

平成22年6月1日現在

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2007～2008

課題番号：19300107

研究課題名（和文） 神経活動依存的な遺伝子発現誘導とシナプス構築の分子機構

研究課題名（英文） Molecular mechanism of activity-dependent gene expression and synapse formation

研究代表者

能瀬 聡直 (NOSE AKINAO)

東京大学・大学院新領域創成科学研究科・教授

研究者番号：30260037

研究成果の概要：

マイクロアレイ技術を用い、ショウジョウバエの神経筋シナプスにおいて、シナプス形成の前後や有無に対応したシナプス後細胞(筋肉細胞)での遺伝子発現の変化を検出することにより、シナプス形成・成熟過程において誘導される遺伝子を系統的にスクリーニングし、さらに機能を調べた。その結果、神経支配により発現が抑制される遺伝子のひとつである、転写因子 *longitudinals lacking (Jola)* が、筋肉において、グルタミン酸受容体などの複数のシナプス機能分子の発現を転写レベルで制御することを見いだした。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	7,800,000	2,340,000	10,140,000
2008年度	7,000,000	2,100,000	9,100,000
年度			
年度			
年度			
総計	14,800,000	4,440,000	19,240,000

研究分野：神経科学

科研費の分科・細目：神経科学・神経科学一般

キーワード：シナプス、ショウジョウバエ、転写因子、グルタミン酸受容体、マイクロアレイ

1. 研究開始当初の背景

シナプス形成は、神経細胞がシナプスを作るべき細胞（標的細胞）に向かって軸索を伸長し、数ある細胞の中から標的細胞を認識した後に開始される過程である。シナプスは神経細胞が情報伝達を行なう場所であり、シナプス伝達に必要な様々なタンパク質（シナプス機能分子）が多数局在した特殊な構造をしている。このシナプス構造が正確に構築されるためには、シナプス前細胞である神経細胞

と、シナプス後細胞である標的細胞とが相互作用を行ない、互いに分化を誘導することが必要である。このシナプス分化の過程には、大きく分けて2つのプロセスが関与すると考えられている。ひとつは、シナプス機能分子のシナプス部への集積が誘導されるプロセスであり、もうひとつは、核において遺伝子発現が制御されるプロセスである。シナプス構造は、発生初期に形成された後、徐々にその形態・機能を成熟させながら、成体に至る

まで長期的に維持される。このようにシナプス形成が長期間にわたって持続し、その構造が維持されるためには、後者のプロセスである遺伝子の発現制御と、それに伴う、新たなタンパク質の合成が非常に重要であると考えられている。

遺伝子発現制御を介したプロセスがシナプス構造の形成・維持に重要であることは、長期的なシナプス構造の変化をもたらすシナプス可塑性についての研究からも明らかになっている。シナプス可塑性とは、成熟したシナプスが神経活動の強さに応じてシナプスの構造を変化させたり、伝達効率を変化させたりする現象である。これは、神経ネットワークの機能を変化させることから、我々の記憶や学習の基礎となる現象として着目されている現象である。このシナプスの可塑的变化には、短期的な変化と長期的に持続する変化がある。特に長期的な変化では、新たなシナプス構造が形成されることが知られており、そのためには、神経活動に応じて遺伝子発現が制御される必要がある事が分かっている。

このように、遺伝子の発現制御を介したシナプス分化のプロセスは、シナプス形成・維持において非常に重要なプロセスであると考えられる。しかしながら、シナプス構造が初期形成される過程において、どのような遺伝子プログラムが機能しているのかはほとんど明らかにされていない。哺乳類の神経筋結合シナプスを用いた研究によって、受容体などのごく少数のシナプス機能分子については、シナプス形成期に遺伝子発現が誘導される事が分かっている。しかし、大多数の遺伝子の挙動や、それらの遺伝子がシナプス形成を誘導するプログラムの全貌は明らかでない。

2. 研究の目的

本研究では、ショウジョウバエの神経筋結合シナプスを用いて、シナプス形成過程に関わる遺伝子プログラムを解明することを目的とした。特に、運動神経（シナプス前細胞）の支配によって筋肉細胞（シナプス後細胞）でシナプス形成が誘導される際に、どのような遺伝子が発現制御されるかを探索し、それらの遺伝子のシナプス形成における機能を解明することを目指した。先のゲノムプロジェクトの成果により、ショウジョウバエをはじめとするモデル生物のゲノム情報はすべて解読されている。そしてそれに伴って、細胞あるいは組織内での全遺伝子の発現量を一度に調べる事が可能な、DNA マイクロ

アレイの技術が大きく進歩してきた。本論文ではこの技術を利用して、筋肉細胞における遺伝子発現パターンを、神経支配の前後、神経支配の有無で比較することにより、シナプス形成誘導に関わる遺伝子プログラムを探索することを計画した。

3. 研究の方法

(1) マイクロアレイ

ショウジョウバエの胚・幼虫の神経筋結合系においては、神経細胞が筋肉細胞へと軸索を伸長し、標的筋肉にシナプスを形成するまでの発生過程が詳細に調べられている。体壁を構成する全筋肉の発生は、ほぼ同時に進み、神経支配（シナプス形成）もほぼ同時期に起こるので、神経支配により誘導される遺伝子発現についても、時間軸に沿って全筋肉で同時に進行すると考えられる。故に、経時的な遺伝子発現の変化を解析するのに非常に適した系であると考えられる。ショウジョウバエの胚は解剖によって平面に展開すると、筋肉細胞が解剖試料の表面に露出するため、顕微鏡下でマイクロピペットを用い個々の筋肉細胞を単離することが可能である。本研究においては、神経支配の前と後の発生時期の筋肉、および、筋肉支配の起こらない *prospero (pros)* 変異体の筋肉を単離し、遺伝子発現の比較プロファイリングを行なうことを試みた (図1)。

本研究申請においてもっとも技術的に困難と考えられた点は、いかにして微量の試料から特異性を失わずに RNA を増幅するかということであったが、約40本の筋肉を出発材料として、再現性よく遺伝子発現プロファイリングを行うことに成功した。その具体的な手法は以下の通りである。胚を解剖して展開した試料から、マイクロピペットを用いて単離した40本の筋肉より抽出した mRNA から、T7 プロモーター配列を持つ2本鎖 cDNA を逆転写反応により合成し、*in vitro* transcription 反応によって cRNA を増幅した。この操作をさらにもう1回繰り返し、ビオチンラベル化を行い、マイクロアレイ解析のためのプローブとして用いた。神経支配の前と後、及び、有り無し、それぞれについて、各3ペアの遺伝子発現プロファイルの比較を行い、3ペアすべてにおいて変化している遺伝子を候補遺伝子とした。

(2) 候補遺伝子の機能解析

候補遺伝子の機能欠失の影響を調べるために、既存の突然変異体とともに、二本鎖 RNA を用いた遺伝子発現抑制 RNAi を用いることにより、筋肉特異的に遺伝子の機能を阻害した。ショウジョウバエにおいては、大多数の遺伝子について、ヘアピン型二本鎖 RNA を

発現するような DNA 配列を UAS の下流にもつ系統が作製されており、これらを GAL4 系統と掛け合わせるにより筋肉特異的に遺伝子の機能を阻害した。以上の突然変異体または RNAi 阻害個体において、シナプスの形態をさまざまなマーカーを用い解析することにより、候補遺伝子のシナプス形成過程への関与を調べた。

4. 研究成果

(1) マイクロアレイ比較解析

神経細胞が筋肉細胞に到達・接触する前の時期の筋肉細胞ではまだ神経細胞依存的に発現する遺伝子は発現していないと思われる。一方、神経細胞が筋肉細胞に到達し、シナプス形成が進んでいる時期の筋肉細胞では、すでに神経依存的に誘導される遺伝子が発現していると考えられる。したがって、これら 2 種類の筋肉で発現している遺伝子の発現量を比較解析することで、神経支配依存的に発現する遺伝子を同定できると期待される (図 1A)。一方、*pros* 変異体においては、野生型でシナプスが形成される時期になっても、神経軸索が到達せず、その結果シナプスが形成されない。そのため、神経細胞の支配により発現が制御され、活動依存的シナプス形成過程に関与するような遺伝子が、神経の不在により制御を受けていない状態にあると考えられる。したがって、この変異体から単離した筋肉細胞での遺伝子発現と、同時期の野生型の筋肉細胞での遺伝子発現を比較すれば、シナプス形成に関わる遺伝子を特異的に同定できると期待された。以上の神経支配の前後、有無の 2 つの比較解析の結果、双方において神経支配に応じて発現が上がっている遺伝子を 73 個、下がっている遺伝子を 11 個同定することに成功した (図 1B, C)。これらの候補遺伝子を下記の機能解析の対象とした。

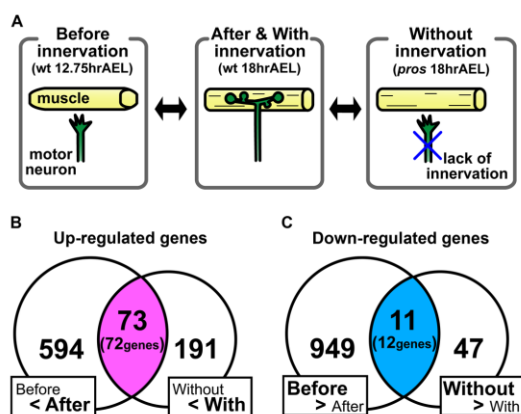


図 1 マイクロアレイ比較解析

(2) 候補遺伝子の系統的機能解析

上記の候補遺伝子は、シナプス形成に関与している可能性が高い遺伝子である。しかし、そのほとんどについて、シナプス形成に関わる機能は調べられていなかった。そこで、ショウジョウバエの豊富な遺伝子発現操作技術やトランスジェニック動物の系統を用いて、シナプス形成における機能解析を 37 個の候補遺伝子について行なった。その結果、少なくとも 2 遺伝子 (*TepIV*, *pst*) が、神経終末の形態を制御する働きを持つ事を新たに示した。さらに大きな発見として、転写因子 *Lola* (*Longitudinals lackings*) が、神経伝達物質受容体であるグルタミン酸受容体のシナプス部の発現量を制御する働きを持つ事が判明した。以下、*lola* に関する詳細な機能解析について述べる

(3) *lola* の機能解析

DNA マイクロアレイ解析において、*lola* は神経支配依存的に発現が抑制される遺伝子として同定された。さらにこの発現変化は、定量 PCR によっても確認された。*lola* 遺伝子は選択的スプライシングにより、少なくとも 20 個の異なるタンパク質 (アイソフォーム) を構成すると考えられている。*Lola* タンパク質のほとんどのアイソフォームは、タンパク質-タンパク質相互作用に関わる BTB (Broad complex, Tramtrack, Bric a brac の略) ドメインと DNA と結合する Zn-finger ドメインを持つ転写因子であると考えられている。*Lola* の機能としては主に胚発生期において、神経細胞の軸索誘導及び樹状突起の誘導に働くことが知られていた。しかし、これまで、シナプス機能分子の発現を制御する機能は解析されていなかった。

シナプス後細胞 (筋肉細胞) における *Lola* の機能を正確に知るため、GAL4-UAS 発現システムを用いて *lola* に対する RNAi を筋肉細胞特異的に作用させ (*2AB-Gal4 / UAS-lola RNAi*; 以下 *lola* RNAi 変異体と呼ぶ)、筋肉細胞での *Lola* の機能をノックダウンして解析を行なった。*lola* RNAi 変異体はコントロール体と比較して、生存率に関して特に目立った差異はなく、また三齢幼虫の運動 (ぜん動運動やパイアルの壁の上昇) に関しても明らかな違いは見られなかった。さらに、*lola* RNAi 変異体において筋肉細胞の走行パターンに異常は観察されず、また筋肉細胞の表面積に対しても影響は与えなかった。

しかし、*lola* RNAi 変異体の三齢幼虫期の神経筋結合シナプスでは、シナプス部全体にわたってグルタミン酸受容体のサブユニット *GluRIIA* の発現がほとんど観察されなかった (図 2A, B)。実際にシナプス部の *GluRIIA* 強度を定量したところ、劇的に減少していた (*control (2AB-Gal4/+)* = 100 ± 5.4 (%), n = 7; *UAS control (UAS-lola-RNAi/+)* = 98

± 9.3 (%), n = 8; *lola* RNAi 変異体 = 39 ± 2.5 (%), n = 11; mean ± SEM, **p < 0.0005; control (*2AB-Gal4/+*) のデータが 100 となるように規格化した)。

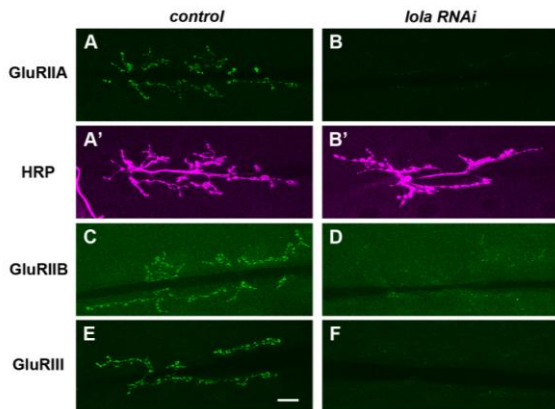


図2 *lola* はグルタミン酸受容体の発現を制御する

ショウジョウバエの筋肉細胞には2つのタイプのグルタミン酸受容体、つまり GluRIIA サブユニットを含む受容体と GluRIIB サブユニットを含む受容体が存在する。この2種類の受容体の生理学的機能は異なっており、シナプス部での局在およびシナプス部への挿入のメカニズムも異なることが知られている。したがって、GluRIIA 量が劇的に減少する *lola* RNAi 変異体において、GluRIIA 以外のサブユニットの発現がどのように変化しているかは大変興味深い点である。そこで、もう一方の受容体複合体に含まれる GluRIIB サブユニットと、共通サブユニットである GluRIII サブユニットの発現を解析した。GluRIIB 及び GluRIII の免疫抗体染色の結果、GluRIIA の場合と同様、*lola* RNAi 変異体でシナプス部の GluRIIB 及び GluRIII の発現がほとんど観察されなかった (シナプス部 GluRIIB 強度: control = 100 ± 3.3 (%), n = 12; *lola* RNAi 変異体 = 60 ± 2.1 (%), n = 15, **p < 0.0005; シナプス部 GluRIII 強度: control = 100 ± 3.4 (%), n = 12; *lola* RNAi 変異体 = 32 ± 0.8 (%), n = 12, **p < 0.0005) (図 2C-F)。GluRIIA、GluRIIB、GluRIII の解析結果を統合すると、*Lola* は筋肉細胞において、シナプス部に局在する2種類のグルタミン酸受容体の発現を両方とも制御していることが示唆された。

次に、*lola* RNAi 変異体におけるシナプス後部構造 PSD の形態を観察するため、PSD のマーカーとして広く用いられる PAK 分子の局在を解析した。PAK はシナプス前部の active zone と向かい合って (シナプス間隙を挟んで)、シナプス後部 PSD に GluR と共にクラスター状に局在している分子である。その結果、PAK の発現強度および発現領域は有意に減少

していた。(シナプス部 PAK 強度: control = 100 ± 13 (%), n = 16; *lola* RNAi 変異体 = 87 ± 3.7 (%), n = 17, *p < 0.05; PAK 発現領域: control = 100 ± 13 (%), n = 16; *lola* RNAi 変異体 = 48 ± 8.2 (%), n = 17, *p < 0.05)。これらの結果から、*Lola* は筋肉細胞において、グルタミン酸受容体だけでなく、PSD に局在する分子 PAK の発現も制御していることが示唆された。

一方、神経終末の形態 (ブトン数、分枝数、神経終末の長さ及び神経終末の面積) に関しては、コントロールと *lola* RNAi 変異体との間で有意な差は見られなかった (図 2A', B')。また、アクティブゾーンのマーカーである BRP のシナプス部の強度及び発現領域についても正常であった。これらの結果から、筋肉細胞での *lola* のノックダウンは、シナプス後部の分子発現に大きな影響を与えるにも関わらず、シナプス前部のアクティブゾーンの形態に顕著な影響は与えないことが分かった。

以上の免疫抗体染色法を用いた解析により、*Lola* は筋肉細胞において、シナプス部のグルタミン酸受容体とシナプス機能分子 PAK の発現量を正常に保つために必要であることが示された。先行研究から、*Lola* は BTB-Zn-finger 転写因子であることが分かっており、したがって、*lola* RNAi 変異体におけるグルタミン酸受容体および PAK の減少は、転写制御を介したメカニズムによるものである可能性が高い。そこで *lola* RNAi 変異体におけるグルタミン酸受容体および *Pak* の転写産物量を、リアルタイム定量 PCR を用いて解析した。

筋肉細胞における各転写産物量を解析するため、三齢幼虫の体壁筋 (体壁と体壁筋から構成される試料) からトータル RNA を抽出し、mRNA を逆転写して定量 PCR 用のサンプルを作製した。コントロール体と *lola* RNAi 変異体で、グルタミン酸受容体のサブユニット *GluRIIA*、*GluRIIB*、*GluRIII* の転写産物量を調べたところ、*lola* RNAi 変異体ではすべてのサブユニットの転写産物量が減少していることが明らかになった (*GluRIIA*: control = 100 ± 2.9 (%); *lola* RNAi 変異体 = 42 ± 7.9 (%), n = 9, *GluRIIB*: control = 100 ± 6.4 (%); *lola* RNAi 変異体 = 56 ± 14 (%), n = 9, *GluRIII*: control = 100 ± 3.5 (%); *lola* RNAi 変異体 = 75 ± 8.7 (%), n = 9, *p < 0.05, **p < 0.0005)。特に *GluRIIA*、*GluRIIB* の減少率が顕著であった。さらに同様に、*Pak* の転写産物量についても変異体で有意に減少していることが分かった (*Pak*: control = 100 ± 2.9 (%); *lola* RNAi 変異体 = 59 ± 6.4 (%), n = 9, **p < 0.0005) (図 3)。

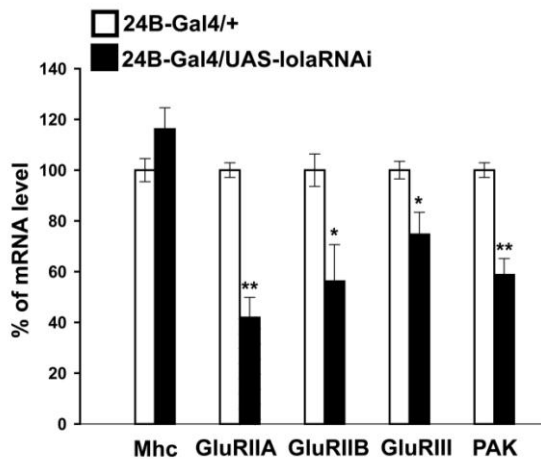


図3 lolaはシナプス後部の遺伝子群の発現を転写制御する

これらの結果から、転写因子 Lola はシナプス後細胞のグルタミン酸受容体 (*GluRIIA*, *GluRIIB*, *GluRIII*) およびシナプス機能分子 *Pak* の転写量を制御していることが分かった。ショウジョウバエの神経筋結合系において、このようにシナプス機能分子を転写レベルで制御する分子を示した例は初めてである。Lola は多数のシナプス機能分子の転写量を制御することによって、シナプス構造の形成を調節する重要な因子であると考えられる。さらに lola 自身の発現が神経支配に応じて変化することから、神経支配の状態を反映して、後シナプス部におけるシナプス機能分子の構成を変化させる役割を担っていると予想される。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 7 件)

1. Inaki, M, Shinza-Kameda, M, Ismat, A., Frasnch, M & Nose, A. *Drosophila* Tey represses transcription of a repulsive cue Toll and generates neuromuscular target specificity. *Development*, in press. (掲載確定) (2010)

2. Morimoto T, Nobechi M, Komatsu A, Miyakawa H & Nose A. Subunit-specific and homeostatic regulation of glutamate receptor localization by CaMKII in *Drosophila* neuromuscular junctions. *Neuroscience* 165, 1284–1292 (2010).

3. Kohsaka, H & Nose, A. Target recognition at the tips of postsynaptic filopodia: accumulation and function of Capricious. *Development* 136, 1127-1135 (2009).

4. Kazama, H., Ichikawa, A, Kohsaka, H., Morimoto-Tanifuji, T. & Nose, A. Innervation and activity dependent dynamics of postsynaptic oxidative metabolism. *Neuroscience*, 152, 40-49 (2008).

5. Kohsaka, H., Takasu, E. & Nose, A. In vivo induction of postsynaptic molecular assembly by the cell adhesion molecule Fasciclin2. *J. Cell Biol.* 179 1289-1300 (2007).

6. Inaki, M., Yoshikawa, S., Thomas, J.B., Aburatani, H. & Nose, A. Wnt4 is a local repulsive cue that determines synaptic target specificity. *Curr. Biol.* 17, 1574-1579 (2007).

7. Kazama, H., Nose, A. & Morimoto-Tanifuji, T. Synaptic components necessary for retrograde signaling triggered by calcium/calmodulin-dependent protein kinase II during synaptogenesis. *Neuroscience* 145, 1007-15 (2007).

[学会発表] (計 4 件)

1. Fukui, A., Tonoe, G., Inaki, M., Homma, M., Morimoto, T., Aburatani, H. and Nose, A.: Functional analysis of genes whose expression is regulated by nerve innervation during synaptogenesis. 第 32 回日本神経科学大会、2009. 9. 16-18 名古屋

2. Fukui, A., Tonoe, G., Inaki, M., Aburatani, H. and Nose, A.: Single-cell analysis of innervation-dependent gene expression during synaptogenesis NeuroFly2008 "12th European *Drosophila* neurobiology conference" 2008.9.6-10. Wurzburg, Germany

3. Fukui, A., Tonoe, G., Inaki, M., Aburatani, H. and Nose, A.: Single-cell analysis of innervation-dependent gene expression during synaptogenesis. 第 31 回日本神経科学大会、2008. 7. 9-11、東京

4. 福井愛、稲木美紀子、油谷 浩幸、能瀬 聡直: Analysis of innervation-dependent gene expression during synaptogenesis 日本神経科学大会、2007. 9. 10-12、横浜

6. 研究組織

(1) 研究代表者

能瀬 聡直 (NOSE AKINAO)
東京大学・大学院新領域創成科学研究科・
教授
研究者番号：30260037

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし