

機関番号：12102
 研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2008～2010
 課題番号：20570196
 研究課題名（和文） ショウジョウバエ脳における高次神経構造構築機構の分子遺伝学的解析
 研究課題名（英文） Molecular genetics of the development of higher-order brain structures in *Drosophila*
 研究代表者
 古久保 克男（徳永 克男）(FURUKUBO-TOKUNAGA KATSUO)
 筑波大学・大学院生命環境科学研究科・教授
 研究者番号：00272154

研究成果の概要（和文）：

脳形成は、細胞生成、軸索誘導、神経層形成等の多段階からなる過程である。ショウジョウバエの脳は、ヒト脳に比べて遥かに単純であるが、その形成は脊椎動物と共通の遺伝的プログラムに支配されている。本研究では、ショウジョウバエの代表的な脳構造であるキノコ体と触角葉をモデルに、高次構造形成機構の分子遺伝学的解析を行った。これにより、ホメオドメインタンパク質等の転写制御に加え、細胞内輸送因子による新たな形成制御機構を明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

The development of brain is a multiple processes consisting of neurogenesis, axon guidance, and the formation of neural layers. Although the *Drosophila* brain is much simpler than the human brain, its development is under the control of a conserved genetic program that is in common with the development of the vertebrate brain. In this study, we have performed molecular genetic analysis of the development of higher order brain structures, focusing on the mushroom body and the antennal lobe, prominent neural structures in *Drosophila*. Our study has disclosed novel control mechanisms of axodendritic development that include homeodomain transcription factors and intracellular transport regulators.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成 20 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
平成 21 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
平成 22 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：発生生物学・発生遺伝

キーワード：神経発生, 脳, ショウジョウバエ, 学習・記憶, 遺伝子, キノコ体, 触角葉, ホメオドメイン

1. 研究開始当初の背景

脳の各領域を構成する高次構造の形成は、細胞生成、軸索誘導、層形成等の多段階からなる過程である。しかしながら、このような高次構造の形成も、基本的にはそれぞれの領域特異的に発現される中核的な制御能を持つ遺伝子により支配されている。ショウジョウバエの脳は、脊椎動物の脳に比べて遥かに単純であるが、その初期形成は脊椎動物と共通の遺伝的プログラムに支配されており、脳高次神経構造構築機構の解析に優れたモデルを提供している。なかでもキノコ体は脳容積の6割を超える発達した神経構造であり、学習記憶をはじめ多様な高次機能の中核である。また、*dunce*, *rutabaga* 等の多数の学習記憶遺伝子の発現部位である。成虫のキノコ体は、脳半球あたり約2500個の神経細胞から構成されるが、それらのすべてがわずかに4個の特異的な幹細胞の分裂により生成される。これまでに我々は、ショウジョウバエ *Pax6* 相同遺伝子 *eyeless* がキノコ体形成に重要な機能を持つことを明らかにしてきた (Kurusu et al., PNAS 2000)。さらに成虫キノコ体発現遺伝子の網羅的解析によりキノコ体で発現する多数の遺伝子を網羅的に同定し、キノコ体に於ける *eyeless/Pax6* 遺伝子を中核とする発生制御プログラムの解析を推進してきた (Kobayashi et al., PNAS 2006)。

2. 研究の目的

ショウジョウバエのキノコ体を構成する神経細胞は、胚発生中期に脳後端部に出現する特異的神経芽細胞の分裂により生成される。胚発生後期には基幹的な神経経路の開拓により前駆構造が形成され、幼虫キノコ体の

原型が完成する。さらに、この基本構造は、変態期に再編成され、発達した成虫のキノコ体が形成される (図1)。本研究は、これまでの我々が明らかにしてきたキノコ体をはじめとするショウジョウバエ脳における発現遺伝子の体系的情報を基礎に、神経細胞分化と初期回路開拓、さらに特異的樹状突起投射を制御する遺伝子プログラムの解析を行い、脳高次構造構築を制御する遺伝子及び神経細胞レベルに於ける新しい分子機構の解明を目的としている。

