

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 3 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24370086

研究課題名(和文) 構造 機能相関からみる発生メカニズム——神経軸索形成をモデルとして

研究課題名(英文) Axon formation as a model of structure-function relationship

研究代表者

多羽田 哲也(TABATA, TETSUYA)

東京大学・分子細胞生物学研究所・教授

研究者番号：10183865

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,000,000円

研究成果の概要(和文)：ショウジョウバエのキノコ体の内在神経Kenyon細胞の軸索伸張、分岐に働く2つの新規遺伝子についての機能解析を行った。

(1) アクチン鎖の再構成に働くCofilinはSlingshotによって脱リン酸化されることにより活性化され、LIMキナーゼにリン酸化されることによって不活化される。この文脈の中で、SickieはCofilinを活性化することを多重変異を用いた実験により示した。Development誌に発表した。

(2) DIP2(Disco interacting protein 2)はJNKによって制御され、glaitk及びcrumbsを通して、軸索誘導や分岐を調節すると考えられる。

研究成果の概要(英文)：The Drosophila mushroom body (MB) has been well studied as a model of neuronal development and function. We identified two novel genes, sickie and Disco interacting protein 2 (DIP2) that are required for MB development.

(1) Sickie regulates F-actin-mediated axonal growth via the non-canonical Rac-Cofilin pathway in a Slingshot (Ssh) -dependent manner. Cofilin plays an essential role as a regulator of axonal growth by severing and depolymerizing F-actin. P-Cofilin levels were increased in the pupal brain of sickie mutants.

(2) DIP2 may catalyse the binding of ATP to an as-yet-unidentified substrate with its ATP-synthase domain in the / Kenyon cells. We propose that DIP2 is regulated by JNK and regulates axon growth and axon branch formation by regulating planar cell polarity in the growth cone. As candidates of its downstream targets, we identified graikit and crumbs genes.

研究分野：生物学 生物科学 発生生物学

キーワード：ショウジョウバエ Sickie アクチン Cofilin slingshot Rac キノコ体 軸索伸長

1. 研究開始当初の背景

ショウジョウバエを用いて、パターン形成に機能するモルフォゲンの作用機構 (Nature, 1997, 1999, Mol. Cell, 2000) の研究を行い、さらに、神経幹細胞の形成 (Development, 2008, 2010) 神経細胞分化における細胞間相互作用 (Nature Neurosci, 2006, Development, 2007, 2008, 2010, 2011, J. Neurosci 2011) などの研究を行った。これらの研究を通して、限られたゲノム情報 (たかだか数万遺伝子) をもとに複雑な体構造が作られるメカニズムを目の当たりにした。また同時に、発生メカニズムは、結果としてダイナミックな生命活動を支える機能発現をも保証していることから、構造—機能発現をも視野に入れた新たな研究領域の創設により、発生メカニズムの意味を問う事ができると思い至った。脳神経系はそのモデルの1つとして適している。脳機能を支える神経回路パターンの基本はゲノムにコードされており、それは発生過程を通して具現化される。神経回路パターンは長い進化の過程で脳機能による淘汰のフィードバックを受けており、神経回路の発生メカニズムは、脳の機能発現を最適化するようにデザインされているはずである。そして、その情報はゲノムという形に統合されコードされている。

脳神経系を眺めていると、そこには様々な形態を持った多種多様な細胞群があり、その形態はその特異的な機能を支える必然があると思われる。これらの細胞を産み出す機構の解明のためにはゲノミクスを基盤として、一細胞レベルの精度で発生システム全体の形成メカニズムを解析することが必要であり、高度な遺伝子操作が可能で小さなゲノムが有用である。ショウジョウバエの脳は理想的なモデルシステムであるといえる。

ショウジョウバエの脳の発生機構の研究は近年盛んに行われている。構造としてまとまっている視覚系および嗅覚系における研究が多く、申請者らが明らかにした視覚系における規則正しい幹細胞形成の研究から、個々の神経の分化機構を探る研究にも発展が見られる。嗅覚系は匂い記憶のセンターであるキノコ体の形成、細胞分化に関わる研究が盛んに行われているが、次章に述べるような特異な形態を形成する機構についてはほとんどわかっていない。

この4半世紀の間に様々な実験系において、形態形成、発生の分子メカニズムが明らかにされ、シグナル分子、転写因子などからなる数多くのネットワークが解明され、共通の、あるいは固有の法則とでもいべきものが理解されるにいたった。では、発生遺伝子ネットワークはどのようにしてできたのだろうか。何がそれを規定しているのだろうか。限られたゲノム情報から最大限の効率を引き出した進化にその鍵があるのであろう。本研究はその質問に答える道を探る新たな研究領域の端緒となるものである。

2. 研究の目的

本申請では嗅覚3次中枢であるキノコ体を研究の対象とする。匂い分子は触覚にある受容体に補足され、その情報は、触覚葉を中継してキノコ体に送られる。匂い記憶学習のセンターでもあるキノコ体は左右1対の構造、 γ 、 β 、 α の3機能ドメインから成り立っており、この順序で分化が進み、機能ドメインごとに、記憶の獲得、固定、読み出しなどの素過程に働くと考えられている。この機能ドメインの発生機構は、進化上、記憶を獲得した状況をゲノムに記録していると考えられる。機能ドメインが順に発生する過程にはChinmoと呼ばれる転写因子が機能しており (Zhou et al., 2006) 最近では核受容体遺伝子が分化制御に寄与していることも知られている (Lin et al., 2009)。 γ と β 神経群の軸索は分岐しているが、 α のそれは、分岐していない。このような特異な軸索の走行、分岐パターンは機能と固く結びついているものと考えられるが、その形成機構はほとんどわかっていない。本研究はこの軸索形成のメカニズムを明らかにすることに主眼をおく。形態形成と機能相関を形態形成メカニズムから探るために適した系である。

軸索伸長メカニズムの解明

神経軸索の形成にはアクチン動態の制御が重要な機能を果たしていることが知られている。発現スクリーニングを通して、遺伝子 sickie を得た。その機能解析の過程で sickie はアクチン再構成に重要な機能を果たす可能性が示唆された。アクチンの再構成にはコフィリンとよばれる蛋白質のリン酸化が重要な役割を果たすことが知られている。リン酸化特異抗体により生体内においてコフィリンのリン酸化状態をモニターすることができる。クローン解析により、キノコ体において、sickie がコフィリンのリン酸化を負に制御していることを明らかにした。Sickie を中心としたアクチン鎖合成制御による軸索形成機構を明らかにする。

軸索走行メカニズムの解明

上述のように γ と β 神経群の軸索は分岐して、遠近軸方向および背腹軸方向に伸長する。 α の軸索は、分岐せず遠近軸方向に伸長する。このような神経細胞群特異的な分岐あるいは走行の機構を明らかにする。そのために神経群特異的な変異をスクリーニングした。その結果、 β 神経群の遠近軸に走行する軸索が背腹軸方向に走行する変異を得たので、この機構の解明を行う。変異のトランスクリプトーム解析により、ゲノムにコードされた制御システムを探る

3. 研究の方法

(1) 神経軸索の伸長を制御するメカニズムの解明

Sickie は軸索伸長を制御する。P エlementあるいはPiggyBac Elementを用いたエンハンサートラップ系統の発現スクリーニングによりキノコ体で発現する遺伝子 sickie を得た。トランスポゾン挿入系統などを用いて作成した sickie の変異は致死ではなく、成体まで発生したが、主にキノコ体と中心複合体と呼ばれる領域の軸索伸長に異常がみられた。この表現型は Rac などの表現型と似ていることから、sickie はアクチン鎖の形成を通して、軸索伸長を制御していると考えられる。コフィリンを中心とするアクチン鎖合成機構における Sickie の機能を様々な遺伝子との相互作用を通して明らかにする。

(2) 神経軸索の走行を制御するメカニズムの解明

DIP2 は軸索走行を制御する。個々の遺伝子に対応したヘアピンループ RNA をキノコ体に発現させ、ロックダウンによる表現型により遺伝子機能を推測する機能スクリーニングを行い DIP2 を得た。DIP2 をキノコ体でロックダウンすることにより / 神経においてのみ遠近軸へ伸長する軸索が背腹軸に向かって伸長する表現型を得た。これをもとに DIP2 の下流で働く遺伝子群を同定し、その機能解析を通して軸索形成の遺伝子カスケードを理解する。

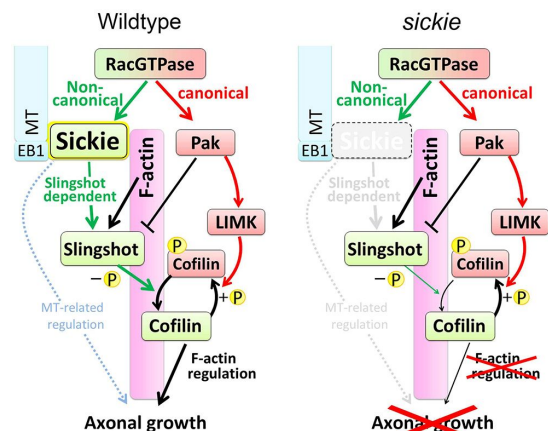
4. 研究成果

(1) Sickie の神経軸索の伸長を制御するメカニズムの解明

Rac-Cofilin 経路は細胞骨格の再編成を制御し、神経軸索の形成に必須の役割を果たす。古典的には、Rac は Rac-Pak-LIMK 経路のスイッチとして機能し、Cofilin に対し抑制的に機能することで、actin 骨格再構成を介した軸索伸長を抑制することが知られている。一方、ショウジョウバエでは Pak 非依存的な経路を介して軸索の伸長の促進にも寄与することが示唆されていた。しかしながら後者の非古典的経路が、最終的に Cofilin 依存的な actin 骨格の制御に寄与することで軸索伸長を促進しているのかどうかは明らかではなかった。また actin 骨格や Cofilin のリン酸化状態の内在性レベルでの変化を、同一個体内の発生過程の神経軸索において同時に検出するという試みはこれまで報告されていなかった。

本研究では、ヒト NAV2 のホモログである Sickie が、ショウジョウバエキノコ体の神経軸索伸長を細胞自律的に正に制御し、その制御は非古典的 Rac-Cofilin 経路を介していることを示唆する結果を得た。Sickie は F-actin に富む新生のキノコ体神経軸索において顕著な発現が観察され、変異体は軸索伸長異常の表現型を示し、キノコ体特異的に Sickie の transgene を発現させることでレスキューされた。Sickie、Rac、Cofilin は遺伝

学的な相互作用を示すことが明らかになり、モザイク組織を誘導することにより、sickie や Rac-Cofilin 経路の各種変異体の神経軸索では、F-actin とリン酸化(不活性型) Cofilin の発現レベルが変化していることが明らかになった。また sickie 変異体の発生過程の脳では、リン酸化 Cofilin の発現レベルが上昇していた。さらに、sickie 変異体下で Cofilin の機能亢進を誘導すると表現型が緩和すること、Cofilin 抑制因子 LIMK の強制発現の表現型が Sickie の強制発現により抑制できるが、Cofilin 活性化因子 Slingshot の変異体下では抑制できないこと、Pak 非依存的 Rac または Slingshot の LIMK 強制発現の抑制作用が sickie 変異体下では十分に発揮されないことが明らかになった。以上の結果から、Sickie は非古典的 Rac 経路を介し、Ssh-Cofilin 経路依存的な F-actin の再編成に関わることで神経軸索伸長を制御するモデルを提唱する。



