

平成 22 年 5 月 31 日現在

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2008～2009

課題番号：20700329

研究課題名（和文）シナプス前終末を誘導する接着分子・受容体の探索と誘導の調節機構の解明

研究課題名（英文）Identification of cell adhesion and receptor molecules which regulate presynaptic differentiation

研究代表者 吉田 知之 (YOSHIDA TOMOYUKI)

東京大学・大学院医学系研究科・講師

研究者番号：90372367

研究成果の概要（和文）：ゼブラフィッシュ嗅神経細胞軸索終末の分化を指標として、プレシナプス分化の調節に関わる細胞接着分子・受容体分子と細胞内シグナル分子をスクリーンしたところ、Interleukin 1 receptor accessory protein like 1 がその細胞内ドメインを介してシナプス形成に伴うシナプス小胞の集積と膜形態の変化を調節することを明らかにした。さらに、シナプス小胞の集積と膜形態の変化はそれぞれ  $IP_3$  を介した小胞体からのカルシウムリリースによるシグナルと電位依存型カルシウムチャンネルを介した細胞外からのカルシウム流入によるシグナルによって調節されることを明らかとした。

研究成果の概要（英文）：Functional screening of transmembrane proteins for their role in presynaptic differentiation of zebrafish olfactory sensory neurons identified IL1RAPL1. We demonstrated that zebrafish orthologue of mammalian IL1RAPL1, Illrapl 1b, played an important role in axon terminal differentiation by regulating synaptic vesicle accumulation and morphological remodeling. We also showed that  $IP_3$ -mediated  $Ca^{2+}$ /calmodulin signaling stimulates synaptic vesicle accumulation and subsequent neuronal activity-dependent  $Ca^{2+}$ /calmodulin signaling induces the morphological remodeling of axon terminals of zebrafish olfactory sensory neurons.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2009 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：神経科学・神経化学・神経薬理学

キーワード：発生・分化・老化

## 1. 研究開始当初の背景

神経細胞間のシナプスの形成と再編は脳の発達に伴い神経回路が作られる際、記憶学習の際に起こる極めて重要なイベントであるのにもかかわらず、その分子機構はいまだ不明の部分が多かった。特に、培養神経細胞を用いた研究からシナプス形成に重要と考えられていた遺伝子を欠失したノックアウトマウスではシナプスが正常にできるなど、実際に個体内でシナプス形成を誘導する細胞接着分子や受容体分子は数種しか明らかにされていない。本研究代表者らは、生体内で実際に機能するシナプス形成の調節分子をスクリーンする為に、ゼブラフィッシュ胚を用いて種々のシナプス分子の機能抑制や機能亢進がシナプス形成に与える影響を個体内でイメージングする方法を確立していた。

## 2. 研究の目的

神経細胞の軸索終末に局在する種々の細胞接着分子及び受容体分子の中からゼブラフィッシュ嗅神経細胞特異的遺伝子操作系を用いて *in vivo* において実際にシナプス前終末への分化を調節する分子をスクリーンし、その調節機構を明らかにすることを本課題の目標とした。

## 3. 研究の方法

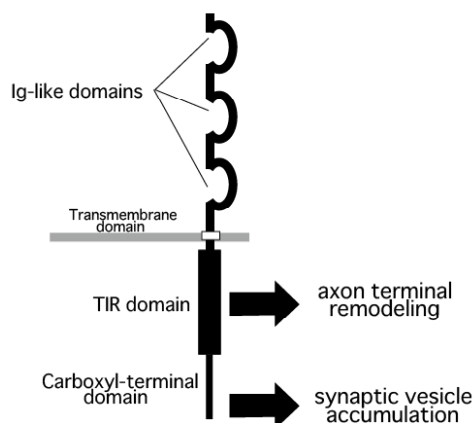
シナプス前終末に存在する細胞接着分子、受容体分子などの膜貫通分子をデータベース検索する。これらのタンパク質のゼブラフィッシュオソログ遺伝子をクローニングする。ゼブラフィッシュ胚にシナプスマーカータンパク質と種々の細胞接着分子・受容体分子の恒常活性化型、恒常不活性型タンパク質を同時に発現させるためのベクターを作製する。これらのベクターをゼブラフィッシュ胚に微量注入することによって嗅神経細胞特異的に遺伝子発現させ、それらの遺伝子操作がシナプス形成に与える影響を共焦点顕微鏡等を用いた *in vivo* イメージングにより明らかにする。また、種々の阻害薬の投与によるシナプス形成への影響や、モルフォリーノアンチセンスオリゴを用いた翻訳抑制によるシナプス小胞の局在や、軸索終末の膜形態

