

令和 3 年 6 月 8 日現在

機関番号：12608

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06250

研究課題名(和文) 視神経軸索の固有の層への投射を決定する分子コードとシナプス形成メカニズム

研究課題名(英文) Molecular codes which determine the depth of final axonal stabilizing layer in the Drosophila

研究代表者

羽毛田 聡子(鈴木聡子)(Hakeda-Suzuki, Satoko)

東京工業大学・生命理工学院・研究員

研究者番号：90631482

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：ショウジョウバエの視神経回路は蛹期中期に軸索を標的層まで伸ばし、シナプス形成を始める。視神経が正しい層に投射するために膜タンパク質と接着分子は特定の層に固着するコードを生み出していると予想した。そこで、脱リン酸化酵素LAR、Ptp69Dと接着分子N-Cadherin(CadN)、Capricious(Caps)の4分子に注目し、R7視神経軸索投射における役割を解析したところCadNとCapsはLARと相互作用し、標的層に安定化させる機能を持つことがわかった。また、ショウジョウバエのNeuroigin2とNeurexin1が視神経でのシナプス形成に関わっていることがわかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

脳神経系の正常な機能には、軸索が正しい位置に投射することが必要である。本研究では、ショウジョウバエの最大の強みである複雑な遺伝学的操作と、短期間で詳細な生体内機能解析が可能である利点を利用して、ショウジョウバエの視神経において複数の分子の発現を操作することにより、伝達回路形成の過程を解析した。その結果、神経の投射先は複数の分子の組み合わせによって決定されていることがわかった。このような、神経同士をつなぐ分子が解明されれば、人工的に神経接続を誘導することができるようになり、神経再生や移植の技術につながるかと考えている。

研究成果の概要(英文)：In the Drosophila visual system, photoreceptor axons reach the correct layer in the middle pupal stage and start to form the synapses. To form the functional neuronal network, we hypothesized that the targeting layers are determined according to the molecular codes consisting of transmembrane proteins and cell adhesion molecules. We focused on the four molecules, LAR, Ptp69D, N-Cadherin (CadN) and Capricious (Caps) and tested genetically if they interact each other. Our results revealed that both CadN and Caps interact with LAR to stabilize the R7 photoreceptor axons to proper M6 layer. We also analyzed the interaction between LAR and Neuroigin(Nlg) and its receptor Neurexin(Nrx) on synapse formation. Nlg is known to be required for synapse formation and interact with LAR in mammals. Among three Nlgs (Nlg1, Nlg2, Nlg3) in Drosophila, Nlg2 seemed to have function on synapse formation together with Nrx1.

研究分野：神経発生学

キーワード：軸索投射 シナプス形成 ショウジョウバエ 視神経

### 1. 研究開始当初の背景

脳神経系の正常な機能には、第一に、軸索が正しい位置に投射することが必要であると考えられる。ショウジョウバエの複眼には約 800 個の個眼があり、各々に 8 種類の視細胞 R1-R8 がある。このうち R7 と R8 はメダラという脳の 2 番目の視葉に等間隔で侵入し、2 層の美しい投射パターンを形成する。これらの軸索は蛹期の中期後半に正しい層に到達し、それとほぼ同時にシナプスの形成が始まる。脳神経系の正常な機能には、第一に、軸索が正しい位置に投射することが必要であると考えられ、当研究室を含め、軸索投射は長年研究され、投射に関わる多くの膜タンパク質が同定されてきた。しかし申請者らの研究から、軸索誘導因子として知られている LAR と Ptp69D の 2 種の受容体型脱リン酸化酵素は軸索を誘導しているのではなく、細胞外ドメインの特異性により、軸索を脳内の特定の層に固着していることがわかった (Hakeda-Suzuki et al. eLife, 2017)。このように、これまでガイダンス分子として同定されてきた多くの膜タンパク質が、実は接着分子を制御することによって特定の標的層に軸索を安定化させるコードを作り出しているというメカニズムが存在するのではないかと予想した。

### 2. 研究の目的

- (1) 視神経軸索を正しい標的層で安定化させるために、膜タンパク質と接着分子は、発生段階で互いにどのように組み合わせられ、どのように作用しているのか。
- (2) 視神経軸索がどのような分子メカニズムによって、正しい標的神経との間にシナプスを形成しているのか。

という点を、膜タンパクと接着分子に注目して解析し、軸索投射からシナプス形成に至るまでの時系軸に沿った分子の組み合わせや機能の変化を明らかにする。

### 3. 研究の方法

- (1) 視神経の投射における、LAR、Ptp69D と接着分子 N-Cadherin (CadN)、Capricious (Caps) の 4 分子の相互作用を調べるために、それぞれの変異株や過剰発現系を組み合わせ、軸索投射を観察する。
- (2) 視神経シナプス形成をつかさどる分子メカニズムを解析するために、シナプス形成にかかわる分子を操作し、軸索投射とシナプス形成の関係を明らかにする。

### 4. 研究成果

- (1) **視神経の投射における二種の脱リン酸化酵素、LAR、Ptp69D と接着分子 N-Cadherin (CadN)、Capricious (Caps) の 4 分子の相互作用**

R7 軸索は本来 M6 層に投射するが、LAR、Ptp69D と CadN の単変異株および caps の過剰発現体では R7 軸索が M3 層に、投射することが知られている。そこで、それぞれの組み合わせの二重変異株を、ヘテロ変異体と RNAi 系統を組み合わせることによって作成し、R7 軸索がメダラのどの層に投射するかを観察した。その結果、CadN、LAR 二重変異株では表現型が促進され、R7 軸索が M3 層より浅い M1 層に投射する軸索が増加した。一方 CadN、caps の二重変異株では、CadN 変異と同様の表現型が見られたことから、Caps と CadN の相互作用は見られなかった。LAR と Caps の二重変異株では、LAR 変異株の表現型が強まり、M3 層に投射する R7 の割合が増加した。ptp69D と CadN の 2 重変異株は LAR と Ptp69D の 2 重変異株と同様のラミナに R7 軸索がとどまるという結果が得られた。一方、Ptp69D と Caps の 2 重変異株は、軸索の投射は正常であるものの視神経細胞が細胞死を起こすことが分かった。これらの結果を定量し、統計学的に解析したところ、CadN は Lar と同様の軸索を M6 層に安定化させる機能を持つが、Caps の変異は LAR、Ptp69D、CadN の単変異株のいずれに対しても表現型を有意

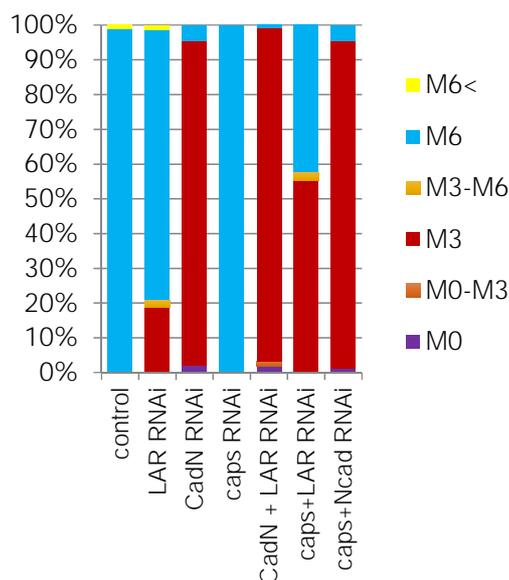


図1 LAR、N-Cadherin (CadN)、Capricious (Caps) との相互作用

RNAi によりロックダウンした系統における、本来 M6 層に投射する R7 軸索のそれぞれの層に投射した割合を示す。Ptp69D は定量不可能であった。

に変化させなかったことより、軸索の安定化には大きな役割を果たしていないことが示唆された。

#### **(2) LAR、Ptp69D の層投射への必要性の普遍性**

視神経以外でメダラ内の様々な層に投射するような神経について、そのような神経特異的な Gal 4 系統を入手した。それらの系統を用いて LAR および Ptp69D の RNAi と軸索を標識する GFP を発現させることにより、二重変異株の層投射への影響を調べた。その結果、M3-M6 に本来投射すべき神経でのみ R7 と同じような影響を受けることが分かった。

