

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 21 日現在

機関番号：12608

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26291047

研究課題名(和文) 視神経軸索投射の層・カラム特異的認識メカニズムの分子基盤

研究課題名(英文) Molecular mechanisms underlying the layer and column specific target recognition in the visual system axons

研究代表者

鈴木 崇之 (Suzuki, Takashi)

東京工業大学・生命理工学院・准教授

研究者番号：60612760

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,900,000円

研究成果の概要(和文)：Fmiの機能解析をサナギ初期において初めて行ったところ、Fmiはフィロポディアの形成と伸長を促進する機能を持っていることがわかり、Gogoはこれを抑制する機能を持っていることが分かった。このGogoの機能が、サナギ初期でR8軸索どうしが距離を一定に保つことにつながっている。サナギの後半でGogoの発現が弱くなると、Fmiのフィロポディア伸長のスイッチが入り、R8がM3に到達することになる。これは、軸索どうしの一定間隔の維持に、フィロポディアの活動を抑制するというGogoの機能が深く関係していることを示唆している。

研究成果の概要(英文)：A detailed functional analysis of fmi mutant in the pupal stages revealed that the Fmi promotes the extension of filopodia and that Gogo has a function to antagonize that effect. This suppressive function of Gogo helps the R8 axons to maintain their distance and prevent them from bundling. In the later half of the pupal stage, when Gogo expression become down regulated, filopodia extension promoted by Fmi takes place. These data suggest that Gogo function to suppress the filopodia extension contributes to shape the axonal array with a constant distance among axons at the surface of the target ganglion.

研究分野：神経生物学

キーワード：神経遺伝学 ショウジョウバエ 軸索投射 受容体型膜タンパク質 軸索間相互作用

1. 研究開始当初の背景

我々の研究室では、ショウジョウバエの視神経軸索投射を制御する遺伝子を大規模スクリーニングより得、それらを網羅的に単離・解析した (Berger et al., PLoS Genetics, 2008)。その中でもとりわけ興味深かった新規膜貫通型リセプターである gogo 遺伝子を世界で初めて単離・解析し、その視神経の軸索誘導における重要さを報告した (Tomasi et al., Neuron 2008)。Gogo は種を超えて保存されており、脊椎動物での機能は未知である。Gogo タンパクの様々な機能の中でも、Gogo は R8 と呼ばれる視神経軸索を脳の M3 と呼ばれる層にターゲットさせる役割を担っていることを明らかにした。さらに Gogo がカドヘリンの一種である Flamingo (fmi) とシスに相互作用して、この共同体が軸索を M3 に投射・認識させる、いわばコード (暗号・指標) になっている事を示した (Hakeda-Suzuki et al., Nature neuroscience 2011)。標的細胞側でも Flamingo が必要である事も分かり、R8 と標的細胞との間で Flamingo 同士がホモ接着結合しており、gogo は R8 側からサポートしていると考えられている (Hakeda-Suzuki et al., Nature neuroscience 2011)。また、Gogo と Fmi は概ね協調して R8 軸索の M3 層の認識に働いているが、それぞれ変異体の表現型を詳しく調べると相違点がある。Gogo 変異体では視神経が脳の表層で軸索が迷走する一方、Fmi 変異体では表層で停止してしまう。これは Fmi が伸長自体に必要であり、Gogo は伸長方向を決定するのに必要であることが示唆される。さらに、Gogo の過剰発現では R8 は M1 層に強く相互作用して接着する表現型を示すことから、Gogo 単独で M1 層でカラムの正しい位置を認識している分子機構があると予想される。

2. 研究の目的

ショウジョウバエの視神経系を用いて、神経回路形成の分子メカニズムを解明する。我々は今まで新規膜受容体タンパク質である Gogo を同定し、その機能解析を行ってきた。Gogo はカドヘリンの一種である Flamingo と強調して視神経の脳内の層特異的な投射を制御していることを明らかにした。それに加え、Gogo は脳内のカラム (柱) 状構造を認識し、規則正しく投射させる機能も担っていることが分かっている。Gogo リガンドを同定し、超解像顕微鏡解析を組み合わせ、縦横両方向の座標を認識する分子メカニズムを解明する。今まで、脳の固有な層への投射は言うまでもなく、カラム状構造を認識するメカニズムも未解明である。これらの分子メカニズムを明らかにしたい。

3. 研究の方法

まず Gogo リガンドを同定することを目的として研究を推進した。まず、カイコ細胞に Gogo の細胞外ドメイン (Gogo-Ecto-AP) を大量発現させるバキュロウィルスの系を立ち上げた。プラスミドを構築し、大量発現を試みた。

Gogo と Fmi の C 末端部に GFP を挿入し、細胞特異的に Gogo と Fmi と GFP の融合タンパクを形成するようなコンストラクトをハエのゲノム上にノックインした。これを使って、内在性のタンパク質の細胞内の局在を追うことが出来るようになった。

さらに R8 特異的に Gogo をノックアウトする方法を確立し、その表現型を発生段階を追って網羅的に調べ、Gogo 変異体の真の表現型を明らかにする。

さらに Fmi のノックアウト体、過剰発現体、RNAi ノックダウン体などを R8 細胞、R7 細胞特異的に解析することで、Gogo と Fmi の生体内での機能を詳細に明らかにすることを試みた。

4. 研究成果

Gogo-Ecto-AP を胚の中枢神経系に結合させ、特異的な染色パターンを探したが、中枢神経系に一樣に弱く結合するように見えた。発生途中であるサナギの脳にカラム特異的に Gogo-Ecto-AP が結合するかを試みたが、特異的な染色パターンは残念ながら得られず、Gogo リガンドがカラムの入り口に存在する確証は得られなかった。

Gogo の R8 特異的なノックアウトを作成し、その表現型をつまびらかにした結果、R8 軸索がサナギ初期の段階で、M1 層に整列してとどまることが出来ず、一時的に深く潜り込んでしまう。さらに、軸索同士の距離を保つことが出来ずにお互いに癒着してしまう R8 が頻出した。

しかし、ここまでは今までの Gogo の変異体の解析からある程度予想されていたことではある。Gogo のこの二つの機能を解くカギは、Fmi の過剰発現体の解析に潜っていた。Fmi の機能解析をサナギ初期において初めて行ったところ、Fmi はフィロポディアの形成と伸長を促進する機能を持っていることがわかり、Gogo はこれを抑制する機能を持っていることが分かった。この Gogo の機能が、サナギ初期で R8 どうしがくっつかないように距離を一定に保つことにつながっていると考えられる。サナギの後半で Gogo の発現が無く (弱く) になると、Fmi のフィロポディア伸長という機能にスイッチが入り、R8 が M3 に到達することになる。これらのことは、層特異的な軸索投射も、軸索どうしの一定間隔の維持にも、フィロポディアの活動を抑制するという Gogo の機能が深く関係していることを示

唆しており、Gogo と Fmi の真の機能が層・カラム特異的に重要な役割を果たしていることを明らかにしたと考えている。

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2件)

1. Organisti C, Hein I, Grunwald Kadow IC*, Suzuki T* (2015)
Flamingo, a seven-pass transmembrane cadherin, cooperates with Netrin/Frazzled in Drosophila midline guidance.
Genes Cells. 2015 Jan;20(1):50-67. doi: 10.1111/gtc.12202. Epub 2014 Nov 30.
2. Hakeda-Suzuki S, Suzuki T (2014)
Cell surface control of the layer specific targeting in the Drosophila visual system.
Genes Genet Syst. 2014;89(1):9-15. Review.

