個体において突起パターンの観察を行ったが、やはり加齢個体において目立った異常は見られなかった。オートファジー経路に属する ATG7 は E1-like 酵素であり、同じくオートファジー系タンパク質である ATG8 と ATG12 を活性化することで、オートファジー経路において重要な役割を果たしていると考えられている。*atg7* 遺伝子の E1-like ドメインを欠損した変異をトランスヘテロにもつショウジョウバエ (*atg7<sup>dl4</sup>atg7<sup>dl7</sup>*) は発生が正常に進むが、*atg1* の突然変異体と同様、ストレス応答性のオートファジーに異常が生じることが知られている (Juhász et al., 2007)。そこで、この *atg7* 欠損突然変異体において突起パターンの観察を行ったが、加齢個体において目立った異常は見られなかった。以上の結果は、オートファジー経路は *da neuron* の樹状突起の維持には必須ではない可能性を支持する。

##### (2) チューブリンシャペロン Prefoldin 複合体は樹状突起の維持に働くか?

突然変異体を探索した結果、ヒトの Prefoldin サブユニットの 1 つである Prefoldin subunit 2 (PFD-2) のホモログを

コードしている遺伝子が、樹状突起の維持に必要である可能性が出て来た。*pfld-2* のコーディング配列に pBac が挿入されているアレル (*pfld-2/pBac*) をホモに持つ神経細胞 (以下突然変異細胞と記す) の樹状突起は、若齢個体では背側領域においてわずかに受容野のサイズの減少が見られたが、突起長に関しては野生型神経細胞と比較して有意な差が見られなかった。一方、加齢個体において野生型細胞と突然変異細胞との樹状突起長を比較したところ、加突然変異細胞では有意に減少していた。この結果から、*pfld-2* が樹状突起の維持に関与している可能性が考えられた。

Prefoldin は 2 つの  $\alpha$ -サブユニットと 4 つの  $\beta$ -サブユニットから成るヘテロ 6 量体 (PFD 複合体) を形成する。PFD-3 と PFD-5 が  $\alpha$ -サブユニット、PFD-1, PFD-2, PFD-4 および PFD-6 が  $\beta$ -サブユニットに属する (Martín-Benito et al., 2002; Siegert et al., 2000)。PFD 複合体は actin や tubulin など細胞骨格系タンパク質に結合し、正しい折りたたみを補助する機能を持つ (Lundin et al., 2010)。Prefoldin 複合体は、PFD-2 を含む PFD-1~PFD-6 の 6 つのサブユニットによって形成されている。これまでの報告から 1 つのサブユニットに対するノックダウンを行うと、複合体に組み込まれずに余った他のサブユニットがユビキチン・プロテアソームシステムによって分解され、Prefoldin 複合体の存在量が減少することが報告されている (Miyazawa et al., 2011)。そこで prefoldin 複合体を構成する他のサブユニットの遺伝子に対してノックダウンを行い、樹状突起に異常がみられるか検証している。

##### (3) ボディーサイズと神経細胞をつなぐ: 樹状突起が示すスケールリング機構

多くの生物において、体の各部や器官のサイズはボディーサイズの変化に応じて調整される。このような体の大きさに歩調を合わせた各組織のサイズコントロールを実現する一つの様式として、各組織を構成する個々の細胞の大きさを調節する方法がある。これには、Insulin receptor-Target of rapamycin (InR-Tor) シグナル伝達経路が中心的な役割を果たしている (Hietakangas and Cohen 2009)。これらの分子群が細胞のサイズコントロールに果たす役割は盛んに研究されているが、その多くは細胞株や上皮細胞など、神経細胞に比べ単純な形態を示す細胞を対象としている。我々は生体内の神経細胞のサイズコントロールを新たな視点で再定義できることを見いだした。

樹状突起サイズの調節には、2 つの様式が考えられる。一つは分岐点間隔を不変量として分岐数を増減させる方法 (成長あるいは成

長不全 *underdevelopment* と呼ぶ) である。長さが一定の爪楊枝の端同士を次々つなげて拡大する (成長)、あるいは外して縮小する (成長不全 *underdevelopment*) ことを想定すればよい。もう一つは、分岐数を不変量として分岐点間隔を変化させる方法 (スケーリング *scaling* と呼ぶ) である。元の樹状突起の分岐の複雑度を維持したまま、突起全体を拡大または縮小コピー (ミニチュア化) する作業に相当する。

個体を飢餓条件で飼育してボディーサイズを減少させたところ、野生型 *da neuron* はミニチュア型樹状突起を形成したことから、この神経細胞では後者のスケーリングが起きていることがわかった。対照的に、*InR/Tor* 経路が神経細胞内で阻害されると、通常の栄養条件下で飼育しても分岐数も突起長も減少した (成長不全 *underdevelopment*)。以上の結果は、*InR/Tor* 経路は成長に関与しており、スケーリングは未知の経路により調節されている可能性が示唆された。

