

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 6月14日現在

機関番号：74415  
 研究種目：若手研究（B）  
 研究期間：2011～2012  
 課題番号：23770263  
 研究課題名（和文） 基底膜分解に依存する神経回路再編メカニズムの研究

研究課題名（英文） Elucidation of mechanisms underlying neural circuit remodeling triggered by basement membrane degradation

## 研究代表者

安永 桂一郎 (KEI-ICHIRO YASUNAGA)  
 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・研究員  
 研究者番号：20534572

## 研究成果の概要（和文）：

本研究では、ショウジョウバエ感覚ニューロンをモデルとして使用し、主として *in vivo* ライブイメージング、分子遺伝学的解析、RNAi の方法を融合させることにより、基底膜分解に依存する樹状突起の再編を制御する分子・細胞メカニズムを明らかにすることを目指した。その結果、局所分解され網目状になった基底膜の近傍に再編途中の樹状突起が存在することを見出した。

## 研究成果の概要（英文）：

In this study, we utilized *in vivo* imaging techniques and *Drosophila* molecular genetics to address molecular and cellular mechanisms underlying dendrite remodeling triggered by degradation of basement membranes, and found that spatial distributions of basement membranes correlated with dendritic branch behaviors during the dendrite remodeling.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,500,000	1,050,000	4,550,000

## 研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・発生生物学

キーワード：樹状突起再配置、細胞外マトリックス、基底膜、マトリックス・メタロプロテアーゼファミリー、生体イメージング、感覚神経、ショウジョウバエ

## 1. 研究開始当初の背景

ニューロンは、軸索と樹状突起という機能・構造的に異なる2つの神経突起を介して情報の受け渡しをおこなっている。神経突起を介した神経回路の大枠は、ヒトでは胎生後期から生後にかけて構築される。その後、各ニューロンの神経活動の活発化や、周囲の細胞との細胞間相互作用により、神経回路の切り替えが頻繁におこなわれ、神経回路は初めて機能的に成熟する。この過程において、樹状突起は外界からの入力に依存して形態を

大きく変化させることにより、最終的に適切な受容領域を獲得する。このような樹状突起の可塑的形態変化は再編と呼ばれ、神経回路が機能的に成熟するための必須のステップである。これまでに、前者の神経回路の大枠を形成する仕組みについて、様々な組織、ニューロン種を使って盛んに研究されており、多くの知識が蓄積されている。その一方で、樹状突起の再編を制御する分子・細胞メカニズムについての情報に関しては、樹状突起再編の観察や遺伝学的操作を簡便に実施する

ための *in vivo* 解析システムが確立されていないために、いまだ乏しい。

研究代表者はこれまでに、ショウジョウバエの感覚ニューロンの樹状突起形態を、単一ニューロンレベルで精緻に *in vivo* 観察できるイメージング系を確立した。さらに、感覚ニューロンをその生涯に渡り観察する過程において、樹状突起の形態が、ハエ成虫が羽化してから 24 時間以内に、放射状から格子状へと劇的に再編されることを発見した (図 1) (Yasunaga et al., *Dev. Cell* (2010) 18: 621-632)。従来、樹状突起の再編は主として突起の切断もしくは伸長・退縮に依存すると考えられていたが、今回発見した再編においては、既存の樹状突起の切断や退縮はほとんど見られず、放射状の樹状突起がそのまま格子状へと再配置されることが明らかになった。さらに、細胞外プロテアーゼ Mmp2 (マトリックス・メタロプロテアーゼ 2) の機能欠損変異体では樹状突起の再配置が著しく抑制されることを発見した。これらの結果から、細胞外プロテアーゼによる基底膜の分解が樹状突起の再編を誘導するという全く新規の制御メカニズムを提唱するに至った。この研究成果を発展させるべく本研究では、樹状突起の再編における、細胞外プロテアーゼ依存的な基底膜の分解機構と、樹状突起と基底膜間の相互作用機構を明らかにすることを目的とする。

