

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 9 月 24 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2014

課題番号：24500410

研究課題名(和文) 樹状突起の平面交差予防機構の分子レベルでの解明

研究課題名(英文) Molecular analyses of crossing-proof mechanism of dendrites

研究代表者

碓井 理夫 (Usui, Tadao)

京都大学・生命科学研究科・助教

研究者番号：10324708

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：我々の研究グループは、ショウジョウバエをモデル系にして樹状突起の正常な伸長に必須なシグナル伝達系を明らかにしてきた。7回膜貫通型カドヘリン分子Flamingoと、その細胞内結合分子Espinassが協調的に機能して樹状突起同士の交差を防いでいる。Espinass結合因子として同定した分子群の一つ、細胞内足場タンパク質NeurochondrinについてRNA干渉法およびCas9/CRISPR法の作出による突然変異体の解析から、Espinass変異体と同様の交差異常を認めた。

研究成果の概要(英文)：Our research group has clarified the essential signaling mechanism of the normal extension of dendrites in the Drosophila model system. We have showed that both seven-transmembrane cadherin molecules Flamingo and intracellular binding molecule Espinass prevented cooperatively the dendrites from crossing with each other. By using RNA interference method and Cas9/CRISPR method, we found that intracellular scaffold protein Neurochondrin, one of the identified group of molecules as Espinass binding factor, displayed a similar crossing defects as that of Espinass mutant.

研究分野：神経科学

キーワード：樹状突起 突起間交差忌避 細胞間認識タンパク質

1. 研究開始当初の背景

われわれは、樹状突起の伸展を制御する分子の候補として細胞膜タンパク質である7回膜貫通型カドヘリン Flamingo (Fmi) に注目して解析を進めてきた。ショウジョウバエの幼虫の体表直下に2次元的に樹状突起を展開するクラス IV 感覚ニューロンをその研究モデル系とした。このニューロンは、個体の全長の数倍にもおよぶ樹状突起を進展させるが、これらの突起は、ほとんど交差することなく展開し、体表の裏側をほとんど隈なく被覆する。まず、Fmi 変異体のクラス IV 感覚ニューロンの樹状突起を細胞特異的に GFP を発現させることにより蛍光顕微鏡下で可視化した。多個体の樹状突起を観察して、樹状突起長と樹状突起同士の自己交差(同一の細胞由来の樹状突起同士の交差)の回数をカウントした後、単位突起長あたりの交差頻度を算出した。その結果、野生型対照区と比較して、統計的に有意に交差頻度が上昇していた。この結果は、Fmi タンパク質が、樹状突起同士の相互反発(自己反発)を調節しており、樹状突起同士の過剰な交差を抑制して受容野の被覆率を維持する役割をもつことを明らかにしてきた。Fmi による樹状突起相互忌避の分子メカニズムに迫るために、Fmi の細胞質領域に結合する信号伝達因子の同定を進めた。酵母ツーハイブリッド法により、ショウジョウバエの cDNA 発現ライブラリーをゲノムワイドにスクリーニングした。その結果、複数の Fmi 結合タンパク質を同定した。その一つとして、細胞内足場タンパク質 Espinas(Esn)を同定した。Esn は、種を超えて保存された PET ドメインタンパク質をコードしている。PET ドメインタンパク質は、平面内細胞極性の形成と維持に必要なタンパク質であり、ショウジョウバエのパラログである Prickle は、発生中の上皮細胞内で共局在することが知られていた。しかし、Esn 自身の機能解析は報告されていなかった。そこで、Esn の遺伝子ノックアウトショウジョウバエを作製し、Fmi の場合と同様にクラス IV 感覚ニューロンの樹状突起パターンを観察した。すると、Fmi 変異体で見られたのと同様の突起交差異常がみられた。すなわち、Esn 変異体では、伸長中の樹状突起が自己交差を頻繁に起こしていることを見出した。この観察結果は、Esn タンパク質が樹状突起の細胞質において Fmi と物理的な結合を介して協働的に作用することで、樹状突起同士の交差を防いでいることが明らかになった。(Matsubara et al., *Genes and Development* 25:1982-1996, 2011)

さて、fmi 変異体や esn 変異体では、本来見られない樹状突起の交差が頻発するが、このような異常な細胞形態を示すニューロンは正常な生理機能を持ちうるだろうか? 予備的な観察ではあるが、esn 変異体では一部の生得的な歩行パターンに異常が見られ

ることがわかった。これは、交差という比較的微細な細胞形態異常が、神経回路の生理機能の変調を介して個体の行動に影響を与えた結果だと想定できる。ただし、esn は中枢神経系でも一部のニューロン群で発現している。したがって、これら中枢のニューロンでも、樹状突起や軸索の形態異常やシナプス接続異常が生じている可能性があることは注意を要する。

当初、Fmi-Esn シグナル伝達複体の下流にあると想定されるシグナル伝達機構を明らかにするために、Esn 結合分子の探索を行っていた。具体的には、エピトープタグを付加した組み換え Esn タンパク質をショウジョウバエ成虫脳に強制発現させ、その破砕液を出発材料として免疫沈降法によって Esn タンパク質複体を回収した。この試料に含まれるタンパク質について質量分析をすすめた結果、多数の構成因子群を同定できていた。こうして同定した Esn 結合候補タンパク質群のうち、我々は Calbindin 53E (Cbp53E) タンパク質に注目していた。Cbp53E はカルシウム結合能をもつ5つの EF-hand モチーフをもつ細胞内遊離タンパク質である。当初の予備的な結果であったが、RNA 干渉法によって Cbp53E の発現量を低下させたショウジョウバエ幼虫では、fmi 変異体や esn 変異体と同様の樹状突起交差異常(樹状突起の異常な自己交差の頻発)が見られた。このことから、Cbp53E が Fmi-Esn シグナル伝達系の下流因子であることが強く示唆されていた。本研究においては、Cbp53E と Fmi および Esn との物理的・生理的な相互作用の有無と具体的な相互作用の機序を検証・解明していくとともに、Cbp53E によってカルシウム信号伝達系が適切にコントロールされ、その結果として樹状突起の伸長パターン(突起間の自己忌避メカニズム)が制御されている可能性を実証的に検証したいと考えて研究をスタートした。

さて、近年になって、ヒトの Esn オルソログの一つである *PRICKLE1* が、古くから知られていた一群の運動失調をともなう進行性ミオクローヌスてんかん症の責任遺伝子の一つであることが当時報告されていた(Bassuk et al., *Am J Hum Genet* 83:572-81, 2008)。また、関連する事象として、ダウン症精神遅滞の責任染色体領域にマップされる *Down syndrome cell adhesion molecule (DSCAM)* は、免疫グロブリンスーパーファミリーに属する膜貫通型タンパク質をコードしており、マウス網膜の樹状突起の交差抑制に必要であることが示されているが、*DSCAM* 変異マウスが新生期に呼吸困難症状を示すことが明らかになった(Fuert et al., *Nature* 451:470-474, 2008; Amano et al., *J Neurosci* 29:2984-2996, 2009)。これらの事実を総合的に勘案すると、ヒトを含む広範な生物種において、「樹状突起の正常な交差抑制機構の破綻」がその原因・発端となって、

神経回路の誤作動を誘発させ、その結果、てんかん発作や呼吸中枢の機能異常などを発症するという発症メカニズムが存在する可能性を示唆していると考えられた。

## 2. 研究の目的

ヒトのてんかん症状は、大脳皮質ニューロンが過剰に発火することで生じる反復性の発作現象である。膨大な先行研究から、てんかん発症の直接の要因・原因として、おおまかに次の2つの可能性が指摘されてきた。(1) 脳の発達過程や成人期において軸索や樹状突起が異常に伸長した結果、異所的な神経回路や異常なシナプス接続が形成されてしまい、その結果として自己増幅的な発火が頻回に持続する、あるいは(2) ニューロンの細胞内カルシウム濃度が恒常的に上昇することで、細胞が脱分極しやすい状態になる、あるいは、細胞内カルシウム信号伝達経路が入力刺激に過敏に反応してしまうなどし、その結果として高頻度発火が誘発されることが原因ではないかと推定されている。しかしながら現在までのところ、発症の分子メカニズムは十分に解明されているとは言えない。

## 3. 研究の方法

*esn* を発現する中枢ニューロンについて、その樹状突起や軸索の伸長パターンをモザイク解析法によって観察し異常の有無を調べる。変異モザイク個体が正常な歩行運動パターンを示すかどうか定量的にアッセイする。予備的な結果ながら、*esn* 機能減弱個体が異常な歩行運動パターン示したので、完全に機能欠失した系統を作出して行動アッセイを行う。さらに、相補的な実験として、ノックアウト個体のクラス IV 感覚ニューロンでのみ *Esn* cDNA の発現を誘導した細胞特異的レスキュー個体の行動パターンを調べることにより、中枢ニューロン群で発現する *Esn* の寄与を評価できると考えた。

*Esn* 結合因子として同定したカルシウム結合タンパク質 *Cbp53E* についても、その機能喪失型変異系統を作出し、樹状突起パターンおよび行動パターンの表現型解析を行う。また、神経突起形態や行動パターンに注目すると同時に、細胞内カルシウムの動態を詳しく解析する。とくに、樹状突起の伸長時・縮退時の細胞内カルシウム濃度に注目する。

平成24年度：

### *espinas (esn)* 変異体の中枢神経ニューロンの形態観察

*esn* を発現している中枢神経ニューロンについて、樹状突起や軸索の伸長パターンを観察し、異常の有無を調べる。具体的には、変異モザイク解析法による。この手法では、GFP融合タンパク質によって変異体細胞を陽性標識すると同時に、単一細胞由来の樹状突起や軸索を個々の突起レベルで高精細に可視

化できる。

### *esn* 変異体の行動アッセイ

突起のパターンに異常が確認できた場合には、そのモザイク個体が正常な生得行動パターンを示すかどうか定量的にアッセイする。具体的には、後期終齢幼虫の「歩行運動」と「高温反射逃避行動」を定量的に観測する。「歩行運動」は、前期終齢幼虫から後期終齢幼虫に発達する過程において、“直進性運動”に加えて“間歇的首振り運動”モードへとシフトすることが知られている。このシフトには、幼弱期における *da* ニューロンの神経活動が必須であることが知られている。予備的な結果ながら、我々は *esn* 変異体ではこのシフトが不完全で、後期終齢幼虫でも幼弱型の“直進性運動”モードを示した。高速 CCD カメラによって運動中の個体の動画を取得して、このアッセイを時空間的に高い分解能で行う計画である。*da* ニューロン依存的な「高温反射逃避行動」にも注目する。*esn* 変異体が正常な逃避行動を起こすかどうか定量的に解析する。

### *esn* 変異体の神経回路の活動解析

われわれは、分割 GFP 再構成法により *da* ニューロンのシナプス標的ニューロンを既に一部同定している(未発表)。そこで、*esn* 変異体において標的ニューロンの活動をカルシウムプローブ *GCaMP5G* で捉えることを目指す。これらの観察とアッセイから、神経回路の機能異常とを明らかにする。

### *Cbp53E* 変異体の作製

*Cbp53E* 遺伝子座に、相同組み換え法による遺伝子破壊法、もしくは位置選択的染色体組み換え法によってヌル変異を導入する。

## 平成25年度以降

### *Cbp53E* 変異体の表現型解析

RNA 干渉法による予備的な機能阻害実験では、*da* ニューロンの樹状突起間の異常交差が検出されていた。*Cbp53E* 遺伝子が完全に機能欠損した場合にも同様もしくは重篤な異常交差が観察される可能性がある。

### *Cbp53E* 変異体での細胞内カルシウム濃度測定

*Cbp53E* はカルシウム結合能を有することが予想されるので、ニューロンの細胞内カルシウム濃度を調節する役割を持つ可能性がある。具体的には、カルシウム濃度依存的な高感度 FRET プローブである「*TNXXL*」をニューロンに導入して CFP/YFP 蛍光強度比を計測する。(この FRET プローブは、ショウジョウバエ *da* ニューロンで機能することを既に確認済みである。) さらに、*fmi* 変異体および *esn* 変異体でも同様に細胞内カルシウム濃度測定をおこなう。

### **Cbp53E 変異体の行動解析**

*esn* 変異体の場合と同様に、後期終齢幼虫の「歩行運動」と「高温反射逃避行動」を定量的に観測する。

### ***esn* 変異体および Cbp53E 変異体のシナプス形態の観察**

da ニューロンと中枢の標的細胞との間のシナプスが正常に形成されているかどうか解析する。分割 GFP 再構成法を用いて当該のシナプスのみを選択的に標識した上で、抗 GFP 抗体による免疫電顕によって観察する。

#### 4. 研究成果

Espinas 結合因子として同定した分子群の一つ、細胞内カルシウムイオン結合タンパク質 Cbp53b について、染色体小領域欠損系統作出コレクションをもとに、新規に遺伝子欠損系統の作出を行った。Cbp53E のみを欠損した染色体を 2 つ作製し、それらをヘテロ接合体にすることで突然変異体を作成した。まず、この突然変異体の樹状突起を可視化できるトランスジェニック系統を作製した後、樹状突起形態の観察を行った。この表現型解析から、Fmi や *Esn* 変異体と同様の交差異常(突起間自己交差の頻発)を認めた。

つぎに、カルシウム動態の変化を解析した。カルシウム指示体を発現する系統の終齢幼虫を血リンパ様緩衝液中で解剖して標本とした。この解剖標本のクラス IV 感覚ニューロンに対して赤外線レーザーによる樹状突起の局所加熱を施した。この時の細胞内カルシウム動態を検討した結果、クラス IV ニューロンが熱刺激を受感した際の細胞内カルシウムの減衰時定数が、野生型対照区と比較して、顕著に減少することが観察された。この観察結果は、Cbp53E が、正常発生時の突起動態制御や、正常に外界からの熱刺激を受容する際においても、樹状突起の局所的での(あるいは大域的な)カルシウム動態を調節することで、突起間忌避に寄与していることが強く示唆された。ただし、当然ではあるが、この動態は単なる時間的変動だけでなく、カルシウム濃度の空間的な変動、すなわち移動速度や移動速度の変化率なども含んでいる。したがって、実際にどのように時空間パターンを制御しているかについては、さらに時空間分解能の高い解析が必要になるとかんがえられる。

*Esn* 結合因子として同定した分子群の別の候補分子の一つである、細胞内足場タンパク質 Neurochondrin (Ncd) について RNA 干渉法および Cas9/CRISPR 法の作出による突然変異体の解析を行った。まず、RNAi 干渉法により樹状突起の交差異常を確認した後、CRISPR 法により Ncd 機能喪失変異体を作製した。この変異体も RNAi 干渉法の場合と同様に、樹状突起の交差異常を示すことを確認した。*Esn* 変異体と同様の交差異常を認めたことから、Ncd は樹状突起の内部で Fmi-Esn と複合

体を形成しており、樹状突起の自己接触を検知して樹状突起の縮退や伸長方向の転換を調節していることが強く示唆される。

これらの研究結果は、Fmi-Esn-Cbp53E あるいは Fmi-Esn-Ncd というシグナル伝達機構が存在して、樹状突起の形態を制御していることを明らかにしてきた。しかし、当初検討していたように、「てんかん発症の分子機構」との関係性を詳しく知るためには、樹状突起形態の異常により、たとえばクラス IV 感覚ニューロンの熱刺激への発火応答の変化などを検討するなど、神経生理学的なアプローチを進めていく必要がある。現在、我々は、熱刺激に応答してクラス IV 感覚ニューロンが特徴的な発火パターンを示すことを確認している。また、この特徴的な発火パターンが、個体の熱忌避行動を促進する情報得をコードしていることを確認している(投稿中)。したがって、樹状突起形態に異常を示しているクラス IV 感覚ニューロンの熱刺激下での発火パターンを計測し定量的に解析すれば、クラス IV 感覚ニューロンを起点とするてんかん発作の発生メカニズムを生理学的な観点からより深い理解が得られるものと考えられる。

#### 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 2 件)

論文名: An evolutionarily conserved protein CHORD regulates scaling of dendritic arbors with body size.

著者名: Shimono K, Fujishima K, Nomura T, Ohashi M, Usui T, Kengaku M, Toyoda A, \*Uemura T.

掲載誌名: *Scientific Reports* 4 巻、1-8 (2014) 査読有り

論文名: Postmitotic transcriptional programs of dendrite morphogenesis controlled by subtype selectors of *Drosophila* sensory neurons: genome-wide analysis of Abrupt and Knot/Collier in vivo.

著者名: Hattori Y, Usui T, Satoh D, Moriyama S, Shimono K, Itoh T, Shirahige K, \*Uemura T.

掲載誌名: *Developmental Cell* 27 巻、530-544 (2013) 査読有り

[学会発表](計 4 件)

Behavioral Neurogenetics of larval *Drosophila*: Molecules, Circuits, Computation & Robotics (熱海)

第 37 回神経科学大会 (横浜)

第 11 回日本ショウジョウバエ研究会 (金沢)

3<sup>rd</sup> Asia-Pacific *Drosophila* Research Conference (ソウル)

〔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〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

碓井 理夫 (USUI, Tadao)  
京都大学・大学院生命科学研究科・助教  
研究者番号： 10324708

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：