幼虫から成体への樹状突起リモデリング過程に異常を示す突然変異を探索した結果、(通常の栄養条件下で発生させても飢餓条件下でも) 成体のボディーサイズに関わらずミニチュア型の樹状突起を形成する突然変異を分離した。つまりこの変異細胞は通常のボディーサイズを感知していないらしい。さらに原因遺伝子 *CHORD* を同定し、神経細胞自律的に働くことを示した。*CHORD* タンパク質は *HSP90* の *co-chaperon* として働き、*Rho-kinase* の活性を負に制御して中心体の過剰な複製を抑制する機能が報告されていた。しかし我々が調べた限り、樹状突起のスケーリングの調節に *Rho-kinase* や中心体が関わる証拠を得られなかった。そこで生化学的および遺伝学的手法を用いて結合分子あるいは機能関連分子の探索を進めると共に、すでに見いだした結合分子の候補の機能解析を進め、*CHORD* の役割を分子レベルで明らかにする試みを続けている。また、神経細胞はどのような細胞外環境からのシグナルを介して、成体のボディーサイズを感知するのかを探している。神経細胞近傍から放出されるシグナル分子、あるいは全身性のシグナル分子の候補を想定し、各々の可能性を追究中である。

#### 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 1 件)

①Daisuke Satoh, Ritsuko Suyama, Ken-ichi Kimura, Tadashi Uemura, High-resolution *in vivo* imaging of regenerating dendrites of *Drosophila* sensory neurons

during metamorphosis: local filopodial degeneration and heterotypic dendrite-dendrite contacts, *Genes to Cells*, 査読有, Dec;17(12), 2012, 939-951, DOI:10.1111/gtc.12008.

[学会発表] (計 14 件)

①Tadashi Uemura, Dendritic arborization: input processing, life-long maintenance, and allometry, 国際シンポジウム「感覚受容と神経回路」, 2013, Feb, 11, Tokyo.

②Kohei Shimono, Molecular mechanisms controlling size of neuronal dendritic arbors, 第 35 回分子生物学会年会, 2012, Dec, 11, 博多.

③Tadashi Uemura, 遺伝子ネットワークから細胞ジオメトリーを解く, 文部科学省数学・数理科学と諸科学・産業との連携研究ワークショップ, 2012 年 11 月 02 日, 博多.

④Yuta Takayama, Roles of a *Drosophila* homolog of Amyotrophic Lateral Sclerosis 2 (ALS2), a Rab5 GEF, in neuronal dendrite formation, 第 10 回日本ショウジョウバエ研究集会, 2012, Oct, 14, Tokyo.

⑤Kohei Shimono, Remodeling and Life-long Maintenance of Dendritic Arbors of Neurons, 第 35 回日本神経科学大会, 2012, Sep, 18, Nagoya.

⑥Kohei Shimono, Remodeling and Life-long Maintenance of Dendritic Arbors of Neurons, 第 45 回日本発生生物学会・第 64 回日本細胞生物学会合同大会, 2012, May, 30, Kobe.

⑦Yuta Takayama, Roles of *Drosophila* homolog of Amyotrophic Lateral Sclerosis 2 (ALS2), a Rab5 GEF, in neuronal dendrite formation, 第 45 回日本発生生物学会・第 64 回日本細胞生物学会合同大会, 2012, May, 29, Kobe.

⑧下野耕平, 神経細胞樹状突起パターンのリモデリングと維持を支える分子機構の解明, 新学術「ゲノム支援」拡大班会議, 2011 年 12 月 17-18 日, 新大阪ワシントンホテルプラザ.

⑨Taiichi Tsuyama, Towards applications of ATeam to monitor ATP levels at single cell resolution in *Drosophila melanogaster*, 発生過程におけるエネルギー代謝を考える会, 2011, Nov, 30, Okazaki.

⑩Tadashi Uemura, Linking global tissue asymmetry to cell polarity. *Developmental Control of Sex, Growth and Cellular Fate*, Cold Spring Harbor Asia, 2011, Oct, 11, China.

⑪Tadashi Uemura, Linking global tissue asymmetry to cell polarity, *Developmental Cell* 創刊 10 周年記念シンポジウム

“Cellular development: Biology at the

interface” , 2011, Sep, 29, Kobe.

⑫Ritsuko Suyama, A Potential Role of Dendro-Dendritic Interaction in Remodeling into an Adult-type Arbor, the 1st Asia-Pacific Drosophila Research Conference , 2011, May 22-25, Taipei.

⑬Yuta Takayama, In Vivo Roles of the Drosophila Homolog of ALS2 Gene, the 1st Asia-Pacific Drosophila Research Conference, 2011, May 22-25, Taipei.

⑭Kohei Shimono, Hunting for Genes that Regulate Remodeling and Life-long Maintenance of Dendritic Arbor, the 1st Asia-Pacific Drosophila Research Conference, 2011, May 22-25, Taipei.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

上村 匡 (TADASHI UEMURA)

京都大学・大学院生命科学研究科・教授

研究者番号 : 80213396

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし