

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 9 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2011～2014

課題番号：23687032

研究課題名(和文)糖鎖修飾によるEphrin/Ephシグナルの制御機構と生理的意義

研究課題名(英文)The role of protein glycosylation in the regulation of Ephrin/Eph signal

研究代表者

千原 崇裕 (Chihara, Takahiro)

東京大学・薬学研究科(研究院)・准教授

研究者番号：00431891

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 20,800,000円

研究成果の概要(和文)：Ephrin/Ephシグナルは進化的に保存されたシグナル伝達機構であり、軸索投射、血管・体節形成など様々な発生現象を制御する。本研究では、生体内におけるEphrin/Ephシグナルの新たな制御機構の理解とその生理的意義の解明を目指し、ショウジョウバエを用いた遺伝学的・生化学的解析を行った。その結果、EphrinのN型糖鎖修飾が、その活性制御に重要であることを示すことに成功した。

研究成果の概要(英文)：An evolutionarily conserved signal, Ephrin/Eph signal functions in axon guidance, blood vessel formation and body segmentation etc. In this study, we aimed to reveal the regulatory mechanism of Ephrin/Eph signal by using biochemical methods and Drosophila genetics. We succeeded to show the significance of Ephrin N-glycosylation for its stability and subcellular localization, which is essential for proper Ephrin/Eph signal in neural development.

研究分野：神経発生遺伝学

キーワード：Eph Ephrin 神経 発生 糖鎖修飾

1. 研究開始当初の背景

Ephrin/Ephシグナルは、進化的に保存された双方向性のシグナル伝達機構であり、網膜-視蓋間の軸索投射、血管・体節形成など様々な発生現象を制御する。更に成体においても神経シナプスの成熟、維持、記憶学習などに機能していることが知られており、個体（特に神経系）の一生を通じて重要な役割を果たすシグナル伝達機構として多くの注目を集めてきた (*Trends Cell Biol* 17:230-8, 2007)。Ephrin、Ephレセプター (Eph)は共に膜結合型の蛋白質であり、EphrinがリガンドとしてEphを活性化する順方向シグナル、及び EphがリガンドとしてEphrinを活性化する逆方向シグナルが知られている (共に*in trans*活性化)。また、同じ細胞に発現したEphとEphrin間での活性制御も行われている (*in cis*制御)。しかし、このようなEphrin/Ephシグナル活性制御の複雑さから、その「生体内」における活性制御機構に関しては不明な点が多かった。

2. 研究の目的

私は独自に単離した糖核酸輸送体 Meigo の分子遺伝学的解析を通して、「N型糖鎖修飾によって Ephrin/Ephシグナルは制御されている」という仮説を導き出していた。よって本研究では、ショウジョウバエの遺伝学、ゲノム工学、生化学的手法を最大限に活用することによって、本仮説を実験的に検証し、「生体内における Ephrin/Ephシグナルの新たな制御機構の理解とその生理的意義」の解明を目指した。

3. 研究の方法

私は、脳神経回路を構成する軸索・樹状突起のターゲティング分子機構を解明する目的で「ショウジョウバエ嗅覚系神経: Projection Neuron (以下PNと省略)」をモデル神経細胞とした脳内単一細胞モザイク解析 (MARCM法)を行ってきた (*Nat Neurosci* 10:828-837,2007)。MARCM法とは、体細胞分裂時に染色体組換えを誘導することにより、生体内の1細胞をラベルし、更に「そのラベルされた細胞」のみを突然変異ホモ接合体にする遺伝学的モザイク法である (*Neuron* 22, 451-461,1999)。この方法により、脳内において1つの神経細胞の樹状突起・軸索の形態を詳細に解析する事が可能になる。これまでMARCM法を用いて、1つのPN樹状突起は、触角葉内に約50個ある系球体のうち1つの系球体へ投射する事が報告されている (*Nature*414, 204-208, 2001)。このように脳内における単一細胞モザイク解析が可能で、且つ神経突起の形態を定性・定量化できるPNは、神経形態、回路形成を研究する上で非常に有用なモデル系と成りうる。