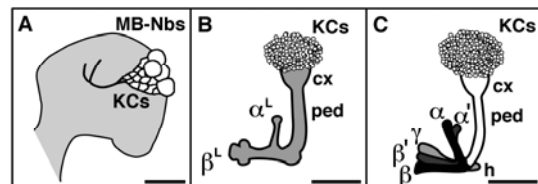


図1 キノコ体の発生段。A:胚発生後期。B:幼虫。C:成虫。キノコ体の原型は胚発生過程に構築され、変態による再編成を経て成虫構造が出来上がる。

3. 研究の方法

我々は、これまでにショウジョウバエ脳におけるマイクロアレーを用いた遺伝子解析により多数の発現遺伝子を同定してきた。また、胚発生過程に於けるキノコ体及び触角葉などの前駆細胞で発現する様々な遺伝子の同定を行ってきた。本研究課題では、これらの解析により同定された遺伝子の中でも、進化的に高い保存性を持つと期待される遺伝子を選別し、キノコ体または触角葉の神経細胞における機能解析を行った。解析に際しては、共焦点顕微鏡を使用して、ショウジョウバエ野生型に於ける脳微細構造とタンパク発現様式を明らかにした。さらに、遺伝子機能欠損変異体を作製し、当該遺伝子に機能欠損により誘起される構造変化を明らかにし

た。また、MARCM 神経モザイク法を使用して、当該遺伝子の細胞自立的機能を明らかにした。さらに、GFP 融合タンパクを使用したイメージングにより、高次構造形成過程の動的変化を解析した。

4. 研究成果

4.1 ホメオドメイン転写因子による軸索誘導と樹状突起形成の制御

触角葉投射神経はショウジョウバエの嗅覚回路において、二次ニューロンとして機能し、嗅受容神経によって触角葉へ伝達された嗅覚情報を高次嗅覚中枢であるキノコ体と側方角へと伝達している。投射神経はそれぞれの種類ごとに触角葉の異なる領域へ樹上突起を投射するとともに、キノコ体の樹上突起構造である傘部に特異的な神経投射を示し、キノコ体樹上突起構造をキノコ体神経とともに協調的に形成している。我々は、これまでに、胚期ならびに幼虫期に於ける触角葉発生過程で発現する遺伝子の探索により多数の遺伝子を同定してきた。これらのなかで、神経細胞分化に重要な機能を持つ事が期待された TALE クラスホメオボックス遺伝子 *homothorax* に着目し、解析を進めた。この遺伝子は発生過程と成虫の投射神経と局所介在神経で発現するのみならず、幼虫期に於いてこれらの細胞を生成する幹細胞（神経芽細胞）で発現する。MARCM 神経モザイク解析により、*homothorax* は側方神経芽細胞の細胞死を抑制し、側方神経細胞系譜の生成に必須の機能を持つ事が示された。さらに、*homothorax* 遺伝子の機能欠失により投射神経の触角葉に於ける特異的な樹状突起投射パターンに大きな異常が誘起される事が明らかとなった。加えて、キノコ体ならびに側方角への投射パターンを解析したところ、遺伝子機能欠失により軸索投射にも大きな異

常が誘起される事が明らかとなった。*homothorax* は胚発生過程においておなじく TALE クラスに属するホメオドメイン転写因子である *extradenticle* と協調的に機能する事が知られている。触角葉形成過程に於ける機能解析により、*extradenticle* が *homothorax* と同様に、側方神経細胞系譜の生成に必須の機能を持つこと、投射神経の軸索誘導と特異的な樹状突起投射に必須である事が明らかとなった。さらに、触角葉において、*extradenticle* と *homothorax* の発現は相互に依存的である事を明らかにした。*extradenticle* 遺伝子と *homothorax* 遺伝子は、脊椎動物の *Pbx* 遺伝子と *Meis/Prep* 遺伝子にそれぞれ相当する。これらの遺伝子は脊椎動物の脳形成過程でも発現しており、進化的に保存された脳高次構造の形成プログラムが存在する事を示唆している。

4.2 高次構造形成過程に於ける細胞内分子輸送の重要性

ホメオドメインタンパクを代表とする転写因子が神経細胞の特異的な生成と分化を制御する一方、生成された神経細胞の軸索と樹状突起の伸長過程には様々な細胞内因子が関与する事が予想される。とりわけ、3次元的に発達した神経細胞に於いては、細胞内に於ける分子輸送が突起誘導等の過程を支配するタンパク質因子の配送に重要な機能を持つ事が期待される。*unc-51* 遺伝子は、セリン・スレオニンキナーゼをコードする進化的に保存された遺伝子であり、線虫からマウスにおいて神経形成機構に重要な役割を有することが示唆されている。我々は、ショウジョウバエ幼虫の運動神経に於ける軸索輸送過程の解析により、UNC-51 がアダプタータンパク質 UNC-76 のリン酸化により、神経細胞におけるキネシンを介した軸索輸送を

制御している事を明らかにした。*unc-51* 変異体では、アダプタータンパク質の機能欠損により、積荷小胞とキネシンモーターが乖離し、小胞が軸索内に蓄積する (図 2)。さらに、三齢幼虫の脳に対する抗体染色により、伸長過程のキノコ体神経で UNC-51 タンパク質の強い発現が確認された。加えて、*unc-51* 機能欠失変異体による解析により、UNC-51 がキノコ体神経軸索の束形成や樹状突起伸長を制御する事を発見した。また、触角葉投射神経においても同様な神経形成異常を観察する事ができた。*unc-51* 変異体では、Fas II, Rab5, LAMP など 様々な分子の細胞内局在に異常がある事が明らかになった。一方、樹状突起特異的タンパク質の局在と微小管の方向性には異常が認められなかった。さらに、*unc-51* 遺伝子とさまざまな軸索輸送関連遺伝子との 2 重変異体の遺伝学的解析により、キノコ体形成において *unc-51* がキネシン軽鎖遺伝子と相互作用をする事が明らかとなった。以上の結果は、UNC-51 が軸索輸送の制御に重要な機能を待つ事を明らかにするのみならず、キノコ体神経細胞をはじめとする様々な神経細胞においても、細胞内分子の輸送と神経突起形成に重要な機能を有していることを明らかにするものである。UNC-51 はヒトやマウスにも保存されており、ショウジョウバエにおけるシグナルカスケードの更なる分子遺伝学的解析によって、脳高次構造の形成機構の理解に重要な手がかりを与えるものと期待される。

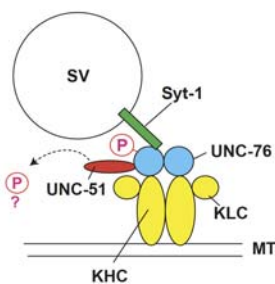


図 2 UNC-51 による軸索輸送制御。

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 10 件)

1. Mochizuki, H., Toda, H., Ando, M., Tomoda, H., and Furukubo-Tokunaga, K. (2011). *Unc-51/ATG1 Controls Axonal and Dendritic Development via Kinesin-Mediated Vesicle Transport in the Drosophila Brain. PloS ONE*, 6, e19632. (査読有)
2. Honjo, K., and Furukubo-Tokunaga, K. (2009). Distinctive neuronal networks and biochemical pathways for appetitive and aversive memory in *Drosophila* larvae. *J. Neurosci.*, 29, 852-862. (査読有)
3. Wairkar, Y., Toda, H., Mochizuki, H., Furukubo-Tokunaga, K., Tomoda, T., and *DiAntonio, A. (2009). *Unc-51 controls active zone density and protein composition by downregulating ERK signaling. J. Neurosci.*, 29, 517-528. (査読有)
4. Kurusu, M., Maruyama, Y., Adachi, Y., Okabe, M., Suzuki, E., and Furukubo-Tokunaga, K. (2009). A conserved nuclear receptor, Tailless, is required for efficient proliferation and prolonged maintenance of mushroom body progenitors in the *Drosophila* brain. *Dev. Biol.*, 326, 224-236. (査読有)
5. Furukubo-Tokunaga, K. (2009). Modeling schizophrenia in flies. *Prog. Brain Res.*, 179, 107-115, Elsevier. (査読有)
6. Furukubo-Tokunaga, K. Adachi, Y., Kurusu, M., and Walldorf, U. (2009). Brain patterning defects caused by mutations of the *twin of eyeless* gene in *Drosophila melanogaster*. *Fly*, 3, 263-269. (査読有)
7. Sawamura, N., Ando, T., Maruyama, Y., Fujimuro, M., Mochizuki, H., Honjo, K., Shimoda, M., Toda, H., Sawamura-Yamamoto, T., Makuch, L. A., Hayashi, A., Ishizuka, K., Cascella, N. G., Kamiya, A., Ishida, N., Tomoda, T., Hai, T., Furukubo-Tokunaga, K. and *Sawa, A. (2008). Nuclear DISC1 regulates CRE-mediated gene transcription and sleep homeostasis in the fruit fly. *Mol. Psychiatry*, 13, 1138-1148, Nature Publishing. (査読有)
8. Sawamura, N., Ishida, N., Tomoda, T., Hai, T., Furukubo-Tokunaga, K. and *Sawa, A. (2008). The fruitfly *Drosophila melanogaster*: a promising model to explore molecular psychiatry. *Mol. Psychiatry*, 13, 1138-1148, Nature Publishing. (査読有)
9. Toda, H., Mochizuki, H., Flores III, R., Josowitz, R., Krasieva, T. B., LaMorte, V. J., Suzuki, E., Gindhart, J. G., Furukubo-Tokunaga, K. and *Tomoda, T.

(2008). UNC-51/ATG1 Kinase Regulates Axonal Transport By Mediating Motor-Cargo Assembly. *Genes Dev.*, 22, 3292-3307. (査読有)

10. 本庄 賢, 古久保 克男 - 徳永 克男 (2008) 「ショウジョウバエ嗅覚連合学習における神経回路基盤」実験医学 26(12):93-101. (査読無し)

[学会発表] (計 10 件)

1. Ando, M., Takayama, K., Ando, T., Honjo, K., Mochizuki, H., Kamiya, A., Sawa, A., and Furukubo-Tokunaga, K. (2010.11.16). Expression of DISC1 impairs associative learning and axonal development in *Drosophila*. Society for Neuroscience 40th Annual Meeting, San Diego, U. S. A.
2. Furukubo-Tokunaga, K. (2010.9.4). "Direct expression of DISC1 alters sleep homeostasis and impairs associative learning and axonal branching in *Drosophila*". John McIntyre Conference "DISC1 2010". University of Edinburgh, U. K.
3. Furukubo-Tokunaga, K. (2010.7.26). UNC-51/ATG1 controls dendritic and axonal development via kinesin-mediated transport in the *Drosophila* brain. Bangalore Maggot Meeting: Neural Circuits to Behavior, Bangalore, India.
4. Mochizuki, H., Toda, H., Tomoda, T., and Furukubo-Tokunaga, K. (2009.10.2). Unc-51/Atg1 Kinase Regulates Kinesin-1 Dependent Axonal Transport and Polarized Axonal Targeting of Diverse Neural Molecules in *Drosophila*. Cold Spring Harbor Meeting "Neurobiology of *Drosophila*", Cold Spring Harbor, New York, U. S. A.
5. Ando, T., Kondoh, K., Honjo, K., Mochizuki, H., Ando, M., Horigane, S., Takayama, K., Maruyama, Y., Shimoda, M., Kamiya, A., Ishida, N., Tomoda, T., Saitoe, M., Sawa, A., and Furukubo-Tokunaga, K. (2009.10.3). Modeling Schizophrenia in Flies: Direct Expression of a Schizophrenia Susceptibility Gene, *DISC1*, Impairs Arousal and Associative Learning in *Drosophila*. Cold Spring Harbor Meeting "Neurobiology of *Drosophila*", Cold Spring Harbor, New York, U. S. A.
6. Furukubo-Tokunaga, K. (2009.8.3). "Sweet and bitter memory in fruitfly larvae". Biozentrum Symposium "Molecular Mechanisms in Development and Evolution". University of Basel, Basel, Switzerland.
7. Furukubo-Tokunaga, K. (2008.11.10). "Distinctive neural networks and

biochemical pathways in appetitive and aversive memory in *Drosophila* larvae". Howard Hughes Medical Institute Janelia Farm Conference "Learning and Memory: a Synthesis of Flies and Honeybees". Howard Hughes Medical Institute, Janelia Farm, Ashburn, USA.

8. Honjo, K., Tanaka, A., and Furukubo-Tokunaga, K. (2008.11.10). Differential induction of short-term and medium-term memories by appetitive and aversive reinforcement in *Drosophila* larvae. 49th Annual *Drosophila* Research Conference, San Diego, U. S. A.
9. Honjo, K., Tanaka, A., and Furukubo-Tokunaga, K. (2008.7.10). Distinctive neuronal networks and biochemical pathways in appetitive and aversive memory in *Drosophila* larvae. The 31st Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society, Tokyo International Forum, Tokyo.
10. Mochizuki, H., Toda, H., Tomoda, T., and Furukubo-Tokunaga, K. (2008.7.10). UNC-51 regulates axonal/dendritic patterning and polarized protein trafficking in *Drosophila*. The 31st Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society, Tokyo International Forum, Tokyo.

[図書] (計 1 件)

1. Furukubo-Tokunaga, K. and Hirth, F. (2011). Development of memory centers in the *Drosophila* brain. in "The Memory Mechanisms", World Scientific, London, U. K., in press.

[その他]

ホームページ

<http://www.biol.tsukuba.ac.jp/~tokunaga/welcome.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

古久保 克男 (徳永 克男)

(FURUKUBO-TOKUNAGA KATSUO)

筑波大学・大学院生命環境科学研究科・教授

研究者番号：00272154