

令和 4 年 6 月 1 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K06207

研究課題名(和文) 樹状突起の自己交叉回避を担う分子機構

研究課題名(英文) Molecular mechanisms of neurite self-avoidance

研究代表者

木瀬 孔明 (Kise, Yoshiaki)

東京大学・大学院理学系研究科(理学部)・特任准教授

研究者番号：70769611

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では始めに、(1)細胞認識分子Dscamによって自己の樹状突起間でのみ反発作用を引き起こす、自己交叉回避の分子機構の解明に取り組み、Dscamが下流の細胞骨格制御分子を介して、自己交叉回避シグナル伝達を行うことを明らかにした。(2)次に、Dscamシグナルを解明する過程で同定したリン酸化酵素Wnkの機能解析を行い、Wnkが軸索の伸長と維持を司ることを明らかにした。最後に、(3)樹状突起における活動電位の逆伝搬を抑制する電位依存性カリウムチャンネルKv4.2とその制御サブユニットKChIP1、DPP6Sとの複合体構造をクライオ電子顕微鏡によって解明し、ゲート開閉の制御機構を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我々ヒトの脳神経系は、1000億個もの神経細胞がその複雑な分枝パターンをもった樹状突起と軸索を介して精密なネットワークを形成し、情報処理、運動、学習、意思決定などを行う。本研究成果の学術的意義は、(1)樹状突起や軸索の分枝パターン形成と維持の機構を明らかにしたこと、(2)神経細胞が機能的電気信号を生み出すために必要なカリウムチャンネルの活性制御機構を明らかにしたことによって、神経細胞の発生と機能の両面のメカニズムに迫ることができた点である。その社会的意義は、損傷を受けた脳の再生や、イオンチャンネルの機能不全による精神疾患の治療という医療への応用にも道を切り開いたことである。

研究成果の概要(英文)：This project aims to reveal the molecular mechanisms of neuronal development, maintenance, and function in the brain. To this end, we first identified the regulators of cytoskeleton which work downstream of cell-recognition molecule Dscam for dendrite self-avoidance. Second, we identified Wnk kinase which is required for the growth/branching as well as maintenance of axon. Finally, we provided, by using cryo-EM, the structural basis for gating modulation of Kv4.2-KChIP1-DPP6S channel complex which is required for the inhibition of the backpropagation of the action potential in dendrites.

研究分野：神経科学

キーワード：樹状突起 軸索 イオンチャンネル

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

脳神経系が機能的な神経回路を正しく構築するためには、莫大な数の神経細胞それぞれが自己と非自己を識別し、自己の樹状突起間でのみ反発作用を引き起こす、自己交叉忌避と呼ばれる原理が必須である。本研究は自己交叉忌避の分子機構を解明することを目的とした。自己交叉忌避には細胞認識分子 Dscam が必要であり、Dscam による自己の認識機構は詳細に明らかにされている。一方で Dscam が自己を認識した後に自己の樹状突起間で反発作用を生み出す分子機構は全く明らかにされておらず、本研究分野において解明するべき最大の課題である。我々は Dscam の新規結合タンパク質としてアクチン細胞骨格の重合に必要な複数の分子を同定した。

2. 研究の目的

本研究は、Dscam の下流のシグナル伝達機構を解明することによって、樹状突起、軸索の複雑な分枝形成と自己交叉忌避がどのように強調して、複雑でありながら正確な神経回路が構築されるのか、そのメカニズムにせまる。さらに、将来的に構造生物学的観点から Dscam シグナル複合体の作動機序を解明するために、クライオ電子顕微鏡の系を立ち上げることも目的とする。

3. 研究の方法

(1) 自己交叉忌避における Dscam 結合タンパク質の役割の遺伝学的解析

Dscam の結合タンパク質として同定した遺伝子の loss-of-function、gain-of-function 解析をショウジョウバエ幼虫の表皮感覚神経細胞を用いて in vivo で行い、樹状突起の自己交叉忌避に関する表現型を観察した。

(2) 軸索の分岐形成に必要な新規遺伝子の同定

複雑な軸索分枝パターンを制御する新規遺伝子を同定し、ショウジョウバエの機械感覚受容神経細胞の軸索分枝パターン形成をモデルシステムとして用い、遺伝学的な解析を行った。

(3) クライオ電子顕微鏡による、電位依存性カリウムチャネル複合体のゲート開閉制御機構の解析

樹状突起における活動電位の逆伝搬を抑制する電位依存性カリウムチャネル Kv4.2 とそのゲート開閉のキネティクスを制御するサブユニット KChIP1、DPP6S との複合体構造をクライオ電子顕微鏡で解明し、電気生理学的解析と組み合わせ、ゲート開閉の制御機構を明らかにした。

4. 研究成果

(1) 自己交叉忌避における Dscam 結合タンパク質の役割の遺伝学的解析

Dscam の結合タンパク質として同定された分子 X の樹状突起自己交叉忌避における役割を調べるために、分子 X をショウジョウバエ幼虫の表皮感覚神経細胞 ddaC で過剰発現させた。すると自己の樹状突起が交叉する表現型が見られた (図 1 右)。同様の表現型は別種の表皮感覚神経細胞 vpda でも見られた (図 2)。

次に、遺伝子 X を ddaC 細胞でノックアウトしたところ、樹状突起の分枝パターンに表現型は見られなかったが、Dscam の結合タンパク質として同定された別の分子 Y と同時にノックアウトすると、樹状突起の高次の突起の伸長が抑制された (図 3)。分子 Y の過剰発現では表現型は認められなかった。これらの遺伝学的機能解析の結果は、(1) 分子 X と Y が協調して Dscam の下流で働いて自己交叉忌避に寄与すること、(2) X と Y は突起を伸長させる働きを持ち、Dscam が X、Y の働きを抑制することで自己交叉忌避を実現していることを示唆しており、Dscam シグナルの一端が明らかになった。

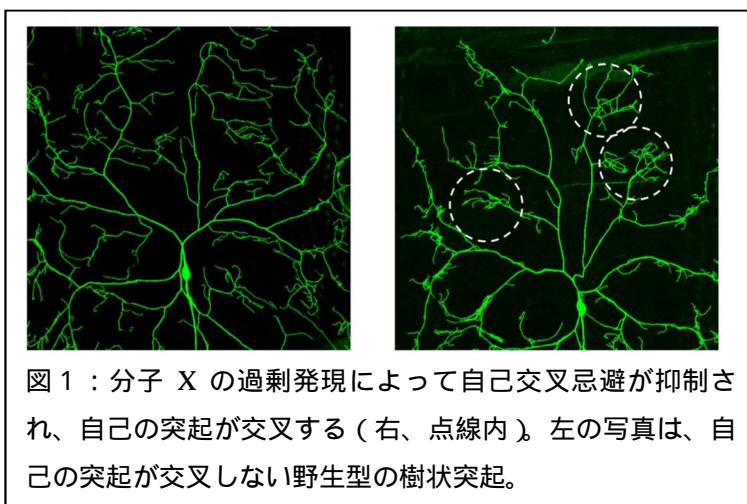


図 1 : 分子 X の過剰発現によって自己交叉忌避が抑制され、自己の突起が交叉する (右、点線内)。左の写真は、自己の突起が交叉しない野生型の樹状突起。

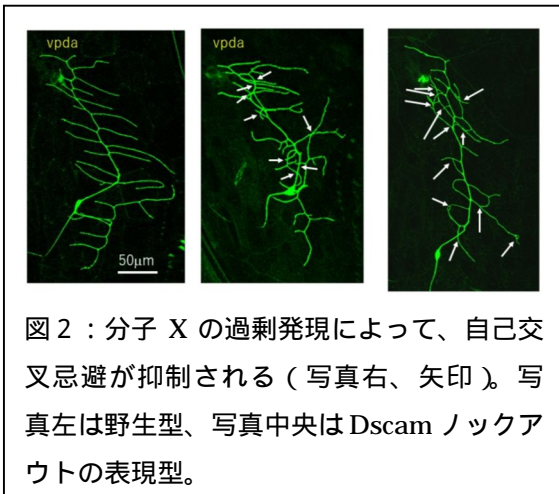


図 2 : 分子 X の過剰発現によって、自己交叉忌避が抑制される (写真右、矢印)。写真左は野生型、写真中央は Dscam ノックアウトの表現型。

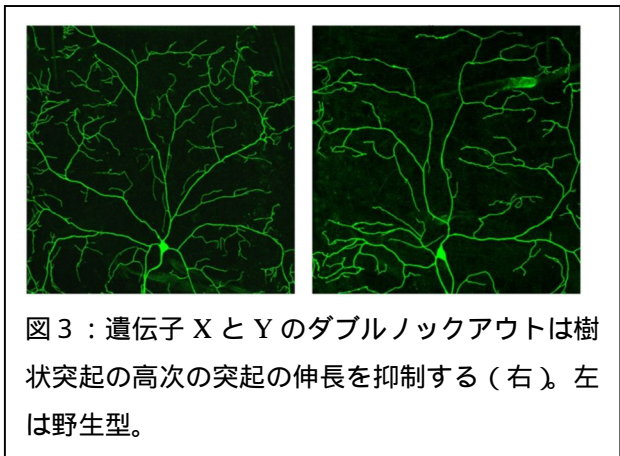


図 3 : 遺伝子 X と Y のダブルノックアウトは樹状突起の高次の突起の伸長を抑制する (右)。左は野生型。

(2) 軸索の分岐形成に必要な新規遺伝子の同定

ショウジョウバエの機械感覚受容神経細胞の軸索分岐パターン形成は自己の軸索成長円錐のフィロポディア間での Dscam シグナルによって制御されており、自己交叉忌避の Dscam シグナル伝達を解明するうえで有用な系であることを我々は見出している (He & Kise et al., Science, 2014)。この軸索分岐形成を制御する遺伝子をスクリーニングし、Wnk というリン酸化酵素を同定した。Wnk をノックアウトすると軸索の伸長が抑制され (図 4)、Dscam のノックアウトと非常によく似た表現型が観察された。ある条件下で Wnk と Dscam が同じパスウェイで働くことを見出しているが、今後発展させていくプロジェクトである。今回は Wnk 自身の機能解析を行い、Wnk が軸索の伸長だけでなく、出来上がった軸索の維持にも必要であるという (図 5)、まったく新しい知見を見出し、Neuron 誌に発表した (Izadifar, Kise et al., Neuron, 2021)。

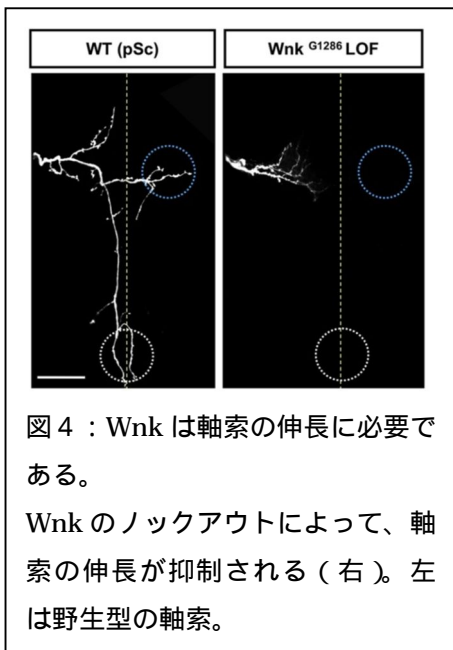


図 4 : Wnk は軸索の伸長に必要である。
Wnk のノックアウトによって、軸索の伸長が抑制される (右)。左は野生型の軸索。

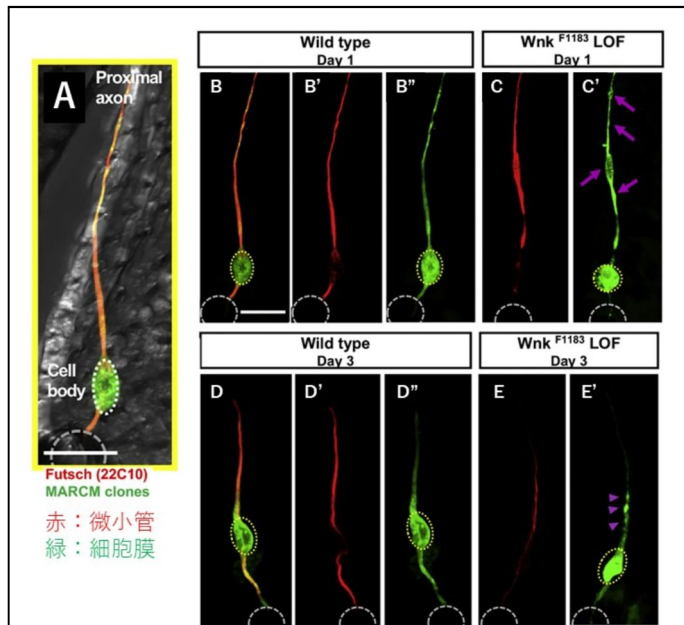


図 5 : Wnk は軸索の維持に必要である。

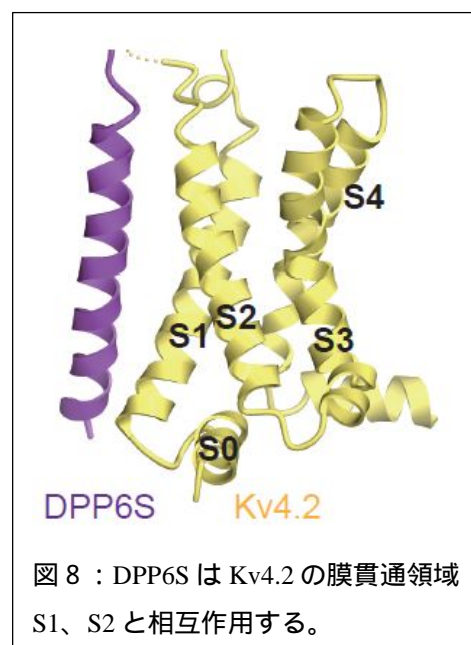
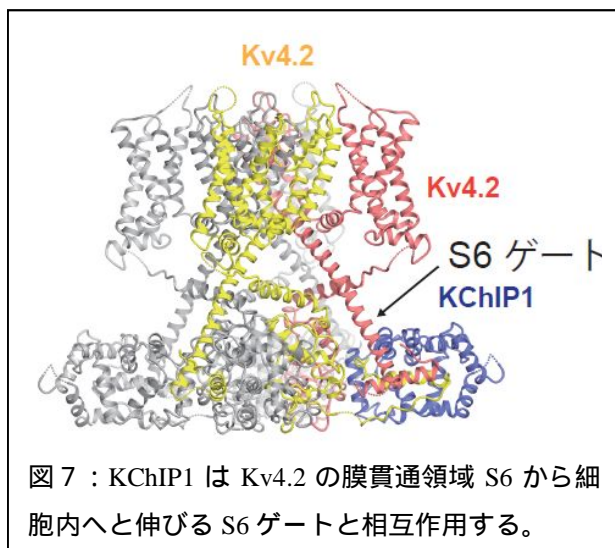
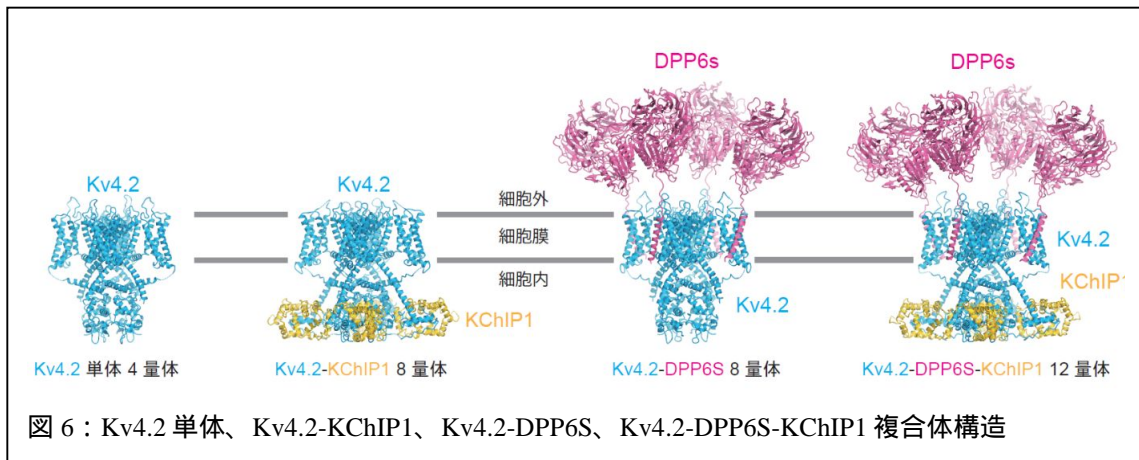
- A. 機械感覚受容神経細胞の細胞膜を GFP (緑) で、微小管を赤で染色した。
- B. ショウジョウバエ成虫が羽化して 1 日後の野生型の軸索 (B': 微小管、B'': 細胞膜)。
- C. 羽化して 1 日後の Wnk 変異体の軸索はフラグメント化され始める (紫の矢印)。
- D. 羽化して 3 日後の野生型の軸索。
- E. 羽化して 3 日後の Wnk 変異体の軸索は細胞体近くを除いて (矢尻)、消失する。

(3) クライオ電子顕微鏡による、電位依存性カリウムチャンネル複合体のゲート開閉機構の解析

神経細胞や筋細胞の電気活動に必須の役割を果たすイオンチャンネルは、多様な制御サブユニットから電位依存性やゲートの開閉のキネティクス kinetics の調整（モジュレーション）を受けて、複合体としてその生理的機能を獲得する。しかしながら、イオンチャンネルのモジュレーション機構については、イオン選択性や電位依存性の機構と比べて、未解明の問題として残されている。

我々は、神経細胞で活動電位の逆伝搬を抑制する重要な役割をもつ電位依存性カリウムチャンネル Kv4.2 と制御サブユニット KChIP1 および DPP6S との複合体構造をクライオ電子顕微鏡で決定することに成功した（図6）。さらに電気生理学的解析を組み合わせることによって、KChIP1 が Kv4.2 のゲートと相互作用すること（図7） また DPP6S が Kv4.2 の電位センサードメインと相互作用することによって（図8） Kv4.2 の活性化、不活性化のキネティクスをモジュレートすることを初めて明らかにし（図9） Nature 誌に発表した（Kise et al., Nature, 2021）。

このようなモジュレーションの機構は全く新規であり、また本研究成果はヒト脳機能の疾患、あるいは心疾患の原因となるイオンチャンネル複合体の機能を制御できる疾患の治療薬の開発につながる事が期待される。



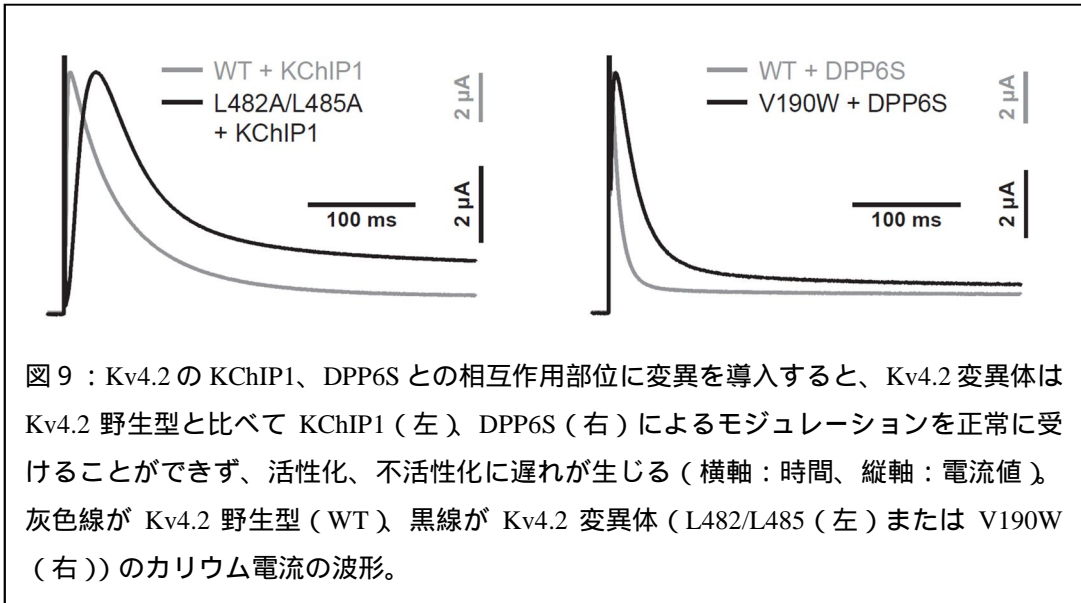


図9：Kv4.2のKChIP1、DPP6Sとの相互作用部位に変異を導入すると、Kv4.2変異体はKv4.2野生型と比べてKChIP1（左）、DPP6S（右）によるモジュレーションを正常に受けることができず、活性化、不活性化に遅れが生じる（横軸：時間、縦軸：電流値）。灰色線がKv4.2野生型（WT）、黒線がKv4.2変異体（L482/L485（左）またはV190W（右））のカリウム電流の波形。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Sachse SM, Lievens S, Ribeiro LF, Dascenco D, Masschaele D, Horre K, Misbaer A, Vanderroost N, De Smet AS, Salta E, Erfurth ML, Kise Y, Nebel S, Van Delm W, Plaisance S, Tavernier J, De Strooper B, De Wit J, Schmucker D.	4. 巻 38
2. 論文標題 Nuclear import of the DSCAM-cytoplasmic domain drives signaling capable of inhibiting synapse formation.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 EMBO J	6. 最初と最後の頁 e99669
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.15252/embj.201899669	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Izadifar A, Courchet J, Virga DM, Verreet T, Hamilton S, Ayaz D, Misbaer A, Vandenbogaerde S, Monteiro L, Petrovic M, Sachse S, Yan B, Erfurth ML, Dascenco D, Kise Y, Yan J, Edwards-Faret G, Lewis T, Polleux F, Schmucker D.	4. 巻 109
2. 論文標題 Axon morphogenesis and maintenance require an evolutionary conserved safeguard function of Wnk kinases antagonizing Sarm and Axed	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Neuron	6. 最初と最後の頁 2864-2883
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.neuron.2021.07.006	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Kise Y, Kasuya G, Okamoto HH, Yamanouchi D, Kobayashi K, Kusakizako T, Nishizawa T, Nakajo K, Nureki O.	4. 巻 599
2. 論文標題 Structural basis of gating modulation of Kv4 channel complexes	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nature	6. 最初と最後の頁 158-164
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41586-021-03935-z	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Izadifar A., Courchet J., Verreet T., Ayaz D., Petrovic M., Sachse S. Misbaer A., Vandenbogaerde S., Yan B., Erfurth ML, Dascenco D., Kise Y., Yan J., Lewis T., Polleux F., Schmucker D.
2. 発表標題 Wnk regulates Nmnat and Axundead during axon morphogenesis and maintenance
3. 学会等名 3rd Axon Meeting "Circuits Development & Axon Regeneration" at Spain (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kise Y, Izadifar A, Schmucker D, Emoto K
2. 発表標題 Molecular signaling pathways regulating axon branching via Dscam1
3. 学会等名 The 41st Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society in 2018 at Kobe
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関