(2) 神経軸索の走行を制御するメカニズムの解明

DIP2 は軸索走行を制御する。RNA 干渉方を用いた表現型スクリーニングにより、キノコ体神経軸索の走行異常を生じる DIP2 遺伝子を得た。一次構造からの推測から DIP2 蛋白は、N 末端側に DMAP1-binding ドメインを 1 つ、C 末端側に AMP-dependent synthetase ドメインを 2 つ有していると考えられている。DMAP1-binding ドメインとは、DNA メチル化関連因子である DNA methyltransferase 1-associated protein 1 と結合するためのドメインである。一方、AMP-dependent synthetase ドメインは、基質に対して ATP 依存的に AMP を結合させるドメインである。近年の研究によって、ヒトにおいて DIP2B 依存的なメチル化制御が正常な精神発達に必要である可能性が示唆された。そこで、DIP2 変異体で確認されたキノコ体の構造異常が DIP2 の DMAP-1 binding ドメインに依存しているかどうかを確かめるため、各ドメインが欠損した DIP2 誘導体を作製し、 / lobe 特異的な Gal4 系統である c739-Gal4 を用いてレスキュー実験を行った。その結果、DMAP-1 binding ドメインを欠損した DIP2 では構造異常がレスキューされるの

に対し、AMP-dependent synthetase ドメインが1つでも欠けた DIP2 では構造異常をレスキューすることが出来なかった。また、RNAi を用いてキノコ体特異的に DMAP1 をノックダウンしても何も表現型が観察されなかった。これらの結果は、正常なキノコ体の発生には DIP2 の AMP-dependent synthetase ドメインが必要であるのに対し、DMAP1-binding ドメインは関与していないことを示している。AMP-dependent synthetase ドメインを持つ遺伝子の多くは脂肪酸代謝酵素であること、これらの遺伝子を RNAi で抑制するとキノコ体の形態異常が観察されることから、DIP2 も脂肪酸を基質としている可能性が考えられる。また、DIP2 の各ドメイン間のリンカー配列を欠失したコンストラクトでも表現型をレスキューすることは出来なかった。これらの誘導体はキノコ体内在神経の細胞体と樹状突起に局在しており、軸索側での局在を確認することは出来なかった。この結果は、リンカー配列が欠損しているため DIP2 が正常な立体構造を取ることが出来ず機能出来なくなっている可能性を排除することは出来ないが、DIP2 の軸索への局在がキノコ体の発生において重要である可能性を示唆している。

DIP2 と相互作用をする因子を探索する為、DIP2 を過剰発現した際の表現型と類似した表現型を示す c-jun N terminal kinase (JNK) と DIP2 の相互作用の解明を行い、両者が少なくとも部分的には共通の信号伝達系で機能していることを示した。

マイクロアレイを用いて DIP2 変異で特異的に発現が変動する遺伝子を網羅的に解析したところ、glaikit が DIP2 の有力な下流因子として同定された。さらに、DIP2、glaikit と相互作用する因子を探索した結果、crumbs と遺伝学的相互作用が確認された。crumbs は上皮細胞において頂端部の決定因子として機能することが知られており、crumbs はキノコ体神経の成長円錐内の極性決定に関与している可能性を提唱した。

また、DIP2 変異体においてキノコ体神経以外に楕円体の形態異常が確認された。中枢神経系全体で発現誘導する事が知られている elav-GAL4 を用いて DIP2 をレスキューした所、構造異常が回復したことから DIP2 は楕円体の発生機構にも必要であることが明らかとなった。

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 1 件)

阿部崇志、山崎大介、村上智史、廣井誠、新田陽平、前山有子、多羽田哲也 The NAV2 homolog Sickie regulates F-actin-mediated axonal growth in *Drosophila* mushroom body neurons via

the non-canonical Rac-Cofilin pathway. *Development*, 141, 4716-4728, 2014 年 DOI: 10.1242/dev.113308, 査読有

[学会発表](計 11 件)

