

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 22 日現在

機関番号：74415

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21300143

研究課題名（和文）ニューロン樹状突起の維持を司る分子基盤と作動原理の遺伝学的研究

研究課題名（英文）Genetic studies on molecular and functional basis for dendrite maintenance.

研究代表者

榎本 和生 (EMOTO KAZUO)

公益財団法人大阪バイオサイエンス研究所・神経細胞生物学部門・研究部長

研究者番号：80300953

研究成果の概要（和文）：ニューロン樹状突起は外環境からの神経入力担当神経突起であり、神経発生過程において適切な場所に形成された後に維持される。私たちは、ショウジョウバエ感覚ニューロンを解析システムとして、ニューロンが固有の受容領域を形成し維持する分子メカニズムについて研究を行ってきた。その結果、受容領域の維持を担う NDR-Hippo シグナル機構について、分子レベルでの理解を大きく進展させることができた。

研究成果の概要（英文）：Developing neurons establish their unique dendritic fields for sampling appropriate inputs from particular places. By using *Drosophila* sensory neurons as a model system, we have studied how neurons specify and maintain their unique dendritic fields. We have progressed our understanding on the functional mechanisms of the NDR-Hippo kinase signaling pathway in dendrite maintenance.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
年度	2,500,000	750,000	3,250,000
年度	5,900,000	1,770,000	7,670,000
年度	5,800,000	1,740,000	7,540,000
総計	14,200,000	4,260,000	18,460,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：神経化学・神経薬理学

キーワード：分子・細胞神経科学

1. 研究開始当初の背景

神経突起を介したニューロン間の配線は、発生・成長の過程で構築され、知覚や思考の構造基盤となる。従って、一度作り上げられると、大まかな配線は変化しない。これに対して、多くの精神遅滞疾患患者や、一部の躁うつ病患者では、錐体ニューロンの樹状突起が変性もしくは萎縮している様子が頻りに観察される。特にダウン症候群患者の錐体ニューロンでは、発生初期における樹状突起形成は正常に進行するが、その後成長に伴って樹状突起が退縮を起し、若年期に樹状突起全体が萎縮する

(Kaufmann et al. *Cereb. Cortex.* 10:981-991 (2001))。これらの傍証から、いったん機能的な神経ネットワークが確立されると、突起のダイナミクスを制限して樹状突起構造を積極的に維持するメカニズムが作動すること、さらには、この樹状突起の維持機構に破綻が生じることが、精神疾患発症の一因である可能性が指摘されている。しかし、初代培養ニューロンやスライス培養など従来の手法では、樹状突起の形成開始から維持に至る各ステップを簡便かつ長期間に渡り解析することが困難だった為に、樹状突起の維持機構メカニズムの詳細は長らく不明だった。

2. 研究の目的

申請者は生きているショウジョウバエ体内における樹状突起形成を、発生の時間軸を通して1細胞レベルの高解像度で追跡できる解析システムを確立した。続いて、この解析手法を駆使して、樹状突起の形成・維持に異常を持つ変異体の単離および原因遺伝子の同定を行ない、従来は癌抑制因子として考えられていたリン酸化酵素 Wts キナーゼが、神経系においては、いったん形成された樹状突起の維持という全く異なる機能を持つ事を世界に先駆けて明らかにした。本研究では、樹状突起の維持を担う分子基盤の網羅的同定を行い、その作動機序を解明することを目的とする。さらに、樹状突起のパターン形成に異常を持つ変異体群を用いて、樹状突起パターンと神経機能との関連について個体レベルで明らかにすることを旨とする。

3. 研究の方法

申請者が同定した Wts キナーゼとポリコム因子群に着目して、①ニューロンにおける Wts キナーゼ活性の時空間制御機構を明らかにし、②Wts キナーゼによるポリコム分子群の活性制御機構を解明する。平行して、③誘導型 RNAi システムを用いて、ポリコム因子群の下流で樹状突起の安定化を促す因子群の網羅的同定を行なう。平成 22 年度以降には、④樹状突起の形成・維持不全を示す変異体を用いて、樹状突起の形態異常が、ニューロンの神経シグナル受容や情報処理に及ぼす影響について個体レベルで明らかにすることを旨とした。

4. 研究成果

(1) 感覚ニューロンにおける Hippo-NDR シグナルの時空間制御機構

ショウジョウバエ感覚ニューロン樹状突起を解析モデルとして、機能分化後のニューロンが自らの樹状突起を安定化させる分子機構の解明を行った。具体的には、我々が同定した Hippo-NDR リン酸化シグナルに着目し、split-GFP法を用いて、感覚ニューロン発生・分化過程の「いつ」「どこで」Hippo-NDRが活性化されるのかを明らかにすることを旨とした。昨年度までに高感度ライブイメージングシステムを確立し、空間軸・時間軸いづれにおいても高い解像度を持つ解析が可能となっている。このイメージングシステムを用いて Split-GFP 解析を行ったところ、受容領域を確立したニューロンの樹状突起先端部において明瞭なシグナルを確認できた。現在さらに詳細な時空間解析を行っているところであるが、

split-GFPシグナルが発生初期には細胞体近傍に観察されるが、それが徐々に先端部へと移動しているという初歩的データを得ている。今後、我々が見いだしたデータを他の手法の導入も含めて詳細な研究を継続することにより、神経系における Hippo-NDR シグナルの作動原理の解明につながると考えている。

(2) 感覚ニューロンにおける Hippo-NDR シグナルの下流因子群の同定

Hippo-NDRシグナルの下流において働く因子群の同定を行った。具体的には、国立遺伝学研究所において作成されたショウジョウバエ RNAi コレクションを活用して、ゲノムワイドスクリーニングを行った。本年度までに約 2000 系統コレクションのスクリーニングを終了し、樹状突起の維持に関わる候補遺伝子 32 個を単離した。その中から、細胞骨格系の制御に関与することが予測される 5 遺伝子に着目して、更なる解析を進めている。

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 25 件)

1. Emoto, K.: Signaling mechanisms that coordinate the development and maintenance of dendritic fields. *Curr, Opin. Neurobiol.* (査読有) 22: 1-7 (2012).
2. Fujioka, H., Dairyo, Y., Yasunaga, K and Emoto, K.: Neural functions of matrix metalloproteinases: plasticity, neurogenesis, and disease. *Biochem. Res. Int.* (査読有) 2012: 789083 (2012).
3. Lee, S., Uchida, Y., Emoto, K., Umeda, M., Kuge, O., Taguchi, T., and Arai, H.: Impaired retrograde membrane traffic in a mutant CHO cell defective in phosphatidylserine synthesis. *Genes Cells* (査読有) 印刷中
4. Eneling, K., Briona, L., Pintob, V., Pinhob, M. J., Mochizuki, N., Emoto, K., S. Patricio, and Bertorello, A. M.: Salt-inducible kinase 1 regulates E-cadherin expression and intercellular junction stability. *FASEB J.* (査読有) 印刷中

5. Morikawa, R., Kanamori, T., Yasunaga, K., and Emoto, K.: Different levels of the TRIM protein Asap regulate distinct axonal projections of *Drosophila* sensory neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (査読有) 108: 19389-19394 (2011).
 6. Emoto, K.: The growing role of the Hippo-NDR kinase signaling in neuronal development and disease. *J. Biochem.* (査読有) 150: 133-141 (2011).
 7. Emoto, K.: Dendrite remodeling in development and disease. *Dev. Growth Differ.* (査読有) 53: 277-286 (2011).
 8. 藤岡洋美・泉あやか・榎本和生: 「Hippo pathway が制御する多彩な細胞機能」細胞工学 特集 Hippo Pathway: 癌・細胞死・再生の新たな鍵を握る器官サイズ制御シグナル 30: 918-922 (2011).
 9. 古泉博之・榎本和生: 「神経入力による脳神経回路の成熟と疾患」ファルマシア 47: 306-310 (2011).
 10. Yasunaga, K., Kanamori T., Morikawa, R., Suzuki, E., and Emoto, K.: Dendrite reshaping of adult *Drosophila* sensory neurons requires matrix metalloproteinase-mediated modification of the basement membranes. *Dev. Cell* (査読有) 18: 621-632 (2010).
 11. Fang, X., Lu, Q., Emoto, K., and Adler, P. N.: The *Drosophila* Furry protein interacts with Trc and is highly mobile in vivo. *BMC Dev. Biol.* (査読有) 10: 40 (2010).
 12. 安永桂一郎・榎本和生: 「樹状突起リモデリングを規定する細胞外マトリックス分解機構」細胞工学 29: 480-481 (2010).
 13. 榎本和生: 「神経ネットワーク再編の鍵を握る細胞外マトリックス分解機構」生化学「特集: 細胞外プロテオリシス研究の最前線」 82: 972-978 (2010).
 14. 榎本和生: 「記憶・学習の形成と維持を司るエピジェネティック機構」医学のあゆみ「特集: エピゲノム研究最前線」 235: 1051-1055 (2010).
 15. Koike-Kumagai, M., Yasunaga, K., Morikawa, R., Kanamori T., and Emoto, K.: The target of rapamycin complex 2 controls dendritic tiling of *Drosophila* sensory neurons through the Tricornered kinase signaling pathway. *EMBO J.* (査読有) 28: 3879-3892 (2009).
- [学会発表] (計 8 件)
1. 榎本和生: The Hippo signaling pathway in dendrite control. 第 34 回日本分子生物学会 横浜 (2011 年 12 月 14 日)
 2. Emoto, K.: Molecular and cellular basis for dendrite development. Cold Spring Harbor Meeting Asia 2011. 10. 21. Suzhou, China
 3. 榎本和生: Control of dendritic fields by the TOR signaling pathway. 第 84 回日本生化学会 京都 (2011 年 9 月 15 日)
 4. 森川麗・榎本和生: The TRIM protein Asap regulates axon patterning of *Drosophila* sensory neurons through modulating the Netrin signaling pathway 第 33 回日本分子生物学会 第 83 回日本生化学会 合同年会 神戸 (2010 年 12 月 8 日)
 5. 安永桂一郎・金森崇裕・榎本和生: Dendrite reshaping in adult *Drosophila* sensory neurons requires matrix metalloproteinase-mediated modification of the basement membranes. 第 33 回日本分子生物学会 第 83 回日本生化学会 合同年会 神戸 (2010 年 12 月 8 日)
 6. 田頭大志・石井萌・森川麗・松田幸江・木谷友次朗・馬場敦・月田早智子・榎本和生・服部光治: KIAA0319, a dyslexia-associated gene, induces abnormal branching of neurites. 第 33 回日本神経科

学会, 神戸市 神戸国際会議場 (2010
年 9 月 2 日)

7. 森川麗・榎本和生: The TRIM protein
Asap is a critical determinant in axon
patterning of Drosophila sensory neurons
第 33 回日本神経科学会, 神戸市 神戸
国際会議場 (2010 年 9 月 2 日)
8. 安永桂一郎・鈴木えみ子・榎本和生
Dendrite reshaping in adult Drosophila
sensory neurons 第 43 回日本発生生物学
会 京都市 京都国際会議場 (2010 年
6 月 20 日)

〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.obi.or.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

榎本和生 (EMOTO KAZUO)

大阪バイオサイエンス研究所・研究部長

研究者番号: 80300953

(2) 研究分担者

安永桂一郎 (YASUNAGA KEI-ICHIRO)

大阪バイオサイエンス研究所・研究員

研究者番号: 20534572

金森麗 (KANAMORI REI)

大阪バイオサイエンス研究所・研究員

研究者番号: 50534575

(3) 連携研究者

該当なし