

平成 23 年 5 月 31 日現在

研究種目：特定領域研究

研究期間：2005～2009

課題番号：17024010

研究課題名（和文）

特異的シナプス形成過程に関与する分子の同定と動態観察

研究課題名（英文）

Identification and dynamics of molecules involved in selective 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（和文）：

神経回路は神経細胞が標的の神経細胞や筋肉細胞とシナプスと呼ばれる接着構造を介してつながることで構築されている。神経細胞は特定の標的細胞を認識し、それとのみシナプス結合を形成することにより、特定の機能を生み出す回路を形成する。本研究においては、高度な遺伝子操作が可能なショウジョウバエの神経系をモデルとし、シナプス結合の特異性の決定に関わる新たな機構を解明するとともに、動物個体内で進行するシナプス形成過程の可視化に成功した。

研究成果の概要（英文）：

Synapses are specialized junctions through which neurons signal to each other and to other target cells such as muscles and are crucial to the functioning of the nervous system. Neurons select and synapse with specific target cells. This “synaptic specificity” underlies the proper functioning of the nervous system. In this study, we used highly sophisticated Drosophila genetics to reveal a novel mechanism by which neurons find and recognize their target cells. We also succeeded in visualizing the process of synapse formation in developing embryos and elucidated a molecular mechanism of synapse formation that occurs in an intact organism.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2005年度	17,100,000	0	17,100,000
2006年度	17,400,000	0	17,400,000
2007年度	26,400,000	0	26,400,000
2008年度	16,900,000	0	16,900,000
2009年度	18,000,000	0	18,000,000
総計	95,800,000	0	95,800,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：脳神経科学・神経科学一般

キーワード：シナプス、神経回路、イメージング、マイクロアレイ、ショウジョウバエ、標的認識、軸索誘導、シナプス形成

1. 研究開始当初の背景

(1) シナプス特異性の決定機構

ヒトも含めた動物の体内では、多数の神経細胞がそれぞれ決まった相手（神経細胞や筋肉）と結合することで、機能的な神経回路が形作られている。発生過程において、神経細胞は、多数の細胞の中から、いかにして自分の結合相手を間違えなく見つけ出すのか？古くより、個々の標的細胞上に存在する、「目印」分子の関与が示唆されており、実際、神経細胞に対して、「こちらにおいで」と誘引的に働きかける作用を持つような分子が少数であるが見つかっている。しかし、特異的神経結合の仕組みは未だ不明の点が多かった。

(2) シナプス形成過程における分子集積

一方、神経細胞は、その標的細胞を認識した後、そこに情報伝達の間としてシナプス構造を形成する。シナプスが正しく機能するためには、情報伝達に関わる様々な機能分子が正しくシナプス部へ配置されることが重要であり、この過程がうまくいかないと神経疾患などの脳神経系の異常を引き起こすことになる。これまでに培養神経細胞を用いた研究から細胞接着分子が神経細胞と標的細胞との接着及びシナプス部への機能分子の配置に関与することが示唆されてきた。シナプスが形成される際、神経細胞と標的細胞の細胞膜が接触すると、両者の膜表面に発現している細胞接着分子がちょうど互いに握手をするように結合してシナプス構造を安定化させる。同時に、細胞接着分子は同じ細胞内の他の分子にも結合することができるので、細胞接着部位への他の分子の集積も誘導することができる（図5参照）。細胞接着分子を介したシナプス形成過程は、培養細胞系では詳しく解析されてきたが、生体内での実際のシナプス形成における細胞接着分子の役割は明らかにされてこなかった。

2. 研究の目的

(1) シナプス特異性の決定に関わる分子の探索

標的認識に関わる目印分子の研究があまり進んでいない理由として、次の2点があげられる。まず、多数の細胞が複雑にからまりあった脳神経系のなかで、特定の細胞においてのみ存在するような微量の分子を見つけれ

すことが技術的に困難であること。次に、仮にそのような分子を見つけても、その機能を生きた動物の中で調べるのが難しいこと、である。本研究において、われわれは、東京大学先端科学技術研究センターの油谷浩幸教授と共同で、特定の神経標的細胞を特徴づけるような「目印」を、単一細胞マイクロアレイを用いて系統的に探索することを試みた。さらに、この技術を用いて同定した分子を、ショウジョウバエの発達した遺伝子操作技術を用いて生体内で調べることを目的とした。

