

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 6 月 15 日現在

機関番号：63801

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2014

課題番号：23500405

研究課題名(和文) シナプスの発達・維持におけるTollファミリータンパク質の機能

研究課題名(英文) Functions of Toll family proteins in synaptic development and maintenance

## 研究代表者

鈴木 えみ子 (Suzuki, Emiko)

国立遺伝学研究所・構造遺伝学研究センター・准教授

研究者番号：20173891

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：シナプスの形成や維持及び可塑的变化において、様々な細胞膜タンパク質が重要な役割を担っている。我々はこの過程に関わる可能性の高い新規の細胞膜タンパク質の探索と機能解析を、ショウジョウバエの神経-筋接合(NMJ)を用いて遂行している。本研究では特にTollファミリーに注目して研究を進めた。Tollファミリー遺伝子の過剰発現や遺伝子突然変異の解析によりToll-7がNMJの発達を抑制的に制御する事を示唆する結果を得た。一方他のTollファミリー遺伝子やリガンドと考えられているSpzファミリーのRNAiによるノックダウンでは表現型が認められなかった。

研究成果の概要(英文)：Various plasma membrane proteins play important roles in the processes of synaptogenesis, as well as synaptic maintenance and plasticity. We are exploring the key functions of such proteins using *Drosophila* neuromuscular junctions (NMJ). In the present study, we focused on Toll family proteins. By the phenotype analyses of genetic overexpression or loss-of-function mutation, we found that Toll-7 functions as a negative regulator of NMJ development and maintenance. On the other hand, we have not observed the impairment of synaptic morphology by genetic RNAi of Spz family proteins, the putative ligand of Toll family proteins.

研究分野：神経組織学

キーワード：ショウジョウバエ 神経筋接合 シナプス Toll

## 1. 研究開始当初の背景

(1) ショウジョウバエ神経筋接合をモデルとしたシナプス形成の研究:

ショウジョウバエ幼虫体壁筋の神経筋接合(NMJ)は、シナプス部が比較的大きく、幼虫の生長に伴うシナプス形成・維持及び可塑的变化の過程を生体内で詳細に解析できる優れたモデル系である(Budnik & Ruiz-Canada, 2006)。我々は、この系における細胞表面タンパク質の機能を解明することを目的とし、ゲノム情報から選択した細胞膜及び分泌タンパク質をコードする約 1000 遺伝子のうち GAL4-UAS system の利用が可能な約 400 遺伝子について過剰発現スクリーニングを行なった。その結果、後シナプスでの過剰発現がシナプス形態に異常を引き起こす遺伝子を複数同定した(Kurusu et al., 2008)。なかでも toll-7 の過剰発現は生長に伴うシナプスの発達を強く抑制する表現型を示した。

(2) 神経系における Toll ファミリータンパク質の機能:

Toll-7 は細胞外に leucine-rich repeat を骨格としたタンパク質相互作用ドメインを持ち、細胞内にはシグナルカスケードの活性化ドメインと考えられている、Toll-Interleukin-1 receptor (TIR) ドメインを持つ TIR protein family に属するタンパク質である。TIR protein family は線虫から哺乳類まで広く存在するタンパク質群で、自然免疫や発生期のパターン形成に関与するものがよく知られている。一方、TIR protein の多くが神経系で発現していることが報告されているが、その機能については、軸索伸長やニューロン分化への関与が報告されているものの、分子メカニズムについてはほとんど不明であった。ショウジョウバエでは 9 種類ある Toll ファミリータンパク質のうち Toll が胚期におけるシナプス形成を負に制御することを我々や他のグループが

報告した(Suzuki et al., 2000, Inaki et al., 2010)。我々が得た Toll-7 によるシナプス形成を抑制する表現型は、より後期のシナプスの発達や維持、可塑的变化の過程においても、Toll ファミリータンパク質が関与していることを示唆する初めての結果であった。そこで、我々はショウジョウバエ NMJ を実験系として用い、Toll-7 を含む複数の Toll ファミリータンパク質がシナプスの発達・維持・可塑的变化の過程に関与している可能性を検証し、またその分子メカニズムを解明することにより、TIR protein family の神経系における機能についてより普遍的な知見を得たいと考えた。

## 2. 研究の目的

ショウジョウバエ NMJ をモデルとした、シナプスの発達・維持・可塑的变化の制御機構の解析を Toll ファミリータンパク質に着目して行う。あわせてこれに関連した分子の機能解析も行う。

## 3. 研究の方法

(1) ショウジョウバエ Toll ファミリータンパク質の発現解析: ショウジョウバエ NMJ シナプスをモデルとして Toll ファミリータンパク質の機能解析を行なうための基礎データとして必須となる、内在性の Toll ファミリータンパク質の時空間的発現パターンを明らかにする。

(2) toll ファミリータンパク質 の遺伝子突然変異体の解析: (1)で発現を確認した Toll ファミリータンパク質について、遺伝子の過剰発現や、RNAi によるノックダウン、機能欠失型突然変異体を作成し、toll-7 も含めこれらの突然変異各々、または複数の重複突然変異について、幼虫の生長にともなうシナプス形態及び機能の変化にどのような異常があ

らわれるのか、細胞微細形態解析や機能分子の動態解析によって、表現型を詳細に解析する。これらの結果から Toll ファミリータンパク質がシナプス形成・維持・可塑的变化の制御にどのように関与するのか明らかにする。

(3) Toll ファミリータンパク質の上流及び下流で機能する分子とこれに関連する分子の探索と機能解析：

Toll ファミリータンパク質の細胞外ドメインに作用する可能性がある分子として、Spatzle 及び *Drosophila neurotrophins* (DNT1, 2) が考えられる (Zhu et al., 2008)。また、細胞内ドメインによって活性化される可能性が考えられる細胞内シグナル系としては、Pelle/IRAK を経由する NF $\kappa$ B 活性化の経路等が考えられる (Gay & Gangloff, 2007)。これら分子と Toll ファミリータンパク質の遺伝的相互作用を調べることにより上流及び下流の経路を明らかにする。また、Wingless や BMP, といった既知あるいは我々が新規に同定したシナプス形成制御因子との遺伝学的相互作用を解析し、これらの結果から Toll ファミリータンパク質を介したシナプス形態及び機能の制御がどのようなシグナルによって制御されているのか明らかにする。

#### 4. 研究成果

(1) ショウジョウバエ Toll ファミリータンパク質の発現解析：Toll-7 については、*in situ* ハイブリダイゼーションにより中枢神経系で mRNA の発現を認めた。一方、ポストシナプスである筋肉細胞での発現について、*in situ* ハイブリダイゼーションにより検証したところ、非特異的なシグナルが認められ、発現を確認することができなかった。そこで、筋組織特異的 RT-PCR 法を行った。この方法では筋細胞特異的に PolyA 結合タンパク質を

発現誘導することによって、このベイトに結合する RNA を回収することができた。これら RNA を template に用いた RT-PCR を行ったが、有意なシグナルが得られなかった。これまでのところ、他の Toll ファミリーメンバーについても有意な発現は認めることができなかった。これらの結果から、発現パターンの解析は困難と思われたので、遺伝子突然変異による表現型の有無を発現の指標にする方向で解析を進めることにした。

(2) Toll ファミリータンパク質の遺伝子突然変異体の解析：

これまでの我々の解析から、Toll-7 の筋肉での過剰発現がシナプス形成において抑制的に作用することが明らかとなったので、まず *toll-7* 遺伝子の機能欠失突然変異体を作成し、シナプスにおける Toll-7 の機能解析を行なった。その結果、*toll-7* 遺伝子の機能欠失突然変異体では NMJ のポストシナプスにおいて、グルタミン酸受容体の発現が上昇していることがわかった。これに対し、プレシナプスのアクティブゾーンの形成や、微小管とその結合タンパク質の配置には異常が認められなかった。このことから、Toll-7 はポストシナプスにおいてシナプス形成を抑制的に制御していることが示唆された。次に、この抑制制御の分子メカニズムを解明すべく、ポストシナプスで細胞骨格を成すスペクトリンやその制御因子である aPKC の局在を検証したが、突然変異体での異常は認められなかった。

他の Toll ファミリータンパク質についても遺伝子突然変異体や RNAi による機能解析を試みた。これまでに Toll-1, 5, 6, 8, について表現型を解析したところ、*toll-7* 遺伝子突然変異体で認められたようなシナプス形態の異常は認められなかった。

(3) Toll ファミリータンパク質の上流及び下

流で機能する分子とこれに関連する分子の探索と機能解析：

To11 ファミリーのリガンドと考えられている Spz ファミリーが NMJ の形成に関与するか検討した。ポストシナプスにおける役割を調べるために、これらの遺伝子の RNAi を筋肉で強制発現した。Postsynaptic density (PSD) のマーカーである Dlg の局在とグルタミン酸受容体サブユニットの局在を検証することにより、これら遺伝子が NMJ のポストシナプスの形成に関与するのを見極めた。しかしながら、RNAi を用いた実験ではこれらマーカーに大きな異常が確認できなかった。RNAi 効果の改善や機能的な重複性の解析をさらに進めることが、今後の課題として残った。

NMJ のマーカーを使った解析の中で、我々は To11-7 に加えて、FGF 受容体の一つである Heartless (Htl) がグルタミン酸受容体の NMJ での発現を制御していることを見出した。そこで、NMJ におけるグルタミン酸受容体の発現制御の機構を総合的に解明する目的で、FGF シグナリングについても解析を進めた。その結果、FGF リガンドである Pyr および Ths が NMJ のポストシナプス膜に局在する Htl 受容体を活性化し、下流の MAPK カスケードを活性化することで、グルタミン酸受容体サブユニットの転写を活性化することを示唆する結果を得た。グルタミン酸受容体サブユニットタンパク質の NMJ での発現も同様に Htl の活性によって正に制御されたが、その機構が転写量の制御のみによるのかを明らかにするため、筋細胞で恒常的に活性のあるプロモーターによるグルタミン酸受容体の強制発現実験を現在進めている。

#### 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 4 件)

1. Homma M, Nagashima S, Fukuda T, Yanagi S, Miyakawa H, Suzuki E, et al. Downregulation of Centaurin gamma1A increases synaptic transmission at Drosophila larval neuromuscular junctions. *The European journal of neuroscience*. 2014;40(3):3158-70. doi: 10.1111/ejn.12681. 査読有
2. 鈴木えみ子, 来栖光彦. 神経分化に伴う N-カドヘリンの細胞内分布と機能の変化. *生体の科学*. 2013;64(3):249-53. 査読無
3. Kurusu M, Katsuki T, Zinn K, Suzuki E. Developmental changes in expression, subcellular distribution, and function of Drosophila N-cadherin, guided by a cell-intrinsic program during neuronal differentiation. *Dev Biol*. 2012;366:204-17. doi: 10.1016/j.ydbio.2012.04.006. 査読有
4. Mochizuki H, Toda H, Ando M, Kurusu M, Tomoda T, Furukubo-Tokunaga K. Unc-51/ATG1 controls axonal and dendritic development via kinesin-mediated vesicle transport in the Drosophila brain. *PLoS ONE*. 2011;6(5):e19632. doi: 10.1371/journal.pone.0019632. 査読有

[学会発表] (計 7 件)

1. Sugie, A., Hakeda, S., Suzuki, E., Tavosanis, G., Suzuki, T. Activity-dependent synaptic remodeling in the Drosophila photoreceptor neurons. The 11th Japanese Drosophila research Conference, 2014年6月4日-6日, 金沢歌舞伎座, 金沢市.
2. 鈴木崇之, 杉江淳, 羽毛田聡子, 鈴木えみ子, Tavosanis, Gaia., 神経活動依存的なフィードバックシグナルによるショウジョウバ視神経細胞の前シナプスの活動部位における分子的再構成. 第37回日本神経科学大会 2014年9月11日-13日, パシフィコ横浜, 横浜市.
3. 杉江淳, 羽毛田聡子, 鈴木えみ子,

- Tavosanis, G., 鈴木 崇之 . Molecular remodeling of the presynaptic active zone of *Drosophila* photoreceptors via an activity-dependent feedback signal. 第37回日本分子生物学会年会, 2014年11月25日-27日, パシフィコ横浜、横浜市.
4. Kobayashi, Y., Kurusu, M., Suzuki, E., *Drosophila* FGF signaling as a regulator of postsynaptic expression of glutamate receptor subunits. 第36回日本分子生物学会年会, 2013年12月3日-6日, 神戸ポートアイランド, 神戸市.
  5. Kobayashi, Y., Kurusu, M., Suzuki, E. FGF signaling regulates postsynaptic development in the *Drosophila* neuromuscular junction. The 10th Japanese *Drosophila* Research Conference, 2012年10月13日-15日, 東京慈恵会医科大学, 東京都.
  6. 小林百合, 来栖光彦, 鈴木えみ子. ショウジョウバエ FGF シグナルによる後シナプス分化の制御. 第35回日本神経科学大会, 2012年9月18日-21日, 名古屋国際会議場, 名古屋市.
  7. Kurusu, M., Katsuki, T., Zinn, K., Suzuki, E. Intrinsic control of spatiotemporal change in N-cadherin expression during neuronal maturation. 第34回日本神経科学大会, 2011年9月14日-17日, パシフィコ横浜, 横浜市.

[その他]

ホームページ等

<http://www.nig.ac.jp/section/suzuki/suzuki-j.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

鈴木 えみ子 (SUZUKI, Emiko)

国立遺伝学研究所 構造遺伝学研究センター 准教授

研究者番号 : 20173891

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

来栖 光彦 (KURUSU Mitsuhiro)

国立遺伝学研究所 構造遺伝学研究センター 助教

研究者番号 : 50413985

(平成24年11月25日まで連携研究者として参画)