

晩発性神経変性を防ぐ機構：高解像度網羅的な遺伝子探索系を用いた解析

京都大学大学院 生命科学研究所 細胞認識学分野
上村 匡

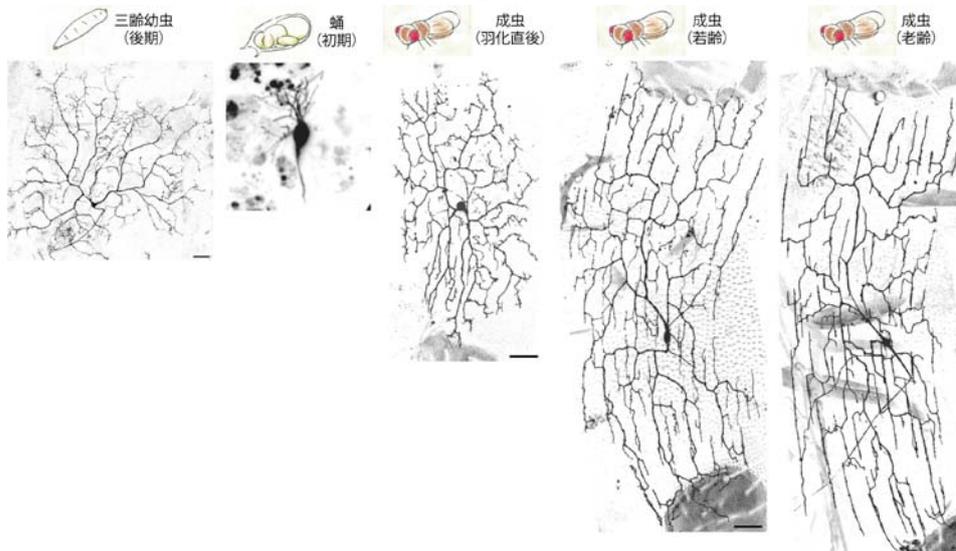
1. はじめに

特殊機能を担うように分化した細胞の中には、何週間、あるいはさらに長期にわたって機能する細胞群がある。その中でも、一部の神経細胞（ニューロン）はその長く複雑な突起を大胆に刈り込み、今度は異なるパターンで伸長させた上で、生存し機能し続ける。どのような遺伝子プログラムが働いて、そのような「モデルチェンジ」と「長寿」は達成されているのだろうか。

神経細胞は高度に極性化された細胞であり、二種類の特徴的な突起を発達させて神経回路を形成する。その一つが樹状突起であり、シナプス入力あるいは感覚入力の受容や処理に特化している。初期発生において形作られた神経回路は、発生のより後期に再編成されて動物の様々な行動を支える。この再編成の一つの様式として、樹状突起の形態変化（リモデリング）があり、作りかえられた突起パターンはその後長期間、場合によっては個体の一生を通して維持される。これらの維持機構は神経回路の正常な機能に重要であり、加齢に伴って維持機構が破綻することが晩発性神経変性疾患の要因として考えられている。しかし、高度に極性化した神経細胞をモデル系として、個体の加齢に伴って起きる異常を簡便に、感度よく検出できる実験系がほとんどなかったことから、神経突起変性に関わる遺伝子群を体系だって探索することは困難だった。

我々は、樹状突起のリモデリングや維持を単一細胞レベルの解像度で解析するモデル系として、ショウジョウバエの感覚細胞である dendritic arborization (da) neuron に着目した。da neuron は、我々や他のグループによって胚や幼虫期において詳しく研究されており、細胞体から軸索と樹状突起が別々に伸長し、後者は複雑に分岐する。我々は、まず幼虫期において da neuron の樹状突起形成に重要な役割を果たす遺伝子を発見した (Sato et al., 2010; Matsubara et al., 2011)。次に、幼虫期から成虫期にわたるホルマウント観察により樹状突起のリモデリングを容易に可視化できることを示し、成虫における個々の da neuron を同定した。さらに一部の細胞では、個体の一生を通して樹状突起が維持されることを定量的に示し、樹状突起のリモデリングや維持を研究する有用なモデル系となることも明らかにした (図1; Shiono et al., 2009)。

図1：幼虫期、蛹期、そして成虫期を通じた da neuron の樹状突起パターン



2. 方法

我々は大規模な突然変異スクリーニングを実現するために、ショウジョウバエで発達したモザイク法を改良し、da neuronにおいて簡便にかつ効率よく遺伝子の機能をノックアウトする方法を開発した (Matsubara et al., 2011)。この方法を用いた大規模な遺伝学的スクリーニングを行い、樹状突起のリモデリングや維持に異常を生じる変異体を分離し、それらの変異体の原因遺伝子の解析を通して、樹状突起リモデリングや維持の分子機構の解明を目指している。

突然変異探索の対象として、ショウジョウバエ遺伝資源センターで維持されている、トランスポゾンの挿入によって突然変異を誘発した系統のコレクションを利用する (約2000系統)。これらの系統はただちにモザイク解析に使えるようにデザインされている。ストックセンターから順次取り寄せた後、我々が開発した系統と交配すれば、次の世代で da neuronを突然変異のホモ接合体にすることができ、かつその da neuron だけが蛍光タンパク質を発現する仕掛けになっている。次世代の成虫をホールマウントのままに観察し、樹状突起の形状が示す表現型を検出する。まず一次スクリーニングにおいては、老齢個体を観察し、突起形態に異常を示す変異系統を分離する。次に二次スクリーニングとして、それらの変異体が若齢個体においても異常を示すかどうか、もし示すとすればどのような異常であるかを調べる。若齢個体での表現型が老齢個体に比べて軽度か、もしくはほとんど検出できない挿入系統を絞り込む。

3. 結果

これまでに約1500系統について一次スクリーニングを終え、老齢個体において重篤な表現型を生じる20株を分離している (図2に例を示す)。候補遺伝子 (トランスポゾンの挿入位置に存在する遺伝子) の中には、膜輸送を制御するタンパク質や細胞骨格系の調節因子など、樹状突起パターン形成に関わる既知の遺伝子が含まれていた。一方で、機能未知の産物をコードする遺伝子も含まれていた。新規遺伝子に注目し、まず、これらの遺伝子へのトランスポゾンの挿入が表現型の原因であるかを調べた。具体的には、ノックアウトショウジョウバエなどの既知の変異体の解析や、復帰突然変異を作製し表現型が回復するかを調べたところ、ノックアウトショウジョウバエは表現型を示さず、復帰突然変異体では依然として表現型が確認された。これらの結果は、表現型がトランスポゾンの挿入によって起きたのではなく、同じ染色体上に存在するbackground mutationが原因であることを強く示唆している。そこで原因遺伝子の同定を目指し、従来の遺伝学的方法を用いた方法と、近年急速に発達した次世代シーケンサーを用いた方法を併用して、原因遺伝子を迅速に同定することを試みている。

シーケンス解析に十分な品質のゲノムDNAの調製方法を確立し、2系統について全ゲノム塩基配列を決定した後、それぞれに特有のcoding sequence (CDS) 内多型の検出を試みた。これらの系統は互いに異なる表現型を示すことなどから、原因遺伝子が異なる事が予想された。このうちの一系統について、従来のマッピング法により絞り込んだ約400 kbの領域内に2個のCDS内多型の候補を見いだした。次世代シーケンサーで得られた元データを検討したところ1つは false positive であったので、原因変異の有力候補を残り一つに特定できた。この多型は一塩基の欠失であり、サンガー法でも確認できた。もう一株の突然変異体ではCDS内多型を検出できなかったため、イントロン内やスプライシングサイトの変異を探索している。

網羅的なスクリーニングを進める一方で、神経変性疾患に関わる既知の遺伝子の解析も行った。現時点で、ユビキチン・プロテアソーム系の関連遺伝子の変異体において、加齢とともに da neuronの樹状突起が退縮することを明らかにした。この結果により、da neuronが樹状突起維持機構を研究する有用なモデル系であることを改めて確認できた。

4. まとめ

我々が独自に開発した方法により、効率よくスクリーニングを進めることができ、樹状突起のリモデリングや維持に異常をきたす変異体を多数単離することができた。候補遺伝子の中には、既知の樹状突起パターン形成関連遺伝子が含まれていたことから、我々のスクリーニング系は問題なく機能していることが示唆された。一方で、樹状突起パターン形成との関連が報告されていない遺伝子も候補に含まれており、これらの遺伝子の解析を通して、樹状突起リモデリングや維持の新たな分子機構を明らかにできることが期待される。また、既知の神経変性疾患関連分子の解析から、ユビキチン・プロテアソーム系が樹状突起パターンの維持に重要である可能性が示唆された。この結果は、ヒトまで保存された樹状突起維持機構の解明に、我々のモデル系が有用であることを示唆しており、スクリーニングで得られた候補遺伝子の解析を通して、「神経細胞を健康に長生きさせる仕組み」が明らかになると期待される。

5. 発表論文、参考文献

Kohei Shimono, Azusa Fujimoto, Taiichi Tsuyama, Misato Yamamoto-Kochi, Motohiko Sato, Yukako Hattori, Kaoru Sugimura, Tadao Usui, Ken-ichi Kimura, and Tadashi Uemura. Multidendritic sensory neurons in the adult *Drosophila* abdomen: origins, dendritic morphology, and segment- and age-dependent programmed cell death. *Neural Development*, 4: 37 [21 pages] (2009).

Daichi Sato, Kaoru Sugimura, Daisuke Satoh, and Tadashi Uemura. Crossveinless-c, the *Drosophila* homolog of tumor suppressor DLC1, regulates directional elongation of dendritic branches via down-regulating Rho1 activity. *Genes to Cells*, 15: 485–500 (2010).

Daisuke Matsubara, Shin-ya Horiuchi, Kohei Shimono, Tadao Usui, and Tadashi Uemura. The Seven-pass transmembrane Cadherin Flamingo Controls Dendritic Self-avoidance via its Binding to a LIM Domain Protein Espinas in *Drosophila* Sensory Neurons. *Genes & Development*, 25: 1982-1996 (2011).