(2) シナプス形成過程の生体内可視化

従来のシナプス形成研究における技術的な問題として以下の2点が挙げられる。第1に、生きた動物個体内で非常に微小なシナプス構造を可視化するのが困難であること。第2に、脳神経系の中では膨大な数のシナプスが形成されるので、いつどこでシナプスが形成されるのかを予測するのが難しいことである。本研究において我々は、比較的構成が単純で、高度な遺伝子操作技術が可能なショウジョウバエの神経筋シナプスに最新のイメージング技術を適用し、これらの問題点を克服し、個体内で進行するシナプス形成の仕組みを解明することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 単一筋肉のマイクロアレイ解析

ショウジョウバエの胚を解剖し、腹側部に存在する隣あった筋肉12及び筋肉13を、一本ずつ微小ガラスピペットにより直接取り出し、そこから得られる微量のRNAを抽出、cDNAに逆転写後、RNAポリメラーゼを用いて、2サイクル増幅し、Affymetrix社のGeneChipを用いてマイクロアレイ解析を行った。

(2) シナプス機能分子のライブイメージング
ライブイメージングは共焦点レーザー顕微鏡を用いて行った。ショウジョウバエ胚をそのまま(whole mount)もしくは解剖し、生理食塩水中で発生させ、その間の分子の挙動を観察した。

4. 研究成果

(1) 負の制御による標的認識機構の発見

ショウジョウバエ幼虫の運動神経が、腹部の特定の筋肉に配線する過程に着目し研究を

行った(図1)。運動神経が、隣り合った個別の筋肉を区別して正確に配線することから、筋肉上で働く目印分子の存在が予想されていたからである。このような目印分子をつくる遺伝子は、筋肉間で異なった発現をされると考えられる。そこで、DNA マイクロアレイを用い、一つ一つの筋肉細胞において、ショウジョウバエのほぼすべての遺伝子の発現を解析し、両者間で発現に差異があり、したがって目印の候補となるような遺伝子を探索した。具体的には、ショウジョウバエの胚を解剖し、腹側部に存在する隣あった筋肉12及び筋肉13を、一本ずつ微小ガラスピペットにより直接取り出し、そこから得られる微量のRNAを増幅し、マイクロアレイ解析を行った。その結果、2つの筋肉間で発現量に差がある遺伝子を、約200個同定することに成功した。この中には、標的認識過程に直接関与する可能性のある膜局在型または分泌型タンパク質も多数含まれていた。これらについて、系統的な機能解析を行うことにより、そのうちの一つ、Wnt4が、運動神経が筋肉を識別する際に重要な役割をもつことを見いだした。

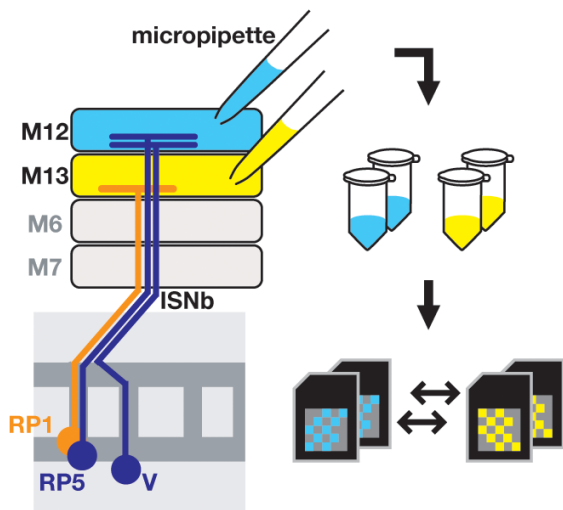


図1：単一細胞マイクロアレイによる標的特異分子の探索

Wnt4はWntファミリーに属する分泌タンパク質で、異なった運動神経と結合する上記の筋肉12, 13のうち、筋肉13においてのみ発現していた。遺伝学的にWnt4を欠失させると、本来筋肉12と結合する運動神経が、筋肉12に加え、本来結合しないはずの筋肉13にも結合するようになった(図2)。逆に、Wnt4を筋肉12で人工的に発現させると、筋肉12における神経結合形成が阻害された。これらの観察結果は、Wnt4が筋肉13において発現し、筋肉12と結合するべき運動神経に対し阻害的に働きかけることにより、それらが筋肉13ではなく筋肉12と結合するように制御していることを示唆している。さらに我々は

ソーク研究所のJohn Thomas博士らと共同で、運動神経側で発現するWnt4のリセプターとしてderailed2とFrizzled2を同定した。

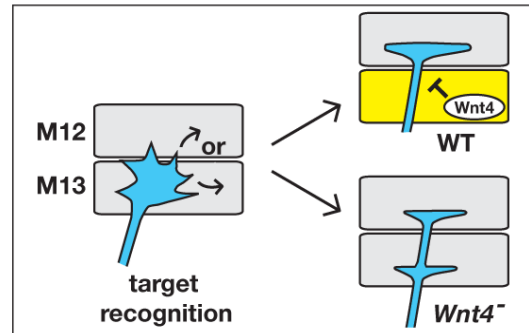


図2：Wnt4の発現と機能解析

これまでに、標的細胞に発現し、「こちらにおいて」という誘因的な働きを通じて標的特異性を決めるような分子の候補がいくつか見つかっている。本研究は、このような正の制御機構だけでなく、非標的細胞からの「こちらにくるな」という負の制御機構が、神経結合の特異性の決定に必須の役割を果たすことを初めて示すものである(図3)。Wnt4の属するWntファミリー分子は種間で保存されているので、本研究で明らかになった「負の目印」を介した神経結合の仕組みは、ヒトを含めた他の動物にも同様に存在する可能性が高いと考えている。

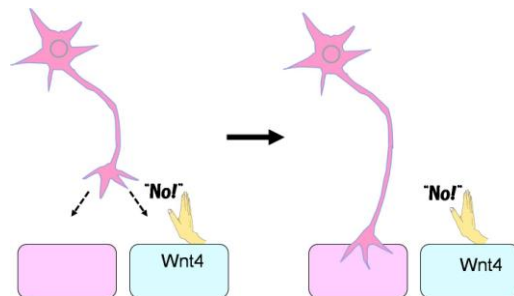


図3：負の制御による標的決定機構

(2) シナプス形成過程の生体内可視化
 ショウジョウバエの神経筋シナプスは以下のような優れた特徴からシナプス可視化に適している。ショウジョウバエの卵は比較的透明で内部構造がよく見える。また、膨大な数のシナプスが存在する中枢神経系に比べて、神経筋シナプスは数が少ないため一つ一つを再現性よく見つけ出すことが可能である。さらに、どの個体でも卵として産み落とされてからほぼ同じ時間経ったのちに、シナプスが形成される。したがっていつどの場所にシナプスが形成されるのかをあらかじめ予測できる。このシナプスにおいて、神経表

面と筋肉表面両方に存在しており、したがって両者を結びつける役割を担っていることが期待されたファシクリン2という細胞接着分子に着目し、以下の研究を行った。

ショウジョウバエの神経筋結合系において、運動神経細胞と筋肉は両者ともに細かい突起を伸ばして互いを認識し、特定の接触を安定化することにより、シナプス部を形成する。まず、この過程における、ファシクリン2 (NCAM ホモログ) と、足場タンパク質 Dlg (PSD-95 ホモログ) の動態と機能を調べた。これら分子は成長後の幼虫のシナプスにおいて PDZ ドメインを介し結合しシナプスの維持に重要であることが以前の研究により知られていたが、最初にシナプスが形成される過程における役割は不明であった。まず、GFP との融合蛋白質 (Fas2-GFP、Dlg-GFP) を特定の筋肉において発現することにより、分子の挙動を調べた。その結果、神経細胞が筋肉細胞に接触するまさにその瞬間にファシクリン2 および Dlg がシナプス部に集まるということが分かった (図4)。また、FRAP (fluorescence recovery after bleaching) 法を用い、ファシクリン2 の細胞膜上での動きやすさを測定したところ、神経細胞との接触に伴って動きやすさが低下し、シナプス部に安定して存在するようになることが明らかになった。さらに、これら分子の突然変異体の解析から、1. Fas2-GFP の後シナプス部への局在は、プレの Fas2 との神経シナプス接着に依存するが Dlg には依存しない、2. Dlg-GFP の後シナプス部への局在は Fas2 に依存する、という知見を得た。

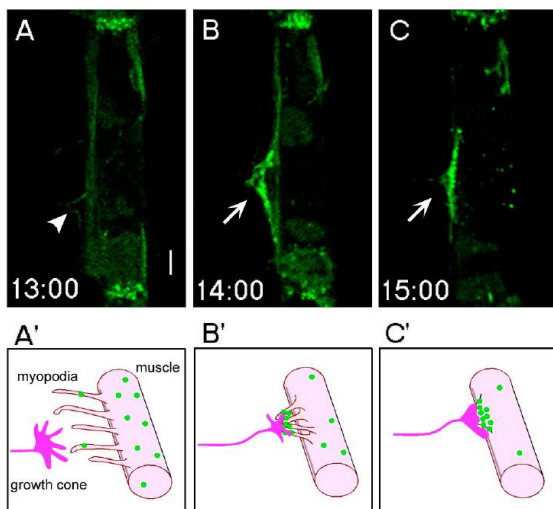


図4：神経筋シナプス形成過程におけるファシクリン2の動態

(A-C: Fas2-GFP の蛍光シグナルの変化、A'-C': 模式図、ファシクリン2 を点で表す。)

以上のイメージング解析および遺伝学的証拠から、神経細胞が筋肉細胞に接触すると、

細胞間の接着を介してまず細胞接着分子自身の集積がシナプス部において誘導され、さらに細胞接着分子が他の機能分子に結合することにより、それらのシナプス部への集積を促す、というシナプス形成のメカニズムが示唆された (図5)。

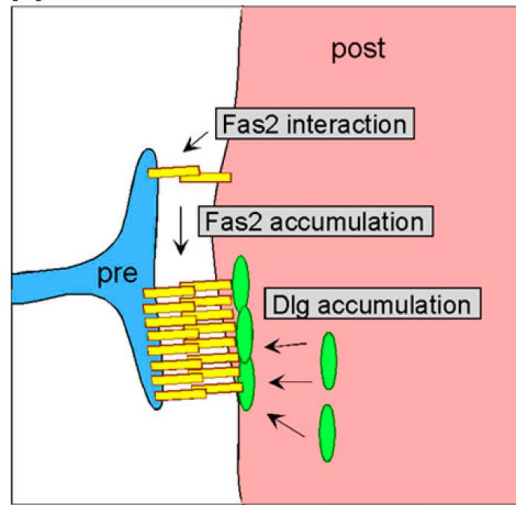


図5：ファシクリン2によるシナプス分子集積誘導機構の模式図

本研究は、発生過程において神経細胞がシナプスを介してつながる際の細胞接着分子の振る舞いと働きを個体内で初めて明らかにした。さらに、細胞接着分子によるトランスシナプティックな細胞間相互作用がシナプスの誘導に関与することの生体内での証拠を示した。

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13件)

(原著論文、すべて査読あり)

- ① Inaki M, Shinza-Kameda M, Ismat A, Frasn M & Nose A *Drosophila* Tey represses transcription of a repulsive cue Toll and generates neuromuscular target specificity. *Development* 137, 2010, 2139-2146
- 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, 2010, 1284-1292
- ③ Kohsaka H, Nose A, Target recognition at the tips of postsynaptic filopodia: accumulation and function of Capricious. *Development* 136, 2009, 1127-1135
- ④ Kazama H, Ichikawa A, Kohsaka H,

- Morimoto-Tanifuji T, Nose A, Innervation and activity dependent dynamics of postsynaptic oxidative metabolism. *Neuroscience* 152, 2008, 40-49
- ⑤ Kohsaka H, Takasu E, Nose A, In vivo induction of postsynaptic molecular assembly by the cell adhesion molecule Fasciclin2. *The Journal of cell biology* 179, 2007, 1289-1300
- ⑥ Inaki M, Yoshikawa S, Thomas JB, Aburatani H, Nose A, Wnt4 is a local repulsive cue that determines synaptic target specificity. *Current biology* : CB 17, 2007, 1574-1579
- 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, 2007, 1007-1015
- ⑧ Nakayama H, Kazama H, Nose A, Morimoto-Tanifuji T, Activity-dependent regulation of synaptic size in Drosophila neuromuscular junctions. *Journal of neurobiology* 66, 2006, 929-939
- ⑨ Shinza-Kameda M, Takasu E, Sakurai K, Hayashi S, Nose A, Regulation of layer-specific targeting by reciprocal expression of a cell adhesion molecule, capricious. *Neuron* 49, 2006, 205-213
(総説等、査読なし)
- ⑩ Lu B, Wang KH, Nose A, Molecular mechanisms underlying neural circuit formation. *Current opinion in neurobiology* 19, 2009, 162-167
- ⑪ 能瀬聡直, 稲木美紀子, 新座(亀田)麻記子, 神経特異結合の分子機構—負のシグナルによる標的決定 蛋白質・核酸・酵素 53, 2007, 531-536
- ⑫ 能瀬聡直, 神経・筋シナプス形成機構の新展開 臨床麻酔 30, 2006, 1811-1818
- ⑬ 能瀬聡直, 高坂洋史, 神経筋連絡の特異性を制御する分子機構 神経科学の進歩 49, 2005, 85-93
- [学会発表] (計 2 3 件)
- ① Inaki, M., Shinza-Kameda, M., Frasnch, M., and Nose, A.: Generation of synaptic specificity by target repulsion Roles and transcriptional regulation of local inhibitory cues. Cold Spring Harbor Asia Francis Crick Symposium on Neuroscience, 2010.4.12-17, Suzhou, China
- ② Nose, A.: Generation of synaptic specificity by target repulsion: Roles and transcriptional regulation of local inhibitory cues. "Constructing Neural Circuits" meeting at Janelia Farm, 2009.5.3-6, USA.
- ③ Kohsaka, H., Tachi, Y. and Nose, A.: Formation and plasticity of neural circuits regulating peristaltic movements of Drosophila larvae "Constructing Neural Circuits" meeting at Janelia Farm. 2009.5.3-6, USA.
- ④ Nose, A., Inaki, M., Shinza-Kameda, M.: Generation of synaptic specificity by repulsion 第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会 合同大会 シンポジウム, 2008.12.10, 神戸
- ⑤ Kohsaka, H. and Nose, A.: Dynamisms of postsynaptic filopodia during target recognition of Drosophila Neuromuscular Junction NeuroFly2008 `12th European Drosophila neurobiology conference", 2008.9.6-10. Wurzburg, Germany
- ⑥ Kohsaka, H. and Nose, A.: Dynamisms of postsynaptic filopodia during target recognition of Drosophila Neuromuscular Junction. 第31回日本神経科学大会、2008.7.9-11、東京
- ⑦ Hiroshi Kohsaka, Etsuko Takasu, Akinao Nose: Induction of molecular assembly by cell adhesion molecule in Drosophila neuromuscular junction, US-Japan Brain Research Collaborative Program "Workshop on Receptor Trafficking and Cell Biology of Neurons: Physiology and Disease", 2008.2.24-2.27, Asilomar, USA
- ⑧ Kohsaka, H., Takasu, E. and Nose, A.: Imaging postsynaptic assembly of the cell adhesion molecule Fasciclin2 in neuromuscular synaptogenesis. Cold Spring Harbor Meeting on "Neurobiology of Drosophila" 2007.10.3-7, Cold Spring Harbor
- ⑨ Nose, A., Inaki, M & Aburatani, H.: Wnt4 is a local repulsive cue that determines target specificity. 第30回日本神経科学大会, 2007.9.10-12、横浜
- ⑩ Kohsaka, H., Takasu, E. and Nose, A.: Postsynaptic accumulation of cell adhesion molecules imaged in vivo. 第30回日本神経科学大会, 2007.9.10-12、横浜
- ⑪ Kohsaka, H., Takasu E. & Nose, A.: Dynamism and regulation of synaptic assembly at the neuromuscular junction in Drosophila. 5th East Asian Biophysics Symposium & 44th annual meeting of the Biophysical Society of Japan. 2006.11.12-16, Okinawa.
- ⑫ Inaki, M, Aburatani H. & Nose A.: Expression profiling of synaptic specificity: target selection by Wnt4-mediated

repulsion. 36th Annual Meeting of the Society for Neuroscience, 2006.10.14-18, Atlanta.

- ⑬ Kohsaka, H., Takasu E. & Nose, A.: Distinct localization of cell adhesion molecules for the target recognition and synapse formation in early phase of synaptogenesis in vivo. Cold Spring Harbor Meeting on “Axon Guidance, Synaptogenesis & Neural Plasticity” 2006.9.13-17, Cold Spring Harbor.
- ⑭ Inaki, M, Aburatani H. & Nose A.: Single-cell microarray identified Wnt4 as a local repulsive cue that determines target specificity. Cold Spring Harbor Meeting on “Axon Guidance, Synaptogenesis & Neural Plasticity” 2006.9.13-17, Cold Spring Harbor
- ⑮ 稲木美紀子, 鈴木良枝, 油谷浩幸, 能瀬聡直: Genome-wide search for the neuromuscular target recognition molecules in Drosophila using single cell expression analysis. 第29回日本神経科学大会、2006.7.19-21、京都
- ⑯ 高坂洋史、高須悦子、能瀬聡直: Initial molecular steps in synaptogenesis in vivo: trans-synaptic interaction of cell adhesion molecule is involved in postsynaptic assembly of PSD95-homolog Dlg. 第29回日本神経科学大会、2006.7.19-21、京都
- ⑰ Hiroshi Kohsaka, Etsuko Takasu, and Akinao Nose: Recognition by postsynaptic filopodia and dynamics of molecular assembly during early phase of synaptogenesis. 2005 meeting on “Neurobiology of Drosophila”, 2005.10.5-9, Cold Spring Harbor, USA

[その他]

・新聞掲載 (計20件)

- ① 日経産業新聞(2006年1月19日)
脳神経結合の目印発見
- ② 毎日新聞(2006年1月22日)
神経の誘導物質発見
- ③ 朝日新聞(2006年1月24日 夕刊)
正しくつながる神経細胞の目印
- ④ 科学新聞(2006年1月27日4面)
神経細胞の正確な配線機構解明
- ⑤ 読売新聞(2006年2月1日)
脳神経結合の目印特定日経産業新聞
(2007年8月31日10面) 神経との接続
を拒むたんぱく質を発見
- ⑥ 日刊工業新聞 (2007年8月31日27面)
負の印から正しい配線
- ⑦ 読売新聞 (2007年9月2日朝刊2面)
誤った神経結合拒むたんぱく質
- ⑧ 毎日新聞 (2007年9月5日朝刊15面)

神経誘導物質を発見

- ⑨ 科学新聞 (2007年9月21日2面)
神経回路形成で働く負の目印
- ⑩ 日刊工業新聞(2007年12月18日22面)
動物個体のシナプス 形成過程を可視化
- ⑪ 科学新聞 (2008年1月1日4面)
シナプス構築の仕組み明らかに
- ⑫ 東京読売新聞朝刊(2008年1月6日19面)
神経と筋肉「接続」の瞬間
- ⑬ 日経産業新聞 (2008年1月7日9面)
シナプスの形成過程 生体内で可視化
- ⑭ 東京新聞朝刊 (2008年1月15日15面)
シナプス形成 生体内で観察
- ⑮ 中日新聞夕刊 (2008年1月15日10面)
シナプス形成 生体内で観察
- ⑯ 毎日新聞朝刊(2008年2月17日19面)
シナプス形成過程 ハエの卵で初確認
- ⑰ 日経産業新聞(2009年3月9日11面)
神経つなぐ仕組み 双方の細胞で認識
- ⑱ 科学新聞 (2009年3月13日7面)
神経回路を正しく接続するための双方向
探索機構を解明
- ⑲ 日刊工業新聞 New ウェーブ21 (2009年3月24日31面)
神経回路形成は双方向
- ⑳ 日本経済新聞 (2011年3月20日)
ミクロで観る生命4. 成長するハエの卵、
神経回路ができる瞬間

・ホームページ

<http://bio.phys.s.u-tokyo.ac.jp/>

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

森本 高子 (MORIMOTO TAKAKO)

東京薬科大学・生命科学部・准教授

研究者番号：10311648

高須 悦子 (TAKASU ETSUKO)

東京大学・大学院理学系研究科・助教

研究者番号：30282718

(2008-2009 は連携研究者)

高坂 洋史 (KOHSAKA HIROSHI)

東京大学・大学院理学系研究科・助教

研究者番号：20431900

(2008-2009 は連携研究者)

(3) 研究協力者

稲木 美紀子 (INAKI MIKIKO)

東京大学・大学院理学系研究科・研究員