阿部崇志、山崎大介、村上智史、廣井誠、新田陽平、前山有子、多羽田哲也 The NAV2 homolog Sickie regulates F-actin-mediated axonal growth in *Drosophila* mushroom body neurons via the non-canonical Rac-Cofilin pathway. 2015 Annual *Drosophila* Research Conference 2015 年 3 月 4-8 日 シカゴ (アメリカ合衆国)

阿部崇志、山崎大介、村上智史、廣井誠、新田陽平、前山有子、多羽田哲也 Sickie, a human MAP Nav2 homolog, facilitates F-actin-mediated axonal growth in *Drosophila* MB neurons by relaying non-canonical Rac signaling to the Cofilin pathway. 第11回日本ショウジョウバエ研究会 2014 年 6 月 4-6 日 金沢歌劇座 (石川県・金沢市)

新田陽平、清水一道、大坪真樹、西賢二、程久美子、多羽田哲也 Disco-interacting protein 2 (DIP2) is required for both proper projection and number of axonal branches in mushroom body neuron. 第11回日本ショウジョウバエ研究会 2014 年 6 月 4-6 日 金沢歌劇座 (石川県・金沢市)

阿部崇志、山崎大介、村上智史、前山有子、多羽田哲也 Sickie, a human MAP Nav2 homolog, regulates F-actin-mediated axonal growth in *Drosophila* MB neurons via non-canonical Rac/Cofilin pathway. 第36回日本神経科学大会 2013 年 6 月 20-23 日 国立京都国際会館 (東京)

新田陽平、清水一道、大坪真樹、西賢二、程久美子、多羽田哲也 Disco-interacting protein 2 (DIP2) regulates guidance of sister axons in the *Drosophila* mushroom body. 第13回東京大学生命科学シンポジウム 2013 年 6 月 8 日 東京大学伊藤国際学術研究センター・小島ホール (東京都)

阿部崇志、山崎大介、村上智史、前山有子、多羽田哲也 Sickie, a mammalian MAP Nav2 homolog, regulates axonal growth of *Drosophila* mushroom body neurons via Slingshot-Cofilin-dependent F-actin regulation. Symposium on Sensory Systems & Neural Circuits 2013 年 2 月 11-12 日 東京大学伊藤謝恩ホール (東京都)

新田陽平、清水一道、大坪真樹、西賢二、程久美子、多羽田哲也 Disco-interacting protein 2 (DIP2) regulates guidance of sister axons in the Drosophila mushroom body. Symposium on Sensory Systems & Neural Circuits 2013年2月11日 東京大学伊藤謝恩ホール(東京都)

新田陽平、清水一道、大坪真樹、西賢二、程久美子、多羽田哲也 Disco-interacting protein 2 (DIP2) regulates guidance of sister axons in the Drosophila mushroom body. 第35回日本分子生物学会年会 2012年12月12日 福岡国際会議場・マリメッセ福岡(福岡県・福岡市)

阿部崇志、山崎大介、村上智史、前山有子、多羽田哲也 Sickie regulates the axon growth of Drosophila Mushroom Body neurons cooperatively with Cofilin signaling pathway. 第10回日本ショウジョウバエ研究会 2012年10月13-15日 慈恵医科大学(東京都)

新田陽平、清水一道、大坪真樹、西賢二、程久美子、多羽田哲也 Disco-interacting protein 2 (DIP2) regulates guidance of axon branches in the mushroom body. 2012年10月13日 慈恵医科大学(東京都)

新田陽平、清水一道、大坪真樹、西賢二、程久美子、多羽田哲也 ショウジョウバエ嗅覚記憶中枢に於いてDIP2は軸索枝の投射を制御する 第35回日本神経科学大会 2012年9月21日 名古屋国際会議場(愛知県・名古屋市)

〔図書〕(計 0件)

〔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：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.iam.u-tokyo.ac.jp/fly/htmls/index.htm>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

多羽田 哲也(Tabata Tetsuya)

東京大学・分子細胞生物学研究所・教授

研究者番号：10183865

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし