

平成 21 年 5 月 27 日現在

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2007～2008

課題番号：19500278

研究課題名（和文）神経細胞接着分子 Dscam による特異的シナプスの形成機構

研究課題名（英文）Regulation of synaptic specificity by cell adhesion molecule Dscam

研究代表者

近藤 真啓 (KONDO MASAHIRO)

日本大学・歯学部・専任講師

研究者番号：50312294

研究成果の概要：細胞接着分子をコードするショウジョウバエ *Dscam* は、選択的スプライシングにより単一遺伝子から 38,000 種類を越える異なった神経受容体を生じうる。本研究から、個々の *Dscam* アイソフォームは独自性をもって神経軸索の分枝形成開始点およびその投射パターンを決定していること、*Dscam* の C 末端構造は軸索分枝形成のために必要であること、また *Dscam* の発現がシナプス関連蛋白の局在化に必要であることが明らかとなった。これらの結果は、各神経細胞に依存した *Dscam* の発現制御によりシナプス形成およびその結合特異性が規定される可能性を示唆している。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,400,000	720,000	3,120,000
2008 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：神経生物学

科研費の分科・細目：神経科学・神経科学一般

キーワード：神経回路形成、シナプス特異性、細胞接着分子、分子多様性

1. 研究開始当初の背景

ヒト脳に存在する神経細胞は総計 10^{15} 個におよぶシナプスを介して精密なネットワークを構築するとされているが、この神経細胞間に見られる膨大な数のシナプス結合の特異性がいかにして制御されているかについては明らかにされていない。

ショウジョウバエ細胞接着分子 *Dscam* は、軸索ガイダンスに関与するアダプター蛋白 Dock と結合する分子として生化学的に同定された (Schmucker et al., 2000)。遺伝子情報の解析により、24 ヶ所存在するエクソンのうち 4 ヶ所が可変エクソンであり、それらが選択的スプライシングによって一種類ずつ選出され、理論上 38,016 種類の異なる神経受容体アイソ

フォームを生じる可能性が示され、シナプス結合特異性を規定する候補分子として注目されるようになった (Schmucker et al., 2000)。その後、キノコ体に存在する神経細胞で Dscam を欠失させると軸索分枝の形成異常が生じること (Wang et al., 2002)、単一神経細胞において、少なくとも mRNA レベルで複数の Dscam アイソフォームが発現し、その発現様式は細胞ごとに異なること (Zhan et al., 2004) などが明らかにされた。また、報告者らは、Dscam の持つ分子の多様性を野生型の 60% にまで減少させた異なる 2 系統の変異体を作製し、Dscam の分子多様性が感覚神経細胞の適切な軸索投射を完成させるために必要であることを実証した (Chen, Kondo et al., 2005)。しかし、特定の神経細胞において発現する Dscam アイソフォームの数および種類が常に一定か、また、特定の Dscam アイソフォームには特定の生理機能が存在するか否かに関しては未解決のままであった。さらに、Dscam の C 末端に PDZ 様ドメイン (シナプス関連蛋白と相互作用する構造のひとつ) が存在すること (Kondo et al., 未発表) から、Dscam がシナプス部に局在してシナプスの形成・成熟、および各シナプスの結合特異性を制御する可能性が浮上していたが、その結論は得られていなかった。

2. 研究の目的

Dscam が各神経細胞間の特異的なシナプス結合の決定に寄与するか否かを検証するために本研究を開始し、特に、以下の点について明らかにすることを目的とした。

(1) 各 Dscam アイソフォームが神経細胞の軸索分枝形成および軸索投射パターンに及ぼす影響

(2) Dscam の C 末端 (PDZ 様ドメイン) が神経細胞の軸索分枝形成および軸索投射パターンに及ぼす影響

(3) 各 Dscam アイソフォームの細胞内局在および Dscam の存在がシナプス形成過程 (シナプス関連分子の発現および局在) に及ぼす影響

3. 研究の方法

(1) 各種 Dscam コンストラクトおよびその形質転換体の作製

① Dscam アイソフォームの細胞外領域に flag タグを付加したコンストラクト (Dscam-flag)、② Dscam の C 末端に点変異 (終止コドン) を誘導して C 末端を欠失させたコンストラクト (Dscam- Δ ct) をそれぞれ作製し、UAS 発現ベクターへ組み込み、転移酵素を供給するヘルパープラスミドと共にハエ卵にキャピラリーチューブを用いて注入、P 因子転移法により形質転換体を作製した。

(2) 各種 Dscam アイソフォームおよび C 末端欠失 Dscam を用いた軸索分枝および投射パターンの解析

MARCM システム (モザイク体細胞組み換え法) を用いて、感覚神経細胞で特異的に Dscam アイソフォームまたは Dscam- Δ ct を外来性に発現させた。GFP の発現を指標に組み換えが生じた神経細胞を同定したのち、剛毛を除去して脂肪親和性色素 (DiI) を注入、単一神経細胞の軸索を標識した。その後、脳を摘出し、共焦点レーザー顕微鏡を用いて、軸索分枝の形成および軸索投射パターンについて解析をおこなった。

(3) 各種 Dscam アイソフォームの細胞内局在およびシナプスの可視化

UAS-Gal4 発現誘導システムを用い、先に作製した各種 Dscam (Dscam-flag, Dscam- Δ ct) または Dscam-RNAi コンストラクトを感覚神経細胞で特異的に発現させた。また、これと同時に GFP 融合シナプトブレビン (syb:GFP) も発現誘導させ、GFP 蛍光を指標にシナプスを可視化し、flag に対する特異抗体を用いた免疫組織化学により Dscam の検出を試みた。

4. 研究成果

(1) 作製した Dscam コンストラクト (Dscam-flag) の機能検証

単一Dscamアイソフォームの細胞内局在を *in vivo*で明らかにするために、flagタグを付加したDscamを作製し、UAS-Dscam-flagとしてゲノムに組み込んだ形質転換体を得た。この形質転換体を用いて、MARCMシステムによりDscam機能欠失神経細胞 (図 1B) へDscam-flagを強制発現させた (図 1D) ところ、flagを付加していないDscamを強制発現させた神経細胞 (図 1C) と同様の軸索投射の救済が観察された。これにより、今回作製したDscam-flagはflag付加による機能障害はなく、神経受容体として正常に機能することが明らかになった。

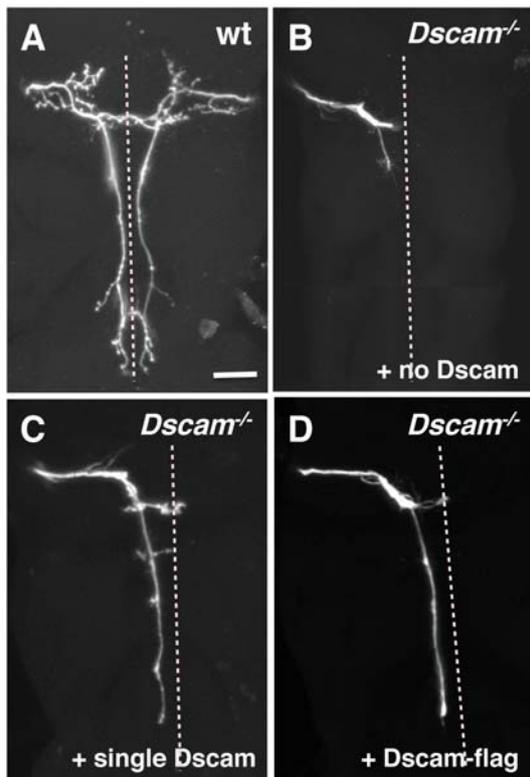


図 1

(2) Dscam アイソフォームに依存した軸索分枝形成および投射パターンの変換

野生型ハエの感覚神経細胞へ 3 種類の Dscam アイソフォーム (isoform-1, -2, -3) をそれぞれ異所性に発現させたところ、軸索投射パターンが変換され、そのパターンは発現させた Dscam アイソフォームの種類に依存した。isoform-1 は常に軸索分枝数を減少させた (図 2B) のに対して、isoform-2 (図 2C) および isoform-3 (図 2D) は野生型ではみられない新たな軸索分枝の形成を誘導した。分枝の形成開始点はアイソフォームごとによく保存さ

れていた。一方、いずれの Dscam アイソフォームを発現させた場合も、発現させない場合と比べて軸索分枝終末の細分化が高頻度に観察された (図 2E, F)。これらの結果は、各 Dscam アイソフォームが特異的なシナプス結合を規定することを示唆すると共に、Dscam の発現がシナプス形成そのものにも関与している可能性を示している。

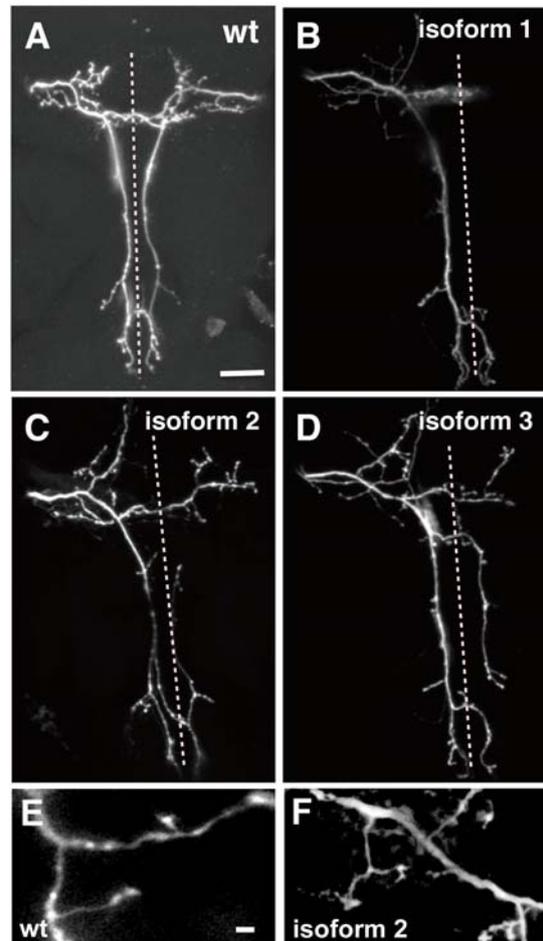


図 2

(3) Dscam C末端構造の機能的意義

シナプス関連タンパクとの相互作用および細胞内局在に関与することが知られているPDZ様ドメイン (DscamのC末端) を欠失させたDscam (Dscam- Δ ct) を用いて、MARCMシステムによる救済実験をおこなった。先に示したように、Dscam欠失神経細胞 (図 1B) へ野生型のDscamを外来性に発現させると軸索突起のposterior方向への伸長と軸索分枝の一部回復が認められた (図 1C) が、C末端欠失型のDscamを発現させても軸索突起の伸長は不完全で、かつ新たな分枝の形成は誘導されなかった (図 3D)。ま

た、時として軸索が方向選択を誤ってanterior方向へと伸長する例も確認された(図3C)。これらの結果は、DscamのC末端構造は軸索突起の伸長および軸索分枝の形成に必要であることを示している。

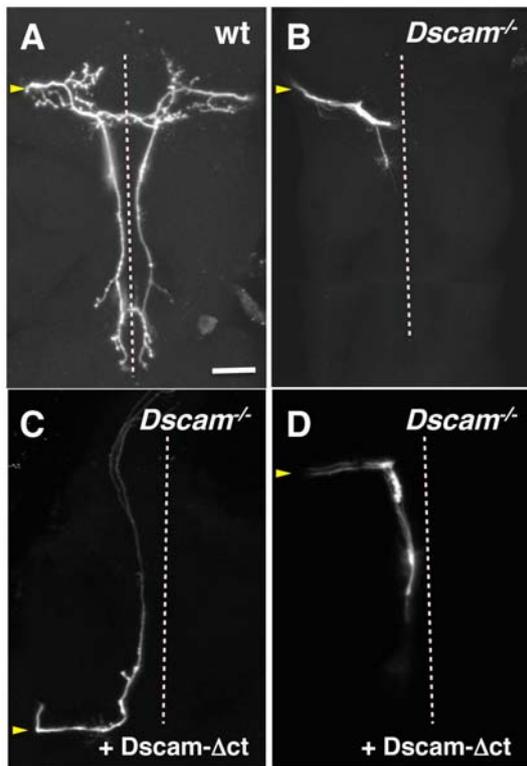


図 3

(4) Dscamによるシナプス関連蛋白のシナプスへの局在化

発生過程の sc 感覚神経細胞 (sc 神経細胞) で特異的にはたらく Gal4 ライン (sc-Gal4) を用いて syb:GFP を発現させ、シナプスの可視化を試みたところ、軸索投射領域に強い点状の GFP シグナルが観察された。これに対して、RNA 干渉法により Dscam の発現をノックダウンさせた神経細胞では軸索分枝が存在すると思われる領域から GFP シグナルが消失する、あるいは線維状に弱く均質な GFP シグナルのみが観察されるようになった。これらの結果は、Dscam の発現がシナプス関連分子のシナプスへの局在化に寄与している可能性を示唆している。

一方、sc-Gal4 ドライバーにより Dscam-flag または Dscam-Δct を発生期の sc 神経細胞へ過剰発現させたところ、剛毛の形成異常が観察された。この予想外の結果は、Dscam の発現が細胞分化にも関与している可能性を示唆して

おり、大変興味深い。また、この Dscam を過剰発現させた sc 神経細胞の軸索は複雑に分枝を繰り返しながら投射するという極めて重篤な投射異常を示した (図 4A)。

flag 抗体を用いた免疫組織化学的手法により Dscam の細胞内局在の解析を試みたが、現時点では成功に至っていない。ホールマウント染色を用いたため、抗体の浸透性に問題があった可能性が考えられる。そこで、初代培養神経細胞へ Dscam-flag を外来性に発現させて、flag 抗体を用いた免疫組織化学により Dscam がシナプス部に局在するか否かについて検索することを計画し、現在その準備をおこなっている。



図 4

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 10 件)

- ① Hotta H, Kagitani F, Kondo M, Uchida S. Basal forebrain stimulation induces NGF secretion in ipsilateral parietal cortex via nicotinic receptor activation in adult, but not aged rats. *Neurosci Res*, 63:122-128, 2009. 査読：有
- ② Honda K, Kitagawa J, Sessle BJ, Kondo M, Tsuboi Y, Yonehara Y, Iwata K. Mechanisms involved in an increment of multimodal excitability of medullary and upper cervical dorsal horn neurons following cutaneous capsaicin treatment. *Mol Pain*, 4:59, 2008. 査読：有

- ③ Suzuki I, Kitagawa J, Noma N, Tsuboi Y, Kondo M, Honda K, Kanda K, Hasegawa M, Saito K, Okamoto R, Iwata K. Attenuation of naloxone-induced Vc pERK hyper-expression following capsaicin stimulation of the face in aged rat. *Neurosci Lett*, 442:39-43 2008. 査読：有
- ④ Kamo H, Honda K, Kitagawa J, Tsuboi Y, Kondo M, Taira M, Yamashita A, Katsuyama N, Masuda Y, Kato T, Iwata K. Topical capsaicin application causes cold hypersensitivity in awake monkeys. *J Oral Sci*, 50:175-179, 2008. 査読：有
- ⑤ Saito K, Hitomi S, Suzuki I, Masuda Y, Kitagawa J, Tsuboi Y, Kondo M, Sessle BJ, Iwata K. Modulation of trigeminal spinal subnucleus caudalis neuronal activity following regeneration of transected inferior alveolar nerve in rats. *J Neurophysiol*, 99:2251-2263, 2008. 査読：有
- ⑥ Noma N, Tsuboi Y, Kondo M, Matsumoto M, Sessle BJ, Kitagawa J, Saito K, Iwata K. Organization of pERK-immunoreactive cells in trigeminal spinal nucleus caudalis and upper cervical cord following capsaicin injection into oral and craniofacial regions in rats. *J Comp Neurol*, 507:1428-1440, 2008. 査読：有
- ⑦ Suzuki I, Kitagawa J, Noma N, Tsuboi Y, Kondo M, Honda K, Kanda K, Hasegawa M, Saito K, Okamoto R, Iwata K. Attenuation of naloxone-induced Vc pERK hyper-expression following capsaicin stimulation of the face in aged rat. *Neurosci Lett*, 442:39-43, 2008. 査読：有
- ⑧ Hughes ME, Bortnick R, Tsubouchi A, Bäumer P, Kondo M, Uemura T, Schmucker D. Homophilic Dscam interactions control complex dendrite morphogenesis. *Neuron*, 54:417-427, 2007. 査読：有
- ⑨ Suzuki I, Harada T, Asano M, Tsuboi Y, Kondo M, Gionhaku N, Kitagawa J, Kusama T, Iwata K. Phosphorylation of ERK in

trigeminal spinal nucleus neurons following passive jaw movement in rats with chronic temporomandibular joint inflammation. *J Orofac Pain*, 21:225-231, 2007. 査読：有

- ⑩ Kubota I, Tsuboi Y, Shoda E, Kondo M, Masuda Y, Kitagawa J, Oi Y, Iwata K. Modulation of neuronal activity in CNS pain pathways following propofol administration in rats: Fos and EEG analysis. *Exp Brain Res*, 179:181-190, 2007. 査読：有

[学会発表] (計3件)

- ① Nakagawa K. Modulation of inferior alveolar nerve activity following regeneration in rat. 12th The International Association for the Study of Pain (IASP), 2008年8月20日, Glasgow.
- ② Hasegawa M. ERK phosphorylation in rat Vc neurons by experimental orthodontic force. 86th International Association for Dental Research (IADR), 2008年7月5日, Toronto.
- ③ 近藤真啓. 細胞接着分子Dscamによる特異的神経配線の決定, 第6回口腔医学フロンティア, 2008年2月9日, 東京.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

近藤 真啓 (KONDO MASAHIRO)
 日本大学・歯学部・専任講師
 研究者番号：50312294

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

坪井 美行 (TSUBOI YOSHIYUKI)
 日本大学・歯学部・専任講師
 研究者番号：50246906