〔学会発表〕(計12件)

1. Satoko Hakeda-Suzuki, Hiorki Takechi, Takashi Suzuki
A combinatorial role of the two receptor tyrosine phosphatases in the Drosophila photoreceptor targeting
JDRC11 2014年06月05日~2014年06月07日石川県金沢市金沢歌劇座
2. Satoko Hakeda-Suzuki, Fu Kusakawa, Takashi Suzuki
A combinatorial role of the two protein phosphatases, Lar and Ptp69D, in the photoreceptor axon targeting
第37回日本分子生物学会年会 2014年11月24日~2014年11月27日パシフィコ横浜
3. Satoko Hakeda-Suzuki, Hiroki Takechi, Takashi Suzuki.
A role of the two receptor tyrosine phosphatases, Lar and Ptp69D, in the photoreceptor axon targeting
The 48th Annual Meeting of the Japanese Society of Developmental Biologists (国際学会) 2015年06月02日~2015年06月05日
Tsukuba International Congress Center
4. Satoko Hakeda-Suzuki, Hiorki Takechi, Takashi Suzuki
A role of the two receptor tyrosine phosphatases, Lar and Ptp69D, in the photoreceptor axon targeting
The 38th Annual Meeting of the Japan

Neuroscience (国際学会) 2015年07月28日~2015年07月31日 Kobe Convention Center

5. Satoko Hakeda-Suzuki, Hiorki Takechi, Takashi Suzuki
A combinatorial role of the two receptor tyrosine phosphatases in the Drosophila photoreceptor targeting
24th European Drosophila Research Conference (国際学会)
2015年09月09日~2015年09月12日
Heidelberg Convention Center, Germany
6. Satoko Hakeda-Suzuki, Hiorki Takechi, Takashi Suzuki
The two receptor tyrosine phosphatases Lar and Ptp69D create a safety net in Drosophila photoreceptor axon wiring
The 39th Annual Meeting of the Japan Neuroscience (国際学会)
2016年07月20日~2016年07月22日パシフィコ横浜
7. Hakeda-Suzuki, S., Takechi, H., Suzuki, T
Two Receptor Tyrosine Phosphatases Dictate the Depth of Final Axonal Stabilizing Layer in the Drosophila Visual System
NeuroFly2016 (国際学会) 2016年09月03日 Crete Island, Greece
8. Hakeda-Suzuki, S., Takechi, H., Suzuki, T
The two protein tyrosine phosphatases Lar and Ptp69D create a safety net in Drosophila photoreceptor axon wiring.
第39回日本神経科学大会 (国際学会)
2016年07月21日パシフィコ横浜
9. Hakeda-Suzuki, S., Takechi, H., Suzuki, T
Two Receptor Tyrosine Phosphatases Dictate the Depth of Final Axonal Stabilizing Layer in the Drosophila Visual System
日本シヨウジョウバエ研究会 (JDRC12) 2016年09月10日立教大学、東京
10. H. Takechi, S. Hakeda-Suzuki and T. Suzuki. The transmembrane protein Golden goal recognizes the correct column at the medulla neuropil border during R8 axons targeting. 日本シヨウジョウバエ研究会 (JDRC12)
2016年09月09日~2016年09月11日
立教大学、東京
11. Hakeda-Suzuki, S., Takechi H, Suzuki, T

Two receptor tyrosine phosphatases dictate the depth of final axonal stabilizing layer in the Drosophila visual system. 第 39 回日本分子生物学会 (MBSJ2016)(国際学会)2016 年 11 月 30 日～2016 年 12 月 02 日パシフィコ横浜

12. Takechi, S. Hakeda-Suzuki and T. Suzuki. The transmembrane protein Golden goal recognizes the correct column at the medulla neuropil border during R8 axons targeting. 第 39 回日本分子生物学会 (MBSJ2016)(国際学会)2016 年 11 月 30 日～2016 年 12 月 02 日パシフィコ横浜

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.suzukit.bio.titech.ac.jp>

6. 研究組織

(1)研究代表者

鈴木 崇之 (SUZUKI, Takashi)

東京工業大学 生命理工学院・准教授

研究者番号：60612760

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

なし