

「脳神経回路の形成・動作原理の解明と制御技術の創出」
平成 21 年度採択研究代表者

柚崎 通介

慶應義塾大学医学部・教授

成熟脳におけるシナプス形成機構の解明と制御

§ 1. 研究実施の概要

成熟後の脳におけるシナプスの維持・形成過程の分子的基盤については未だに解明されていない点が多い。本研究グループは、小脳顆粒細胞より分泌される Cbln1 が、成熟後においても強力なシナプス形成・維持作用をもつことをこれまでに発見した。さらに Cbln1 が属する C1q ファミリーの類縁分子 (Cbln1-Cbln4, C1ql1-C1ql4) が海馬や小脳のさまざまなシナプスに特徴的なパターンで発現することが分かってきた。これまでシナプス形成・維持機構は海馬や大脳皮質をモデルとして主に研究が進んできたが、小脳における分子機構とは大きく異なっている。そこで本研究では、C1q ファミリー分子という新しいシナプス形成・維持因子群に着目し、小脳と海馬の 4 種類の異なったシナプスにおける動作原理を比較することにより、より普遍的な、新しいシナプス形成・維持原理に迫る。さらに、これらの神経回路網において C1q ファミリー分子を介したシグナル伝達経路を操作することによって神経回路の形成と個体行動を制御し、分子—回路—個体レベルの脳研究の統合化を目指す。

平成 21 年度には、シナプス後部における Cbln1 の受容体である GluD2 についての解析を進めた。また C1q 分子群の発現様式と生化学的解析を進めた。各種遺伝子変異マウスの作成も順調に進んでおり、引き続き C1q ファミリーの類縁分子によるシナプス形成・維持原理の解明を進める。

§ 2. 研究実施体制

(1) 柚崎グループ

① 研究分担グループ長: 柚崎 通介 (慶應義塾大学、教授)

②研究項目

- Cbln1 受容体の同定とシグナル伝達機構の解明：

Cbln1 受容体候補遺伝子についてさらに解析を進めた。また小脳切片に Cbln1 を投与してシナプス形成過程をタイムラプスイメージングすることにより、Cbln1 によるシグナル伝達機構の解明を進めた。

- C1ql 群の生化学的解析：

C1ql1-4 分子群について、発現・分泌・会合様式について生化学的な解明を進めた。

- C1ql1 受容体の同定：

C1ql1 受容体候補遺伝子についてさらに解析を進めた。

(2) 渡辺グループ

①研究分担グループ長:渡辺 雅彦(北海道大学大学院、教授)

②研究項目

- Cbln1~4 遺伝子発現の *in situ* ハイブリダイゼーション解析：

Cbln 各遺伝子に相補的な cRNA プローブを作成し、異なる波長の発光系を用いた多重発現解析方法を確立し、これを用いて、特定の領域や特定の時期に発現する Cbln の発現様式の細胞レベルでの解析を進めた。

- Cbln 群各分子の特異抗体開発：

各 Cbln 分子にユニークなアミノ酸配列部位を含む大腸菌融合タンパクもしくは合成ペプチドを抗原として、ウサギとモルモットに免疫して特異抗体の開発を進めた。

- 免疫組織化学による分子発現解析：

得られた特異抗体を用いて、共焦点レーザー顕微鏡を用いて、Cbln 分子の発現部位の同定を進めた。

- Cbln1 欠損マウスにおけるシナプス形成関連分子の発現解析：

平行線維シナプス形成作用を有するグルタミン酸受容体 GluD2 の分子局在調節がどのようになっているかを、Cbln1 欠損マウスにおいて検討した。

(3) 崎村グループ

①研究分担グループ長:崎村 建司(新潟大学、教授)

②研究項目

- Cbln2 及び Cbln4 遺伝子に loxP をノックインした floxed キメラマウス (C57BL/6 純系統) を用いて、発生初期に Cre を発現するマウスと交配することにより各 KO マウス系統を樹立した。また特定の神経細胞で Cbln2 及び Cbln4 が欠損する conditional KO の樹立も進めた。

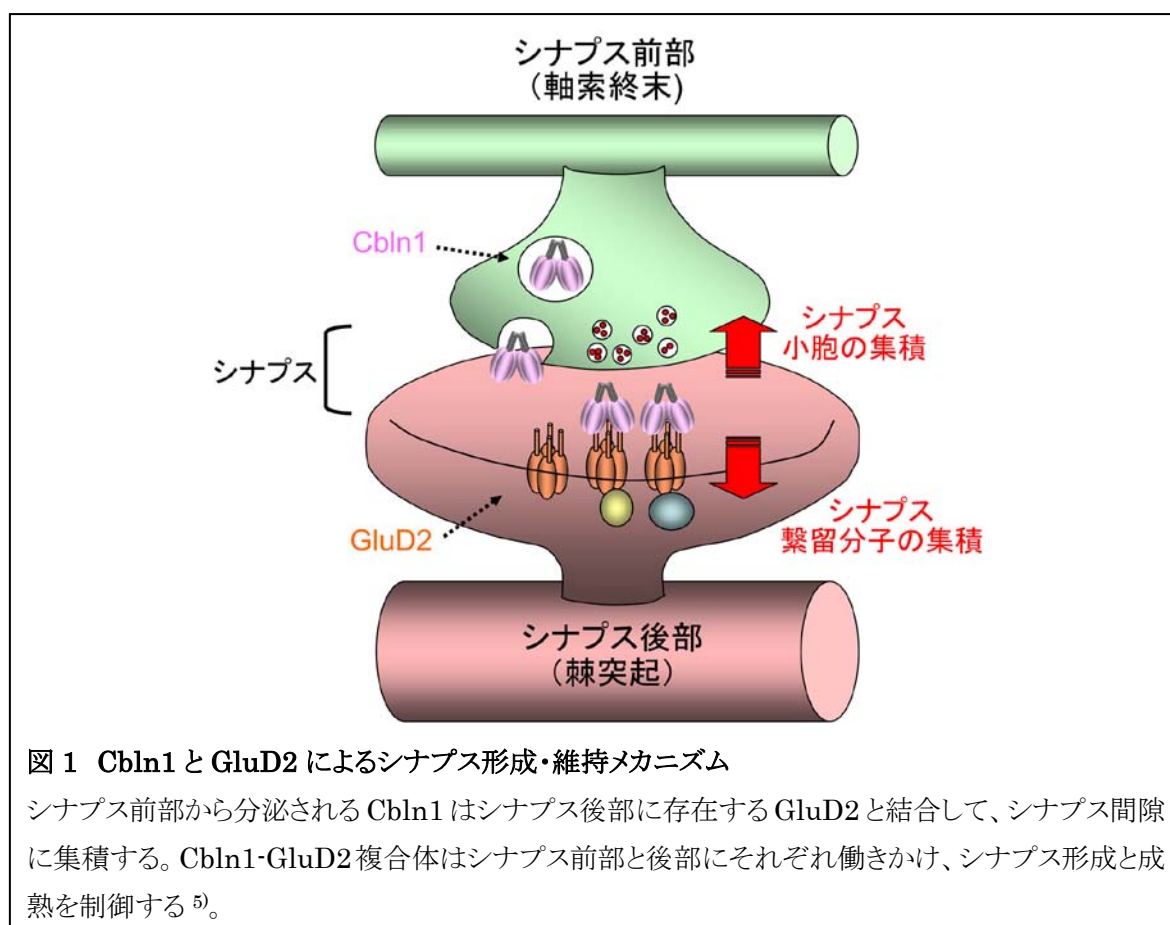
・C1q 群分子のうち C1q11, C1q13 遺伝子について C57BL/6 純系統 ES 細胞 RENKA を用いて loxP をノックインした floxed キメラマウスの作成を進めた。

§ 3. 研究実施内容

(文中に番号がある場合は(4-1)に対応する)

