

令和 6 年 4 月 26 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K15102

研究課題名(和文) 神経回路再編における神経突起の選択的除去メカニズムの解明

研究課題名(英文) Regulatory mechanisms for neurite elimination underlying developmental neuronal remodeling

研究代表者

古澤 孝太郎 (Furusawa, Kotaro)

東京大学・大学院理学系研究科(理学部)・特任助教

研究者番号：30898961

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：申請者は、ショウジョウバエ感覚ニューロンを実験モデルとして用いることにより、神経コンパートメント選択的除去メカニズムの解明に取り掛かった。まず、遺伝子の機能欠失スクリーニングにより、シナプス刈り込み、および樹状突起刈り込みに必要な遺伝子を探索したところ、樹状突起刈り込みには Cullin1が必要である一方で、シナプス刈り込みには Ube3aが必要であることを見つけた。さらに、Ube3aがシナプス刈り込みを誘導する分子メカニズムを探求したところ、Ube3aはキネシンモータータンパク質依存的にシナプス前部へと輸送され、BMP受容体の分解を介してシナプス刈り込みを誘導することを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで、発達期における脳神経回路刈り込みの制御メカニズムは、軸索・樹状突起・シナプスなどの異なる神経コンパートメントごとに研究されており、単一ニューロン内の神経コンパートメントが選択的に刈り込まれる時空間制御メカニズムは全く理解されていなかった。この問題に取り組むためには、単一ニューロンにおいて、それぞれの神経コンパートメントの刈り込みを同時に観察できる実験モデルを用いる必要があり、簡便な実験モデルの不足が研究の障壁となっていた。本研究は、ショウジョウバエ感覚ニューロンを実験モデルとして用いることにより、世界に先駆けて神経コンパートメント選択的除去メカニズムの解明に取り組むものである。

研究成果の概要(英文)：First, we performed loss of functional screening to identify genes required for synapse elimination and dendrite pruning, and found that Cullin1 is required for dendrite elimination, while Ube3a is required for synapse elimination. Furthermore, we examined the molecular mechanisms by which Ube3a induces synapse elimination and found that Ube3a is transported to the presynaptic terminal in a kinesin motor-dependent manner and induces synapse elimination by downregulating BMP signaling.

研究分野：細胞分子生物学

キーワード：神経回路再編 感覚ニューロン シナプス 樹状突起 刈り込み Ube3a

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

脳神経回路の大まかな配線は胎児期に形成されるが、この時期の脳神経回路は過剰量の神経突起を張り巡らせている。そのため、その後の発達段階において、余分な神経突起を淘汰する「神経突起の選択的除去」を通じて、機能的な情報処理回路へと成熟する。神経突起の選択的除去の異常は、自閉症などの発達障害の一因となる可能性が示されているため、神経突起の選択的除去は脳発達の根幹を担う機構であると考えられている。神経突起の選択的除去のプロセスは、複数本の突起の中から除去される突起が「選択」される過程と、それに引き続き、突起が「除去」される過程から成り立つ。これまで、突起の除去過程について多くの研究がなされ、その細胞・分子メカニズムが明らかにされてきたが、その一方で、突起が「選択」される仕組みに関してはほとんど理解されていない。その理由として、この「選択」という不明瞭な過程を、神経細胞の外部形態などから判別することが困難であることが挙げられる。つまり、選択メカニズムの研究を行うためには、除去される突起として選択されたことを識別するための何らかの指標が必要だった。

申請者の所属研究室は、ショウジョウバエ感覚ニューロンにおいて、神経突起が除去される約3時間前に、将来的に除去される突起において「低頻度 Ca^{2+} 振動」が発生することを発見した (Kanamori et al. Science 2013; Kanamori et al. Nat Commun 2015)。この低頻度 Ca^{2+} 振動は、除去される運命にある突起を時空間的に規定するものであった。この知見から申請者は、低頻度 Ca^{2+} 振動の発生を「選択」の指標にすることにより、神経突起の選択的除去メカニズムを解明できると考え実験を開始した。

2. 研究の目的

本研究では、以下の3点を明らかにすることにより、神経突起の選択的除去メカニズムの解明へと繋げることを目的とする。

- (1) ミトコンドリアの神経突起への輸送は、除去される突起の選択性を規定するのか？
- (2) ミトコンドリア由来の ROS 産生は、除去される突起の選択性を規定するのか？
- (3) 突起における局所的な ROS 産生は、突起の除去を駆動するのか？

3. 研究の方法

本研究では、以下の3点を検証することにより、神経突起の選択的除去メカニズムの解明に繋げることを目指す。

- (1) 神経回路再編期におけるミトコンドリアの動態解析
- (2) 神経回路再編期における ROS 濃度変化と神経突起構造変化の同時イメージング
- (3) 光遺伝学的手法を用いた ROS 産生操作による選択的な神経突起除去の誘導

4. 研究成果

研究開始当初は、ショウジョウバエ感覚ニューロンを実験モデルとして用いることにより、樹状突起の選択的除去メカニズムの解明に繋げることを目的としていた。しかし、ショウジョウバエ感覚ニューロンの細胞構造を詳細に解析する過程において、樹状突起に加え、シナプスと呼ばれる構造も観察したところ、非常に興味深いことに、樹状突起を除去する分子基盤とシナプスを除去する分子基盤が異なる可能性を見出した。これまで、発達期における脳神経回路除去の制御メカニズムは、軸索・樹状突起・シナプスなどの異なる神経コンパートメントごとに研究されてきたが、単一ニューロン内における神経コンパートメントが選択的に除去される時空間制御メカニズムは全く理解されていなかった。この問題に取り組むためには、単一ニューロンにおいて、それぞれの神経コンパートメント除去を同時に観察できる実験モデルが必要であり、簡便な実験モデルの不足が研究の障壁となっていた。申請者がかねてより実験モデルとして採用していたショウジョウバエ感覚ニューロンは、それぞれの神経コンパートメント除去を同時に、なおかつ簡便に観察できるものであるため、この実験モデルを駆使することにより、世界に先駆けて神経コンパートメント選択的除去メカニズムを提唱できると考え研究の方向性を修正した。

まず、遺伝子の機能欠失スクリーニングにより、シナプス除去、および樹状突起除去に必要な遺伝子を探索したところ、E1 ユビキチン活性化酵素の機能欠失において、シナプス除去と樹状突起除去の両方が強く阻害された。このことから、シナプス除去と樹状突起除去の両方において、ユビキチン-プロテアソーム経路が必要であることがわかった。次に、E1 ユビキチン活性化酵素の下流因子である E3 ユビキチンリガーゼについて検証した。E1 ユビキチン活性化酵素の下流において、Cullin1 と呼ばれる E3 ユビキチンリガーゼが樹状突起除去に必要なことが既に報告されていたため (Wong et al. PLoS Biol 2013)、まずは Cullin1 がシナプス除去にも必要であるのかを解析した。すると、興味深いことに、Cullin1 の機能欠失において樹状突起除去が阻害された一方で、シナプス除去は正常だった。この結果は、樹状突起除去には Cullin1 が必要である一方で、シナプス除去には、Cullin1 とは異なる何らかの E3 ユビキチンリガーゼが機能していることを示唆する。そこで、シナプス除去に必要な E3 ユビキチンリガーゼを、遺伝子の機能欠失スクリーニングにより探索したところ、Ube3a と呼ばれる E3 ユビキチンリガーゼがシナ

プス除去に必要であることを発見した。これらの結果から、樹状突起除去には Cullin1 が機能する一方で、シナプス除去には Ube3a が機能するという、ユニークな制御機構が示唆された。

次に、Ube3a がシナプスを特異的に除去するメカニズムを探求した。EGFP タグを付加した Ube3a をショウジョウバエ感覚ニューロンに発現させ、神経コンパートメントごとに Ube3a の発現レベルを比較したところ、Ube3a は細胞体や樹状突起に比べてシナプスに強く局在することがわかった。さらに、Ube3a がキネシンモータータンパク質によってシナプスへと輸送される可能性を検証するために、キネシンモータータンパク質の機能欠失体において、Ube3a の神経コンパートメントにおける発現量を解析した。結果として、キネシンモータータンパク質の機能欠失体において、Ube3a のシナプス局在は喪失することがわかった。このことから、Ube3a はキネシンモーター依存的にシナプスへと輸送されることが示唆された。

次に、シナプス除去を誘導する Ube3a の下流経路を検証した。Ube3a は E3 コビキチンリガーゼであることから、Ube3a による標的基質の分解を通じてシナプス除去が誘導される可能性が高い。このことを踏まえると、ショウジョウバエ感覚ニューロンに Ube3a の基質を過剰発現させた場合、シナプス除去が阻害されることが想定される。そこで、Ube3a の基質候補をショウジョウバエ感覚ニューロンに過剰発現させ、シナプス除去が阻害されるのかを検証した。その結果、ショウジョウバエの BMP 受容体である Thickvein (Tkv) の過剰発現下において、シナプス除去が阻害されることを見出した。次に、シナプス除去が起こる時間枠において、Tkv の発現レベルの変動を解析したところ、シナプス除去が起こる時期特異的に Tkv の発現レベルがシナプスにおいて減少することがわかった。さらに、この Tkv 発現レベルの減少は、Ube3a 機能欠失において抑制されることから、Ube3a によって Tkv が分解される可能性がサポートされた。さらに、Ube3a 機能欠失におけるシナプス除去阻害は、Tkv のヘテロ欠損もしくは Tkv 下流因子である Mad のヘテロ欠損によりレスキューされた。このことから、Ube3a の機能欠失による BMP シグナリングの活性化が、シナプス除去を阻害することが示唆された。これらの結果から、Ube3a は BMP シグナリングの下方制御を介してシナプス除去を誘導することが示唆された。

本研究では、ショウジョウバエ感覚ニューロンを実験モデルとして採用することにより、神経コンパートメントが除去される時空間制御メカニズムを明らかにした。樹状突起除去には Cullin1 が必要であり、シナプス除去には Ube3a が必要であるという異なる E3 コビキチンリガーゼによる神経コンパートメントの選択的除去メカニズムが明らかになった (図 1)。さらに、Ube3a がシナプスを特異的に除去するメカニズムを追求したところ、キネシンモータータンパク質依存的に軸突末端へと輸送された Ube3a が、BMP シグナリングの下方制御を介してシナプス除去を誘導することを明らかにした (図 2)。本研究では、神経コンパートメントの選択的除去メカニズムを世界に先駆け示したが、本研究で明らかにしたシナプス除去因子や樹状突起除去因子の機能欠失においても、全ての神経回路除去が阻害されないことから、その他の因子によるシナプス誘導メカニズムが想定される。引き続き、本研究において確立した実験モデルを駆使することにより、神経コンパートメント選択的除去の分子基盤の解明に繋げることができると考えられる。

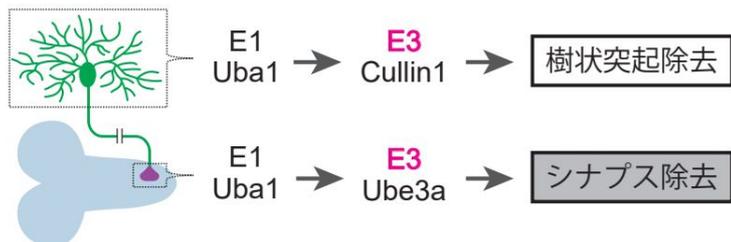


図 1. E1 コビキチン活性化酵素 (Uba1) は、シナプス刈り込みと樹状突起刈り込みの両方に必要である。Uba1 の下流において異なる E3 コビキチンリガーゼが機能する。Ube3a はシナプス刈り込みにおいて機能する一方で、Cullin1 は樹状突起刈り込みにおいて機能する。

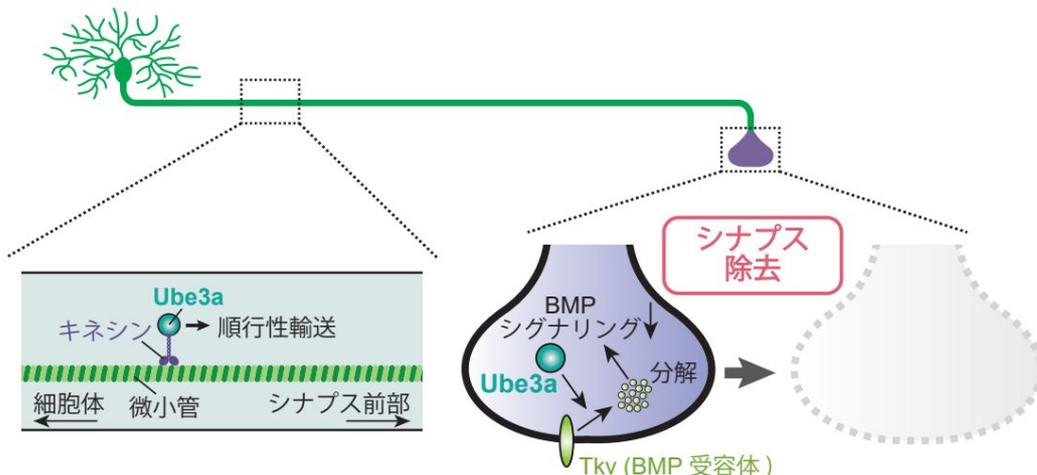


図 2. Ube3a はキネシンモータータンパク質によってシナプス前部へと輸送され、Tkv (BMP 受容体) の分解を介してシナプス刈り込みを誘導する。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Kotaro Furusawa, Kazuo Emoto	4. 巻 167
2. 論文標題 Spatiotemporal regulation of developmental neurite pruning: Molecular and cellular insights from Drosophila models	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Neuroscience Research	6. 最初と最後の頁 54-63
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.neures.2020.11.010	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 -

1. 著者名 Kotaro Furusawa, Kenichi Ishii, Masato Tsuji, Nagomi Tokumitsu, Eri Hasegawa, Kazuo Emoto	4. 巻 381
2. 論文標題 Presynaptic Ube3a E3 ligase promotes synapse elimination through down-regulation of BMP signaling	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Science	6. 最初と最後の頁 1197-1205
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1126/science.ade8978	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 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Kotaro Furusawa, Kenichi Ishii, Kazuo Emoto
2. 発表標題 Molecular control of developmental neuronal remodeling in Drosophila neurons
3. 学会等名 NEURO2022
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Kotaro Furusawa, Kenichi Ishii, Kazuo Emoto
2. 発表標題 Protein degradation systems in functional remodeling of Drosophila nociceptive circuits
3. 学会等名 第44回日本神経科学大会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Kotaro Furusawa and Kazuo Emoto
2. 発表標題 Molecular mechanisms underlying developmental neuronal remodeling in Drosophila sensory neurons
3. 学会等名 第46回日本神経科学大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Kotaro Furusawa, Keiko Tominaga, and Kazuo Emoto
2. 発表標題 Molecular mechanisms underlying developmental synapse elimination in Drosophila sensory neurons
3. 学会等名 CSHL meeting (Neurobiology of Drosophila)
4. 発表年 2023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