

論文 / 著書情報
Article / Book Information

題目(和文)	シヨウジョウバエ視覚系におけるシナプス特異性と可塑性を規定する分子基盤の解明
Title(English)	
著者(和文)	小坂二郎
Author(English)	Jiro Osaka
出典(和文)	学位:博士(理学), 学位授与機関:東京工業大学, 報告番号:甲第12334号, 授与年月日:2023年3月26日, 学位の種別:課程博士, 審査員:鈴木 崇夫,廣田 順二,増田 真二,立花 和則,藤田 尚信
Citation(English)	Degree:Doctor (Science), Conferring organization: Tokyo Institute of Technology, Report number:甲第12334号, Conferred date:2023/3/26, Degree Type:Course doctor, Examiner:,,,,
学位種別(和文)	博士論文
Category(English)	Doctoral Thesis
種別(和文)	要約
Type(English)	Outline

令和4年度 博士論文（要約）

ショウジョウバエ視覚系における
シナプス特異性と可塑性を規定する分子基盤の解明

東京工業大学 生命理工学院生命理工学系生命理工学コース

氏名 小坂 二郎

指導教員 鈴木 崇之

目次

要旨.....	2
1. 序論.....	4
2. 材料と実験方法.....	8
3. 「シナプス可塑性を規定する新規分子の探索」結果と考察.....	11
4. 「シナプス特異性を規定する新規分子の探索」結果と考察.....	12
参考文献.....	13
謝辞.....	17

要旨

神経細胞は、発生段階においてはシナプス形成を介した神経接続（シナプス特異性）によって神経回路を形成し、発生後においては刺激依存的なシナプス特性の変化（シナプス可塑性）によって神経回路を調節するが、分子基盤の多くは未解明である。ショウジョウバエは、遺伝学的解析ツールの豊富さと、短いライフサイクルから、網羅的な新規分子探索に優れたモデル生物である。ショウジョウバエの視神経系をモデルとして、（1）神経活動依存的なシナプス可塑性におけるシナプス安定化因子の探索と同定の研究と、（2）神経回路形成におけるシナプス接続の特異性の分子メカニズムの解明、という2つの研究をおこなった。

（1）先行研究において、ショウジョウバエの視神経のシナプスが、連続した光環境に曝露されることで減少し、暗闇環境に置かれることで元に戻る現象が発見された (Sugie et al., 2015)。この刺激依存的に可塑的にシナプス数が増加する現象を利用し、シナプス可塑性に関わる新規分子を探索することを目的に実験がおこなわれ、5つのシナプス数の減少を亢進する「シナプス解体分子」が明らかになった (Araki et al., 2020)。一方で、シナプス数の増加を亢進する「シナプス安定化分子」は、ほとんど分かっていなかった。

シナプス安定化に関わる分子を探索するために、300 遺伝子に対して RNAi スクリーニングを行った。まず簡便なシナプス不安定化の指標である Brp-short-mCherry の凝集体シグナルの形成を利用して、27 の候補遺伝子を得た。次に、候補遺伝子の RNAi によるシナプス数の変化を解析するために、機械学習を組み込んだ自動シナプス定量プログラムを、共同研究を通じて開発した。このプログラムによって、3D のシナプス画像から、軸索ごとのシナプス数を自動で定量することが可能になった。そして、*cirl* をシナプス安定化に関わる最終候補遺伝子として同定した。さらに、前シナプス神経である視神経で *cirl* が、後シナプス神経でそのリガンド候補である *ten-a* が、シナプス安定性に働いていることを明らかにした。

（2）Beat/Side タンパク質は、発生期においてほぼすべての神経系で発現の強い機能が未知な免疫グロブリン様スーパーファミリー (IgSF) である。そのため、Beat/Side タンパク質はシナプス特異性のような発生中のシナプスにも働きを持つ可能性が高いと予想されていた。そこで Beat/Side タンパク質がシナプス特異性に働いているか検証するため、視神経の神経接続に影響を与えるものをスクリーニングした。そして、*side* を発現させることで、リガンドである *beat* の発現層へと神経接続を誘導できることを発見した。Side と Beat はクラスター複合体を形成し、シナプス形成できる分子だと分かった。また、Side によるシナプス誘導は、細胞内ドメインを介さない Kirre などの共受容体を介したシグナル伝達と、細胞内ドメインを介するシナプス形成因子の足場タンパク質である Dsyd-1 との相互作用が関わることを明らかにした。

次に、*side* の内在性の機能を解析するために、*side* の発現するラミナ神経における

機能喪失の表現型を解析した。ラミナ神経のシナプス形成は、**Proximal** 領域でのみで起こり、**Distal** 領域では起きない。*side* 変異体は、**Distal** 領域に異所性シナプスを形成してしまう。**Side** は、シナプス形成の起こる **Proximal** 領域に限定して細胞内局在する。さらに、**Side** の特徴的な局在によって、シナプス形成因子 **Dsyd-1** の局在を **Proximal** 領域に留め、**Distal** 領域での誤ったシナプス形成を抑制することが示唆された。

以上 2 つのトピックに取り掛かった本研究では、まず「シナプス可塑性」に関して、シナプス自動定量プログラムを開発し、*cirl* と *ten-a* による新たなシナプス安定化機構を見出した。また、プログラムはインターネット上で公開されており、学習データをそのまま流用できるため、シナプス解析手法の新たな選択肢となり得る。さらに、「シナプス特異性」においては、*side* がシナプス誘導できる新規分子であることを発見した。リガンドである **Beat** とのクラスター形成や、共受容体である **Kirre** と足場タンパク質である **Dsyd-1** との複合体を形成による新たなシナプス形成機構と、それによるシナプス特異性の決定機構を明らかにした。