これまで私は、独自に遺伝学的モザイクスクリーニング (*Nat Neurosci* 10:828-837,2007)を行い、樹状突起ターゲティングに異常を示す変異体 *meigo* (*medial*

glomeruli)の取得に成功していた。*meigo*変異ホモ接合体PN (*meigo*^{-/-} PN)の樹状突起は触角葉内「正中線側」の系球体へと投射するといった特徴的な表現型を示す。このような表現型が引き起こされる原因を突き止める目的で、責任遺伝子 *meigo* を同定し、その機能解析を行った。その結果、Meigo蛋白質は小胞体に局在する糖核酸輸送体であることが明らかになった。糖核酸輸送体は、細胞質の糖核酸(UDP-Gal)を小胞体やゴルジ体へ輸送することにより、膜蛋白質の折り畳みや糖修飾に関与している。よって *meigo*^{-/-} PNでは、何らかの膜蛋白質(コア蛋白質)の糖鎖修飾異常の結果、コア蛋白質の機能・安定性が乱れ、樹状突起ターゲティング異常が現れたと考えられた。私は、コア蛋白質を同定する目的で遺伝学的相互作用スクリーニングを行い、Ephrinを唯一の候補膜蛋白質として同定した。更に *meigo* のノックダウンによって EphrinのN型糖鎖レベルが減少していることも確認している。このような研究状況から私は、「Ephrin/Ephシグナルは、そのN型糖鎖修飾によって活性が制御されている」という仮説を導き出した。よって本研究では、ショウジョウバエPNをモデル系として、*meigo* と Ephrinの機能的関係、更にはEphrinに対するN型糖鎖修飾の意義を遺伝学的、生化学的に解析した。

4. 研究成果

遺伝学的・生化学的解析を進めた結果、「Ephrinは4カ所でN型糖鎖修飾を受けること」、「Ephrin上のN型糖鎖修飾はEphrinの機能発揮に必要であること」、「Meigoの量に対応して、Ephrin N型糖鎖修飾の程度が変化すること」を見出した。すなわち、小胞体膜上に存在するMeigoは、EphrinのN型糖鎖修飾を介してEphrinの機能を調節し、神経回路形成に寄与していることが明らかになった。これまでEphrinの糖鎖修飾に関してその可能性は示唆されていたものの、生化学的・遺伝学的検証を行われておらず、今回の研究結果は、Ephrin機能に対する新たな制御機構を提示するものとなった (*Nat Neurosci* 16, 683-91, 2013)。

以上のように当初の目的である「生体内におけるEphrin/Ephシグナルの制御機構解明」に関しては十分な成果を挙げることができた。私はこの研究過程で、更にEphrin/Ephシグナルが「特定の」PN樹状突起ターゲティング、特にショウジョウバエの性行動を司る性フェロモン感知に重要なDA1系球体へのPN樹状突起ターゲティングに関わる事を見出したので、その生物学的意義を明らかにする研究を開始した。まず脳発生過程において、内在性のEphrinとEphが「いつ」「どこで」発現しているかを明らかにする目的で、内在Ephrinタンパク質、Ephタンパク質を検出するMycタグノックインシステムを樹立した。CRISPR/Cas9ゲノム編集技術を活用することにより、内在Eph、

内在Ephrin遺伝子にMyc遺伝子を融合させたシステムを作出した。抗Myc抗体を用いて、Eph-Mycタンパク質、Ephrin-Mycタンパク質を検出した結果、Eph-Mycは発生過程の一時期のみに「性フェロモン感知シナプス領域特異的に」発現することが明らかになった。一方、Ephrin-Mycは全体的に弱く発現していた。今後は、これらEphrin、Ephの発現解析結果を踏まえ、「何故、Ephrin/Ephシグナルが性フェロモン神経回路特異的に発現する必要があるのか」、その生物学的意義、及び分子機構に関して研究を進めていく。

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7件)

Okumura, M., Sakuma, C., Miura, M. and Chihara, T.* “Linking cell surface receptors to microtubules: Tubulin folding cofactor D mediates Dscam functions during neuronal morphogenesis”
J Neurosci 35:1979-1990 (2015)
DOI:10.1523/JNEUROSCI.0973-14.2015
査読有り

Sakuma, C., Kawauchi, T., Haraguchi, S., Shikanai, M., Yamaguchi, Y., Gelfand, V.I., Luo, L. and Miura, M. and Chihara, T.* “*Drosophila* Strip serves as a platform for early endosome organization during axon elongation”
Nat Commun 5:5180 (2014)
DOI:10.1038/ncomms6180
査読有り

Sakuma, C., Anzo, M., Miura, M. and Chihara, T.* “Development of olfactory projection neuron dendrites that contribute to wiring specificity of the *Drosophila* olfactory circuit”
Genes and Genetic Systems, 89: 17-26 (2014)
https://www.jstage.jst.go.jp/article/ggs/89/1/89_17/article
査読有り

Chihara, T.*, Kitabayashi, A., Morimoto, M., Takeuchi, K., Masuyama, K., Tonoki, A., Davis, L.D., Wang, J.W. and Miura, M.* “Caspase inhibition in select olfactory neurons restores innate attraction behavior in aged *Drosophila*”
PLOS Genetics 10:e1004437 (2014)
DOI:10.1371/journal.pgen.1004437
査読有り

千原崇裕「膜タンパク質を一網打尽：小胞体分子Meigoによる樹状突起ターゲティング制御機構」生化学 86, 259-264 (2014)
http://www.jbsoc.or.jp/ebook/ebook_JBS8602/#258

査読なし

Sekine, S.U., Haraguchi, S., Chao, K., Kato, T., Luo, L., Miura, M. and Chihara, T.* "Meigo governs dendrite targeting specificity by modulating Ephrin level and N-glycosylation"
Nat Neurosci 16:683-91 (2013)
DOI:10.1038/nn.3389
査読有り

関根清薫・千原崇裕「小胞体タンパク質MeigoはEphrinの蛋白質量およびN-結合型糖鎖修飾を介し樹状突起のターゲティングにおける特異性を制御する」
ライフサイエンス新着論文レビュー(2013)
<http://first.lifesciencedb.jp/archives/7116>
査読なし

[学会発表](計7件)

Chihara, T.: Molecular and cellular mechanism underlying neural map formation in *Drosophila*. 2015. 1.28, Global COE Liaison Laboratory Seminar, Kumamoto

千原崇裕, 関根清薫, 森谷浩幸, 三浦正幸: 神経発生において特異的な機能を持つ小胞体分子 Meigo. 第 87 回 生化学会大会. 2014.10.15-18、京都

Chihara, T.: ephrin/Eph signal governs wiring specificity in the *Drosophila* olfactory circuit. 2014. 1.30, Workshop on Sensory Systems, Yokohama

千原崇裕: 微小脳から学ぶ神経科学と疾患、熊本大学大学院生命科学研究部 大学院特別講義、2013.10.11、熊本

千原崇裕: 神経回路の一生を支える分子基盤 ショウジョウバエ遺伝学を用いたアプローチ、熊本大学発生医学研究所第220回発生研セミナー、2013.10.10、熊本

千原崇裕: 新規因子Dogiは、初期エンドソーム成熟と癌抑制遺伝子Hippo経路を介して神経発生を制御する、第86回日本生化学会大会シンポジウム、2013.9.13、横浜

千原崇裕: 新規因子 Dogi は、発生過程の神経において初期エンドソーム成熟と癌抑制遺伝子 Hippo 経路を制御する、第 65 回日本細胞生物学会シンポジウム、2013.6.19、名古屋

[図書](計0件)

[産業財産権]
出願状況(計0件)

名称:

発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況（計0件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

<http://www.f.u-tokyo.ac.jp/~genetics/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

千原 崇裕 (CHIHARA TAKAHIRO)
東京大学 大学院薬学系研究科・准教授
研究者番号：00431891

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし