

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 22 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24300124

研究課題名(和文) 感覚ニューロン受容領域の形成と維持を担う分子細胞基盤に関する遺伝学的研究

研究課題名(英文) Molecular and cellular basis for dendritic development and maintenance

研究代表者

榎本 和生 (Emoto, Kazuo)

東京大学・理学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：80300953

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,600,000円

研究成果の概要(和文)：ショウジョウバエ幼虫感覚ニューロンでは、同種ニューロンの樹状突起間に生じる反発作用を介して受容領域を確立することが示されていた。私達は、ショウジョウバエ成虫感覚ニューロンの解析を行い、樹状突起間に生じる反発作用には依存しない受容領域形成機構の存在を明らかにした(Yasunaga et al. Genes Dev 2015)。さらにその責任因子として、ニューロン周辺の上皮細胞から分泌されるWnt5と、その受容体Drlを同定した。さらに、受容体Drlの下流シグナルの同定も行い、低分子量G蛋白質RhoGTPaseのGEFであるTrioがRhoAの活性化を介して細胞骨格の再編を誘導することを示した。

研究成果の概要(英文)：In *Drosophila* larvae, dendrites of C4da neurons completely but non-redundantly cover the whole epidermis, and the boundaries of these tiled dendritic fields are specified through repulsive interactions between homotypic dendrites. Here we report that, unlike the larval C4da neurons, adult C4da neurons rely on both dendritic repulsive interactions and external positional cues to delimit the boundaries of their dendritic fields. We identify Wnt5 derived from sternites, the ventral most part of the adult abdominal epidermis, as the critical determinant for the ventral boundaries. Further genetic data indicate that Wnt5 promotes dendrite termination on the periphery of sternites through the Ryk receptor family kinase Drl and the Rho GTPase guanine nucleotide exchange factor Trio in C4da neurons. Our findings thus uncover the dendritic contact-independent mechanism that is required for dendritic boundary specification.

研究分野：神経科学

キーワード：受容領域 樹状突起 感覚ニューロン ショウジョウバエ

1. 研究開始当初の背景

我々の脳では、軸索と樹状突起という機能・構造的に異なる2種類の神経突起を介して、1000億個ものニューロンがネットワークを形成している。樹状突起は、他のニューロンや感覚受容器からの情報入力を持っており、その空間配置と大きさは入力シグナルの質と量を規定する主要因子となる。実際に生体脳では、同じ機能を担うニューロン群は、ほぼ同じ大きさの樹状突起を持ち、しかも特定の脳内空間に配置・配線されることにより機能ユニットを形成する。このような同種ニューロンの空間的な組織化は、遺伝情報に加えて、細胞外からの情報に規定されると考えられている。例えば、ほ乳類の視覚情報を担う神経節細胞(retina ganglion cells: RGCs)は、網膜上に樹状突起を展開するが、同種ニューロンの樹状突起同士は決して重なり合うこと無くタイル状に配置され網膜全体を覆う。このRGCsのタイル構造は、隣接する樹状突起間の相互作用を介して組織化される可能性が提唱されたが、適切な解析手法が確立されていなかったため、組織化を担う分子実体と制御原理は全く不明である。

一方、発達過程において構築された機能的神経回路は、その後の一生を通して維持され、思考や行動の基盤となることが示されている。ダウン症候群などの神経疾患では、いったん構築された機能的脳神経回路が、その後徐々に退縮・変性することが報告されている。従って、構築された機能回路は、何らかのメカニズムにより積極的に維持・管理されていることが示唆されるが、その分子基盤に関しては、いまだほとんど理解されていない。

2. 研究の目的

本研究は『脳を構成する神経回路は如何にして空間的に組織化されて、さらに出来上がった回路が如何にして生涯に渡り維持・管理されるのか?』という神経発生学の根源的な問題に対して、独自に確立した方法論を駆使して制御メカニズムの包括的解明を目指すものである。空間的組織化については、研究代表者が発見した『神経突起間の反発作用』と『神経突起と周辺細胞との相互作用』という異なる2つのメカニズムに着目し、それぞれの分子基盤を追求するとともに、2者の協調メカニズムを明らかにする。維持・管理に関しては、神経突起変性の抑制因子として研究代表者が同定したWtsキナーゼに着目し、その生理的リン酸化基質を同定し作動原理を解明する。さらに、新たに発見したショウジョウバエ成虫の老化に伴う神経突起変性を解析モデルとして、神経回路の維持・管理を担うエピジェネティック制御メカニズムを解明する。

3. 研究の方法

感覚ニューロン特異的にGFPを発現するショウジョウバエ系統を使い、特定の遺伝子

群をRNAiノックダウンする網羅的スクリーニングにより、受容領域を形成・維持する遺伝子群の同定を行った。

4. 研究成果

まず、ショウジョウバエ成虫ニューロンの空間配置は、隣り合うニューロン間に生じる反発作用により規定されることを示した。一方、腹側の空間境界は、ニューロンと近傍上皮細胞との相互作用より規定されることを発見した。さらに、成虫の組織を遺伝学的にトランスフォームさせる技術をもちいて、腹側の境界決定には、腹側に位置する特定の上皮細胞組織(stemite を呼ばれる)が必要であることを示した。さらに、約200遺伝子を網羅的にRNAiスクリーニングしたところ、上皮細胞から分泌される因子としてWnt5、ニューロン側の受容体としてDrlを同定した。さらに、Wnt5-Drlシグナルはニューロン局所のTrio-RhoGTPaseシグナルを活性化させる事により樹状突起の伸長を阻害する事を明らかにした。

一方、Wtsキナーゼの下流ターゲット候補として、カルシウム依存的蛋白質分解酵素カルパインを同定した。カルパインの活性化は、神経突起の不安定化・変性を誘導することから、Wtsキナーゼはカルパイン活性を抑制することにより、神経回路を維持・管理する可能性が考えられた。

さらに、羽化後40日(ショウジョウバエ成虫の寿命は約60日)以降の感覚ニューロンに顕著な進行性の神経突起変性・退縮を発見した(未発表)。さらに興味深いことに、羽化後40日以降のニューロンでは、ヒストンH3K27メチル化(H3K27me3)の顕著な低下が起きることを見出した。以前に研究代表者は、ポリコーム複合体(PcG)によるヒストンH3K27me3修飾が、完成した神経回路の維持に必須であることを示している(Genes Dev 2007)。従って、神経回路が完成したときに受けたPcGによるメチル化修飾が加齢に伴いヒストンから外れることが、神経突起変性の引き金となる可能性が想定される。

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9件)(すべて査読あり)

1. Koizumi H, Fujioka H, Togashi K, Thompson J, Yate J, Gleeson J and Emoto K: DCLK1 phosphorylates the microtubule-associate protein MAP7D1 to promote axonal elongation in cortical neurons. *Dev Neurobiol.* in press
2. Yasunaga K, Tezuka A, Ishikawa N, Dairyō Y, Togashi K, Koizumi H and Emoto K:

- Adult *Drosophila* sensory neurons specify dendrite territories independently of dendritic contacts through the Wnt5-Drl signaling pathway. *Genes Dev* 29: 1763-1775 (2015). doi: 10.1101/gad.262592.115.
3. Kanamori T, Yoshino J, Yasunaga K, Dairyo Y and Emoto K: Local endocytosis triggers dendrite thinning and pruning in *Drosophila* sensory neurons. *Nature Communications* 6: 6515 (2015). doi: 10.1038/ncomms7515.
 4. Kanamori T, Togashi K, Koizumi H and Emoto K: Dendrite remodeling: lessons from invertebrate models. *Int Rev Cell Mol Biol* (Invited Review) 318: 1-38 (2015). doi: 10.1016/bs.ircmb.2015.05.001.
 5. Yang L, Li R, Kaneko T, Takle K, Morikawa KR, Essex L, Wang X, Zhou J, Xing Y, Emoto K and Ye B: Trim9 regulates activity-dependent fine-scale topography in *Drosophila*. *Curr Biol* 24: 1024-1030 (2014). doi: 10.1016/j.cub.2014.03.041.
 6. Kanamori T, Kanai M, Dairyo Y, Yasunaga K, Morikawa R and Emoto K: Compartmentalized calcium transients trigger dendrite pruning in *Drosophila* sensory neurons. *Science* 340: 1475-1478 (2013). doi: 10.1126/science.1234879.
 7. Kato U, Inadome H, Yamamoto M, Emoto K, Kobayashi T and Umeda M: A phospholipid flippase complex of Type IV P-type ATPase ATP8A1 and CDC50A is required for cell migration. *J Biol Chem* 288: 4922-4934 (2013). doi: 10.1074/jbc.M112.402701.
 8. Shin E, Kashiwagi Y, Kuriu T, Iwasaki H, Tanaka T, Koizumi H, Gleeson JG and Okabe S: Doublecortin-like kinase enhances dendritic remodeling and negatively regulates synapse maturation. *Nature Communications* 4: 1140 (2013). doi: 10.1038/ncomms2443.
 9. Sakurai A, Koganazawa M, Yasunaga K, Emoto K and Yamamoto D: Select interneuron clusters determine female choosiness in *Drosophila*. *Nature Communications* 4: 1825 (2013). doi: 10.1038/ncomms2837.
- 〔学会発表〕(計 4 件)
1. Emoto K: Local calcium signaling in dendrite remodeling. Gordon Research Conference “Dendrite: Molecules, Structure & Function” @ Ventura Beach, USA, 3/16-20, 2015.
 2. Emoto K: Sculpting nociceptive circuits in *Drosophila*. Gordon Research Conference “Molecular and Cellular Neurobiology” @ Hong Kong, 6/29-7/3, 2014.
 3. Emoto K: Genetic control of dendrite development. EMBO Conference “Development Biology of *Drosophila*” @ Crete, Greece, 6/22-29, 2014.
 4. Emoto K: The role of compartmentalized calcium signaling in dendrite development and remodeling. Gordon Research Conference “Dendrite: Molecules, Structure & Function” @ Les Diablerets, Switzerland, 5/19-24, 2013.
- 〔図書〕(計 9 件)
1. 榎本和生: プレインサイエンスレビュー 2016 「ニューロン固有の受容領域を規定する分子細胞基盤」 113-124: (2016).
 2. 榎本和生: 実験医学「特集：個性を生み出す脳神経回路ダイナミクス」 33: 1360-1363 (2015).
 3. 富樫和也・手塚茜・石川夏子・古泉博之・榎本和生: 「発達期における不要回路の選択的除去メカニズム」 実験医学「特集：個性を生み出す脳神経回路ダイナミクス」 33: 1371-1377 (2015).
 4. 大領悠介・吉野次郎・榎本和生: 「Hippo pathway による神経回路構築制御と神経疾患」 医学のあゆみ「特集：広がる Hippo

pathway 研究—癌から各種疾患へ」235:
1051-1055 (2014).

5. 榎本和生：第15章「遺伝子は脳の設計図か？」遺伝学の謎（共著）悠書館（2014）
6. 金森崇浩・榎本和生：「局所性カルシウムシグナルによる樹状突起の選択的除去メカニズム」実験医学 31: 2603-2606 (2013).
7. 金井誠・橋本大輝・木下裕介・榎本和生：「神経-血管ワイヤリング研究のための古くて新しいモデル生物ショウジョウバエ」血管医学 14: 267-272 (2013).
8. 榎本和生：第6章「ニューロンの機能分化と樹状突起パターンニング」脳の発生学（共著）化学同人 90-104 (2013).
9. 榎本和生：「生体膜」等 遺伝学図鑑（共著）悠書館（2013）.

〔産業財産権〕
出願状況（計0件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況（計0件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等
<http://www.bs.s.u-tokyo.ac.jp/biol/>

6. 研究組織

- (1)研究代表者
榎本 和生 (Emoto, Kazuo)
東京大学・大学院理学系研究科・教授
研究者番号：80300953

- (2)研究分担者
古泉 博之 (Koizumi, Hiroyuki)
東京大学・大学院理学系研究科・助教
研究者番号：10334335