

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 10 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22500293

研究課題名（和文）細胞接着分子ネクチンとアフアディンによるシナプス形成機構

研究課題名（英文）Functional analysis of nectin and afadin system in synaptogenesis

研究代表者

富樫 英 (TOGASHI HIDERU)

神戸大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号：90415240

研究成果の概要（和文）：ネクチン・アフアディン系とともに ZO-1 による神経細胞の形態形成機構の検討を行った。これまで神経細胞において機能が不明だった ZO-1 は、ネクチン・アフアディンとともに樹状突起フィロポディアどうしが接触する部位に局在し、また樹状突起フィロポディア自身の形成にも関与していた。さらに ZO-1 は樹状突起フィロポディア間の接着を制御することで、樹状突起の形態形成を制御していることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：Neuronal dendrites and their branches dynamically protrude many fine filopodia in the early stages of neuronal development that gradually establish complex structures, but the role of these dendritic filopodia in dendritic arborization is unknown. The MAGUK family member, ZO-1, was concentrated at the filopodia-filopodia contact sites. Overexpression or knockdown of ZO-1 affected the dynamics of dendritic filopodial protrusions and their interactions, causing abnormal dendrite morphologies. These results indicate that ZO-1 regulates dendritic filopodial dynamics, and therefore dendrite morphogenesis, in cultured neurons.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2012年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：神経科学一般

科研費の分科・細目：分子・細胞神経科学

キーワード：樹状突起、細胞間接着、ZO-1、ネクチン、カドヘリン

1. 研究開始当初の背景

シナプスは神経伝達の行われる部位であ

り、記憶に密接に関連して可塑的な変化の起こる接着構造である。海馬 CA3 領域における苔状線維と錐体細胞間でのシナプスは細胞間の機械的な接着を主に担っているアドヘレンスジャンクション (AJ) に類似する Puncta adherentia junction (PAJ) という接着装置が、軸索中の伝達物質の放出に関わるアクティブゾーンと樹状突起内の受容体が集積する場である PSD を取り囲んでいる。PAJ の主要な接着分子はカドヘリンであり、申請者はこれまでにシナプス形成におけるカドヘリンの重要性を世界に先駆けて示した。さらに軸索・樹状突起間の識別に細胞接着分子ネクチンがカドヘリンとともに必須であることを解明した。ネクチンは免疫グロブリン様一回膜貫通型の接着分子で、ネクチン-1~ネクチン-4 までの4つのメンバーからファミリーを構成している。ネクチンは細胞内で、アクチン線維に結合する分子アフアディンと直接結合することにより、アクチン細胞骨格に連結されている。ネクチン-アフアディン系が細胞間接着において果たす役割については上皮細胞で研究が非常に進んでおり、現在、その分子機構がかなり明らかになっている。上皮細胞では、細胞間の機械的な接着を主に担っている AJ が主要な接着装置である。カドヘリンとネクチンは AJ に主に局在し、上皮細胞において AJ が形成される際、最初に隣り合う細胞間でネクチン同士の結合が生じ、このネクチンによる細胞間接着部位にアフアディンを介してカドヘリンがリクルートされて AJ が完成する。神経細胞におけるネクチンファミリーメンバーの局在は異なっており、ネクチン-1 は軸索に、ネクチン-3 は樹状突起に存在する。申請者は、ネクチン-1 とネクチン-3 が神経細胞内でこのように異なった局在をすることが、軸索と樹状突起の間での特異的な接着に必要不可欠であることを見出し、さらに、上皮細胞と同様に、軸索と樹状突起間でネクチン-1 とネクチン-3 がまず結合し、その部位にカドヘリンをリクルートしてシナプス形成を制御するという新しい分子機構を解明している。シナプスは一般的に軸索と樹状突起の間で形成されることから、シナプス形成の過程では神経突起間の認識や、さらに特異的な神経回路形成のための正確な標的認識など様々な分子機構が関与すると考えられている。また、最近の研究からは、樹状突起の形態とその情報処理が密接に関連していることが示されている。つまり、神経回路の正しい機能発現には、神経細胞の軸索が正しい標的細胞とシナプス結合することに加えて、個々の神経細胞が

それぞれに特徴的なパターンでの樹状突起を発達させることが必要である。神経細胞間の適切な標的の認識、シナプス形成、さらに樹状突起の形態形成には様々な細胞接着分子が関与することが示されている。細胞接着分子は発生過程において適切な神経細胞同士でシナプスを形成することが知られているが、神経細胞間の接着制御機構は十分解明されていない。また、神経細胞は細胞ごとに固有の樹状突起の形態を発達させ、これが神経細胞の入出力制御にも関係することが知られているが、樹状突起形態制御の機構も十分には解明されていない。マウス海馬 CA3 領域では、海馬歯状回からの苔状線維と錐体細胞の間でシナプスが形成され、ここの接着構造ではネクチン・アフアディンと共に Z0-1 が存在する。Z0-1 は上皮細胞などにおいてはタイトジャンクションの形成などに必須であることが示されているが、Z0-1 が神経細胞の形態形成にどのように関わるのかは全く不明であった。また、Z0-1 がネクチン・アフアディンとどのように細胞間の接着の制御に関与するのかは明らかにされていない。このような背景のもとに本研究を計画した。

2. 研究の目的

ネクチンは申請者の所属する研究室で新規に見出された免疫グロブリン様一回膜貫通型の接着分子で、ネクチン-1~ネクチン-4 までの4つのメンバーからファミリーを構成している。ネクチンは細胞内で、アクチン線維に結合する分子アフアディンと直接結合することにより、アクチン細胞骨格に連結されている。ネクチン-1 やネクチン-3 のノックアウトマウスでは、海馬での神経軸索投射に異常が生じ、正常な標的認識及びシナプス形成が出来ないことが申請者の所属する研究室から報告されている。Z0-1 は MAGUK ファミリーに属する F-アクチン結合分子であり、上皮細胞においては主に密着結合 (TJ) に局在し、クローディンと結合する。Z0-1 は TJ を持たない線維芽細胞などの非上皮細胞において、ネクチン・アフアディン系によって細胞間接着部位にリクルートされることが、これまでの研究で明らかにされている。また Z0-1 は海馬 CA3 領域のシナプスでは、PAJ に局在することが示されている。本研究では、シナプス形成時におけるアフアディンおよび Z0-1 による細胞間接着の制御機構と、神経細胞の形態形成に果たす役割と作用機序を明らかにする。シナプス形成の分子機構を

明らかにすることは、発生段階における神経回路の形成のみならず、シナプス可塑性の分子基盤を明らかにする上でも重要な問題であり、神経科学分野の発展において大きく貢献するものと考えられる。

3. 研究の方法

シナプス形成と神経細胞の形態形成におけるネクチン-アファディン系およびZO-1の役割と作用機構を明らかにする目的で、(1)シナプスの形成と維持、(2)樹状突起の形態形成における分子機構に着目して研究を行う。これまでの研究結果から、シナプス形成の過程では、軸索先端に存在するネクチン-1と樹状突起に存在するネクチン-3がまず結合してその部位にカドヘリンをリクルートすることによりPAJを形成し、その中心部にアクティブゾーンとPSDの構成因子をリクルートして最終的にシナプスを形成することが明らかにされており、ネクチン-1またはネクチン-3をノックアウトしたマウスでは樹状突起スパインの形態が異常になる。またアファディンおよびZO-1が軸索と樹状突起の間の接着制御とシナプス形成に関与する可能性を想定し、培養神経細胞を用いた分子・細胞レベルの研究からノックアウトマウスを用いた神経回路レベルの研究を組み合わせることにより、細胞間接着とシグナル伝達など種々の細胞機能がシナプス形成と神経細胞の形態形成に及ぼす作用を統合的に検討する。

4. 研究成果

これまでにマウス海馬CA3領域における海馬歯状回からの苔状線維と錐体細胞の間の接着構造にはMAGUKファミリーに属するアクチン結合分子のZO-1がネクチン・アファディン系と共に存在することが示されている。ZO-1は上皮細胞などにおいてはタイトジャンクションの形成などに必須であることが示されているが、ZO-1が神経細胞の形態形成にどのように関わるのかは不明であった。培養海馬神経細胞においてZO-1はネクチン・アファディンとともに樹状突起フィロポディア間の接触した部位に強い局在が見られたが、このような構造は一時的であり、神経細胞が成熟するに従い消失した。そこでZO-1の過剰発現を行ったところ、ZO-1は樹状突起フィロポディア間に強い局在を示し、樹状突起どうしの異常な接触が誘導され

た。このような樹状突起フィロポディアの接触部位には、ネクチンやカドヘリンなどの接着分子が濃縮していた。ZO-1の発現により樹状突起どうしの接着が安定化された結果、樹状突起の伸長が抑制され、複雑な形態になったと考えられた。一方、培養海馬神経細胞においてZO-1のノックダウンを行ったところ、これらの神経細胞では樹状突起の本数や長さには変化がなかったが、偏った方向に複数本の樹状突起が束になって伸長しており、樹状突起フィロポディアどうしの接触は減少し、接着分子の濃縮も減少していた。これらの結果は、ZO-1は樹状突起フィロポディア間の接着を制御することで、樹状突起の形態を制御していることを示している。本研究によって、培養神経細胞から伸長した樹状突起は、フィロポディアどうしの接着を介してお互いが重なり合わないよう形態を制御しているという新しいモデルが考えられる。今後は生体においてZO-1による神経細胞の形態形成への機能と、および生理機能において果たす役割について検討することが課題である。

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)

[学会発表] (計4件)

① 富樫英

中枢神経系の神経突起間認識とシナプス形成における細胞接着分子の働き
第86回日本薬理学会年会、2013年3月21-23日、福岡市、招待講演

② 井上貴仁、力武良行、富樫英、三好淳、溝口明、高井義美

Localization of nectin-1 at dendro-dendritic contacts between mitral/tufted cells in the external plexiform layer of mouse olfactory bulb
第34回日本分子生物学会年会、2011年12月13-16日、横浜市

③ 富樫英

細胞接着分子によるシナプス形成の分子機構
第27回Wakoワークショップ「記憶の形成と障害～基礎から臨床まで」、2011年11月22日、東京都品川区、招待講演

④ 豊嶋大作、富樫英、出来祐子、三好淳、

萬代研二、高井義美
マウス海馬神経細胞のシナプス形成における
アフアデインの役割
第84回日本生化学会大会、2011年9月21-24
日、京都市

[その他]
ホームページ等
<http://www.med.kobe-u.ac.jp/mcb/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

富樫 英 (TOGASHI HIDERU)
神戸大学・大学院医学研究科・助教
研究者番号：90415240