

機関番号：34304

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2008～2010

課題番号：20300115

研究課題名（和文） シナプスを形成する神経細胞間の発生過程における相互作用

研究課題名（英文） Molecular Mechanisms for neuronal interactions during synapse formation

研究代表者

浜 千尋 (HAMA CHIHIRO)

京都産業大学・総合生命科学部・教授

研究者番号：50238052

研究成果の概要（和文）：

ショウジョウバエの嗅覚神経細胞の軸索投射ないしシナプス標的パターンに異常を示す複数の変異株に対して解析を行った。その中で、Wnt5シグナルカスケード上のWnt5、Drl、Drl-2の3種類の分子が異なる発現パターンを示しながら嗅覚中枢における回路形成を制御していることが明らかとなり、神経回路形成におけるWnt5シグナルの新しい機構を示すことになった。また、他の変異の原因遺伝子としてヒストンのメチル化制御に関与するタンパク質をコードする遺伝子が同定された。

研究成果の概要（英文）：

We have studied several mutants showing that the olfactory receptor neurons exhibit abnormal axonal projection or synaptic targeting in the first olfactory processing center in the brain. Among these, we have concentrated our attention on the mutants of Wnt5, Drl and Drl-2. All these molecules constitute Wnt5 signaling, each expressed in a distinct pattern, and regulate the distribution of glomeruli in the olfactory center. Notably, both Drl and Drl-2 can play opposing roles in Wnt5 signaling, depending on the cells where they are expressed. These findings suggest a new mechanism for Wnt5 signaling in the development of neural circuits.

交付決定額

（金額単位：円）

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|------------|-----------|------------|
| 2008年度 | 6,400,000 | 1,920,000 | 8,320,000 |
| 2009年度 | 4,400,000 | 1,320,000 | 5,720,000 |
| 2010年度 | 4,400,000 | 1,320,000 | 5,720,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 15,200,000 | 4,560,000 | 19,760,000 |

研究分野：分子神経科学

科研費の分科・細目：神経科学・神経科学一般

キーワード：軸索 嗅覚 ショウジョウバエ 突然変異 Wnt5 Drl ヒストン

1. 研究開始当初の背景

ショウジョウバエはまわりの多様な匂いを嗅覚神経細胞上の嗅受容体を通して知覚している。嗅覚神経細胞は多数存在しており(ショウジョウバエで 1300 個)、それぞれがゲノム上にコードされている多数の嗅受容体(約 60 種)のうちの通常一種類のみを発現している。また、嗅覚神経細胞はその軸索を脳内の嗅覚一次中枢に投射するが、同種の嗅受容体を発現している多数の嗅受容体は嗅覚一次中枢内に多数存在する糸球体のうちのひとつに軸索を収束させる。この嗅受容体の種類と糸球体が 1対1に対応していることが匂いを識別する基礎となっている。糸球体は嗅覚神経細胞の軸索と二次神経細胞の樹状突起がシナプス結合をして作られており、ショウジョウバエでは 50 種類の嗅覚神経細胞と 50 種類の二次神経細胞が特異的に結合して 50 個の糸球体を形成している。これらの糸球体は、その位置と形状から基本的には全て同定することが可能であり、個体間で不変の定型的なパターンで配置していることが知られている。決まった位置に特定の糸球体ができるメカニズムとして、まず二次神経細胞の樹状突起が一定の位置に伸長することが観察されているが、その時に **Semaphorin** のグラディエントが存在して樹状突起の位置決め働くことが報告されている。その後嗅覚神経細胞の軸索が特定の樹状突起を目指して伸長し、特異的なシナプス結合を行いながら糸球体を形成すると考えられている。このように嗅覚神経系において、一次神経細胞(嗅覚神経細胞)と二次神経細胞の間でシナプスをはさんで作られる神経回路の形成機構については一定の理解が得られているが、この分野の歴史は浅く未だ不明な点が多い。

2. 研究の目的

(1) 嗅覚神経細胞間の発生過程における相互作用

嗅覚中枢に多数存在する糸球体の分布パターンを制御する機構は、従来二次神経側にのみついて解析されてきた。ここでわれわれは、糸球体の配置が二次神経細胞だけで決まるのではなく、嗅覚神経細胞と二次神経細胞の間の相互作用にも依存しているのではないかと考えた。そこで、まず糸球体が常に定型的なパターンで配置するための機構を上記 2 種の神経細胞間のシグナル伝達によって説明することを第一の目的とした。次に、脳回路の形成を統御する遺伝的プログラムを明らかにするために、シナプスを挟む 2 種の細胞対の遺伝的な性質を解明することを、第二の目的とした。

(2) 嗅覚神経細胞の嗅覚一次中枢への投射制御機構

嗅覚神経細胞が嗅覚一次中枢へ投射する際の制御機構は未だ一部が明らかにされているのみである。そこで、突然変異株の解析を基礎にあらたな制御機構を発見することを目的とする。

3. 研究の方法

嗅覚神経細胞の投射パターンに異常を示す変異株の分離を行うために、2 種類のスクリーニング法を用いた。第一に、既存の変異の中でホモ接合体が生存するものに注目し、その変異体の成虫の嗅覚中枢を観察して糸球体の分布パターンに異常を示す変異株を収集する。そのような変異株が得られた時には、特定の嗅覚神経細胞あるいは特定の二次神経細胞を特異的に遺伝的に標識し、それぞれの神経繊維の投射パターンに異常があるかどうか調べる。第二に、ホモ接合体が致死の場合は成虫の嗅覚中枢を観察することはできないため、嗅覚系を含む領域に変異クローンを誘導し、その上で嗅覚神経細胞の中枢への投射パターンにおける異常の有無を調べる。この時には、特定の嗅覚神経細胞を GFP で遺伝的に標識できるようにしておき、その

うちの変異細胞だけがGFPを発現するように、MARCM法を用いたクローン誘導システムを構築する。得られた変異株に対しては、15種類程度の異なる嗅覚神経細胞をそれぞれ特異的に標識できるため、これらの標識を用いて嗅覚神経細胞の軸索投射パターンを解析していく。さらに二次神経細胞の投射パターンも明らかにしていく。また、変異の原因遺伝子を同定するため、既存の欠失変異や挿入変異を用いて変異マッピングを行う。原因遺伝子が同定された場合には、その産物を大腸菌で発現させて抗原とし、特異抗体を作成して免疫組織学的な解析に用いる。さらに、遺伝学的、分子遺伝学的手法をあわせて用いることにより、注目する遺伝子産物の機能と回路構築における制御機構を解明する。

4. 研究成果

(1) Wnt5 シグナルによる糸球体の配置の制御

嗅覚神経細胞の軸索投射に異常を示す変異を見出すひとつの方法として、ホモ接合体が致死とならない変異株にまず着目して、ホモ接合体の嗅覚一次中枢内の糸球体の配置パターンに異常を示す株をスクリーニングした。その結果Wnt5変異株の糸球体の配置に異常があることが判明した。Wnt5に対する抗体を用いて染色すると、Wnt5は嗅覚神経細胞の軸索に沿って主に発現していることがわかった。また、Wnt5変異株の糸球体の位置を調べるために、特定の嗅覚神経細胞においてのみ発現するGal4系統を用いてGFPを発現させ、嗅覚神経細胞の投射先である糸球体の多くを標識した。その結果、変異株における糸球体の異常な分布は、中枢全体が中心点のまわりに回転した結果生まれたパターンのように見えた。ここで、さらに引き続き、Wnt5の受容体として同定されていたDrlの遺伝子変異株を調べてみると、糸球体の配置は確かに異常を示していた。しかし、そのパターン

はWnt5変異株における配置パターンとは異なっていた。注目すべきは、遺伝的な解析の結果、Drlは嗅覚系においてWnt5シグナルを抑制する作用があることが判明したことである。またこのことは、Drl以外にもWnt5受容体が存在することを示唆していた。そこでDrlと構造的に類似したDrl-2の変異株を調べた結果、糸球体の一部の配置に異常が観察された。Drl-2抗体により嗅覚系および脳の染色をしたところ、Drl-2は主に嗅覚神経細胞の軸索に存在することがわかった。さらに、*drl* *drl-2*二重変異株の糸球体の配置はWnt5変異における配置により類似していた。このことは、DrlがWnt5シグナルに対して抑制的な作用を持つだけでなく、Drl-2とともにシグナルを伝達する機能があることを示唆している。さらにDrlと構造的に類似したDrl-2も発現する細胞によってはWnt5シグナルを抑制しうることが明らかとなった。このように、類似した受容体分子がそれぞれ機能を使い分けることにより細胞間のWnt5シグナルを制御し嗅覚系の発生を調節していることが明らかとなった。これらの結果は、Wnt5シグナルが新しい機構で神経回路の構築を制御していることを示している。

(2) 嗅覚神経細胞の正確な軸索投射を制御する遺伝子の同定

嗅覚神経細胞の軸索投射を制御する因子はWnt5シグナルだけでなく、他にも多くの因子の存在が予想される。そこで、成虫の嗅覚系の解析を致死変異に対して行うことも可能にするために、変異クローンを嗅覚系に誘導し、かつ変異クローン中の細胞のみをGFPで視覚化するMARCM法を用いて変異スクリーニングを行った。その結果、今までに① 軸索投射時の走行経路が異常となる、② 軸索が投射した糸球体においてbouton状の形状を示す、③ 軸索が正しい糸球体に到達したのちに行き過ぎる、④ 軸索が正しい糸球体の位置に到達したのちに樹枝状化せ

ず糸球体を形成しない、という表現型が観察された。このうち、4系統については遺伝子マッピングにより原因遺伝子の同定に成功し、そのうちのひとつはNotchシグナル系における *mastermind* (*mam*) であった。Mamタンパク質は転写因子であり、その変異によりNotchシグナルが伝達されなくなることにより嗅覚神経細胞の個性決定が異常となることが判明した。第二の変異は、④の軸索投射は正常だが糸球体を形成しない表現型を示し、tRNA合成酵素をコードしている遺伝子の変異であることが明らかとなった。この結果は、軸索投射には必須ではないが、糸球体形成に必要な局所的な翻訳制御機構が存在していることを示唆している。第三の変異は、①および③の複合的な表現型を示し、その原因遺伝子はヒストンのメチル化を制御しているタンパク質をコードしていることが判明した。この結果は、軸索投射の制御因子をコードする遺伝子がヒストンのメチル化により発現制御を受けていることを示唆している。神経細胞が前駆細胞から分裂して生まれてくる時の運命決定にヒストンの修飾が重要な役割を持つことが知られていたが、今回の発見は、神経細胞が生まれたあとの投射制御にもヒストンのメチル化が関与していることを示唆している。今後はさらに、このエピジェネティックな発現調節を受ける軸索投射誘導因子をコードする遺伝子の同定をしていく必要がある。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計2件)

- ① Nakayama, M. and Hama, C.
Modulation of neurotransmitter receptors and synaptic differentiation by proteins containing complement-related domains. *Neuroscience Research* 69, 87-92 (2011).
査読あり

- ② Sakurai, M., Aoki, T., Yoshikawa, S., Santschi, L.A., Saito, H., Endo, K., Ishikawa, K., Kimura, K-i., Ito, K., Thomas, J.B. and Hama, C. Differentially expressed Drl and Drl-2 play opposing roles in Wnt5 signaling during *Drosophila* olfactory system development. *The Journal of Neuroscience* 29, 4972-4980 (2009).
査読あり

[学会発表] (計2件)

- ① 伊藤弘樹、小金沢雅之、大手学、松本健、浜千尋、山元大輔
Drosophila 性決定因子 Fruitless はクロマチン調節因子 Rpd3, HP1 との結合により中枢神経系および性行動の雄化をコントロールする。
第32回日本分子生物学会年会
2009年12月11日 横浜

- ② Hiroki Ito, Masayuki Koganezawa, Manabu Ote, Ken Matsumoto, Minoru Tateno, Chihiro Hama and Daisuke Yamamoto. Chromatin regulators HP1 and Rpd3 function as opposing effectors on neural masculinization in *Drosophila*.
第31回日本分子生物学会年会、第81回日本生化学会大会、2008年12月11日 神戸

[図書] (計1件)

- ① 浜千尋、クバプロ
ショウジョウバエ嗅覚神経回路の発生機構
ブレインサイエンスレビュー2010, 24ページ
(185-208) 2010年 ブレインサイエンス振興財団 伊藤正男、川合述史編

[その他]

ホームページ URL

<http://www.cc.kyoto-su.ac.jp/~hama/homepage-j.html/toppu.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

浜 千尋 (HAMA CHIHIRO)

京都産業大学・総合生命科学部・教授

研究者番号：50238052

(2) 研究分担者 なし