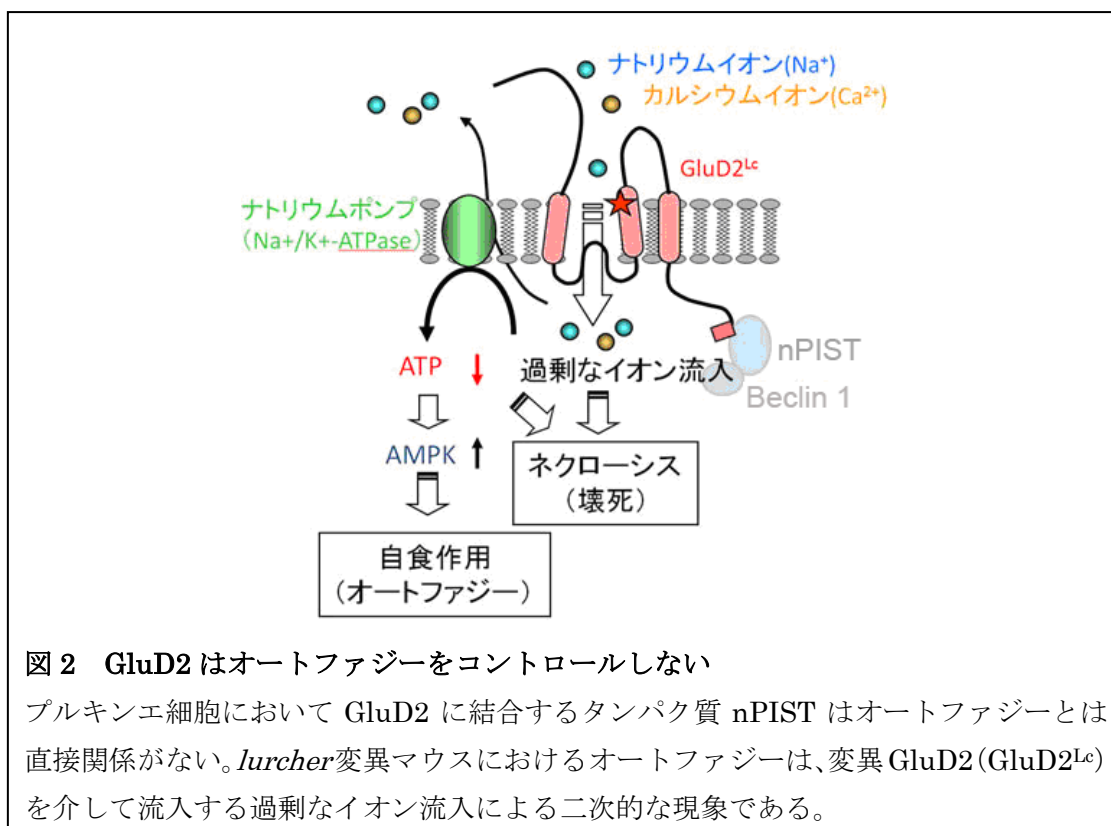
本研究では、C1q ファミリー分子に着目し、小脳と海馬の 4 種類の異なったシナプスにおける動作原理を比較することにより、より普遍的な、新しいシナプス形成・維持原理に迫ることを目的とする。さらに、C1q ファミリー分子を介したシグナル伝達経路を操作することによって神経回路の形成と個体行動を制御し、分子—回路—個体レベルの脳研究の統合化を目指す。

まずシナプス形成を制御する代表分子として、小脳平行線維—プルキンエ細胞シナプスにおける Cbln1 と、登上線維—プルキンエ細胞における C1q11 のシグナル伝達機構の解明に着手した。Cbln1 と $\delta 2$ グルタミン酸受容体 (GluD2) は、シナプス形成・維持において非常に似た機能を発揮することから、GluD2 を介したシグナル伝達経路を解明することが重要である。まず、顆粒細胞から分泌される Cbln1 は、プルキンエ細胞樹状突起に存在する GluD2 と結合して複合体を形成してシナプス間隙に集積し、シナプスの分化と安定化を制御することを発見した(図1)⁵⁾。



また *Cbln1* でコートしたビーズを小脳顆粒細胞と共に培養すると、ビーズ周囲にシナプス前部（顆粒細胞の軸索）が集まりシナプス小胞も集積する。一方、*Cbln1* でコートしたビーズを小脳プルキンエ細胞と共に培養すると、GluD2 が存在する時に限って、GluD2 やプルキンエ細胞内で GluD2 に結合するタンパク質がビーズ周囲に集まった。つまり、*Cbln1* はシナプス前部には直接作用し、シナプス後部には GluD2 を介して作用することにより、シナプスの形成と成熟をコントロールすることが分かった。

