

平成 27 年 5 月 28 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25840094

研究課題名(和文) Wntシグナルによる感覚ニューロン受容野境界決定メカニズムの解明

研究課題名(英文) Elucidation of mechanisms that establish boundaries of dendritic fields in sensory neurons

研究代表者

安永 桂一郎 (YASUNAGA, KEI-ICHIRO)

東京大学・理学系研究科・研究員

研究者番号：20534572

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

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、受容野境界が確立される分子・細胞メカニズムの解明を目指した。生体内の可視化法や遺伝学的手法を組み合わせることにより、分泌タンパク質 Wnt5が境界での樹状突起伸長を適切なレベルに抑えることを見出した。さらに、Wnt5シグナルを媒介する分子として *trio* を同定した。これらの結果は受容野境界を確立する仕組みの一端を示している。

研究成果の概要(英文)：In this study, we investigated molecular and cellular mechanisms by which boundaries of dendritic fields were established in *Drosophila* sensory neurons. Using a combination of *in vivo* imaging techniques and molecular genetics, we found that Wnt5 protein prevented dendritic branches from growing across the boundary during the dendrite development.

研究分野：生物学

キーワード：受容野境界 Wnt5 Ryk *drl* 神経-表皮間相互作用 *in vivo* 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

感覚ニューロンは神経系において最も末梢の皮膚などに位置し、体外環境に関する情報を感知する。この情報はニューロンの樹状突起によって感知され、軸索によって脳や脊髄まで届けられる。感覚ニューロンの樹状突起が外界の情報を正常に受容するためには、自身の適切な「位置」及び「サイズ」を守りながら、皮膚などの感覚器官表面を覆わなければならない。このように感覚ニューロンが自身の樹状突起によって覆う領域は受容野と呼ばれる。感覚情報が外界から入ってくる時に、その場所に関する空間的情報は受容野の位置及びサイズによって定義されるため、受容野形成メカニズムの解明は大切な問題である。これまでの研究から、受容野の縁にあたる受容野境界は細胞外環境に依存して決定されることが示されてきた。複数の感覚ニューロン受容野が隣接して存在するときには、受容野境界は個々の受容野を形成する樹状突起の突起間反発作用により決定され、境界は受容野が互いに重なり合わないよう形成される。一方で、隣接する感覚ニューロン受容野が存在しないときも、受容野は適切な領域にのみ形成されるが、受容野境界が決定される分子・細胞メカニズムは分かっていない。

研究代表者はこれまでに、細胞外環境に着目して樹状突起がつくる受容野の形態決定メカニズムを追究してきた (Yasunaga et al., Dev. Cell (2010) 18: 621-632)。ショウジョウバエの成虫期感覚ニューロンをモデルとして選び、以前には困難であった生体内の樹状突起ダイナミクスのイメージング法を確立した。研究代表者は、感覚ニューロンの受容野が表皮細胞性のうろこ様組織である腹板へ向かって成長するが、その手前で停止し、境界を完成させることを発見した(図1)。さらに、境界形成に必要な分子として、分泌因子 Wnt ファミリーの1つ Wnt5 と細胞表面受容体 receptor related to tyrosine kinase (Ryk) を同定した。感覚ニューロンに対するレスキュー実験により、Ryk は感覚ニューロンで機能するが、Wnt5 は細胞非自律的に機能することが示唆された。これらの結果を発展させることで、細胞外環境による受容野境界決定の新規メカニズムに迫ることが期待される。

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、樹状突起の受容野境界が細胞外環境によって決定される分子・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つの研究計画を実施した。

(1) 受容野境界形成を制御する分泌因子 Wnt5 のダイナミックな役割の解明

ライブイメージング及び蛍光プローブ技術を駆使することにより、受容野境界決定時の Wnt5 ダイナミクスを発現及び分布について時空間的に明らかにする。一方、変異体を用いた解析により、どの細胞外マトリックス分子が Wnt5 ダイナミクスの調節に重要なかを明らかにする。これらの結果を統合することにより、Wnt5 がどのようなメカニズムにより受容野境界の決定に貢献しているかを明らかにする。

(2) 受容野境界決定において樹状突起の振るまいを制御するメカニズムの解明

Wnt5 及び Ryk 変異体解析により、受容野境界近傍における樹状突起の振るまいがこれらの分子によってどのように制御されるかを明らかにする。また、遺伝学的手法を用いて Wnt5 を強制発現させることにより、受容野境界決定シグナルとして機能する Wnt5/Ryk が樹状突起に対して誘引・反発いずれの作用を示すかを明らかにする。一方、Ryk の樹状突起内分布を解析することにより、Ryk 機能部位についての情報を得る。

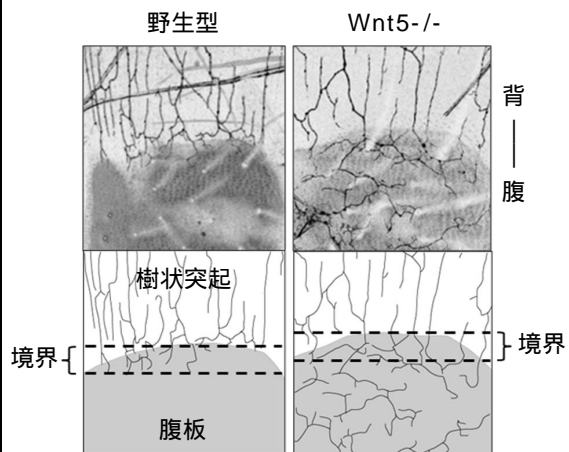


図1 ショウジョウバエ感覚ニューロン樹状突起によって形成される受容野。破線に囲まれた領域が受容野境界である。野生型において受容野は境界より背側の領域に形成される(左)。一方 Wnt5 変異体では、受容野が境界を越えて拡大している(右)。下段は上段の模式図。

(3) 受容野境界決定シグナルを伝達する受容体下流の細胞内分子ネットワークの解明

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、受容野境界の形成において必要な細胞内分子群を同定する。同定された遺伝子を機能的に分類するために、Ryk、細胞骨格、代表的な細胞内シグナル経路などに対するそれらの相互作用を解析する。同定された分子群の解析結果をもとにして、受容野の境界形成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) 受容野境界形成を制御する分泌因子 Wnt5 のダイナミックな役割の解明

研究代表者はこれまでの研究から、受容野は腹側表皮に位置する腹板へ向かって成長するが、その手前で停止し境界を完成させること、さらに受容野境界決定が分泌因子 Wnt5 に依存することを発見した。Wnt5 変異体では、受容野が腹板上にまで拡大してしまう。しかし、どのようにして Wnt5 が受容野境界決定における樹状突起の振るまいを制御するかは不明である。本研究では、受容野境界決定において Wnt5 が「いつ」「どこで」作用するかを明らかにするために、Wnt5 の発現・分布の時間変化を詳細にイメージングする。

具体的には、Wnt5 発現細胞を同定するために、抗体による免疫組織染色をおこなった。並行して、Wnt5 発現を再現するレポーター系統 (Wnt5-EGFP 系統) を作製し、Wnt5 発現の時空間的变化を詳細にイメージングした。

(2) 受容野境界決定において樹状突起の振るまいを制御するメカニズムの解明

分泌因子 Wnt5 に対する細胞表面受容体の 1 つとして receptor related to tyrosine kinase (Ryk) が同定されている。研究代表者はこれまでの研究から、感覚ニューロンの受容野境界決定が Ryk に依存することを発見した。Ryk 変異体では、Wnt5 変異体と同様に受容野が腹板上にまで拡大してしまう。さらにレスキュー実験から、Ryk が感覚ニューロンにおいて細胞自律的に機能する可能性を見出している。しかし、受容野境界が決定されるときに、Wnt5 と Ryk が樹状突起の振るまいを「どのように」制御するかは不明である。本研究では、受容野境界決定における樹状突起の振るまいを制御する分子・細胞メカニズムを明らかにするために、Wnt5 と Ryk を対象とする遺伝学的操作を施して樹状突起の振るまいを詳細に解析する。

具体的には、ライブイメージングを用いて野生型と Wnt5 及び Ryk 変異体の樹状突起を比較解析した。これにより、Wnt5 と Ryk がどのようにして退縮・方向転換などの受容野境界近傍における樹状突起の振るまいを制御するかを解明する。

(3) 受容野境界決定シグナルを伝達する受容体下流の細胞内分子ネットワークの解明

研究代表者はこれまでの研究から、受容野境界の決定には分泌因子 Wnt5 と感覚ニューロン中の受容体 Ryk が要求されることを明らかにしている。Ryk は何らかの細胞内シグナル伝達経路を活性化し、局所的な細胞骨格系を変化させ、樹状突起の形態を制御すると考えられているが、その分子実体は不明な点が多い。本研究では、受容体 Ryk の下流において、どのような細胞内分子ネットワークが受

容野境界決定における樹状突起の形態変化を制御するかについて明らかにするために、全遺伝子の網羅的スクリーニングを実施する。

感覚ニューロン特異的に全遺伝子の機能破壊をするために誘導型 RNAi を利用した。誘導型 RNAi は非常に簡便なため、網羅的探索に適している。ここでは Dishevelled といった種々の Wnt シグナルに關与する遺伝子を優先的に検証した。これと並行して、Src kinase などの細胞内シグナル分子やアクチンなどの細胞骨格分子との相互作用に着目して単離された遺伝子を解析した。最終的に、同定された遺伝子群の解析により、受容野境界決定を制御する分子間ネットワークを同定した。

4. 研究成果

(1) 受容野境界形成を制御する分泌因子 Wnt5 のダイナミックな役割の解明

受容野境界決定において分泌因子 Wnt5 が「どこで」作用するかを明らかにするために、境界が決まる時期のショウジョウバエを抗 Wnt5 抗体により免疫組織染色した。しかし、受容野とその周辺組織では、Wnt5 を検出することはできなかった。その原因として Wnt5 発現が検出下限以下であること、また、抗体が免疫組織染色に適していないことが想定される。そこで、並行して作製した Wnt5-EGFP 系統を用いて Wnt5 発現細胞を調べた。すると、Wnt5 が受容野境界部分の表皮細胞に局所的な発現をすることが分かった。この結果より、Wnt5 は受容野境界で局所的に機能することが示唆された。

次に、Wnt5 が「いつ」機能するかを調べるために、上記と同じレポーター系統を様々な発生タイミングで解析した。Wnt5 は受容野境界形成前から形成されるタイミングまで境界部分で持続的に発現し続けるが、受容野境界形成後にその発現が低下することが分かった。したがって、Wnt5 は拡大する受容野を適切なサイズで止めるときに必要であるが、完成後の受容野サイズを維持するときには不要になると考えられる。

(2) 受容野境界決定において樹状突起の振るまいを制御するメカニズムの解明

最初に、樹状突起の振るまいを経時的にライブイメージングするシステムを確立した。このシステムを利用して野生型の樹状突起の振るまいをイメージングした結果、突起伸長が境界近傍で有意に低下することが分かった。次に、同じ条件下で Wnt5 変異体を解析したところ、突起伸長が低下することはなかった。そのため、樹状突起は境界を越えて伸長してしまっていた。これらの結果より、受容野境界が形成されるときには、樹状突起の伸長が止まることにより、適切なサイズの受容野が形成されることが明らかになった。

さらに、Wnt5 がこの伸長低下を制御している可能性が高い。現在、Ryk 変異体と Wnt5 変異体との比較解析を進めており、その結果を本研究と統合する予定である。

(3) 受容野境界決定シグナルを伝達する受容体下流の細胞内分子ネットワークの解明

ショウジョウバエの Wnt シグナルに関係することが知られている約 50 遺伝子について RNAi スクリーニングを実施した。この中には、細胞表面分子や細胞内エフェクター分子などが含まれる。しかし、有望な候補遺伝子の発見には至らなかった。その原因として、主に RNAi の遺伝子破壊効率が不十分なことが考えられるが、一方で未知の経路が受容野形成を制御する可能性も否定できない。

次に、細胞骨格系を制御する遺伝子である低分子量 GTP アーゼとその調節分子 GAP と GEF に着目した。その結果、候補として 4 遺伝子が見つげ出され、最終的に GEF 分子 trio が同定された。trio のクローン解析と遺伝学的相互作用解析をおこない、trio が Wnt5 及び Ryk と同一経路で機能することを示唆するデータを得た。本研究により同定された trio を足掛かりとして、Wnt5/Ryk の下流で機能する分子ネットワークの全容解明を進めている。

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 3 件)

(1) Takahiro Kanamori, Jiro Yoshino, Kei-ichiro Yasunaga, Yusuke Dairyo, and Kazuo Emoto. (2015). Local endocytosis triggers dendritic thinning and pruning in *Drosophila* sensory neurons. Nature Communications 6, Article number: 6515. 査読有り
doi: 10.1038/ncomms7515
<http://www.s.u-tokyo.ac.jp/ja/press/3831/>

(2) Takahiro Kanamori, Makoto I. Kanai, Yusuke Dairyo, Kei-ichiro Yasunaga, Rei K. Morikawa, and Kazuo Emoto. (2013). Compartmentalized calcium transients trigger dendrite pruning in *Drosophila* sensory neurons. Science 340, 1475-1478. 査読有り
doi: 10.1126/science.1234879
<http://www.s.u-tokyo.ac.jp/ja/press/2013/23.html>

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

〔学会発表〕(計 1 件)

(1) Kei-ichiro Yasunaga and Kazuo Emoto. Adult *Drosophila* sensory neurons use two distinct mechanisms to specify their dendritic fields. Neuro2013. 2013 年 6 月 21 日、国立京都国際会館(京都府・京都市)

〔図書〕

なし

〔産業財産権〕

なし

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.biol.s.u-tokyo.ac.jp/users/brain/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

安永 桂一郎 (YASUNAGA, Kei-ichiro)
東京大学大学院・理学系研究科・特任研究員
研究者番号: 20534572

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし