

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 7 日現在

機関番号：63801
 研究種目：若手研究(B)
 研究期間：2011～2012
 課題番号：23700395
 研究課題名（和文）シナプス可変性制御機構の分子・細胞生物学的解析
 研究課題名（英文）Molecular and cell biological analyses of mechanism of synaptic plasticity
 研究代表者
 来栖 光彦（KURUSU MITSUHIKO）
 国立遺伝学研究所・構造遺伝学研究センター・助教
 研究者番号：50413985

研究成果の概要（和文）：

FGF シグナルは、逆行性シグナルとしてプレシナプスの分化を誘導することが哺乳類神経系において知られていたが、ポストシナプスにおける役割は明らかにされていなかった。本研究では、ショウジョウバエ神経筋接合部を実験モデルに利用することによって、(1)FGF リガンド Pyr と Ths が神経筋接合部で発現すること、FGF 受容体 Htl がグルタミン酸受容体 II サブユニット(GluRIIA)の近傍に局在することを、(2) FGF シグナルが GluRIIA のシナプスにおける局在を正に制御すること、(3)FGF シグナルが GluRII サブユニットの転写量を正に制御することを明らかにした。以上の結果は、ショウジョウバエ FGF シグナルが神経筋接合部の発達過程において、ポストシナプスで機能し、GluRII サブユニットの発現を制御していることを示唆している。

研究成果の概要（英文）：

Although FGF signaling has been known to induce presynaptic differentiation in mammalian synaptic development, it remains unclear whether FGF signaling has a role in postsynaptic development. Here we report that Drosophila FGF signaling is required for the postsynaptic development of neuromuscular junctions. Two Drosophila FGF ligands, Pyramus and Thisbe, are expressed in neurons and muscles and a FGF receptor, Heartless, is localized in close proximity to postsynaptic GluRIIA clusters. Mutant analyses found that FGF signaling positively regulates GluRIIA localization on postsynaptic sites. Moreover, GluRIIA expression is also controlled transcriptionally by FGF signaling. These results suggest that Drosophila FGF signaling is a regulator of Glutamate receptor expression in postsynaptic NMJ development.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,300,000 円	990,000 円	4,290,000 円

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：FGF、シナプス、神経筋接合部、ショウジョウバエ、神経

1. 研究開始当初の背景

シナプスは神経回路の中でも、情報伝達の効率を変化させる重要な制御部位である。この制御にはシナプスの数の増減、シナプス経路の再編、単一シナプスの伝達効率を変化させる等、回路レベルから生理学的な制御まで知られている。このようなシナプスの動態によって、神経情報の伝達効率に変化が生じることが、記憶の獲得や運動制御の発達等に関係すると考えられている。このようなシナプスの変化には、シナプス前部と後受容部間で授受される細胞表面タンパク質による相互作用が重要であると考えられており、どのような普遍的な分子が必要なのか、その知見が求められている。

この問題にアプローチするために、遺伝子操作の容易なショウジョウバエの神経筋接合部(NMJ)に着目した。この回路は、シナプスの発達が活動依存的な作用によって調節されていること、グルタミン酸作動性シナプスであることから、哺乳類脳を構成する興奮性シナプスのモデルになる。

この系を用いて、シナプス終末部に形態的な影響を与える分子を遺伝学的にスクリーニングした。その結果、複数の細胞表面タンパクを同定することに成功した(Kurusu et al., 2008, Neuron)。興味深いことに、これらの中に FGF8 と相同性が高い Pyramus が含まれていた。本研究では FGF シグナルがシナプス可変性の素過程においてどのような役割をもつのか、その作用機序を明らかにする。

2. 研究の目的

シナプス形成における FGF シグナルの重要性は、マウスをモデルにした研究から示唆されている。それによると、苔状繊維と小脳顆粒

細胞間のシナプス接続や運動神経において FGF7/10/22 サブファミリーがシナプス前部の誘導とシナプス小胞の集積を指示することが明らかとなった (Umemori et al., 2004; Fox et al., 2007)。また、線条体の大脳皮質-淡蒼球経路において、アデノシン受容体シグナルと共同して ERK 活性を促進し、LTP を亢進することが明らかとなっている (Flajolet et al., 2008)。このように FGF シグナルはマウス脳神経系シナプスにおいて重要な機能を有しているが、その機能がどのような細胞学的なメカニズムを介しているのか、多数存在する FGF family の機能にどのような違いがあるのか、リガンドの放出がどのような刺激によって制御されているのか等、不明な点が多い。

ショウジョウバエ FGF シグナルは、3 種のリガンドと 3 種の受容体によってコードされている。申請者のこれまでの解析から、ショウジョウバエ神経接合部において、Heartless 受容体がシナプス前部の伝達物質放出部と後受容部の伝達物質受容体のそれぞれの近傍に局在することを確認している。本研究では、ショウジョウバエの利点を生かして、シナプス形成における細胞生物学的な作用機構を明らかにする。

3. 研究の方法

発現パターンの解析：

ショウジョウバエゲノムは、3 個の FGF 遺伝子(Pyramus, Thisbe, Branchless)、3 個の受容体(Heartless, Breathless, CG31431)をもつ。3 種のリガンドの中で Pyramus (Pyr)と Thisbe (Ths)は FGF8 に相同性が高く、Branchless (Bnl)は viral FGF に比較的相同性が高い。これら FGF 関連分子の発現や分布

の違い、*in situ* ハイブリダイゼーションや特異的抗体を用いて明らかにする。

in vivo 表現型の解剖学的、細胞学的解析、生理学的解析:

ショウジョウバエ FGF 関連分子には、既知の変異体、RNAi 系統、強制発現系統が豊富に存在する。これらを利用しシナプス前部とシナプス後部における役割を解剖学的、細胞学的に明らかにする。シナプス前部では、伝達物質に必要なアクティブゾーンの形成、シナプス小胞の形成/輸送/回収、微小管を中心とした細胞骨格系の制御に着目しながら細胞学的な役割を明らかにする。シナプス後部では、受容体の集積や輸送、シナプス後部直下のアクチン/スペクトリンを軸とした骨格系の制御、局所翻訳の制御等に注目し、その影響を詳細に解析する。これらの解析には既知の抗体マーカー、GFP 融合タンパク質、豊富な変異体を用いる。

4. 研究成果

ショウジョウバエ NMJ における FGF/FGFR の発現パターン

ショウジョウバエの FGF シグナルには Branchless-Breathless (Bnl-Btl) 経路、Thisbe / Pyramus-Heartless (Ths / Pyr-Htl) 経路が知られている。このうち神経筋接合部の形成には、Ths / Pyr-Htl 経路が重要な役割を担うことが明らかとなった。*in situ* hybridization を用いた発現パターンの解析から、リガンドとなる Ths と Pyr が神経細胞と筋肉の両方で発現することを明らかにした。一方、Htl 受容体は、抗体を利用したイメージング解析から筋肉の GluR クラスタ近傍に強く局在することを見いだした。

Pyr と Ths は、NMJ におけるブートンの数を正に制御する

Pyr と Ths の機能を調べる目的で、これらの機能欠損変異体のブートン数を解析した。その結果、*pyr* と *ths* の変異体のどちらにおいても、ブートンの数が減少していることが明らかになった。一方、Pyr や Ths を筋肉へ過剰発現させるとブートンの数が上昇することが明らかとなった。このことから、Pyr と Ths 共にブートン数を正に制御することが明らかとなった。

FGF シグナルは、シナプスにおけるグルタミン酸受容体サブユニット A (GluRIIA) のタンパク発現量を促進する

FGFR である Htl は、発現パターンの解析から GluRIIA の近傍に局在することが明らかとなった。そこで、Pyr や Ths の機能欠損変異体と Htl の遺伝学的 RNAi 法を用いた組織特異的発現低下 (Htl-KD)、または恒常活性化型 Htl の組織特異的発現 (Htl-CA) を用いた解析を行った。その結果、*pyr* と *ths* の機能欠損変異体では、シナプスの GluRIIA の発現量が低下することが明らかとなった。同様に、Htl のポストシナプスにおける機能低下 (Htl-KD) においても GluRIIA の発現が低下することが判明した。反対に、ポストシナプスで Htl の機能を恒常的に活性化 (Htl-CA) させると、GluRIIA の発現が上昇することが明らかとなった。

FGF シグナルの GluRIIA の制御は、dPak を介する

FGF シグナルによる GluRIIA の制御機構を探索する目的で、既知の制御分子が介在するか検証した。その結果、Htl-CA を後シナプスで発現させた個体では、GluRIIA の局在制御に関わる d Pak (p21-activated kinase) のシナプスでの発現が上昇することが明らかとなった。

Ht1 は GluRIIA、GluRIIB の正常な転写制御に必要である

FGF シグナルによる GluR の制御には、タンパクの局在と転写制御によるコントロールが想定される。この実験では、転写量を測定する定量的 RT-PCR を用いることによって、転写制御の介在性について調べた。その結果、Ht1-KD では、GluRII サブユニット A, B の転写量が減少することが明らかとなった。逆に Ht1-CA ではこれらの発現の上昇が観察された。

以上の結果は、FGF シグナルがショウジョウバエ神経筋接合部において GluR のサブユニット特異的に、その発現制御と局在制御の両方の制御に関与することを示唆している。

これまでの報告によると、哺乳類の FGF シグナルは、逆行性シグナルとしてプレシナプスの分化を誘導することが知られていたが、ポストシナプスの形成過程に関わることは示されていない。私達の研究成果はシナプス形成における FGF 分子の役割を理解する上で議論されていなかった新たなポストシナプスにおける役割を提案している。

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. Kurusu, M., Katsuki, T., Zinn, K., Suzuki, E. Developmental changes in expression, subcellular distribution, and function of *Drosophila* N-cadherin, guided by a cell-intrinsic program during neuronal differentiation. *Developmental Biology*, 366(2), 204-217 (2012). 査読有
DOI:10.1016/j.ydbio.2012.04.006
2. Mochizuki, H., Toda, H., Ando, M., Kurusu, M., Tomoda, T., Furukubo-

Tokunaga, K. Unc-51/ATG1 controls axonal and dendritic development via kinesin-mediated vesicle transport in the *Drosophila* brain. *PLoS One*.

May 12;6(5):e19632 (2011). 査読有

DOI: 10.1371/journal.pone.0019632.

[学会発表] (計 3 件)

1. 小林百合、来栖光彦、鈴木えみ子
FGF signaling regulates post synaptic development in the *Drosophila* neuromuscular junction. 日本ショウジョウバエ研究集会,
2012年10月13日, 東京慈恵会医科大学
2. 小林百合、来栖光彦、鈴木えみ子 ショウジョウバエ FGF シグナルによる後シナプス分化の制御. 第35回日本神経科学大会, 2012年9月19日, 名古屋国際会議場
3. 来栖光彦 Intrinsic control of spatiotemporal change in N-cadherin expression during neuronal maturation 第34回日本神経科学学会, 2011年9月15日, パシフィコ横浜

[その他]

ホームページ等

<http://www.nig.ac.jp/Research-Highlights/992/1067.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

来栖 光彦 (KURUSU MITSUHIKO)

国立遺伝学研究所・構造遺伝学研究センター・助教

研究者番号: 50413985

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

鈴木 えみ子 (SUZUKI EMIKO)

国立遺伝学研究所・構造遺伝学研究センター・准教授

研究者番号: 20173891