

研究報告書

「脳神経地図の形成と認識を司る分子基盤解明」

研究タイプ： 通常型

研究期間： 平成 21 年 10 月～平成 25 年 3 月

研究者： 千原 崇裕

1. 研究のねらい

神経細胞は「軸索」「樹状突起」、双方の突起を正確に配線し、シナプス結合を形成することにより機能的な神経回路を形成する。脳のように極度に複雑な神経回路も、1つ1つの神経細胞レベルで観察するとこのような単純な神経接続の集合にすぎない。しかし、脳は限られた数の神経細胞で莫大な量の神経情報を統合・処理・収納するために、シナプス形成領域の「脳内における空間的配置」をも巧みに利用しており、これによって更に情報処理能力を向上させている。このような個々の神経細胞が神経組織でとるシナプス形成場の脳内配置様式を「神経地図」と呼ぶ。機能的な神経回路網の基本原理解明には、「神経地図」の発生機構の理解が必須となる。しかし、これまでの神経地図、回路に関する研究は、「複数の神経が集団として軸索ガイダンスやシナプス形成を行う系」、あるいは「単一細胞を神経組織から解離した状態での現象に関するもの」であり、生体組織としての神経地図、回路形成研究は殆ど行われていない。このような状況を鑑み本研究では、ショウジョウバエの遺伝学的モザイク解析法を活用することにより、脳内1細胞レベルの解像度で「神経地図」発生の分子機構解明を目指す。脳内「神経地図」のモデル系としては「ショウジョウバエ嗅覚系一次中枢:触角葉」を採用する。ショウジョウバエのゲノム情報・遺伝学的手法を最大限に駆使することによって、発生過程におけるすべての触角葉構成神経(前シナプス神経、後シナプス神経、介在神経)の遺伝子型を時空間的に操作し、神経細胞それぞれの樹状突起と軸索が相互依存・相互作用しながら自己組織的に神経地図・神経回路を形成する過程の分子機構を明らかにする。

2. 研究成果

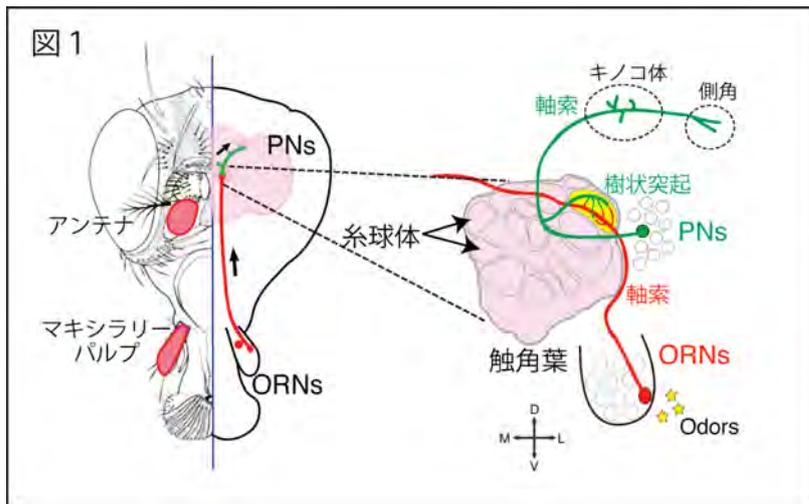
(1)概要

神経細胞は、軸索、樹状突起を伸長し、分岐させ、最終的にシナプスを形成する接続相手を探し出す(ターゲティング)。脳の中では何万、何億もの神経細胞のそれぞれがこのようなステップを介して神経回路を形成しているが、その分子機構に関しては未だ不明な点が多い。今回私は、ショウジョウバエ脳の嗅覚一次中枢:触角葉神経回路(嗅覚系一次神経と二次神経)をモデル系として、神経回路形成に関わる分子基盤の解明を試みた。進化的に保存された分子「Meigo」と「Dogi」の分子機能を明らかにする過程で、① 樹状突起ターゲティング・形態形成における「小胞体ストレスと糖鎖修飾」の重要性、② 軸索伸長過程における「細胞内初期エンドソームの成熟」の必要性を生体内で示すことに成功した。これらの研究成果は、個々の分子の機能特性を明らかにしたのみならず、脳内神経回路が形成される過程において各神経細胞内で起きている分子動態、及びその制御機構を理解するのに有用な知見を与える。以下に結果の詳細を記す。

(2) 詳細

1) 神経突起伸長・ターゲティング・神経形態形成を生体内で解析できるモデルシステムとしての「ショウジョウバエ嗅覚系一次中枢: 触角葉回路」

私は、脳神経回路を構成する軸索・樹状突起の伸長、分岐、ターゲティングの分子機構を解明する目的でショウジョウバエ嗅覚系一次中枢である「触角葉」神経回路を利用した。外界からの匂い情報は、まず嗅覚受容体神経 (Olfactory Receptor Neuron: ORN) で受容される。ORNはその軸索を触角葉内に約50個存在するシナプス構造「糸球体」へ投射し、そこで二次神経である投射神経 (Projection Neuron: PN) の樹状突起とシナプスを形成する。PNは更にその軸索を高次嗅覚中枢であるキノコ体や側角へ投射する。この神経回路の最も大きな特徴として、ORN軸索とPN樹状突起の間における「1対1」のシナプス接続が挙げられる。ORNは、発現する嗅覚受容体の種類によって約50種類に分けられ、それぞれ異なる種類のORNは触角葉内の異なる糸球体へと軸索を投射する。これに対応するように、PN樹状突起もそれぞれの糸球体に特異的に投射することが知られている。このようにORN軸索、PN樹状突起がそれぞれ特異的な糸球体へ投射しシナプスを形成することにより特徴的な「1(種類)対1(種類)」のシナプス結合を実現している(図1右)。更に、遺伝学的モザイク法(MARCM法)を適応することにより、生体内の1細胞をラベルし、更に「そのラベルされた細胞」のみを突然変異ホモ接合体にすることが可能になる。この方法により、脳内において1つの神経細胞の樹状突起・軸索の形態を詳細に解析する事が可能に



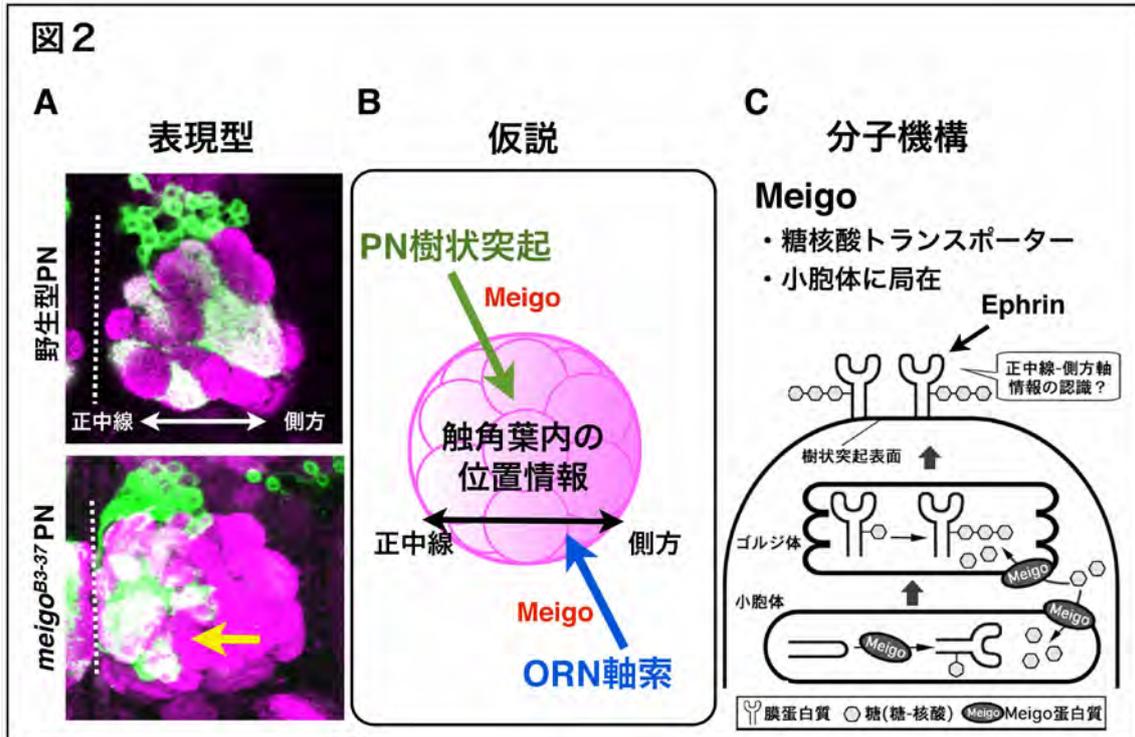
なる。このように定性・定量的な解析、及び脳内における単一細胞モザイク解析が可能なORN-PN神経回路は、神経回路形成を研究する上で非常に有用なモデル系となる。

私は、遺伝学的モザイクスクリーニングを行い、樹状突起ターゲティングに異常を示す変異

体 *meigo* (*medial glomeruli*) 及び *dogi* (*doubled glomeruli*) の取得に成功していた。よって、これら変異体の解析を進めることによって触角葉神経回路を構成する神経突起の伸長、分岐、ターゲティングに関する分子機構解明を試みた。

2) 小胞体ストレス関連分子 Meigo は、Ephrin の糖鎖修飾を制御し、ORN 軸索、PN 樹状突起のターゲティングを制御する

MARCM 法により PN を *meigo* 変異ホモ接合体にした場合(*meigo*⁺ PN)、その樹状突起はすべて正中線側へシフトした(図 2A)。更に *meigo*⁺ ORN を作成した場合も、ORN 軸索は正中線側へシフトした。これらの結果から「触角葉内には正中線・側方軸方向の軸情報があり、ORN 軸索、PN 樹状突起はそれら位置情報を利用して最終的な糸球体を選び出していること」、及び

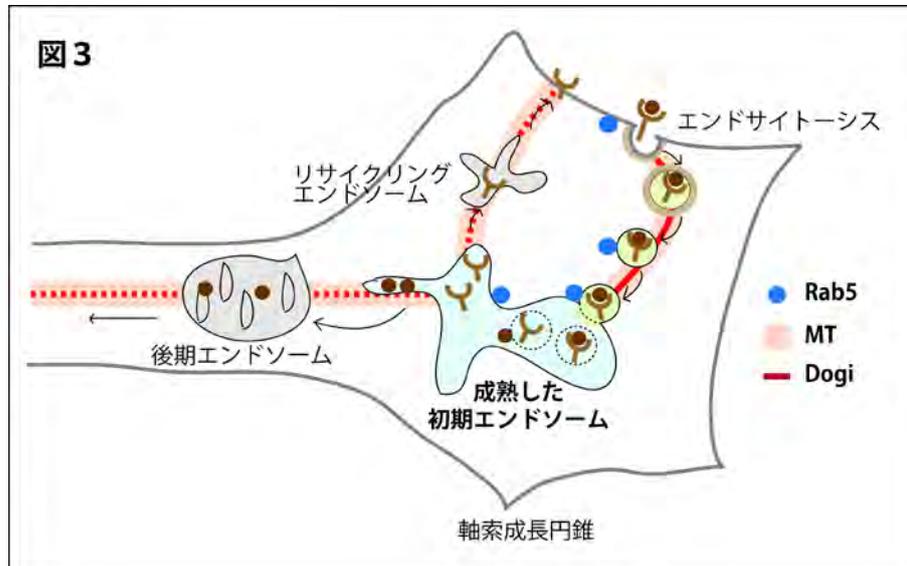


「*meigo*⁺神経細胞では、この位置情報認識に異常があること」が想定される(図 2B)。*meigo* 変異の原因遺伝子は、小胞体中存在する糖核酸トランスポーター様分子であり、小胞体ストレスによって発現誘導される。私は「Meigo は、小胞体において神経突起ターゲティングに必要な膜分子の修飾に影響し、その結果として神経突起ターゲティング制御に関わっている」と仮説を立て、*meigo* 変異と遺伝学的に相互作用する細胞膜表面分子を検索した。その結果、PN 樹状突起ターゲティングに関して *meigo* 変異と強く遺伝学的相互作用する因子として Ephrin を見出した。更に、遺伝学的・生化学的解析を進めた結果、① Ephrin は 4 カ所で N 型糖鎖修飾を受けること、② Ephrin 上の N 型糖鎖修飾は Ephrin の機能発揮に必要であること、③ Meigo の量に対応して、Ephrin N 型糖鎖修飾の程度が変化すること、を見出した。すなわち、小胞体膜上に存在する Meigo は、Ephrin の N 型糖鎖修飾を介して Ephrin の機能を調節し、神経回路形成に寄与していることが明らかになった(図 2C)。これまで Ephrin の糖鎖修飾に関してその可能性は示唆されていたものの、生化学的・遺伝学的検証を行われておらず、今回の研究結果は、Ephrin 機能に対する新たな制御機構を提示するものである(*Nat Neurosci*,2013)。

3) 軸索突起の伸長には、Dogi-Dynactin 複合体を介した初期エンドソームの輸送・成熟が必要である

dogi⁺ PN は、「樹状突起の過剰な分岐」、及び「軸索長の短縮」という表現型を示す。*dogi* 変異の責任遺伝子 *dogi* がコードする蛋白質は、進化的に高度に保存されているにも関わらず、既知の機能ドメインを持たないため蛋白質構造からの機能予測は困難であった。Dogi の分子機能を明らかにする目的で Dogi に対する Yeast Two-Hybrid スクリーニングを行ったところ、Glued を見出した。Glued は、p120^{Glued} のショウジョウバエオソログであり、Dynein モーター蛋白質を制御する Dynactin 複合体の重要なサブユニットの1つである。事実、*dogi*⁺ PN 内ではシナプトタグミンの輸送に異常が見られ、軸索中間部にシナプトタグミン蛋白質の異常蓄積が観察された。ま

た軸索突起伸長に関して、*dogi* 変異と *Glued* 変異は強く遺伝学的相互作用を示した。では、*dogi*⁺ PN 内では、どのような物質輸送が異常になった結果、軸索伸長異常が起きているのだろうか？私は以下に示す理由に基づいて、「初期エンドソームの輸送異常」が結果的に軸索突起伸長に影響を与えているとの仮説を立てた。まず、第一の理由として、軸索突起伸長に必要な膜受容体の活性化にはエンドサイトーシスによる膜受容体の取り込みが必要であることが知られている。第二に、初期エンドソームの適切な輸送は、樹状突起の形態形成に必要であるという報告もある。よって次に、*Dogi* が初期エンドソームに与える影響を解析する目的で、S2 細胞で *dogi* をノックダウンし、様々な初期エンドソームマーカーを調べた。その結果、*dogi* ノックダウン細胞では、エンドサイトーシス自体は起こるものの、その後の初期エンドソームの輸送異常、形態異常が検出された。一般に初期エンドソームは、細胞膜近傍に形成された後、Dynein 依存的な輸送により細胞核近傍まで輸送され、その過程で融合を繰り返し成熟初期エンドソームになる(図 3)。しかし、*dogi* ノックダウン細胞では、形成された初期エンドソームは長期間細胞形質膜の近傍に留まり、またそれらエンドソームのサイズは小さかった。すなわち、*dogi* ノックダウン細胞では、初期エンドソームの成熟過程が異常になっていることが明らかになった。次に、初期エンドソーム成熟異常が軸索伸長に影響している



かを調べる目的で、初期エンドソームの融合・成熟を制御する Rab5 の活性化型を *dogi*⁺ PN に発現させ軸索の長さを定量した。その結果、活性化型 Rab5 を発現していない *dogi*⁺ PN に比べて、顕著に伸長していた。以上の結果は、進化的に保存された機能未知蛋白質 *Dogi* による軸索伸長制御機構を提示すると同時に、軸索突起伸長における初期エンドソーム成熟の重要性を示す初めての結果である(図 3)(論文投稿中)。

3. 今後の展開

今回の研究により、ショウジョウバエ嗅覚一次中枢を構成する触角葉神経回路において、ORN 軸索と PN 樹状突起が触角葉内の適切な糸球体でシナプス接合するためには *Meigo* 依存的な *Ephrin* の機能調節が必要であることが明らかになった。しかし、*meigo* と *ephrin* の変異体表現型から、*Meigo* が機能調節する蛋白質は *Ephrin* だけではないことが予想される。今後は、*Ephrin* 以外のどのような蛋白質が *Meigo* によって機能調節されているか、そしてそれらがどのように神経突起ターゲティングに関わっているか解析を進めていく。

Dogi による軸索突起伸長の制御には、初期エンドソーム成熟が関わっていることが明らかになった。一方、Dogi による樹状突起分岐制御に関する分子機構は未だ不明である。今後は、樹状突起における Dogi の役割についても解析を進める。更に、Dogi の解析過程で Dogi はシナプス部位にも局在していることを見出している。よって、神経回路形成の後の「シナプス形成時における Dogi の役割」についても解析を進める。

本研究結果により、Ephrin/Eph システムが神経地図形成に重要な機能を担っている可能性を示唆された。その後の研究により、Ephrin/Eph システムが神経地図の発生、雌雄差、進化などにも関わっていることが分かってきている(研究者未発表)。今後は、Ephrin/Eph と神経地図の関係についても精力的に研究を進め、神経地図発生の理解を深めていく。

4. 自己評価

今回得られた研究結果は、神経地図の発生を理解する上で有用である。神経地図とは、神経樹状突起、軸索が脳内の特定の部位にシナプス領域を形成することによって生じる。神経地図形成のモデルシステムとして利用する「触角葉」において機能している分子 (Meigo, Dogi, Ephrin)を知り、その発生様式の素過程(触角葉内における軸情報の存在など)を理解することは、今後、神経地図発生の理解を進めていく上で避けては通れないステップである。よって本研究は、今後の神経地図発生研究において重要な礎を築いたと言える。なお、上記研究結果に関して論文1報(責任著者)の発表が確定し、更に論文2報を責任著者として国際科学雑誌に投稿済み・審査中である。

5. 研究総括の見解

神経回路を構成するシナプスの形成場はその神経組織の細胞群の遺伝子発現による規定を受ける。個々の神経細胞レベルでの遺伝子操作が容易なショウジョウバエの一次嗅覚中枢(触角葉)に着目して、先に見出した神経投射異常に関わる2個の分子 Meigo と Dogi の解析を行った。*meigo* 変異の原因遺伝子は、小胞体に存在する糖核酸トランスポーター様分子であるため、Meigo は、小胞体において神経突起ターゲティングに必要な膜分子の修飾に影響し、その結果として神経突起ターゲティング制御に関わっているとの仮説のもとに、*meigo* 変異と遺伝学的に相互作用する細胞膜表面分子として軸索ガイダンス因子のひとつである Ephrin を見出した。一方 Dogi についてはその結合相手が軸索輸送に関わる Glued であることを発見して、実際にモデル細胞で Dogi のノックダウンによる初期エンドソーム輸送の異常を観察することに成功した。これらは、正確な神経投射には初期エンドソームの輸送・成熟が必要であることを明らかにした最初の結果であり、高く評価される。また、世界的にも高く評価され、論文が受理された。今後これらの分子機構の解明が進むとともに、特異的シナプス形成との関連についても進展が期待される。

6. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

Sayaka Sekine, Shuka Haraguchi, Chao Kinhong, Tomoko Kato, Liqun Luo, Masayuki Miura and Takahiro Chihara. Meigo governs dendrite targeting specificity by modulating Ephrin level and *N*-glycosylation. *Nat Neurosci* 16, 683-691 (2013)

(2) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

Takahiro Chihara “脳内単一脳細胞モザイク解析法を用いて神経回路形成を理解する”、Symposium on “Biological Sciences” at Kumamoto University, Oct 16th, 2009, Kumamoto, Japan(口頭発表)

Sayaka Sekine, Liqun Luo, Masayuki Miura and Takahiro Chihara, “Dendritic and axonal targeting along medial to lateral axis in the antennal lobe are regulated by Meigo, a putative UDP-sugar transporter”, The 51st Annual *Drosophila* Research Conference, April 7th-11th, 2010, Washington DC, USA(ポスター発表)

Chisako Ando, Liqun Luo, Masayuki Miura and Takahiro Chihara, “Neuronal wiring in the olfactory system requires a novel targeting molecule, Dogi”, The 13th European *Drosophila* neurobiology conference, Sep 1st-5th, 2010, Manchester, UK(ポスター発表)

Sayaka Sekine, Liang Liang, Miki Hino-Yamamoto, Satoshi Goto, Hideyuki Okano, Liqun Luo, Masayuki Miura and Takahiro Chihara, “Nucleotide sugar transporter Meigo regulates both dendrite and axon targeting of synaptic partners through Ephrin signaling in the olfactory system”, 53rd Annual *Drosophila* Research Conference, March 7th-11th, 2012 Chicago, USA(ポスター発表)

Takahiro Chihara “ER homeostasis and vesicle trafficking for the olfactory wiring specificity in *Drosophila*” 45rd Annual meeting for the Japanese society of developmental biologists & The 64th annual meeting of the Japan society for cell society, May 30th, 2012, Kobe (口頭発表)

Chisako Sakuma, Vladimir I. Gelfand, Liqun Luo, Masayuki Miura and Takahiro Chihara “Neurite branching and elongation are regulated by Dogi, a novel microtubule interacting protein”, 14th European *Drosophila* Neurobiology Conference, Sep 3rd-7th, 2012, Padua, Italy (ポスター発表)

