

論文の内容の要旨

論文題目

チューブリン折りたたみ補因子 TBCD と Dscam による 神経形態制御機構の解明

奥村 美紗子

【序】

機能的な神経回路の形成には、神経細胞の軸索と樹状突起が正しく配線する必要がある。その過程において、軸索と樹状突起は種々の細胞膜分子やガイダンス受容体によって周囲の情報を認識し、下流のシグナル経路に伝達することによって、細胞骨格分子のダイナミクスを制御している。これまでの研究によりアクチンのリモデリングに関わるガイダンス受容体は同定されているが、微小管関連因子がどのようなガイダンス受容体やその下流のシグナルによって制御されているのかはほとんど解明されていない。本研究ではショウジョウバエ嗅覚系神経回路をモデルに用いた。単一細胞レベルの神経形態の解析により、チューブリン折りたたみ補因子 D (*tubulin folding cofactor D* (TBCD))がダウン症細胞接着分子(*Down syndrome cell adhesion molecule* (Dscam))と相互作用し、神経突起形成に必要であることを示した。

【方法と結果】

1. TBCD 変異投射神経は軸索退縮と樹状突起の枝分かれに異常を示す

遺伝学的モザイク解析法(MARCM 法)を用いることによって、神経細胞の形態を脳内において、単一細胞レベルで可視化することが可能であり、さらに目的の遺伝子を変異ホモ接合体にすることが

できる。私は本学修士課程において投射神経の形態形成に関わる分子を同定するために、候補遺伝子として *dachsous* (*ds*)の変異体表現型解析を行った。ショウジョウバエの嗅覚系投射神経の樹状突起は触角葉に存在する約50個の糸球体のうち、単一の糸球体へと投射している(図1A)。一方 *ds* 変異ホモ接合体投射神経(*ds^{UA071}* PN)では、樹状突起は正しい糸球体だけでなく、別の糸球体へも投射していた。また、野生型投射神経(WT PN)の軸索はキノコ体、側角へと伸長し、側角においてL型の枝分かれを持つが(図1B)、*ds^{UA071}* PNでは軸索がキノコ体や側角まで伸長せず短かった。しかし、(1)野生型の *ds* を *ds^{UA071}* PN に発現させても表現型を抑制しなかったこと、(2) *ds^{UA071}* アリルと野生型アリルを用いて染色体組み換え系統を複数樹立した際、*ds* 変異を持たない系統も投射神経に表現型を示したこと、(3)他の *ds* 変異系統では投射神経の形態に異常が生じなかったことから、*ds^{UA071}* PNにおける表現型は *ds* の変異によるものではなく、バックグラウンドに存在する他の遺伝子の変異によるものと考え、原因遺伝子の同定を行った。マッピングによりチューブリン折りたたみ補因子D (*tubulin folding cofactor D* (*TBCD*))が原因遺伝子であることを見いだした。微小管は α -チューブリンと β -チューブリンの二量体が重合して形成される。*TBCD*は5つのチューブリン折りたたみ補因子の1つであり、 β -チューブリンと結合し、チューブリン二量体の形成に不可欠である(図1G)。*ds* 変異をのぞいた *TBCD* 変異ホモ接合体投射神経(*TBCD¹* PN)でも、*ds^{UA071}* PNと同様に樹状突起が一つの糸球体ではなく複数の糸球体へと投射する異常がみられた(図1C)。また軸索が短くなる表現型も観察された(図1D)。これらの表現型は野生型の *TBCD* を発現させることによってレスキューできた(図1E, F)。*TBCD¹* PNの軸索の表現型を発生過程において観察したところ、蛹期中期までは野生型と同様に *TBCD¹* PNの軸索はキノコ体と側角へ伸長しているが、蛹期後期または羽化直後から軸索が退縮していることがわかった。これらの結果から *TBCD* は投射神経の樹状突起の枝分かれの制御と軸索の維持に必要であることが明らかとなった。

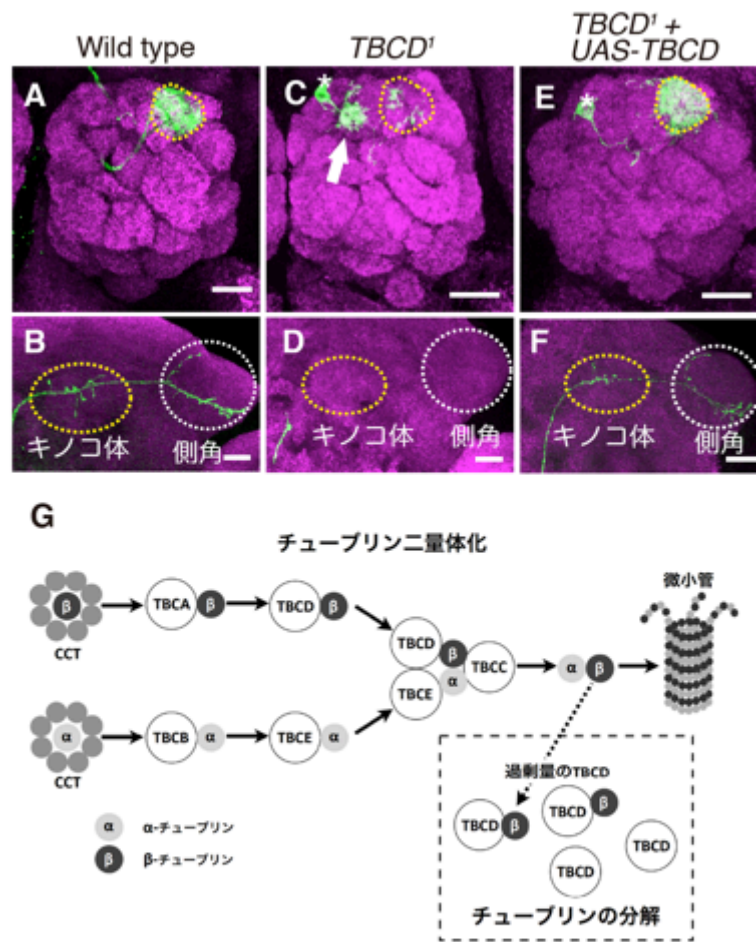


図1 A, C: WT PNの樹状突起は一つの糸球体のみへ投射するが(A), *TBCD¹* PNでは複数の糸球体(矢印)へ投射する(C)。B: WT PNの軸索はキノコ体、側角へ投射する。D: *TBCD¹* PNの軸索は短くなる。E, F: レスキュー実験。G: チューブリン折りたたみ経路の模式図。スケールバー: 20 μ m。

ds^{UA071} PNにおける表現型は *ds* の変異によるものではなく、バックグラウンドに存在する他の遺伝子の変異によるものと考え、原因遺伝子の同定を行った。マッピングによりチューブリン折りたたみ補因子D (*tubulin folding cofactor D* (*TBCD*))が原因遺伝子であることを見いだした。微小管は α -チューブリンと β -チューブリンの二量体が重合して形成される。*TBCD*は5つのチューブリン折りたたみ補因子の1つであり、 β -チューブリンと結合し、チューブリン二量体の形成に不可欠である(図1G)。*ds* 変異をのぞいた *TBCD* 変異ホモ接合体投射神経(*TBCD¹* PN)でも、*ds^{UA071}* PNと同様に樹状突起が一つの糸球体ではなく複数の糸球体へと投射する異常がみられた(図1C)。また軸索が短くなる表現型も観察された(図1D)。これらの表現型は野生型の *TBCD* を発現させることによってレスキューできた(図1E, F)。*TBCD¹* PNの軸索の表現型を発生過程において観察したところ、蛹期中期までは野生型と同様に *TBCD¹* PNの軸索はキノコ体と側角へ伸長しているが、蛹期後期または羽化直後から軸索が退縮していることがわかった。これらの結果から *TBCD* は投射神経の樹状突起の枝分かれの制御と軸索の維持に必要であることが明らかとなった。

2. 適切な量のチューブリン折りたたみ補因子が神経形態形成に必要である

次に他のチューブリン折りたたみ補因子が投射神経の形態形成に必要であるかを解析した。チュ

チューブリン折りたたみ補因子 B (*TBCB*)の変異ホモ接合体投射神経(*TBCB¹* PN)とチューブリン折りたたみ補因子 E (*TBCE*)のノックダウン投射神経では *TBCD¹* PN と同様の樹状突起の枝分かれ異常が生じた。さらに *TBCB¹* PN の軸索では側角において背側の枝分かれがなくなるという異常が生じた。これらの結果は、チューブリン折りたたみ補因子が投射神経の突起形成、特に樹状突起の枝分かれの制御に必要であることを示している。

TBCD を培養細胞に過剰発現させるとチューブリン二量体のβ-チューブリンと結合し、チューブリンの分解を促すことが知られている(図 1G)。そこで野生型の投射神経に MARCM 法を用いて *TBCD* を過剰発現させた結果、樹状突起の異常な枝分かれを引き起こした。このとき軸索形態に異常はみられなかった。これらの結果は、適切な量のチューブリン折りたたみ補因子が投射神経の形態形成に不可欠であることを示唆している。

3. *TBCD* 変異神経は微小管に異常が生じる

TBCD の変異が微小管に与える影響を検討した。脳内で内在性の微小管を単一細胞レベルで観察することは困難であるため、myc タグしたβ-チューブリンを WT PN と *TBCD¹* PN で発現させた。WT PN ではβ-チューブリン myc は細胞体、樹状突起と軸索の主枝で強く発現し、末端では弱く発現していた(図 2A, C)。一方 *TBCD¹* PN ではβ-チューブリン myc の発現は大きく減少していた(図 2B, D)。 *TBCD¹* PN でのチューブリンの減少は GFP タグしたα-チューブリンの発現によっても確認している。これらの結果から *TBCD¹* PN では微小管の形成または維持に異常が生じ、微小管の異常により樹状突起の枝分かれ異常と軸索退縮を引き起こしていると考えられる。

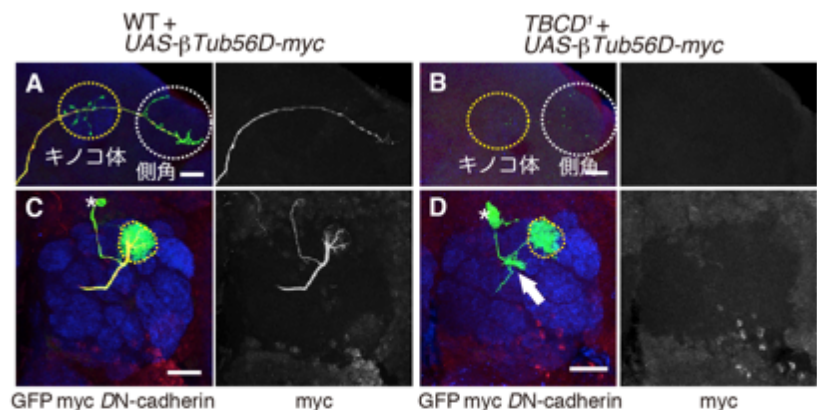


図 2A, C: WT PN での β-チューブリン myc の発現。軸索 (A)、樹状突起 (C)、細胞体 (C,*) で発現している。B, D: *TBCD¹* PN では β-チューブリン myc の発現が減少する。スケールバー: 20 μm。

4. *TBCD* は *Dscam* と結合し、遺伝学的にも相互作用する

神経細胞において *TBCD* がどのような分子によって制御されているか不明であったため、酵母ツーハイブリッド法により、*TBCD* と相互作用する分子の同定を行った。神経細胞の突起形成において細胞膜分子が重要な働きをすることから、細胞膜分子の一つであるダウン症細胞接着分子(*Down syndrome cell adhesion molecule (Dscam)*)に着目した。*Dscam* は免疫グロブリンファミリーに属する一回膜貫通分子であり、神経発生において重要な役割を担っている。ショウジョウバエ培養細胞である S2 細胞に *TBCD* と *Dscam* を発現させ、免疫共沈降実験を行うことにより、*Dscam* と *TBCD* が結合することを確認した。

神経形態形成において *TBCD* と *Dscam* が相互作用しているか確認するために、MARCM 法を用いて *Dscam* 変異ホモ接合体投射神経(*Dscam^{P1}* PN)を *TBCD* 変異ヘテロ接合体バックグラウンドで作成した。樹状突起は正しい糸球体へ投射したが、触角葉の外側へ樹状突起がもれ出てしまう表現型を亢進した。*TBCD* の過剰発現によっても投射神経の樹状突起形態に異常が生じたことから、*Dscam* を

過剰発現させた際の投射神経の形態を確認しところ、TBCD 過剰発現と同様に、樹状突起の異所的な枝分かれを生じた。そこで *Dscam* の過剰発現による微小管への影響を検証した。ショウジョウバエ初代培養神経を用いて *Dscam* を過剰発現させ、チューブリンの染色を行ったところ、*Dscam* が集積しているところでチューブリンが局所的に減少した。これらの結果は投射神経において TBCD と *Dscam* が相互作用していると示唆している。

キノコ体神経の軸索は背側(α 葉)と正中線側(β 葉)の 2 本に枝分かれするが、この軸索の分枝には *Dscam* が必要であることが知られている(図 3A)。*Dscam* 変異体では分枝に異常が生じ、2 本の軸索が同じ方向へと伸長する(図 3B)。キノコ体神経で TBCD をノックダウンすると *Dscam* 変異体と同様に分枝に異常が生じる(図 3C)。さらに、*Dscam* をキノコ体で過剰発現させると α 葉、 β 葉が形成されない(図 3D)。この異常は TBCD をノックダウンするまたは TBCD 変異ヘテロ接合体によって抑制される(図 3E, F)。これらの結果からキノコ体における *Dscam* 過剰発現の表現型には TBCD が必要であり、*Dscam* の過剰発現により TBCD の活性または量が増えることが示唆された。

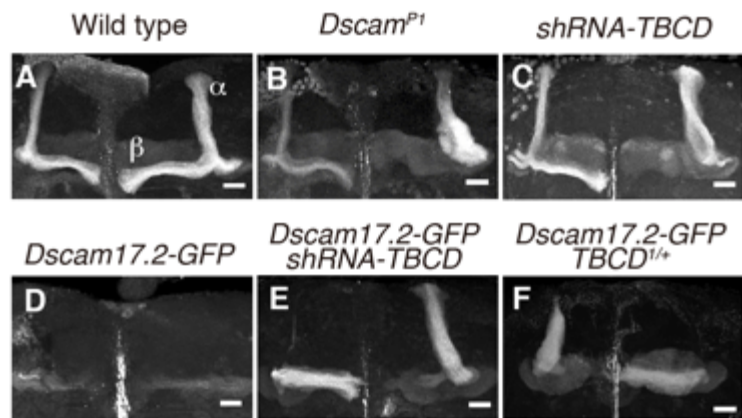


図 3 A-F: キノコ体神経の α 葉, β 葉 (FasII 抗体) . A: 野生型 . B: *Dscam^{P1}* 変異体 . C: TBCD ノックダウン . D: *Dscam* 過剰発現によって α 葉, β 葉が形成されない . E, F: TBCD ノックダウン (E) または TBCD 変異ヘテロ接合体 (F) により *Dscam* 過剰発現の表現型を一部抑制する . スケールバー :20 μ m.

【まとめと考察】

本研究では TBCD が投射神経とキノコ体神経の形態形成において機能することを明らかにした。TBCD と他のチューブリン折りたたみ補因子が適切な量発現することによって、微小管の形成または維持を調整し、正しい神経突起形成を可能にしている。さらに TBCD は *Dscam* と結合し、投射神経とキノコ体神経において遺伝的に相互作用することを明らかにした。*Dscam* の過剰発現によって、投射神経では樹状突起の異所的な枝分かれが生じ、初代培養神経では *Dscam* が集積しているところで局所的にチューブリンの量が減少していたことから、過剰量の *Dscam* によって TBCD が集積し、チューブリンの分解が亢進していると考えられる。さらに、キノコ体神経において *Dscam* 過剰発現の表現型は TBCD の発現量を減らすことによって抑制された。これらの結果から TBCD は *Dscam* の機能に必要であり、TBCD が *Dscam* の下流として働いていると考えられる。TBCD の神経系での働きはこれまで知られておらず、本研究は TBCD が神経突起形成において機能することを初めて示した。*Dscam* はヒトのダウン症への関与が示唆されており、TBCD はダウン症による神経回路の変化の解明に新たな洞察をもたらすと考えられる。

【参考文献】

Okumura M, Sakuma C, Miura M, Chihara T (2015) Linking Cell Surface Receptors to Microtubules: Tubulin Folding Cofactor D Mediates *Dscam* Functions during Neuronal Morphogenesis. *J Neurosci*, 35:1979–1990