

## 研究課題別評価書

### 1. 研究課題名

脳神経ネットワークの形成における脂質機能の網羅的解析

### 2. 氏名

榎本 和生

### 3. 研究のねらい

我々の脳では、1000 億個ものニューロンが、軸索と樹状突起という機能・形態的に異なる2種の神経突起を介してネットワークを形成している。脳神経ネットワークが正しく構築される為には、ニューロンが神経突起を適切な方向に伸長・分岐させることが必須である。アルツハイマー病やダウン症候群など精神疾患患者の脳では、神経突起の構造や分岐の異常が頻繁に観察されることから、神経突起の形態異常に起因する神経回路の破綻が発症の主因である可能性が指摘されている。従って、生体脳内における神経突起形成の分子基盤を明らかにすることは、精神疾患発病のメカニズムを理解し、予防や治療の手がかりを得る上でも重要である。一方で、脂質代謝機構に異常が生じると、神経突起の形成不全を伴う精神疾患を発症する確率が高いことから、脂質が神経突起形成において重要な機能を果たしていることが予想されているが、その機能メカニズムについては不明な点が多い。本研究では、ショウジョウバエを個体モデルとして、脳神経系の多様な脂質代謝物を生み出す分子基盤を網羅的に同定するとともに、その神経突起形成における機能を解明することを目的とした。更に、脂質代謝物の動態や神経機能を生体脳内において直接評価するための新技術を創出することにより、脂質による脳神経ネットワーク形成制御機構を総合的に理解することを目指した。

### 4. 研究成果

#### (1) 感覚ニューロン樹状突起の形成・維持・再編に関わる脂質代謝酵素群の網羅的同定

ゲノムワイド in situ ハイブリダイゼーション法を用いて、脳神経系に発現する脂質代謝関連遺伝子群を同定した。これに並行して、誘導型 RNAi システムを用いて、樹状突起形成に働く脂質代謝関連遺伝子群の網羅的同定を試みた。誘導型 RNAi とは、個々の遺伝子に対する RNAi コンストラクトを組み込んだショウジョウバエ系統のことであり、Gal4/UAS システムと併用することにより、時期および細胞特異的に特定遺伝子の機能を抑制することが可能となる。具体的には、それぞれの脂質代謝酵素に対応する RNAi コンストラクトを、感覚ニューロン特異的に発現させたときに、樹状突起の「伸長」、「分岐」、「停止」、「シナプス形成」の各ステージに特異的な表現型をしめす遺伝子群を抽出した。まず、ショウジョウバエ神経系に発現することが確認できた脂質関連遺伝子の中で、(1)動物培養細胞等ですでに性状解析されている脂質代謝酵素群(約 150 遺伝子)と、(2)既存の脂質代謝酵素群と一定のホモロジーを有するが機能未知である遺伝子群(約 500 遺伝子)にグループ化し、(1)に属する遺伝子群から優先的に RNAi 解析を行なった。これまでに、(1)グループに属する遺伝子群すべてと、(2)グループ群に属する遺伝子群の一部(約 200 遺伝子)のスクリーニングが終了し、約 10%にあたる 41 遺伝子(「伸長」25 遺伝子;「停止」11 遺伝子;「シナプス形成」5 遺伝子)において特徴的な表現型が観察された(図1)。

#### (2) イノシトールリン脂質代謝とTORキナーゼによる樹状突起伸長・分岐と領域化の制御

上記の RNAi 解析において「伸長・分岐」に顕著な表現型を示す遺伝子群の中には、ホスファチジルイノシトール(PI)代謝経路に関わる因子群が多数含まれることに着目し、遺伝子欠損変異体(null 変異体)を用いて PI 代謝と樹状突起形成との関連に付いて更なる検討を行った。その結果、脂質メディエーターPIP3 産生の律速酵素である PIP3 キナーゼの変異株では樹状突起の長さと同分岐数がともに激減し、逆に PIP3 分解酵素である PTEN ホスファターゼの変異体では樹状突

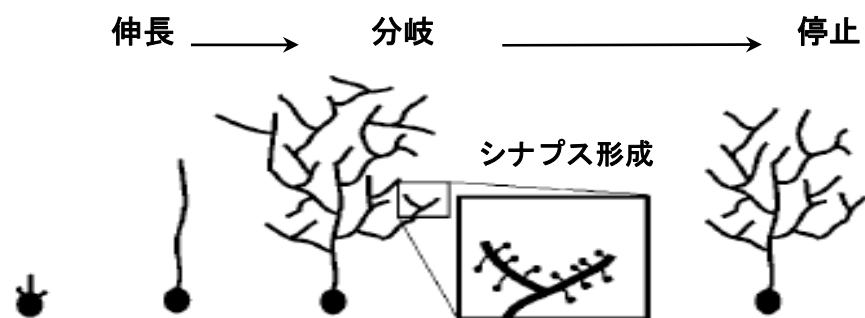


図1 神経突起形成の概念図

神経突起形成は、主として突起の「伸長」、「分岐」、「停止」という3ステージから成り、その間に「シナプス形成」が行われる。本研究では、それぞれのステップにおいて特異的に機能する脂質産物の同定を目指す。なお、本モデルでは、樹状突起形成のみを示している。

起の長さや分岐数が大幅に増加していた。従って、PIP3 産生が樹状突起の分岐・伸長制御に必須であることが示された。更に、PIP3 の主要な下流エフェクター因子群として Akt キナーゼと TOR (Target of Rapamycin) キナーゼを同定した。近年 TOR キナーゼは2種の異なる複合体を形成することが報告されている(図2)。TOR が Raptor へと形成する TOR 複合体 1 (TORC1) は S6K を直接的な基質とし、翻訳制御を介して細胞増殖を促進する。一方で、TOR が Sin1 や Rictor などと形成する TOR 複合体 2 (TORC2) は細胞骨格制御を担うことが提唱されている。そこで、樹状突起形成における各複合体の機能を個別に解析したところ、TORC1 は突起伸長・分岐に必須であり、TORC2 は突起伸長の領域化(樹状突起の大きさが一定値に達すると突起伸長を停止する)に必須であることが明らかとなった(図2)。つまり、TORC1 は PIP3→Akt 経路の下流で樹状突起の伸長・分岐を促進するのに対して、TORC2 は PIP3→Akt 経路に対してネガティブに働きかけることが示された。これらの結果から、TOR キナーゼが、樹状突起の「伸長・分岐(=アクセル)」と「停止(ブレーキ)」を協調的に制御するための「クラッチ」のような役割を果たす事により、樹状突起の大きさが一定に保たれるという作動モデルを提唱するに至った(EMBO J. 2009)。

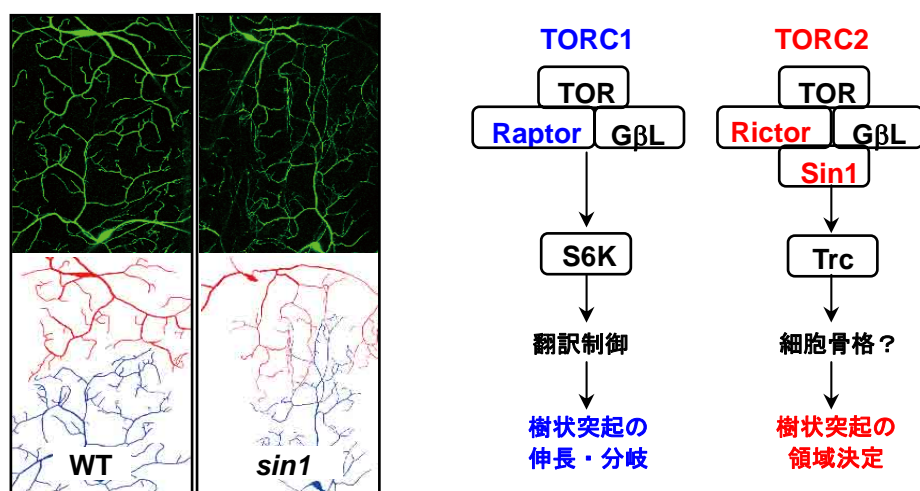
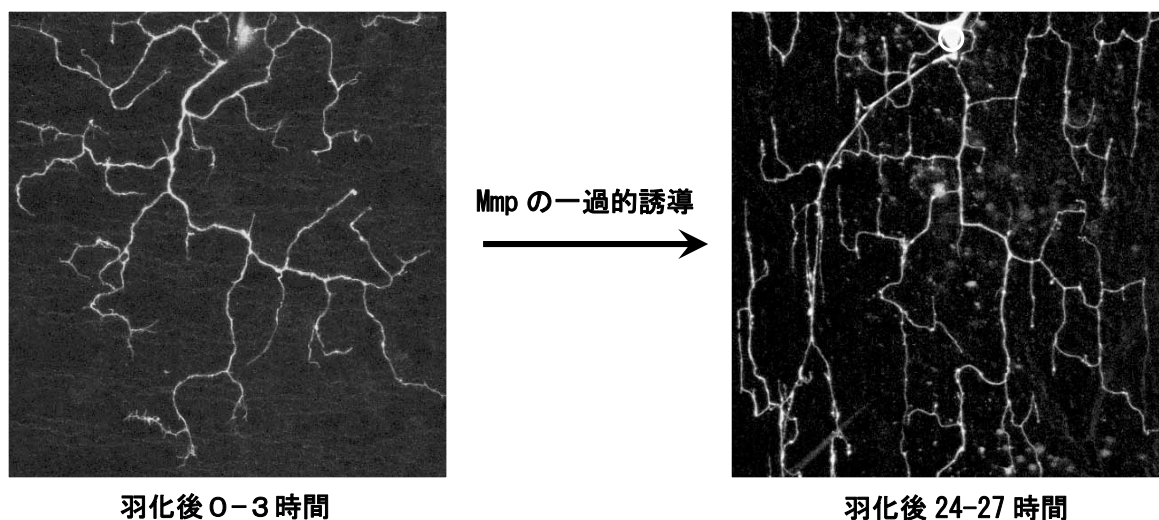


図2 TOR キナーゼは2つの複合体を介して、樹状突起の「伸長・分岐」と「領域決定」を制御する  
左図: 正常体 (WT) では樹状突起間に重なりがなくタイル状に配置されるのに対して、TORC2 に異常をきたす変異体 (*sin1*) では、適切な位置で伸長・分岐を停止できない為にタイル状の領域形成ができない。右図: ニューロンでは、TORC1 は翻訳制御を介して樹状突起の伸長・維持を司るのに対して、TORC2 は突起の伸長・分岐を制限することにより領域決定を行なう。

### (3) 樹状突起の再編(リモデリング)を制御する細胞外マトリックス代謝

神経突起を介したニューロン間ネットワークは、ヒトでは胎生後期から生後にかけて構築されるが、各ニューロンが神経活動を開始すると、神経活動依存的な配線の切り替えが頻繁に行われる。特に、視神経や体性感覚神経などの感覚ニューロンは、外界からの入力に依存して樹状突起形態を大きく変化させることで、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リモデリングは、神経回路が機能的に成熟するための必須ステップであるが、簡便な解析システムが確立されていないために、その制御機構に関してはほとんど明らかにされていない。私達は、ショウジョウバエ腹部に位置する感覚ニューロンの樹状突起が、ハエ成虫が羽化してから 24 時間以内に、放射状から梯子状へと劇的にリモデリングすることを見出した(図3)。羽化後 24 時間は、ハエ成虫が、温度・匂い・機械刺激など様々な外界情報を受容し始める時期であり、感覚ニューロンにおいて感覚刺激依存的な神経活動(sensory-evoked neural activity)が急激に上昇する時期と合致する。したがって、私達が見出したショウジョウバエ感覚ニューロンの樹状突起リモデリングは、外界からの感覚入力依存的な樹状突起リモデリングの分子メカニズムを遺伝学的に解明するための有用な解析モデルとなると考えられた。そこで RNAi ノックダウン法を用いて樹状突起リモデリングに必須な遺伝子の網羅的検索を行い、細胞外マトリックスの分解酵素である Matrix metalloproteinase (Mmp)を同定した。続いて、Mmp の発現が樹状突起リモデリングの時期にあわせて一過的に上昇こと、誘導された Mmp は感覚ニューロン周辺の細胞外基質を限定分解することにより樹状突起リモデリングを促すことを明らかにした。これらの結果は、細胞外マトリックスの限定分解が、樹状突起リモデリングの基本制御メカニズムである事を初めて示した成果である(*Developmental Cell* in press)。



**図3 ショウジョウバエ成虫羽化後 24 時間以内に起きる樹状突起リモデリング**

蛹から羽化直後のショウジョウバエ腹部感覚ニューロンの樹状突起は放射状に配置されている(左)が、同じニューロンを 24 時間後に観察すると、その形態は梯子状へと大きく変化していた(右)。この樹状突起リモデリングは、細胞外マトリックス分解酵素 Mmp が一過的かつ局所的に誘導されることにより、感覚ニューロン近傍の細胞外マトリックスが限定分解されることにより引き起こされる。

## 5. 自己評価

ショウジョウバエ遺伝学を駆使することにより、樹状突起の形成・維持・再編制御における脂質

代謝の位置づけを明確にすることができた。まず、イノシトールリン脂質代謝産物 PIP3 の下流において TOR キナーゼが機能すること、さらには TOR を含む2つの複合体 (TORC1 と TORC2) が、樹状突起形成において相反する制御を行なうことを発見した。TORC1 と TORC2 は翻訳レベルや翻訳後修飾レベルなど複数の異なる階層において互いにネガティブなクロストークを行なうことが知られている。これらの結果から、TORC1 と TORC2 のクロストークを介して、樹状突起の「伸長・分岐」と「領域化 (樹状突起の大きさが一定値に達すると突起伸長を停止する)」が協調的な制御を受け、最終的に樹状突起の大きさ (受容領域) を一定に保つことができるという作動モデルが考えられた。脳内の各ニューロンは、それぞれの機能に応じて適切な大きさの受容領域を作り上げるが、その制御機構は不明であった。本成果により、樹状突起の大きさを制御する分子機構の一端をはじめて明らかにできたと考えている。

次に、ショウジョウバエ成虫初期において、樹状突起が劇的にリモデリングすることを発見した。これまでにマウスやネコ等をモデルとして樹状突起リモデリングの存在とその重要性が示唆されてきたが、分子遺伝学的解析が困難であるために、樹状突起リモデリングの制御メカニズムについてはほとんど理解されていない。本研究において見出されたショウジョウバエ感覚ニューロンの樹状突起リモデリングは、様々な点においてマウスやネコに見出されたりリモデリングと相同であることから、分子遺伝学的な解析モデルとして有用であると考えられる。

## 6. 研究総括の見解

ショウジョウバエ遺伝学を駆使し、イノシトールリン脂質 PIP3 の下流で TOR キナーゼが機能し、TOR を含む2つの複合体が樹状突起形成において相反する制御を行うこと、細胞外マトリックスの限定分解が樹状突起リモデリングの基本制御メカニズムであることなど、計画に沿った独創性の高い研究成果を挙げた。これらは国際的にも高く評価されるものである。今後は、脂質分子の *in vivo* イメージングなどにより、神経機能における脂質代謝物の役割が更に解明されることを期待する。また、これらの研究がヒトを含む高等動物での研究へと発展し、精神疾患の病因解明と治療法開発に発展することを期待する。

## 7. 主な論文等

### A. さきがけ個人研究者主導で得られた成果で主なもの

#### ①論文 \*corresponding author

1. Koike-Kumagai, M., Yasunaga, K., Morikawa, R., Kanamori, T., and \*Emoto, K. : Target of rapamycin complex 2 controls dendritic tiling of *Drosophila* sensory neurons through the Tricornered kinase signaling pathway. *The EMBO Journal* 28: 3879 – 3892 (2009).
2. Yasunaga, K., Kanamori, T., Morikawa, R., Suzuki, E., and \*Emoto, K. Dendrite reshaping in adult *Drosophila* sensory neurons requires matrix metalloproteinase-mediated modification of the basement membranes. *Developmental Cell* in press.
3. \*Emoto, K. : Genetic control of dendritic patterning in *Drosophila* sensory neurons. *Dev. Growth Differ., Review* in press.

#### ②受賞

1. 平成 18 年度日本生化学会奨励賞 (2006 年 10 月 27 日)
2. 平成 20 年度文部科学大臣表彰若手科学者賞 (2008 年 4 月 15 日)

#### ③著書

1. 榎本和生:「ニューロンはいかにして固有の受容領域を獲得し、それを維持・管理するのか?」蛋白質核酸酵素 54: 842-852 (2007).
2. 榎本和生:「リン脂質分子の膜動態と細胞骨格制御」生化学 80:811-819 (2008).
3. 榎本和生:「神経突起のパターン形成」特集:神経系の発生とその異常」BRAIN and NERVE 60: 351-364 (2008).
4. 金森崇浩・榎本和生:「脂質代謝物による細胞分裂の時空間制御」ファルマシア 44:1157-1160 (2008).

#### ④招待講演

1. Emoto, K.: How do neurons establish and maintain their unique dendritic fields? **NAIST International Symposium “Cell Signaling”** 2008.11.3–5, Nara
2. Emoto, K.: The molecular mechanisms that regulate establishment, maintenance, and remodeling of dendritic fields. **The 1<sup>st</sup> iCeMS Symposium** 2008.2.20–22, Kyoto

B. 本研究課題に関連した成果で主なもの

①論文

1. Soba, P., Zhu, S., Emoto, K., Younger, S., Yang, S.J., Yu, H.H., Lee, T., Jan, L.Y., and Jan, Y.N.: *Drosophila* sensory neurons require Dscam for dendrite self avoidance and proper dendritic organization. **Neuron** 54: 403–416 (2007).
2. Parrish, J. Z., Emoto, K., Jan, L., and Jan, Y. N.: Polycomb genes interact with the tumor suppressor *hippo* and *warts* in the maintenance of *Drosophila* sensory neuron dendrites. **Genes Dev.** 21: 956–972 (2007).