#### **(3) 軸索投射とシナプス形成の関係**

視神経シナプス形成をつかさどる分子メカニズムを CadN および LAR を中心にして解析した。哺乳類のシナプス形成において LAR はグルタミン酸受容体 (GluR) と相互作用するという報告がされていたことから、ショウジョウバエの 5 種類の GluR に対して、RNAi を用いて遺伝子発現をノックダウンし、シナプス形成を解析したが異常は見られなかった。

#### **(4) ニューロリジンとニューレキシンの視神経のシナプス形成に対する役割**

ニューロリジン (Nlg) はシナプス形成にかかわる接着因子として知られている。Nlg が哺乳類で脱リン酸化酵素 LAR と相互作用があることが報告されていることから、ショウジョウバエに存在する 3 種類の Nlg (Nlg1、Nlg2、Nlg3) と、その結合相手であるニューレキシン (Nrx1) のシナプス形成に対する影響を調べた。LAR はショウジョウバエの 8 種類の視細胞のうち R7 で投射に関わっている。そこで視神経および視神経の投射先である神経において RNAi を用いてそれぞれの分子の発現を抑制し、R7 のシナプスを観察した結果、Nlg2 と Nrx1 ではシナプスが減少した。また、過剰発現させると、Nlg1、Nlg2、Nlg3、Nrx1 のすべての分子においてシナプス形成が促進された。シナプス形成は R7 の投射先である M6 層で特に顕著であった。これらの結果から、ショウジョウバエの視神経では主に Nlg2 と Nrx1 の相互作用によってシナプスが形成されていることが示唆される。

#### **(5) ニューロリジンとニューレキシンと LAR の相互作用**

ショウジョウバエにおいて LAR と Nlg が相互作用するのであれば、LAR の発現を増加させれば、シナプスの数を増加する方向に変化すると予想される。そこで、(4) で用いた Nlg および Nrx の発現抑制系、および過剰発現系において、さらに LAR を視神経側で強制発現させてシナプス形成の変化を観察した。しかし、LAR の過剰発現は Nlg および Nrx の発現抑制系、および過剰発現系のシナプス形成に顕著な変化をもたらさなかった。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Takechi Hiroki, Hakeda-Suzuki Satoko, Nitta Yohei, Ishiwata Yuichi, Iwanaga Riku, Sato Makoto, Sugie Atsushi, Suzuki Takashi	4. 巻 10
2. 論文標題 Glial insulin regulates cooperative or antagonistic Golden goal/Flamingo interactions during photoreceptor axon guidance	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 eLife	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.7554/eLife.66718	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Kawamura Hinata, Hakeda-Suzuki Satoko, Suzuki Takashi	4. 巻 95
2. 論文標題 Activity-dependent endocytosis of Wingless regulates synaptic plasticity in the Drosophila visual system	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Genes & Genetic Systems	6. 最初と最後の頁 235 ~ 247
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1266/ggs.20-00030	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Araki Tomohiro, Osaka Jiro, Kato Yuya, Shimozono Mai, Kawamura Hinata, Iwanaga Riku, Hakeda-Suzuki Satoko, Suzuki Takashi	4. 巻 95
2. 論文標題 Systematic identification of genes regulating synaptic remodeling in the <i>Drosophila</i> visual system	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Genes & Genetic Systems	6. 最初と最後の頁 101 ~ 110
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1266/ggs.19-00066	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Shimozono Mai, Osaka Jiro, Kato Yuya, Araki Tomohiro, Kawamura Hinata, Takechi Hiroki, Hakeda Suzuki Satoko, Suzuki Takashi	4. 巻 24
2. 論文標題 Cell surface molecule, Klingon, mediates the refinement of synaptic specificity in the Drosophila visual system	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Genes to Cells	6. 最初と最後の頁 496 ~ 510
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/gtc.12703	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Trush Olena, Liu Chuyan, Han Xujun, Nakai Yasuhiro, Takayama Rie, Murakawa Hideki, Carrillo Jose A., Takechi Hiroki, Hakeda-Suzuki Satoko, Suzuki Takashi, Sato Makoto	4. 巻 39
2. 論文標題 N-Cadherin Orchestrates Self-Organization of Neurons within a Columnar Unit in the Drosophila Medulla	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The Journal of Neuroscience	6. 最初と最後の頁 5861 ~ 5880
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1523/JNEUROSCI.3107-18.2019	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Suzuki Takahisa, Oochi Keita, Hakeda-Suzuki Satoko, Suzuki Takashi	4. 巻 60
2. 論文標題 Transplantation of photoreceptor precursor cells into the retina of an adult Drosophila	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Development, Growth & Differentiation	6. 最初と最後の頁 442 ~ 453
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/dgd.12545	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Suzuki Takumi, Liu Chuyan, Kato Satoru, Nishimura Kohei, Takechi Hiroki, Yasugi Tetsuo, Takayama Rie, Hakeda-Suzuki Satoko, Suzuki Takashi, Sato Makoto	4. 巻 8
2. 論文標題 Netrin Signaling Defines the Regional Border in the Drosophila Visual Center	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 148 ~ 160
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.isci.2018.09.021	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Matsumoto Yutaro, Shimizu Kazuya, Arahata Kota, Suzuki Miku, Shimizu Akira, Takei Koki, Yamauchi Junji, Hakeda-Suzuki Satoko, Suzuki Takashi, Morimoto Takako	4. 巻 7
2. 論文標題 Prepulse inhibition in Drosophila melanogaster larvae	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biology Open	6. 最初と最後の頁 034710 ~ 034710
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1242/bio.034710	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Satoko-Hakeda Suzuki, Olena Trush, Makoto Sato, Takashi Suzuki
2. 発表標題 Molecular codes which determine the depth of final axonal stabilizing layer in the Drosophila visual system
3. 学会等名 NEURO 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Satoko Hakeda-Suzuki, Hiroki Takechi, Takashi Suzuki
2. 発表標題 Molecular codes which determine the depth of final axonal stabilizing layer in the Drosophila visual system
3. 学会等名 26th European Drosophila Research Conference (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Satoko Hakeda-Suzuki, Takahisa Suzuki, Keita Oochi, Takashi Suzuki
2. 発表標題 The transplantation of the retinal precursor cells into the adult Drosophila retina
3. 学会等名 Joint Annual Meeting of 51st JSDB and 70th JSCB
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Satoko Hakeda-Suzuki, Hiroki Takechi and Takashi Suzuki
2. 発表標題 Two receptor tyrosine phosphatases dictate the depth of final axonal stabilizing layer in the Drosophila visual system
3. 学会等名 The 41st Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Satoko Hakeda-Suzuki, Hiroki Takechi and Takashi Suzuki
2. 発表標題 Two receptor tyrosine phosphatases dictate the depth of final axonal stabilizing layer in the Drosophila visual system
3. 学会等名 The 41st Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

東京工業大学 生命理工学院 鈴木崇之研究室 <a href="http://www.suzukit.bio.titech.ac.jp/japanese/index.html">http://www.suzukit.bio.titech.ac.jp/japanese/index.html</a>
--

6. 研究組織		
氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------