

令和元年5月30日現在

機関番号：82609

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07077

研究課題名(和文) プロテオグリカンによる神経回路形成の制御機構

研究課題名(英文) Regulation of Neural Network Formation by Proteoglycans

研究代表者

前田 信明 (MAEDA, Nobuaki)

公益財団法人東京都医学総合研究所・脳発達・神経再生研究分野・プロジェクトリーダー

研究者番号：90202308

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)： ショウジョウバエ幼虫の神経筋接合部(NMJ)はグルタミン酸作動性であり、脊椎動物中枢神経系の興奮性シナプスと類似した性質を示す。我々は、本NMJを興奮性シナプスのモデルシステムとして用いて、ヘパラン硫酸プロテオグリカン(HSPG)による神経回路形成あるいは神経可塑性の制御機構を解析した。まずプロテオームの手法を用いて、NMJに存在するHSPG結合蛋白質を網羅的に解析し、Spatzleを始めとするいくつかの新規HSPG結合蛋白質を同定した。また、飢餓により誘導されるNMJの経験依存的可塑性にGPIアンカー型のHSPGであるグリピカン(Dip)が寄与することを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、プロテオグリカンがシナプス形成やシナプス可塑性の制御に重要な役割を果たしており、その機能異常は種々の精神神経疾患の原因になることが明らかになってきた。本研究課題で我々は、ショウジョウバエモデルを用いて、ヘパラン硫酸プロテオグリカンによる新規シナプス機能制御機構を見出した。本研究成果は、ショウジョウバエを用いた統合失調症、心的外傷後ストレス障害等の疾患モデルの創出につながるものである。

研究成果の概要(英文)： The synapses of the *Drosophila* larval neuromuscular junction (NMJ) serve as a model for the excitatory synapses because they are glutamatergic and show structural similarities to the excitatory synapses in the mammalian brain. We studied the functions of heparan sulfate proteoglycans (HSPGs) in the synapse formation and neural plasticity using *Drosophila* NMJ. By using shotgun proteomics, we identified spatzie as a novel HSPG-binding protein. Furthermore, we revealed that the experience-dependent neural plasticity of NMJ synapses, which is induced by starvation, is regulated by GPI-anchored HSPG glypican (Dip).

研究分野：神経科学

キーワード：ヘパラン硫酸 プロテオグリカン 神経筋接合部 シナプス可塑性 グリピカン ショウジョウバエ

1. 研究開始当初の背景

近年、神経回路の発達や可塑性の制御、あるいは軸索再生等に、プロテオグリカンが重要な役割を果たしていることが明らかになってきた(1)。プロテオグリカンは、コア蛋白質にヘパラン硫酸やコンドロイチン硫酸などのグリコサミノグリカンが共有結合した分子群であり、様々な成長因子や細胞外基質分解酵素、接着分子等と相互作用することによって、これらの分子の活性や局在を制御していると考えられる。しかしながら、神経組織においてプロテオグリカンがどのような分子機構で神経回路形成等を制御しているのかについては、ほとんど明らかになっていない。その要因の一つとして、プロテオグリカンコア蛋白質およびグリコサミノグリカン合成修飾酵素のアイソフォームが、脊椎動物においては多数存在して重複した機能を果たすため、ノックアウト等の手法を用いた解析が困難なことが挙げられる。我々は、このような困難を克服するため、ショウジョウバエを用いた解析を試みた。ショウジョウバエは、プロテオグリカン関連分子のアイソフォーム構成が脊椎動物と比較して著しく単純であり、かつ高度な遺伝学的手法が活用できる。ショウジョウバエのこのような優位性を活用して、神経回路形成および神経可塑性におけるヘパラン硫酸プロテオグリカンの機能解析を開始した。

2. 研究の目的

ショウジョウバエ幼虫の神経筋接合部はグルタミン酸作動性であり、脊椎動物中枢神経系の興奮性シナプスと類似した性質を示す。また、形態観察や電気生理学的解析が容易であるため、興奮性シナプスのモデルシステムとして、神経回路形成あるいは神経可塑性等の解析に盛んに利用されている。本研究課題では、(1)プロテオグリカンによる神経回路形成制御機構の全体像を明らかにするため、プロテオームの手法を用いて、ショウジョウバエ神経筋接合部におけるヘパラン硫酸プロテオグリカン結合蛋白質を網羅的に同定する。さらに、(2)ヘパラン硫酸プロテオグリカンによるシナプス可塑性制御機構を明らかにすることを目指す。

3. 研究の方法

(1) ショウジョウバエ神経筋接合部におけるヘパラン硫酸プロテオグリカン結合蛋白質の網羅的解析

ショウジョウバエ3齢幼虫筋肉標本(神経筋接合部を含む)をヘパリチナーゼ処理し、遊離してくる蛋白質を質量分析(ショットガン LC-MS/MS)により網羅的に同定する。さらに、HAタグを付加したグリピカンやシンデカン(Sdc)を幼虫の運動ニューロンあるいは筋肉細胞に特異的に発現させる。次に、抗-HA抗体を用いた免疫沈降実験により、各プロテオグリカンに特異的に結合する蛋白質を同定する。同定した新規ヘパラン硫酸プロテオグリカン結合蛋白質について、ショウジョウバエ変異体を用いて機能解析を行う。

(2)ヘパラン硫酸プロテオグリカンによるシナプス可塑性制御機構の解析

ショウジョウバエ幼虫を通常の餌の入った飼育容器から餌の無い飼育容器に移すと、新たな餌を求めて活発に移動するようになる。その際、飢餓により増強するオクトパミンシグナルによって、神経筋接合部における神経終末の新生が起こる(飢餓誘導神経可塑性)。GPIアンカー型ヘパラン硫酸プロテオグリカンであるグリピカン(Dip)の変異体を用いて飢餓誘導可塑性を解析し、野生型幼虫と比較検討する。

4. 研究成果

(1) ショウジョウバエ神経筋接合部におけるヘパラン硫酸プロテオグリカン結合蛋白質の網羅的解析

プロテオーム解析によって細胞接着因子や成長因子等、多数のヘパラン硫酸プロテオグリカン結合蛋白質を同定した。その内の一つである Spatzle (Spz) は、神経栄養因子様の構造を示す分泌蛋白質であり、Toll を受容体として NMJ 形成を制御することが知られている。そこで、免疫沈降実験を行い、Spz が Dip と結合すること、さらに、Dip が Toll と相互作用することを見出した。Spz は Sdc とは相互作用せず、その結合には明確な特異性が認められた。Dip と Toll の共発現細胞を Spz で刺激すると、これら三者と一緒に細胞内に取り込まれることから、Dip と Toll は、Spz に対する受容体複合体を形成している可能性が考えられた。Spz および Dip のショウジョウバエ変異体は、シナプス終末の増加等、互いに類似した表現型を示すが、遺伝学的相互作用実験により、両者が同一の情報伝達経路に寄与していることが示唆された。これらの事は、Dip が Spz-Toll 経路を修飾する制御因子であることを示唆している。

(2) ヘパラン硫酸プロテオグリカンによるシナプス可塑性制御機構の解析

ショウジョウバエ幼虫は飢餓状態にさらされると新たな餌を求めて活発な移動を開始するが、この際、脊椎動物のアドレナリンに相当するオクトパミンの作用によって、神経終末の新生を始めとする神経筋接合部の再編成が起こる(2)。これは経験依存的神経可塑性のモデルになると考えられる。我々はオクトパミンシグナルが神経筋接合部におけるDipの局在にどのような影響を与えるかを解析した。その結果、野生型幼虫の神経筋接合部では、飢餓によりDipの発現レベルが一過的に減少することが明らかになった。それに対して、オクトパミン欠失個体では、飢餓状態になってもDipのレベルは全く変化しなかった。これらのことは、飢餓時に増強するオクトパミンシグナルによって神経筋接合部におけるDipの発現レベルが負に制御されていることを示している。次にDipのノックダウン個体を用いて解析を進めたところ、本ノックダウン個体では、飢餓による神経終末の新生及び移動速度の増加が起こらないことが明らかになった。以上のことから、オクトパミンによってDipの発現レベルが調節され、神経終末の形成及び幼虫の移動速度が制御されていることが示唆された。

これまでに、HSPGとの相互作用が報告されているBMPリガンドであるGbbが、神経筋接合部における神経終末の成長を誘導することが知られている。しかしながら、その経験依存的神経可塑性における役割については全く明らかにされていない。そこでまず、飢餓時の神経筋接合部におけるBMPシグナル強度を推定するため、BMPシグナル下流因子であるMadのリン酸化レベル(pMad)を免疫組織化学的に解析した。その結果、幼虫を飢餓状態におくと、シナプス前部におけるpMadレベルが著しく増加することが明らかになった。それに対して、飢餓にさらしても神経終末の新生が起こらないDipノックダウン個体では平常時のpMadレベルが既に増加しており、飢餓後もそのレベルが変化しないことが明らかになった。このことから、Dipが飢餓時のBMPシグナル強度を調節していることが示唆された。そこでGbb変異体幼虫を用いて解析したところ、意外なことに本変異体においても飢餓によって神経終末の新生が誘導されることが明らかになった。このことは、経験依存型可塑性はGbb非依存性であり、Gbb依存的な通常の神経終末の発達とは異なる分子機構によって制御されていることを示している。

最近、シナプス前部におけるpMadのリン酸化が、グルタミン酸受容体サブユニットGluRIIAとBMP受容体Wit間の相互作用によって制御されていることが報告された(非古典的BMP経路)(3)。そこで、飢餓時にDipが非古典的BMP経路を制御している可能性を検討した。まず、非古典的BMP経路が飢餓時の幼虫の移動速度の増大および神経終末の新生を誘導することを確認した。次に、Dipノックダウン個体では、pMadと同様に、平常時のGluRIIAレベルが既に増加しており、飢餓後もそのレベルが変化しないことが明らかになった。すなわち、DipはGluRIIAの発現を抑制しており、飢餓後のDip発現の減少によってGluRIIAレベルが増加し、非古典的BMP経路が活性化されることが示唆された。

<引用文献>

- (1) Maeda N (2015). Proteoglycans and neuronal migration in the cerebral cortex during development and disease. *Front. Neurosci.* 9, 98. Doi: 10.3389/fnins.2015.00098
- (2) Koon AC et al. (2011). Autoregulatory and paracrine control of synaptic and behavioral plasticity by octopamine signaling. *Nat. Neurosci.* 14, 190-199.
- (3) Sulkowski MJ et al. (2016). A novel, noncanonical BMP pathway modulates synapse maturation at the *Drosophila* neuromuscular junction. *PLoS Genet.* 12, e1005810.

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計5件)

- ① Ohtaka-Maruyama C., Okamoto M., Endo K., Oshima M., Kaneko N., Yura K., Okado H., Miyata T., Maeda N. (2018). Synaptic transmission from subplate neurons controls radial migration of neocortical neurons. *Science* **360**, 313-317. DOI: 10.1126/science.aar2866 (査読有)
- ② Furotani K., Kamimura K., Yajima T., Nakayama M., Enomoto R., Tamura T., Okazawa H., Sone M. (2018). Suppression of the synaptic localization of a subset of proteins including APP partially ameliorates phenotypes of the *Drosophila* Alzheimer's disease model. *PLoS One* **13**, e0204048. DOI: 10.1371/journal.pone.0204048 (査読有)
- ③ 前田信明、丸山千秋 (2018). 「サブプレートニューロンから移動ニューロンへのシナプス伝達は大脳新皮質におけるニューロンの放射状移動を制御する」*ライフサイエンス新着論文レビュー* DOI: 10.7875/first.author.2018.053 (査読無)
- ④ Kamimura K., Maeda N. (2017). Heparan sulfate proteoglycans in *Drosophila* neuromuscular development. *Biochim. Biophys. Acta* **1861**, 2442-2446. DOI: 10.1016/j.bbagen.2017.06.015 (査読有)
- ⑤ Sakuma C., Saito Y., Umehara T., Kamimura K., Maeda N., Mosca T.J., Miura M., Chihara T. (2016). The Strip-Hippo pathway regulates synaptic terminal formation by modulating actin organization at the *Drosophila* neuromuscular synapses. *Cell Rep.* **16**, 2289-2297. DOI: 10.1016/j.celrep.2016.07.066 (査読有)

〔学会発表〕(計5件)

- ① 神村圭亮、丸智香子、中藤博、由良敬、前田信明「Wingless 濃度勾配形成におけるヘパラン硫酸微細構造の機能解析」第91回日本生化学会(2018)
- ② 丸智香子、神村圭亮、中藤博、前田信明、由良敬「ヘパラン硫酸微細構造によるWingless濃度勾配の制御」第91回日本生化学会(2018)
- ③ 神村圭亮、小田嶋愛子、前田信明「ショウジョウバエの神経筋接合部においてグリピカンはオクトパミンを介したシナプス可塑性を調節する」第40回日本分子生物学会・第90回日本生化学会大会(2017)
- ④ Kamimura K., Odajima A., Maeda N. “Glypican regulates synaptic plasticity at the Drosophila neuromuscular junction” 7 Lakes Proteoglycans Conference 2017(2017)
- ⑤ 神村圭亮、小田嶋愛子、前田信明「ショウジョウバエの神経筋接合部においてグリピカンがシナプス可塑性を調節する」第89回日本生化学会大会(2016)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.igakuken.or.jp/regeneration/>

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：神村圭亮

ローマ字氏名：KAMIMURA, Keisuke

所属研究機関名：公益財団法人東京都医学総合研究所

部局名：脳発達・神経再生研究分野

職名：主席研究員

研究者番号(8桁)：30529524

研究分担者氏名：三枝智香

ローマ字氏名：SAEGUSA, Chika

所属研究機関名：公益財団法人東京都医学総合研究所

部局名：脳発達・神経再生研究分野

職名：研究員

研究者番号(8桁)：00280800

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。