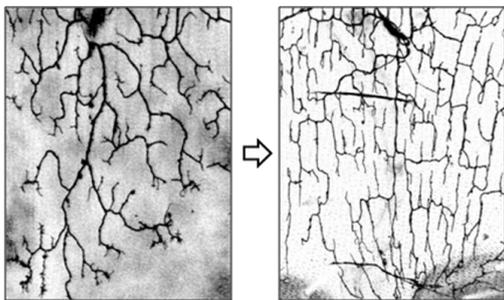


図 1 ショウジョウバエ感覚ニューロン樹状突起の再編。樹状突起は羽化後 24 時間以内に、放射状 (左) から格子状 (右) へと再配置される。この再編は、Mmp2 依存的な基底膜分解によって誘導される (Yasunaga et al., *Dev. Cell* (2010))。

## 2. 研究の目的

本研究では、ショウジョウバエ感覚ニューロンをモデルとして使用し、主として *in vivo* ライブイメージング、免疫組織染色、組織解剖学、遺伝学的解析、RNAi の方法を融合させることにより、樹状突起の再編を制御する分子・細胞メカニズムを明らかにすることを目的とする。具体的には、以下の 3 つの研究

を実施した。

### (1) Mmp2 依存的な基底膜分解が時間的・空間的に制御されるメカニズムの解明

蛍光タンパク質標識された Mmp2 の *in vivo* ライブイメージングを用いて Mmp2 の細胞内局在を詳細に解析することにより、Mmp2 依存的な基底膜の時間的・空間的に制御された分解が Mmp2 のどのような特性に基づくのかを明らかにする。

### (2) ニューロン樹状突起の再編を誘導する基底膜分子群の同定

基底膜が分解される過程において、基底膜分子の分布・動態を免疫染色およびライブイメージング解析により明らかにする。さらに、基底膜分子の機能欠損変異体を解析することにより、樹状突起の再配置を誘導する基底膜成分を特定する。平行して、基底膜分子に加えて、基底膜に作用して機能するモルフォゲンやガイダンス分子にも着目し、その動態と機能を同様に明らかにする。

### (3) 樹状突起による基底膜由来の再編シグナル受容とその細胞内伝達経路の解明

RNAi 法を利用したハエ全遺伝子の網羅的スクリーニングにより、樹状突起の再配置を誘導する分子群を同定する。同定された分子群の *in silico* 相互作用解析から、樹状突起の再配置を制御する分子間ネットワークを明らかにする。

## 3. 研究の方法

### (1) Mmp2 依存的な基底膜分解が時間的・空間的に制御されるメカニズムの解明

研究代表者はこれまでの研究から、①基底膜分解にともなって樹状突起が再配置されること、②基底膜分解は Mmp2 に依存し、成虫初期に且つ樹状突起の周辺領域に限定しておこること (時空間的制御)、③突然変異を使った実験により、Mmp2 は基底膜周辺の表皮細胞において機能すること、を明らかにした。Mmp2 の活性は発現組織、細胞内局在のレベルで制御されていると考えられるが、Mmp2 の詳細な分布様式について、さらに、基底膜分解を時間空間的に制御するメカニズムについては不明である。これまでに、Mmp2 遺伝子発現を模倣するレポーターを持つ系統を利用して Mmp2 の発現を解析したところ、成虫初期に表皮細胞で強い発現を検出したが、内在性 Mmp2 分子と一致するか否かはまだ解析されていない。本研究では、Mmp2 依存的な基底膜の時空間特異的分解の機構を明らかにするために、Mmp2 の動態を詳細にライブイメージングする。

具体的には、まず Mmp2 抗体を作製し、免疫染色をおこなう。これと並行して、GFP 標識した Mmp2 を発現する系統を使い、Mmp2 分子の動態を詳細にイメージングする。この

とき、赤色蛍光タンパク質 mCherry 標識されたコラーゲン IV 分子を発現する系統を使用し、同時に 2 色イメージングすることにより、樹状突起の再配置の過程において Mmp2 が基底膜に作用する様子を解析する。

#### (2) ニューロン樹状突起の再編を誘導する基底膜分子群の同定

基底膜は細胞接着のための足場として機能することが知られている。細胞は基底膜を構成する分子や包含された特定の分子の情報を読みとり、細胞内の骨格系を制御している。研究代表者はこれまでの研究から、①樹状突起が再配置されるときに、基底膜が大規模に再編されること、②再配置された樹状突起が再編後の基底膜に対して非常に密接に接触していることを発見している。樹状突起が再配置されるためには、樹状突起による基底膜の認識が重要だと考えられるが、標的である具体的な基底膜分子は特定できていない。

本研究では、基底膜を構成する分子基盤を明らかにし、樹状突起の再配置を誘導する基底膜分子を同定するために、GFP で標識されたショウジョウバエの基底膜を構成する分子群を使って、再配置期の動態を解析した。一方、基底膜に作用して機能する Wnt, ヘッジホッグ等のモルフォゲンやガイダンス分子が樹状突起の形態形成を制御することが報告されている(Singh et al., Development (2010) 137:1351-1360)。そこで、基底膜分子に加えて、これらの分子群にも着目し、その動態と変異体による機能解析を同様に実施する。

#### (3) 樹状突起による基底膜由来の再編シグナル受容とその細胞内伝達経路の解明

樹状突起は基底膜の分解再編を検出し、自身の骨格系を変化させると予想されるが、どのようにして基底膜を感知し、適切な応答を示すかは不明である。本研究では、樹状突起の再配置において、樹状突起が基底膜の分解再編をどのように感知し、応答するかを明らかにするために、全遺伝子の網羅的探索をおこなう。ニューロン特異的に全遺伝子の機能を破壊するためのスクリーニング方法として、誘導型 RNAi を利用する。樹状突起が細胞外の情報を受容するためには、接着分子・受容体 (Integrin・Lar 等) が機能していると想定されるため、これらの分子群にまず着目して、スクリーニングを進めていく。

### 4. 研究成果

#### (1) Mmp2 依存的な基底膜分解が時間的・空間的に制御されるメカニズムの解明

樹状突起の再編過程において細胞外プロ

テアーゼ Mmp2 分子が示す挙動を可視化するために、GFP 標識 Mmp2 を細胞内に定常的に発現させたが、分子の挙動を追跡することはできなかった。その原因が Mmp2 を定常的に発現させたためではないかと考え、その後新たに、生体内での発現調節機構を再現できる GFP 標識 Mmp2 ノックイン系統の作製を進め、実際に樹立することに成功した。この系統が有する GFP 標識 Mmp2 分子は内在性の Mmp2 分子の挙動を再現していた。これは GFP シグナルの分布が Mmp2 発現細胞と一致するかを検証することにより示された。

次に、樹状突起再編と Mmp2 分子や基底膜の挙動を同時に可視化するために、樹状突起のイメージングシステムに GFP 標識 Mmp2 分子や蛍光標識型の基底膜分子を導入した。詳細な観察の結果、Mmp2 分布と樹状突起との間には明確な関連を見出せなかったが、基底膜と樹状突起との間に興味深い関係性を発見した。すなわち、基底膜が局所分解されるにつれて、樹状突起が基底膜の残存部分に移動する傾向が見られた。この結果は、基底膜が樹状突起の再編を誘引的に導く可能性を示唆している。

#### (2) ニューロン樹状突起の再編を誘導する基底膜分子群の同定

樹状突起の再配置期に分解される基底膜分子の候補を同定するために、GFP 標識された基底膜分子群を発現するショウジョウバエ系統をスクリーニングした。そのなかから、コラーゲン IV と良く似た時空間スケールで分解される 2 つの遺伝子を同定することができた。これらは、Syndecan と Perlecan であった。この結果は、Mmp2 がコラーゲン IV のみでなく、多くの基底膜分子を分解することにより、樹状突起再配置が誘導される可能性を示唆している。現在、Mmp2 変異体におけるこれら基底膜分子の挙動を解析中である。また、基底膜と相互作用する樹状突起上の分子を同定するために、プロテイン相互作用データベース等を利用して、Syndecan と Perlecan と結合する分子を選別し、それらの機能解析を進める予定である。

#### (3) 樹状突起による基底膜由来の再編シグナル受容とその細胞内伝達経路の解明

ショウジョウバエ全遺伝子を対象にした RNAi スクリーニングを約 2500 系統 (ショウジョウバエ全遺伝子の約 20%) に対して実施しており、基底膜由来の再編シグナルの受容に関与する候補遺伝子が 15 個単離されている。2 次スクリーニングとして、同定されたこれら 15 個の遺伝子の変異体解析を実施しているところである。また、変異体の存在しない遺伝子については、1 次スクリーニングで用いた RNA 配列とは異なる遺

伝子領域を標的とする RNAi 系統を入手し、解析を進展させる予定である。

#### 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 4 件)

(1) Takahiro Kanamori, Makoto I. Kanai, Yusuke Dairyo, Kei-ichiro Yasunaga, Rei K. Morikawa, and Kazuo Emoto. Compartmentalized Calcium Transients Trigger Dendrite Pruning in *Drosophila* Sensory Neurons. *Science*. (2013) 査読有り  
DOI: 10.1126/science.1234879

(2) Akira Sakurai, Masayuki Koganezawa, Kei-ichiro Yasunaga, Kazuo Emoto and Daisuke Yamamoto. Select interneuron clusters determine female sexual receptivity in *Drosophila*. *Nature Communications*. 4, Article number: 1825 (2013) 査読有り  
Doi:10.1038/ncomms2837

(3) Hiromi Fujioka, Yusuke Dairyo, Kei-ichiro Yasunaga and Kazuo Emoto. Neural Functions of Matrix Metalloproteinases: Plasticity, Neurogenesis, and Disease. *Biochemistry Research International*. 2012, Article ID: 789083 (2012) 査読有り  
Doi:10.1155/2012/789083

(4) Rei K. Morikawa, Takahiro Kanamori, Kei-ichiro Yasunaga and Kazuo Emoto. Different levels of the Tripartite motif protein, Anomalies in sensory axon patterning (Asap), regulate distinct axonal projections of *Drosophila* sensory neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*. 48, 19389-19394 (2011) 査読有り  
Doi: 10.1073/pnas.1109843108

[学会発表] (計 2 件)

(1) Kei-ichiro Yasunaga, Kazuo Emoto. Adult and larval sensory neurons use different mechanisms to specify dendritic fields. Joint Meeting of JSDB 45th & JSCB 64th. 2012 年 05 月 28 - 2012 年 05 月 31 日、神戸

(2) Kei-ichiro Yasunaga, Kazuo Emoto. Dendrite Remodeling in Adult *Drosophila* Sensory Neurons. 1st Asia-Pacific *Drosophila* Research Conference. May 24, 2011. Taipei, Taiwan

[図書] (計 1 件)

(1) Kei-ichiro Yasunaga, Kazuo Emoto. NOVA Publishers. "The Role of Matrix Metalloproteinases in Neural Plasticity and Disease." *Matrix Metalloproteinases: Biology, Functions and Clinical Implications*. 215-224 (2012)

[その他]

ホームページ等

<http://www.obi.or.jp/emoto-lab/research/>

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

安永 桂一郎 (KEI-ICHIRO YASUNAGA)  
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・研究員  
研究者番号：20534572

(2) 研究分担者  
なし

(3) 連携研究者  
なし