プルキンエ細胞内において GluD2 に結合するタンパク質としては、nPIST がある。nPIST は Beclin 1 と会合することにより自食（オートファジー）経路を活性化することがこれまでに提唱されている。実際に、*lurcher* 変異マウスにおいては、GluD2 の点変異によってオートファジーが過剰に活性化し、プルキンエ細胞死が引き起こされるとされていた。オートファジーは昆虫の変態に伴う樹状突起の改変時に重要な役割を果たすことが分かっていることから、この経路と GluD2 の機能との関係について検討を加えた。その結果、*lurcher* によるオートファジー活性化は、nPIST・Beclin 1 経路とは関係が無く、変異 GluD2 を通って流入する過剰イオン流入によって、細胞内 ATP が低下するために引き起こされる二次的な反応であることを初めて明らかにした¹⁾。さらにオートファゴソームそのものは、GluD2 が存在する樹状突起ではなく、軸索において形成され、逆行性に細胞体に向かって逆行性に輸送されることを見出した（図 2）⁶⁾。



一方、C1ql 分子群の遺伝子発現パターン解析とそれぞれのタンパク質の生化学的解析を行った⁷⁾。C1ql1 mRNA は小脳に登上線維を送る下オリブ核や腹側蝸牛神経核に非常に高い発現がみられた。C1ql2 と C1ql3 mRNA は海馬歯状回に高く発現していた。いくつかの脳部位においては C1ql 分子がオーバーラップして発現しており、実際にヘテロ複合体を形成することが判明した。これらのことから、C1ql 分子群はこれらの脳部位において重要な機能を担うことが示唆された。

Cbln1 はグルタミン酸を神経伝達物質とする興奮性シナプスに選択的に観察されるが、他の Cbln ファミリー分子や C1ql 分子群は抑制性や拡散性伝達(volume transmission)による情報伝達経路の形成にも関与している可能性がある。これらのさまざまな伝達様式について検討を加えた。例えばアセチルコリン受容体(M1)は海馬や大脳皮質において特にシナプス前部とは無関係に存在することから拡散性伝達に関わることが判明した²⁾。また小脳や海馬において内因性カナビノイドによる逆行性情報伝達はシナプス辺縁部に形成されるジアシルグリセロールリパーゼ陽性部位によって制御されることも判明した³⁾。一方 GABA を用いる抑制性シナプスが、局所回路だけではなく投射性神経細胞によっても形成されることも発見した⁴⁾。

§ 4. 成果発表等

(4-1) 原著論文発表

●論文詳細情報

- 1) Nishiyama J, Matsuda K, Kakegawa W, Yamada N, Motohashi J, Mizushima N, Yuzaki M: Reevaluation of neurodegeneration in lurcher mice: constitutive ion fluxes cause cell death with, not by, autophagy. *J Neurosci* 30: 2177-87, 2010.
DOI:10.1523/JNEUROSCI.6030-09.2010
- 2) Yamasaki M, Matsui M, Watanabe M: Preferential localization of muscarinic M1 receptor on dendritic shaft and spine of cortical pyramidal cells and its anatomical evidence for volume transmission. *J Neurosci* 30: 4408-4418, 2010.
DOI:10.1523/JNEUROSCI.5719-09.2010
- 3) Tanimura A, Yamazaki M, Hashimotodani Y, Uchigashima M, Kawata S, Abe M, Kita Y, Hashimoto K, Shimizu T, Watanabe M, Sakimura K, Kano M: The endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol produced by diacylglycerol lipase alpha mediates retrograde suppression of synaptic transmission. *Neuron* 65: 320-327, 2010.
DOI:10.1016/j.neuron.2010.01.021

- 4) Higo S, Akashi K, Sakimura K, Tamamaki N: Subtypes of GABAergic neurons project axons in the neocortex. *Front Neuroanat* 3: 1-5, 2009.
DOI:10.3389/neuro.05.025.2009
- 5) Matsuda K, Miura E, Miyzaki T, Kakegawa W, Emi K, Narumi S, Fukazawa Y, Ito-Ishida A, Kondo T, Shigemoto R, Watanabe M, Yuzaki M: Cbln1 is a ligand for an orphan glutamate receptor $\delta 2$, a bidirectional synapse organizer. *Science*, *in press*
- 6) Katsumata K, Nishiyama J, Inoue T, Mizushima N, Takeda J, Yuzaki M: Dynein- and activity-dependent retrograde transport of autophagosomes in neuronal axons. *Autophagy*, *in press*.
- 7) Iijima T, Miura E, Watanabe M, Yuzaki M: Distinct expression of C1q-like family mRNAs in mouse brain and biochemical characterization of their encoded proteins. *Eur J Neurosci*, *in press*.