1. 序論

神経細胞は、発生段階においてはシナプス形成を介した神経接続（シナプス特異性）によって神経回路を形成し、発生後においては刺激依存的なシナプス特性の変化（シナプス可塑性）によって神経回路を調節する。しかしながら、その分子基盤の多くは未解明である。本研究では、遺伝学的解析に優れ、短いライフサイクルから網羅的な遺伝子解析が可能であるショウジョウバエを用いて、新規分子の探索を行った。

1. シナプス可塑性を規定する新規分子の探索

神経細胞は、外部環境に応じて神経回路を編成し、環境に適応する。このような、神経細胞の柔軟な可塑性は、シナプス可塑性と呼ばれる。とくに、外部刺激による神経細胞の神経活動変化により外部環境に適応する能力は、神経活性依存的なシナプス可塑性と呼ばれ、その一部は神経伝達の効率の調節することで引き起こされる。前シナプス神経には活性帯（Active Zone: AZ）という小胞放出を行う構造が存在し、後シナプス神経には神経伝達物質を受け取る受容体が存在する。そのため、神経伝達の効率を調節する方法は主に2つあり、前シナプス神経の活性帯を変化させ小胞放出の効率を調節する方法と、後シナプス神経の受容体の発現量を調節することで、神経伝達物質の受容する効率を調節する方法である。後シナプス神経における受容体の調節方法については、主に哺乳類での研究の発展によって、その分子経路がいくつか明らかになった（Mayadevi et al. 2012）。一方で後シナプス神経における調節機構に比べて、前シナプス神経におけるその調節機構についてはあまり分かっていない。シナプス小胞の放出効率は、活性帯構成要素のタンパク質の状態に依存する（Matz et al. 2010; Lazarevic et al. 2011; Davydova et al. 2014）。そのため、活性帯構成要素のタンパク質の局在レベルを制御する調節機構の解明が前シナプスにおけるシナプス可塑性に重要であるが、あまり研究は進んでいない。中枢神経系の神経細胞のシナプスの多くはシナプスがしばしば高密度であり、その神経形態が複雑であることが解析を困難にしている。とくに、3D画像の解析になると、解析がさらに困難になり、解析にかかる時間や精神的な負担が大きくなる。

当研究室の先行研究によって、ショウジョウバエの活性帯の数が神経活動依存的にその数が変化することが明らかになった（Sugie et al. 2015）。ショウジョウバエの複眼は、約800個の個眼から形成され、それぞれの個眼には8種類の視神経（R1-8）が含まれる。ショウジョウバエの視覚野は、4つの神経節（ラミナ、メダラ、ロビュラ、ロビュラプレート）から形成される。視神経 R8 は、メダラ神経節の M3 層に投射しシナプス形成を行う（Clandinin and Zipursky 2002; Hakeda-Suzuki et al. 2011; Takemura et al. 2013; Hakeda-Suzuki et al. 2017; Shimozone et al. 2019）。視神経 R8 においては、STaR（Synaptic Tagging with Recombination）法によって活性帯構成要素の1つである *bruchpilot* (*brp*) を GFP ラベリン

グすると、1つ1つの前シナプス活性帯を粒状シグナルで観察することができる (Chen et al. 2014; Sugie et al. 2015; Araki et al. 2020)。Brp シグナルによって可視化された視神経のシナプスの数は、電子顕微鏡によって数えられたシナプスの数と一致するため、STaR 法によって正確なシナプスの量的な変化を共焦点顕微鏡レベル解析できる (Chen et al. 2014)。視神経 R8 は高波長の色覚に関わる視神経であるため、光環境に曝露することで神経発火させることが出来る。当研究室の先行研究では、光環境依存的に視神経 R8 の活性帯数が増加することを見出した (Sugie et al. 2015)。ショウジョウバエを3日間 (72時間) の光条件 (LL)、暗闇条件、光暗闇条件 (LD) に曝露すると、LL 条件の視神経 R8 のシナプス数が、DD と LD 条件と比べ減少することが明らかになった (Sugie et al. 2015)。光環境によって視神経 R8 は神経発火するため、この機構は神経活動依存的な活性帯の調節機構であると考えられた。加えて、LL 条件で減少したシナプスは、再び DD にハエを置くことで元に戻ることが分かった。このことから、活性帯は LL では解体され、DD では安定化されていると考えられた。従って LD 条件でシナプスの数が変化しないのは、LL 条件・DD 条件によるシナプス不安定化・安定化が競合することで、シナプスの安定性が保たれているためだと考えられる。神経活動依存的なシナプス数の変化には、LL でシナプスを解体する分子と DD でシナプス安定化する分子が、働いていると予想された。実際に、古典的 Wnt シグナル伝達経路がシナプス安定性に関わることが分かった (Sugie et al. 2015; Kawamura et al. 2020)。さらに、シナプス解体に関わる分子のスクリーニングを行い、5つの遺伝子 (*npc2a*, *beat-VI*, *obst-b*, *swim*, and *CG34370*) が神経活動依存的なシナプス解体に関わることを明らかになった (Araki et al. 2020)。しかしながら、シナプス安定化に関わる分子は未だ解明されていなかったため、本研究で明らかにすることにした。

2. シナプス特異性を規定する新規分子の探索

シナプス形成を介した選択的な神経接続 (シナプス特異性) は、神経回路形成の基盤をなす重要な生理現象である。適切な神経回路形成のメカニズムとして、余剰に神経回路が形成されるが神経活動の有無などの機能的な選択によって特定の回路のみが残るといった仮説や、神経細胞には標的細胞を選びだし適切な神経回路を形成する能力がある仮説などが考えられてきた。Sperry の両生類の神経再生の研究などによって、神経接続が1度断たれた場合でも、神経細胞は適切な標的細胞まで軸索を伸ばし再び神経接続することが明らかになった (Sperry 1963)。このことから、神経細胞には標的細胞を見つけ出す能力が備わっており、これによって機能的な選択を受けなくても、適切な神経回路を形成できることが示唆された。そして、接続すべき神経間だけに、特異的な何かしらの化学親和力が働くよう遺伝子プログラムすることで、適切な神経回路形成が可能になるという化学親和説が提唱された (Sperry 1963)。そのような化学親和力の原動力として、神経間で働く膜タンパク質が有力な候補であり、いくつかのシナプス特異性に働く膜タンパク質が明らかにされてきた (Sanes and Zipursky 2020; Südhof 2021)。とくに神経間で鍵と鍵穴のように特異的な相互

作用を持つ分子は鍵-鍵穴分子と呼ばれ、このような分子が神経ごとに異なる発現していると考えられる。しかし、いままでに見つかったシナプス結合の選択的相互作用を直接担う分子は、あまりにも少なく、シナプスパートナー間の選択的な相互作用を媒介することを示した分子はほとんどない。

ショウジョウバエの視覚系には、およそ 200 種類の神経細胞がひしめき合うが、どの神経同士が接続するか、その神経接続パターンの多くが明らかにされた (Takemura et al. 2013; Takemura et al. 2015)。さらに、ここ数年のシングルセル解析の発展により、ほとんどの視覚系の神経細胞における、細胞種かつ時期特異的な網羅的な遺伝子発現パターンがデータベース化された (Davis et al. 2020; Kurmangaliyev et al. 2020; Özel et al. 2021; Jain et al. 2022)。そのためショウジョウバエ視覚系は、コネクトームとトランスクリプトームに基づく解析のできる魅力的なモデルである。実際に、結合性相互作用を示す膜タンパク質ペアが、接続関係にある神経細胞間で発現し機能することが報告されている (Özkan et al. 2013; Carrillo et al. 2015; Tan et al. 2015; Cosmanescu et al. 2018; Kurmangaliyev et al. 2020)。最も研究が進んでいるのは、免疫グロブリン様スーパーファミリー (IgSF) の 1 つである DIP/Dpr タンパク質である。11 種類の DIP と 20 種類の Dpr のサブファミリーから構成され、それらはヘテロフィリックまたホモフィリックの相互作用ネットワークを形成する (Özkan et al. 2013; Sergeeva et al. 2020)。ここ数年の活発的な研究により、DIP/Dpr タンパク質の神経間における相互作用が、神経接続や軸索誘導や細胞死シグナルに関わっていることが明らかになった (Carrillo et al. 2015; Tan et al. 2015; Barish et al. 2018; suppXu et al. 2018; Courgeon and Desplan 2019; Venkatasubramanian et al. 2019; Xu et al. 2019; Bornstein et al. 2021)。一方で、DIP/Dpr タンパク質と類似して、14 種類の Beat と 8 種類の Side のサブファミリーから構成され、相互作用ネットワークを形成する IgSF である Beat/Side タンパク質の機能についてはほとんど分かっていない。

beaten path 1a (*beat-1a*) と *sidestep* (*side*) は神経筋接合部 (NMJ) の軸索誘導に異常をきたす遺伝子変異体の順遺伝学的なスクリーニングによって同時に発見された (Vactor et al. 1993; Fambrough and Goodman 1996; Sink et al. 2001)。*beat-1a* と *side* の変異体は類似した表現型を示すことが知られていたが、後に遺伝学的・生化学的に相互作用することが明らかにされた (Siebert et al. 2009)。さらに、遺伝子データ解析によって *beat-1a* と *side* はそれぞれ 14 種類と 8 種類のパラログを持つことが明らかになった (Pipes et al. 2001; Aberle 2009; Zinn 2009)。さらに生化学的にタンパク質相互作用を解析したインターラクトーム解析によって、Beat パラログと Side パラログがヘテロフィリックな相互作用ネットワークを形成することが分かった (Özkan et al. 2013; Li et al. 2017)。加えてシングルセル解析により、Beat/Side タンパク質は、ほぼ全ての神経細胞において発現し、細胞ごとに固有の種類の組み合わせで発現していることが明らかになった (Davis et al. 2020; Kurmangaliyev et al. 2020)。これらから、Beat/Side タンパク質が神経間で相互作用し、シナプス特異性に関わる重要な分子であると示唆される。NMJ の軸索誘導にかかわることが

知られる *beat-1a* と *side* に関しては、運動機能や脚神経での解析など多様な観点から研究されるが (Kinold et al. 2018; Kinold et al. 2021; Heymann et al. 2022)、他の種類の Beat/Side タンパク質の機能は未知である。本研究では、Beat/Side タンパク質が、シナプス特異性に働く有力な新規の鍵-鍵穴分子であると考え、機能解明を試みた。

2. 材料と実験方法

1. ハエの飼育

ショウジョウバエは 2 cm の餌を底に敷いたバイアルまたはボトルで飼育を行なった。温度 25 度、湿度 60% に設定されたインキュベーター内で飼育を行なった。また、ハエのストックの保管は温度 18 度、湿度 60% で行なった。

2. S2 培養細胞のトランスフェクションと共免疫沈降法

S2 細胞の飼育には、500mL のシュナイダー培地 (x1, gibco) と 5mL のペニシリン-ストレプトマイシン (x100, wako) と 50mL の FBS (Sigma) によって調整された培養液を用いた。トランスフェクションは、24 ウェルプレートで飼育された S2 細胞に、UAS ベクターと pActin5C-Gal4 が計 1.5 μ g になるように、遺伝子導入剤 HilyMax (DOJINDO) と共に添加した。共免疫沈降法は、3 well 分の S2 細胞を Lysis Buffer (50 mM Tris at pH 6.8, 150 mM NaCl, 1% NP40, protease inhibitor cocktail [Roche]) で細胞溶解し、1 μ g の GFP 抗体 (Life technologies) と Protein A ビーズ (Pierce) で免疫沈降、7.5% SDS-PAGE ゲル (Bio-Rad) と V5 抗体 (Invitrogen) でウェスタンブロットティングした。

3. 抗体染色

抗体染色は当研究室の先行研究で述べられた方法で行われた (Hakeda-Suzuki et al. 2017)。ショウジョウバエの脳は、0.1%PBT 溶液 (Triton X-100 を含む PBS 溶液) 内で摘出され、4%のparaホルムアルデヒドを含む 0.1%PBT 溶液に浸し、ニューテイター上で室温 60 分間固定した。その後、1 次抗体が加えられ、4°C で 1 晩ニューテイター上にて 1 次抗体反応させた。次の日に、サンプルを 0.1%PBT 溶液で 3 回液交換し、ニューテイター上で室温 60 分間洗浄した。その後、2 次抗体が加えられ、室温で 60 分間ニューテイター上にて 2 次抗体反応させた。次に、サンプルを 0.1%PBT 溶液で 3 回液交換し、ニューテイター上で室温 120 分間洗浄した。最後にサンプルを、PBS で 1 回液交換し、VECTASHIELD® (Vector laboratories, U. S. A.) に置き換えた。染色で用いられた抗体とその濃度は次となる。

・ mAb24B10 (1:50, DSHB)、mAbCadN (Ex#8, 1:50, DSHB)、V5 抗体 (R960, 1:400, Invitrogen)、HA 抗体 (3F10, 1:100, Sigma)、GFP488 抗体 (1:400, Life technologies)、Alexa488- Alexa568- Alexa633-conjugated (1:400, Life Technologies)

4. 光環境

ショウジョウバエは 12 時間の光環境と暗闇環境のサイクル (LD) に 25°C で 50-60%湿度のインキュベーターにて飼育された。LL 条件と LD 条件実験では、LED パネル (MUSASHI ELECTRIC、MLP-LSK2478DA4、日本) を照度計にて 2000 (lux) に設定した。

5. 画像撮影と処理

全てのコンフォーカル画像は、Nikon C2+または A1 の顕微鏡を、NIS-elements (version4.11) のシステムを用いて撮影された。それぞれの脳は、Z ステップが 0.5 または 1.0 μm で脳の表面から 30-50 μm の深度が撮影された。撮影の際に、画像は 2 回のシグナルの平均化が行われている。画像は、NIS-elements と Adobe フォトショップと Adobe イラストレーターで処理した。

6. RNAi スクリーニングの候補遺伝子の選定

候補遺伝子の選定にあたり、3つのカテゴリーを設け（膜タンパク質遺伝子、記憶関連遺伝子、シナプス関連遺伝子）た。はじめに、ショウジョウバエデータベース Flybase の RNAseq 情報より、成虫の脳で”moderately high”より強い発現を示す 1854 遺伝子が選定された。膜タンパク質遺伝子の選定については、各遺伝子のアミノ酸配列を膜貫通ドメイン予想プログラム THMMM とシグナルペプチドを予測するソフトウェアである signalP を用いて、膜貫通ドメインを持つ遺伝子 205 遺伝子を選定した。70 の記憶関連遺伝子と 130 のシナプス関連遺伝子は、Flybase の”class”と”Tissue/cell affected”のデータを利用して得られた。いくつかの遺伝子は、複数のカテゴリーに属していたので、重複が無いように 378 遺伝子が選定された。その中から、Bloomington Drosophila Stock Center で入手可能であった 300 遺伝子をスクリーニングで用いた。

7. Synapse Quantifier を用いたシナプス定量

- convolution neural network (CNN) の学習

CNN の学習で用いたシナプスと背景画像は、手動で 12 × 12 pixel 領域が 800 枚ずつ集められた。CNN による機械学習は、オンラインで入手可能な MATLAB スクリプトを応用して行った。CNN の構造は、先行研究 (Han et al. 2020) で用いたものを応用したものである。CNN は 11 層で構成されている。層 1 が 12×12pixel のオリジナル画像を受け取った後、2組の畳み込み、正規化、ReLU 層があり、それらの間に最大プーリング層が接続されている。層 9 の完全接続層に続いて、層 10 のソフトマックス関数が、層 11 のシナプスや背景との類似性に依じて最終的な分類結果を計算する。学習された CNN の精度は 99.9%以上であった。学習済み CNN はオンラインで公開されている (<https://github.com/satouma7/SynapseQuantifier>)。

-CNN を用いたシナプス検出

3D 共焦点画像で指定された関心領域 (ROI) は、12×12 pixel 領域のフレームで走査される。走査のためのデフォルトの Stride (フレームの動かす幅) は 2 pixel であるが、2 次スクリーニングでは解析を高速化するために 3 pixel に設定し解析した。各画像は学習された

CNN によって分類され、「Score」が計算される。Stride はシナプスの幅よりも小さいため、1 つのシナプスが複数回検出される。overlap threshold というパラメーターは、隣接するシナプス間の最小距離を定義するために用いられる。隣接するシナプス画像間の距離が閾値より小さい場合、それらは同じシナプスの画像とみなされる。オーバーラップ閾値で定義された領域内で最もスコアの高い画像のみが、解析に用いられる。重なるの除去は、まず x-y 平面に沿って行い、次に z 軸に沿って行う。

-シナプス数の算出とグループ化

検出されたシナプスは、その相対的な距離によって分類される。X-Y 軸と Z 軸に沿った閾値距離は別々に指定される。しかし距離だけを考慮すると、R8 は M2 層付近ではシナプス形成しないため、M1 層付近のシナプスと M3 層付近のシナプスが別々のグループに分類される。M1 層・M3 層付近のシナプスを同じグループに分類するために、回転スライダーを使ってシナプスの座標を手動で回転させる。ここで、シナプス間の距離は、Y 軸に沿った重みに従って過小評価される。その結果、同じ R8 軸索の M1 層・M3 層付近のシナプスは同じグループとみなされ、その結果はグループ番号が色分けされたプレビューで確認できる。全シナプスの座標と各グループのシナプス数は、エクスポートした Excel ファイルに出力できる。

-ソースコードとデータ

MATLAB ソースコード (“eval_synapse_GUI.fig”, and “eval_synapse_GUI.m”) は GitHub にて公開されている (<https://github.com/satouma7/SynapseQuantifier>)。

3. 「シナプス可塑性を規定する新規分子の探索」結果と考察

本研究では、シナプス安定化に関わる分子を探索するために、始めに簡便なシナプス不安定化の指標である Brp-short-mCherry の凝集体形成シグナルを用いて、300 遺伝子に対して RNAi スクリーニングを行い、27 の 1 次候補遺伝子を得た。そして、候補遺伝子に対して実際に RNAi した際に、シナプス数の減少が生じているかを、STaR 法を用いて調べることにした。シナプス数の定量にあたって、機械学習を組み込んだ自動定量プログラムを共同研究みよって開発した。シナプス画像と背景画像を 800 枚ずつ学習させ、シナプスを認識できるニューラルネットワークを構築し、軸索ごとのシナプス数を算出できるプログラムと組み合わせた。ユーザーが視覚的に操作できるように、Graphic User Interface (GUI) を設計し、Synapse Quantifier と名付けた (図 1)。Synapse Quantifier を用いて 27 の候補遺伝子 RNAi のシナプス数を定量したところ、

cype、*letm1*、*cirl* を RNAi した際に、有意なシナプス減少の表現型が見られた。しかし、*cype* と *letm1* は RNAi によって神経変性を引き起こすことが確認されたので、シナプス減少は二次的なものであると考えた。そして、最終的に *cirl* をシナプス安定化に関わる分子として同定した。Cirl は結合性の GPCR の 1 つであり、哺乳類のホモログである LPHN1 は膜タンパク質 Lasso と相互作用することが知られていた。そこで、Lasso のハエホモログである Ten-a と Ten-m も Cirl と相互作用することで機能していると考えた。Cirl と Ten-a と Ten-m、これらを前シナプス神経または後シナプス神経特異的なノックダウンを行い、そのシナプス数への影響を解析した。その結果、前シナプス神経では *cirl* が、後シナプス神経では *ten-a* がノックダウンされた際に、シナプスの不安定化の表現型が観察された。

以上より、シナプス安定化に関わる分子を、シナプス自動定量プログラムを用いて解析し、*cirl* を候補遺伝子として得た。さらに本研究によって、前後シナプス間の Cirl と Ten-a の相互作用がシナプスの安定化を行う分子モデルが示唆される (図 2)。

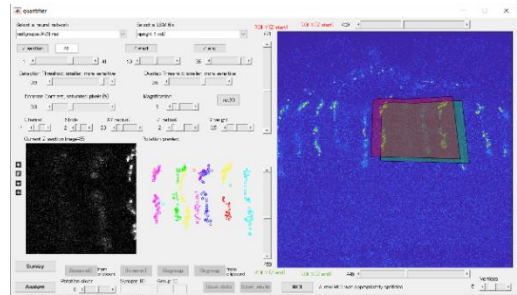


図 1. Synapse Quantifier の GUI

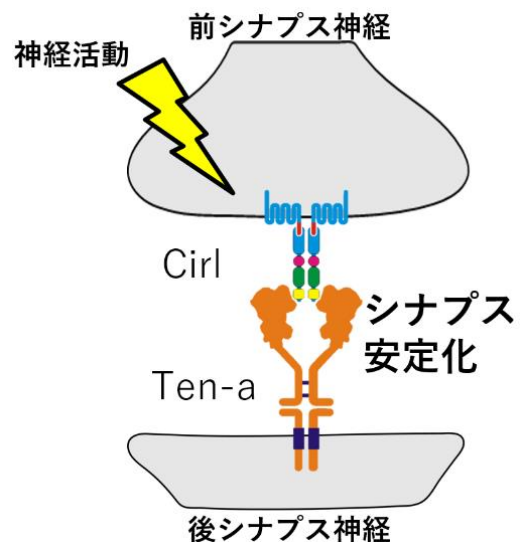


図 2. Cirl-Ten-a シナプス安定化モデル (Ushkaryov et al., 2019 modified)

4. 「シナプス特異性を規定する新規分子の探索」結果と考察

本研究では始めに、ショウジョウバエ視神経を用いてシナプス誘導の出来る分子を探
索し、Sideを発見した。Sideは細胞外に免疫グロブリン様ドメインを持ち、リガンドで
あるBeatと相互作用し、クラスター複合体を確立することで前シナプス構造を誘導で
きる分子であることが分かった。興味深い観察結果として、Sideはシグナル伝達に必要な細胞内ドメインを失っても、全長と比べると弱いもののシナプスを誘導した。このこ
とから、Sideには共受容体を介したシグナルと細胞内ドメインの下流で働くシグナル
の、2つのシグナル経路が予想された。そして、共受容体として膜タンパク質Kirreが、
下流因子としてシナプス足場タンパク質Dsyd-1が、Sideと複合体形成することでシグ
ナル伝達に働くことを明らかにした。次に発現データから、SideとBeatの相互作用が
働くと予想された神経であるラミナ神経に着目し、Side-Beatの相互作用の内在性の機
能解析を行った。Sideを機能欠損すると、神経接続が出来なくなってシナプス形成不全
が起きなくなるのではなく、接続パターンの変化が変化してしまい異所性のシナプスが
誘導された。SideはBeatと相互作用することで、シナプス形成のすべきProximal領域
のみに細胞内局在し、SideやBeatの変異体はシナプス形成が本来起きないDistal領域
に異所性のシナプスが誘導されてしまう。ここから、SideとBeatは適切なシナプス形
成箇所を細胞部位レベルで制御していることが明らかになった。さらに、Sideが無くな
ってしまえば、共受容体であるKirreや、下流で働くシナプス足場タンパク質である
Dsyd-1が適切な局在や機能ができなくなり、誤った接続パターンを誘発してしまうこ
とが分かった。そのため、Sideの機
能は2つあると考えられる1つ目は細胞外ドメインによるBeatとの
相互作用に規定される細胞内局在
によってシナプス形成する相手や
位置を決定することであり、2つ目
はKirreやDsyd-1と複合体形成す
ることでシナプス形成促進と誤接
続の抑制をしていると考えられ
る。

本研究は、新しいシナプス誘導
出来る鍵-鍵穴分子の発見だけで
なく、これら分子の複合体形成によ
るシナプス特異性の制御機構の新
しいモデルを提唱する(図3)。

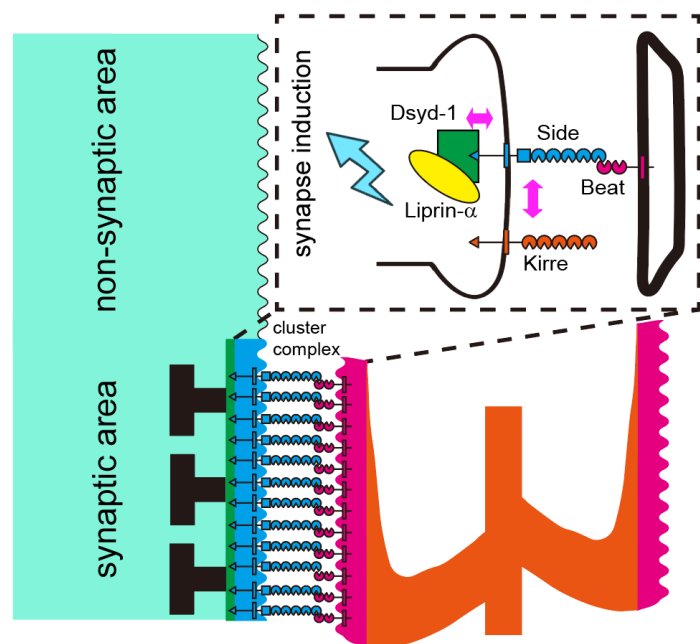


図3. Side-Beatによるシナプス特異性決定機構

参考文献

- Aberle, H. (2009) Searching for guidance cues: follow the Sidestep trail. *Fly (Austin)* **3**, 270-3.
- Araki, T., Osaka, J., Kato, Y., Shimoazono, M., Kawamura, H., Iwanaga, R., Hakeda-Suzuki, S., and Suzuki, T. (2020) Systematic identification of genes regulating synaptic remodeling in the *Drosophila* visual system. *Genes & Genetic Systems* **95**, 101-110.
- Barish, S., Nuss, S., Strunilin, I., Bao, S., Mukherjee, S., Jones, C.D., and Volkan, P.C. (2018) Combinations of DIPs and Dprs control organization of olfactory receptor neuron terminals in *Drosophila*. *PLoS Genet* **14**, e1007560.
- Bornstein, B., Meltzer, H., Adler, R., Alyagor, I., Berkun, V., Cummings, G., Reh, F., Keren-Shaul, H., David, E., Riemensperger, T., et al. (2021) Transneuronal Dpr12/DIP- δ interactions facilitate compartmentalized dopaminergic innervation of *Drosophila* mushroom body axons. *Embo j* **40**, e105763.
- Carrillo, R.A., Özkan, E., Menon, K.P., Nagarkar-Jaiswal, S., Lee, P.T., Jeon, M., Birnbaum, M.E., Bellen, H.J., Garcia, K.C., and Zinn, K. (2015) Control of Synaptic Connectivity by a Network of *Drosophila* IgSF Cell Surface Proteins. *Cell* **163**, 1770-1782.
- Chen, Y., Akin, O., Nern, A., Tsui, C.Y., Pecot, M.Y., and Zipursky, S.L. (2014) Cell-type-specific labeling of synapses in vivo through synaptic tagging with recombination. *Neuron* **81**, 280-93.
- Clandinin, T.R., and Zipursky, S.L. (2002) Making Connections in the Fly Visual System. *Neuron* **35**, 827-841.
- Cosmanescu, F., Katsamba, P.S., Sergeeva, A.P., Ahlsen, G., Patel, S.D., Brewer, J.J., Tan, L., Xu, S., Xiao, Q., Nagarkar-Jaiswal, S., et al. (2018) Neuron-Subtype-Specific Expression, Interaction Affinities, and Specificity Determinants of DIP/Dpr Cell Recognition Proteins. *Neuron* **100**, 1385-1400.e6.
- Courgeon, M., and Desplan, C. (2019) Coordination between stochastic and deterministic specification in the *Drosophila* visual system. *Science* **366**.
- Davis, F.P., Nern, A., Picard, S., Reiser, M.B., Rubin, G.M., Eddy, S.R., and Henry, G.L. (2020) A genetic, genomic, and computational resource for exploring neural circuit function. *eLife* **9**, e50901.
- Davydova, D., Marini, C., King, C., Klueva, J., Bischof, F., Romorini, S., Montenegro-Venegas, C., Heine, M., Schneider, R., Schröder, M.S., et al. (2014) Bassoon specifically controls presynaptic P/Q-type Ca²⁺ channels via RIM-binding protein. *Neuron* **82**, 181-94.
- Fambrough, D., and Goodman, C.S. (1996) The *Drosophila* beaten path gene encodes a novel secreted protein that regulates defasciculation at motor axon choice points. *Cell* **87**, 1049-58.

- Hakeda-Suzuki, S., Berger-Müller, S., Tomasi, T., Usui, T., Horiuchi, S.Y., Uemura, T., and Suzuki, T. (2011) Golden Goal collaborates with Flamingo in conferring synaptic-layer specificity in the visual system. *Nat Neurosci* **14**, 314-23.
- Hakeda-Suzuki, S., Takechi, H., Kawamura, H., and Suzuki, T. (2017) Two receptor tyrosine phosphatases dictate the depth of axonal stabilizing layer in the visual system. *eLife* **6**, e31812.
- Heymann, C., Paul, C., Huang, N., Kinold, J.C., Dietrich, A.C., and Aberle, H. (2022) Molecular insights into the axon guidance molecules Sidestep and Beaten path. *Front Physiol* **13**, 1057413.
- Jain, S., Lin, Y., Kurmangaliyev, Y.Z., Valdes-Aleman, J., LoCascio, S.A., Mirshahidi, P., Parrington, B., and Zipursky, S.L. (2022) A global timing mechanism regulates cell-type-specific wiring programmes. *Nature* **603**, 112-118.
- Kawamura, H., Hakeda-Suzuki, S., and Suzuki, T. (2020) Activity-dependent endocytosis of Wingless regulates synaptic plasticity in the *Drosophila* visual system. *Genes & Genetic Systems* **95**, 235-247.
- Kinold, J.C., Brenner, M., and Aberle, H. (2021) Misregulation of *Drosophila* Sidestep Leads to Uncontrolled Wiring of the Adult Neuromuscular System and Severe Locomotion Defects. *Front Neural Circuits* **15**, 658791.
- Kinold, J.C., Pfarr, C., and Aberle, H. (2018) Sidestep-induced neuromuscular miswiring causes severe locomotion defects in *Drosophila* larvae. *Development* **145**.
- Kurmangaliyev, Y.Z., Yoo, J., Valdes-Aleman, J., Sanfilippo, P., and Zipursky, S.L. (2020) Transcriptional Programs of Circuit Assembly in the *Drosophila* Visual System. *Neuron* **108**, 1045-1057.e6.
- Lazarevic, V., Schöne, C., Heine, M., Gundelfinger, E.D., and Fejtova, A. (2011) Extensive Remodeling of the Presynaptic Cytomatrix upon Homeostatic Adaptation to Network Activity Silencing. *The Journal of Neuroscience* **31**, 10189.
- Matz, J., Gilyan, A., Kolar, A., McCarvill, T., and Krueger, S.R. (2010) Rapid structural alterations of the active zone lead to sustained changes in neurotransmitter release. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 8836-41.
- Mayadevi, M., Archana, G.M., Prabhu, R.R., and Omkumar, R.V. (2012). Molecular Mechanisms in Synaptic Plasticity. In.
- Özel, M.N., Simon, F., Jafari, S., Holguera, I., Chen, Y.C., Benhra, N., El-Danaf, R.N., Kapuralin, K., Malin, J.A., Konstantinides, N., et al. (2021) Neuronal diversity and convergence in a visual system developmental atlas. *Nature* **589**, 88-95.
- Özkan, E., Carrillo, R.A., Eastman, C.L., Weiszmann, R., Waghray, D., Johnson, K.G., Zinn, K., Celniker, S.E., and Garcia, K.C. (2013) An extracellular interactome of immunoglobulin and LRR proteins reveals receptor-ligand networks. *Cell* **154**, 228-39.

- Pipes, G.C., Lin, Q., Riley, S.E., and Goodman, C.S. (2001) The Beat generation: a multigene family encoding IgSF proteins related to the Beat axon guidance molecule in *Drosophila*. *Development* **128**, 4545-52.
- Südhof, T.C. (2021) The cell biology of synapse formation. *J Cell Biol* **220**.
- Sanes, J.R., and Zipursky, S.L. (2020) Synaptic Specificity, Recognition Molecules, and Assembly of Neural Circuits. *Cell* **181**, 536-556.
- Sergeeva, A.P., Katsamba, P.S., Cosmanescu, F., Brewer, J.J., Ahlsen, G., Mannepalli, S., Shapiro, L., and Honig, B. (2020) DIP/Dpr interactions and the evolutionary design of specificity in protein families. *Nat Commun* **11**, 2125.
- Shimozono, M., Osaka, J., Kato, Y., Araki, T., Kawamura, H., Takechi, H., Hakeda-Suzuki, S., and Suzuki, T. (2019) Cell surface molecule, Klingon, mediates the refinement of synaptic specificity in the *Drosophila* visual system. *Genes to Cells* **24**, 496-510.
- Siebert, M., Banovic, D., Goellner, B., and Aberle, H. (2009) *Drosophila* motor axons recognize and follow a Sidestep-labeled substrate pathway to reach their target fields. *Genes & development* **23**, 1052-1062.
- Sink, H., Rehm, E.J., Richstone, L., Bulls, Y.M., and Goodman, C.S. (2001) sidestep encodes a target-derived attractant essential for motor axon guidance in *Drosophila*. *Cell* **105**, 57-67.
- Sperry, R.W. (1963) CHEMOAFFINITY IN THE ORDERLY GROWTH OF NERVE FIBER PATTERNS AND CONNECTIONS. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **50**, 703-710.
- Sugie, A., Hakeda-Suzuki, S., Suzuki, E., Silies, M., Shimozono, M., Möhl, C., Suzuki, T., and Tavosanis, G. (2015) Molecular Remodeling of the Presynaptic Active Zone of *Drosophila* Photoreceptors via Activity-Dependent Feedback. *Neuron* **86**, 711-25.
- suppXu, S., Xiao, Q., Cosmanescu, F., Sergeeva, A.P., Yoo, J., Lin, Y., Katsamba, P.S., Ahlsen, G., Kaufman, J., Linaval, N.T., et al. (2018) Interactions between the Ig-Superfamily Proteins DIP- α and Dpr6/10 Regulate Assembly of Neural Circuits. *Neuron* **100**, 1369-1384.e6.
- Takemura, S.-y., Xu, C.S., Lu, Z., Rivlin, P.K., Parag, T., Olbris, D.J., Plaza, S., Zhao, T., Katz, W.T., Umayam, L., et al. (2015) Synaptic circuits and their variations within different columns in the visual system of *Drosophila*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **112**, 13711-13716.
- Takemura, S.Y., Bharioke, A., Lu, Z., Nern, A., Vitaladevuni, S., Rivlin, P.K., Katz, W.T., Olbris, D.J., Plaza, S.M., Winston, P., et al. (2013) A visual motion detection circuit suggested by *Drosophila* connectomics. *Nature* **500**, 175-81.
- Tan, L., Zhang, K.X., Pecot, M.Y., Nagarkar-Jaiswal, S., Lee, P.-T., Takemura, S.-Y., McEwen, J.M., Nern, A., Xu, S., Tadros, W., et al. (2015) Ig Superfamily Ligand and Receptor Pairs Expressed in Synaptic Partners in *Drosophila*. *Cell* **163**, 1756-1769.

- Vactor, D.V., Sink, H., Fambrough, D., Tsoo, R., and Goodman, C.S. (1993) Genes that control neuromuscular specificity in *Drosophila*. *Cell* **73**, 1137-53.
- Venkatasubramanian, L., Guo, Z., Xu, S., Tan, L., Xiao, Q., Nagarkar-Jaiswal, S., and Mann, R.S. (2019) Stereotyped terminal axon branching of leg motor neurons mediated by IgSF proteins DIP- α and Dpr10. *eLife* **8**, e42692.
- Xu, C., Theisen, E., Maloney, R., Peng, J., Santiago, I., Yapp, C., Werkhoven, Z., Rumbaut, E., Shum, B., Tarnogorska, D., et al. (2019) Control of Synaptic Specificity by Establishing a Relative Preference for Synaptic Partners. *Neuron* **103**, 865-877.e7.
- Zinn, K. (2009) Choosing the road less traveled by: a ligand-receptor system that controls target recognition by *Drosophila* motor axons. *Genes Dev* **23**, 1042-5.

謝辞

本研究は、東京工業大学大学院の鈴木崇之研究室の皆様をはじめ、多くの方々のご指導とご協力のもと行うことが出来ました。この場をお借りして、深く感謝申し上げます。

実験を行うにあたり、多くの系統をストックセンター(VDR、BDSC(Harvard))から提供していただきました。

金沢大学新学術創成研究機構の数理神経科学研究ユニット佐藤研究室の佐藤教授には、機械学習の基礎知識のレクチャーを始め、機械学習のプログラム作製、論文の執筆と添削にいたるまで、さまざまな面でご協力頂きました。

新潟大学脳研究所の杉江研究室の杉江淳准教授、新田陽平助教には、研究結果についての考察や論文の構成についてなど、多くのご助言を頂きました。

増田研究室の増田真二准教授には、研究室での共免疫沈降法の確立のためのウェスタンブロットティングの手法について、多くの助言とご指導を頂きました。

鈴木研究室の鈴木(羽毛田)聡子博士には指導・議論・実験の手伝い等、多大な時間を当てて頂きました。心より感謝いたします。当研究室の武智広樹さん、川村ひなたさんには、日頃の実験操作をはじめ、研究結果に対するディスカッションなど多くの面でアドバイスして頂きました。綿貫雄介さん、安田晴香さんには、視神経 R8 のシナプス画像データの取得と解析、機械学習の学習データの収集とニューラルネットワークの作製をしていただきました。荒木智裕さん、大地啓太さん、加藤由野さん、岩永りくさんには、cDNA や変異体やタンパク質可視化ツールの作製をしていただきました。石井愛莉沙さん、王旭さんには、過剰発現体の作製に加え実験の一部を手伝っていただきました。

そして、指導教員である鈴木崇之准教授には、研究手法から論文の書き方に至るまで一からご指導頂きました。鈴木研究室で6年間研究が出来て幸せでした。深く感謝いたします。

ありがとうございました。