の変化に対する影響を観察し、プレシナプス分化を調節する膜タンパク質とその下流のシグナルを明らかにする。

## 4. 研究成果

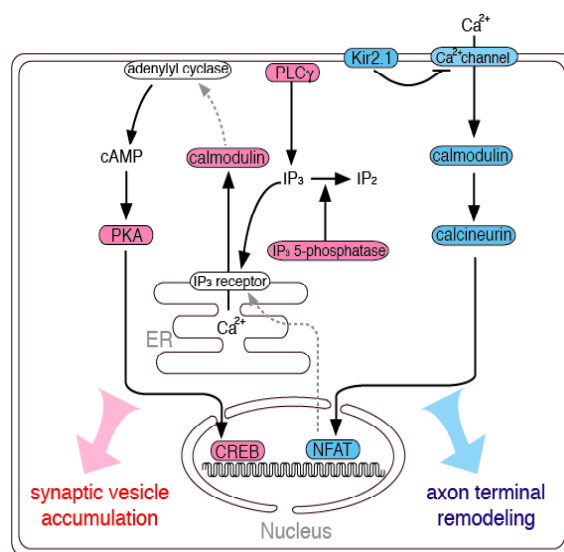
Interleukin 1 receptor accessory protein like 1 (IL1RAPL1)はインターロイキン1受容体ファミリーに属する膜貫通分子であり、細胞外に3つのイムノグロブリンドメイン、細胞内に1つのTIRドメイン及び他の分子との顕著な相同生を持たないC末端ドメインより構成される。IL1RAPL1はX染色体連鎖型の家族性精神遅滞の原因遺伝子として報告された分子である。ゼブラフィッシュのIL1RAPL1相同遺伝子は2つ存在し、そのうちの1つ(IL1RAPL1b)は嗅神経細胞に発現することを *in situ hybridization* により明らかにした。蛍光タンパク質を融合したIL1RAPL1bはシナプス形成時期の軸索終末に局在することから、プレシナプス分化の調節に関わることが示唆された。私たちは先に開発したゼブラフィッシュ嗅神経細胞特異的遺伝子操作系を用いてシナプス形成におけるIL1RAPL1bの役割について解析を行った。ゼブラフィッシュ嗅神経細胞ではシナプス形成に伴って、VAMP2-EGFPで可視化したシナプス小胞が軸索終末に急速に集積し、一方、GAP43-EGFPで可視化した軸索終末は複雑な形から単純な形に形態変化することが分かっている。モルフォリーノアンチセンスオリゴヌクレオチドを用いてIL1RAPL1bの翻訳を抑制するとシナプス小胞の集積及び、軸索終末の形態変化が阻害された。さらに、TIRドメインからのシグナル伝達を阻害する点変異を導入したIL1RAPL1b(IL1RAPL1-P455H)を発現させると軸索終末の形態変化は阻害されたが、シナプス小胞の集積は阻害されなかった。野生型IL1RAPL1bの発現はシナプス小胞の集積を顕著に増加させたが、IL1RAPL1-P455H変異を導入してもシナプス小胞の集積の促進効果は影響されなかった。一方ドメイン構造のよく似たInterleukin 1 receptor accessory protein (IL1RAcP)とC末端ドメインをスワップした変異体はIL1RAPL1bによるシナプス小胞の集積を増加させる効果を消失した。ところが、TIRドメインをスワップした変異体は依然としてシナプス小胞の集積を促進した。これらのこと

から、IL1RAPL1はTIRドメインを介して軸索終末の形態変化を、一方C末端ドメインを介してシナプス小胞の集積を調節することが示唆された(Yoshida and Mishina, 2008)(下図)。



研究代表者らは2005年にカルシウム依存型タンパク質脱リン酸化酵素(カルシニューリン)による転写因子NFATの活性化とcAMP依存性タンパク質リン酸化酵素(PKA)とその下流の転写因子CREBがそれぞれ軸索終末の形態変化とシナプス小胞の集積を調節することを見出していた。これらの分子の上流に位置して、カルシニューリン及びPKAを活性化する分子が重要と考え、カルシニューリン及びPKAを活性化しうる候補シグナルとしてカルシウム・カルモジュリンシグナルに着目した。嗅神経細胞においてカルモジュリン阻害ペプチドを発現させると、軸索終末の形態変化とシナプス小胞の集積の双方が阻害された。同様にシナプス形成期のゼブラフィッシュ胚をカルモジュリン阻害薬で処理すると軸索終末の形態変化とシナプス小胞の集積の双方が阻害された。さらに、イノシトール3リン酸を加水分解するイノシトール3リン酸脱リン酸化酵素を発現させるとシナプス小胞の集積は抑えられたが、軸索終末の形態変化は阻害されなかった。一方、内向整流性カリウムチャンネルを発現させると軸索終末の形態変化が抑制されることを見出した。同様にホスホリパーゼC阻害薬の投与はシナプス小胞の集積を阻害し、電位依存性のカルシウムチャンネルの阻害薬の投与は軸索終末の形態変化を阻害した。さらに、イノシトール3リン酸脱リン酸化酵素の発現によるシナプス小胞集積の抑制効果は恒常活

性化型PKAによって回復し、また恒常不活性化型PKAによって付加的な抑制効果を受けないことからイノシトール3リン酸シグナルがPKAシグナルの上流にあることが示唆された。以上のことから電位依存性カルシウムチャンネルを介した神経活動依存的なカルシウムシグナルがカルシニューリンの上流に、一方、イノシトール3リン酸によって小胞体内から放出されるカルシウムによるシグナルがPKAの上流として、シナプス形成に伴う軸索終末の膜形態の変化と、シナプス小胞の集積を調節することを見出した(Yoshida et al., 2009)(下図)。



これらの研究成果は神経回路形成の調節機構の解明のための重要な知見となると考えられる。

#### 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 Yoshida T, Uchida S, Mishina M. (2009) Regulation of synaptic vesicle accumulation and axon terminal remodeling during synapse formation by distinct Ca signaling. The Journal of Neurochemistry 111,160-170. 査読有

② Yoshida T, Mishina M. (2008) Zebrafish orthologue of mental retardation protein IL1RAPL1 regulates presynaptic differentiation. Molecular and Cellular Neuroscience 39,218-228. 査読有

〔学会発表〕（計 3 件）

① 植村健、李聖真、安村美里、吉田知之、羅紋真、田口良、三品昌美. グルタミン酸受容体 $\delta 2$ の新規リガンド Cbln1 の同定. 第 83 回 日本薬理学会年会. 2010 年 3 月 17 日（大阪府 大阪国際会議場）

② 吉田知之、三品昌美. 精神遅滞関連遺伝子 IL1RAPL1 はシナプス形成に伴うプレシナプス分化を調節する. 第 82 回 日本薬理学会年会. 2009 年 3 月 17 日（神奈川県 パシフィコ横浜）

③ 吉田知之、三品昌美. 精神遅滞関連遺伝子 IL1RAPL1 によるゼブラフィッシュ嗅神経細胞の軸索終末分化の調節. 第 31 回 日本神経科学大会. 2008 年 7 月 10 日（東京都 東京国際フォーラム）

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

吉田 知之 (YOSHIDA TOMOYUKI)  
東京大学・大学院医学系研究科・講師  
研究者番号：90372367

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし