

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 22 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 GluD2 のファミリー分子である GluD1 についての検討も進めた。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 ファミリーおよびその受容体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 (慶應義塾大学医学部、教授)

② 研究項目

- ・シナプス後部における Cbln1 受容体である GluD2 を介したシグナル伝達機構の解明
- ・GluD2 ファミリー分子である GluD1 の機能解析
- ・C1ql ファミリー分子群の機能解析

(2) 渡辺グループ

① 研究分担グループ長: 渡辺 雅彦 (北海道大学大学院医学研究科、教授)

② 研究項目

- C1ql 遺伝子発現の *in situ* ハイブリダイゼーション解析
- Cbln 群各分子および C1ql 群各分子の特異抗体開発
- GluD2 によるグルタミン酸受容体のシナプス発現調節とシナプス回路維持

(3) 崎村グループ

① 研究分担グループ長: 崎村 建司 (新潟大学脳研究所、教授)

② 研究項目

- C1ql 群各分子の conditional KO マウスの樹立
- Cbln1 floxed マウスの樹立
- C1ql 群受容体と想定される分子群の KO マウスの作製

§3. 研究実施内容

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。

本年度は C1q ファミリー分子によるシナプス制御機構を解明する第一歩として、小脳平行線維—プルキンエ細胞シナプスをモデルとして、Cbln1 のシグナル伝達機構の解明をさらに進めた。小脳平行線維から分泌される Cbln1 はシナプス後部であるプルキンエ細胞に発現する・2 グルタミン酸受容体 (GluD2) の最アミノ末端に結合することによって、平行線維—プルキンエ細胞シナプスの形成と維持を制御することを前年度に見いだした (Matsuda et al, Science 2010)。Cbln1 はさらにシナプス前部に存在する Neurexin (Nrx) に特異的に結合することを見いだした³⁾。すなわち、平行線維から分泌された Cbln1 はシナプス前部の Nrx とシナプス後部の GluD2 にそれぞれ両側から挟まれて結合することによってシナプス間隙に局在するという、非常にユニークな存在様式とシグナル伝達機構をもつことが分かった (図1)。

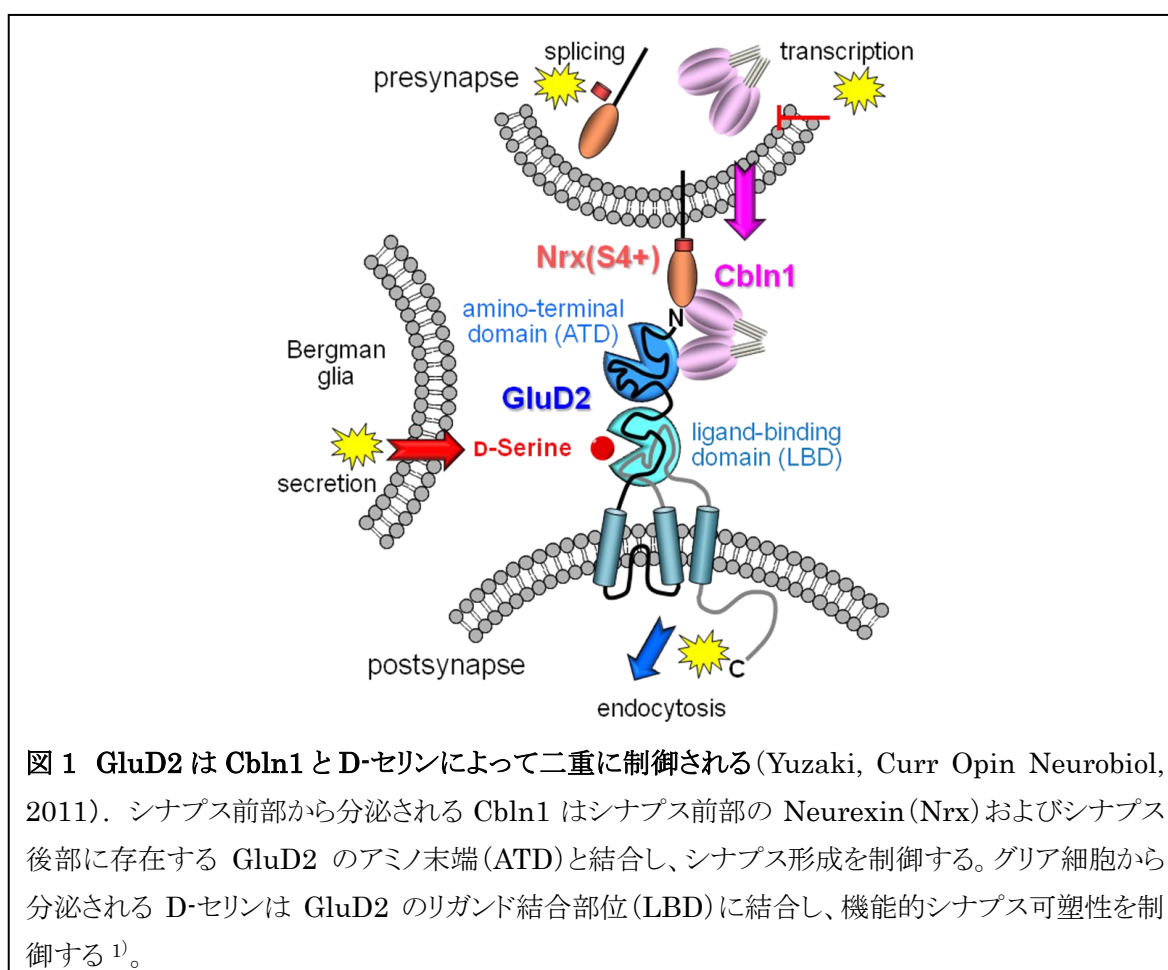


図1 GluD2 は Cbln1 と D-セリンによって二重に制御される (Yuzaki, Curr Opin Neurobiol, 2011)。シナプス前部から分泌される Cbln1 はシナプス前部の Neurexin (Nrx) およびシナプス後部に存在する GluD2 のアミノ末端 (ATD) と結合し、シナプス形成を制御する。グリア細胞から分泌される D-セリンは GluD2 のリガンド結合部位 (LBD) に結合し、機能的シナプス可塑性を制御する¹⁾。

また、薬剤誘導によって成体期になって GluD2 が特異的に欠損するマウスを解析したとこ

ろ、平行線維シナプスの離解の進行に一致して、登上線維の上行枝の遠位伸展と側方側枝の異所性支配が進行し、これにより複数の登上線維によるプルキンエ細胞の多重支配と小脳性運動失調が重篤化した⁴⁾。この観察結果は、GluD2は平行線維側の強化分子として機能することにより、成体期における登上線維の単一支配の維持に不可欠であることを示した。

これまでにシナプス形成活性をもつさまざまな分子が同定されている。特に Nrx と Neurologin (NL)は自閉症との関連から大きく注目されている。興味深いことに Nrx の S4 部位がスプライシングされるアイソフォーム Nrx(S4-)は NL に加えて leucine-rich repeat transmembrane neuronal protein (LRRTM)と特異的に結合することが分かっている。一方、Cbln1 は S4 部位がスプライシングされないアイソフォーム Nrx1(S4+)と特異的に結合する。従って、Cbln1 は Nrx(S4-)と LRRTM や NL との結合には全く影響しないが、Nrx(S4+)と NL との結合を競合的に阻害することを見いだした³⁾。また Nrx(S4-)と LRRTM や NL との結合には細胞外 Ca が必須であるが、Cbln1 と Nrx(S4+)の結合は細胞外 Ca 濃度に左右されないことも見いだした。これらの結果は、Nrx(S4+) - Cbln1 - GluD2 経路によるシナプス形成機構は、これまでに知られているシナプス形成分子とは一部共通するものの、特異的な新しい分子機構を用いていることが判明した。

一方、アミノ酸配列からは、イオンチャネル型グルタミン酸受容体に属する GluD2 には、他のグルタミン酸受容体におけるリガンド結合部位とアミノ酸配列が保存されており、実際に D-セリンが特異的に結合することが分かっていたが、これまでその機能は不明であった。面白いことに、D-セリンが結合しても GluD2 そのもののチャネル活性は見られないが、AMPA 型グルタミン酸受容体 (AMPA 受容体)のエンドサイトーシスを促進して、シナプス可塑性現象である長期抑圧 (LTD)を誘導することを私たちは見いだした(図1)¹⁾。すなわち長年リガンドが不明であることから「孤児受容体」として扱われてきた GluD2 であるが、アミノ末端に Cbln1、リガンド結合部位に D-セリンがそれぞれ結合することによって、形態的なシナプス形成と機能的なシナプス可塑性を制御することが判明した。

C1q 分子群のシグナル伝達経路を操作することによってと個体行動を制御する可能性を探るために、まず小脳運動学習のモデルである瞬目条件づけ学習をマウスにおいて検討した。これまでのマウスにおける瞬目条件づけでは、1日100試行ずつ数日かけて行うために発達段階にある個体や、あるいは薬剤・ウイルスベクターの急性投与実験には用いることができなかった。そこで新しく50回試行を3時間間隔で6回行うことにより1日以内に瞬目条件付け学習ができるプロトコルを開発した²⁾。このプロトコルを用いることにより GluD2 欠損マウスでは瞬目条件付けが起きないが、ウイルスベクターを用いて GluD2 をプルキンエ細胞に急性に発現させると、翌日には瞬目条件付けが正常に引き起こされるようになることを見いだした²⁾。

C1qlファミリー分子の脳内発現について二重標識蛍光 in situ ハイブリダイゼーション法により解析を行い、C1ql4を除く3種の分子が脳内のグルタミン酸作動性ニューロンにほぼ選択的に発現することを明らかにした。Cbln 群各分子および C1ql 群各分子の特異抗体開発を行った結果、これまで得られている Cbln1, Cbln3 の特異抗体に加え、Cbln4 に特異的な抗体を作成することができた。C1ql1-4 の各分子に対する抗体については、その特異性を検討中である。

§4. 成果発表等

(4-1) 原著論文発表

●論文詳細情報

- 1) Kakegawa W, Miyoshi Y, Hamase, K, Matsuda S, Matsuda K, Kohda K, Emi K, Motohashi J, Konno R, Zaitu K, Yuzaki M. D-Serine regulates cerebellar LTD and motor coordination through the delta2 glutamate receptor. *Nature Neurosci*, *in press*. DOI:10.1038/nn.2791
- 2). Emi K, Kohda K, Kakegawa W, Narumi S, Yuzaki M. A New Rapid Protocol for Eyeblink Conditioning to Assess Cerebellar Motor Learning. *Neurochem Res*, *in press* DOI: 10.1007/s11064-010-0392-z
- 3) Matsuda K, Yuzaki M. Cbln family proteins promote synapse formation by regulating distinct neurexin signaling pathways in various brain regions. *Eur J Neurosci*, *in press*. DOI: 10.1111/j.1460-9568.2011.07638.x
- 4) Miyazaki T, Yamasaki M, Takeuchi T, Sakimura K, Mishina M, Watanabe M.: Ablation of glutamate receptor GluRd2 in adult Purkinje cells causes multiple innervation of climbing fibers by inducing aberrant invasion to parallel fiber innervation territory. *J. Neurosci.*, 30:15196-15209, 2010
- 5) Yamasaki M, Miyazaki T, Azechi H, Abe M, Natsume R, Hagiwara T, Aiba A, Mishina M, Sakimura K, Watanabe M.: Glutamate receptor GluRd2 is essential for input pathway-dependent regulation of synaptic AMPAR contents in cerebellar Purkinje cells. *J. Neurosci.*, 31:3362-3374, 2011
- 6) Yazaki M, Fukaya M, Hashimoto K, Yamasaki M, Tsujita M, Itakura M, Abe M, Natsume R, Takahashi M, Kano M, Sakimura K, Watanabe M. : TARPs γ -2 and γ -7 are essential for AMPA receptor expression in the cerebellum. *Eur J Neurosci*. 31(12):2204-20. 2010 doi:10.1111/j.1460-9568.2010.07254.x
- 7) 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 δ 2, a bidirectional synapse organizer. *Science*, 328(5976):363-8, 2010. DOI: 10.1126/science.1185152
- 8) Katsumata, K., Nishiyama, J., Inoue, T., Mizushima, N., Takeda, J., Yuzaki, M. Dynein- and activity-dependent retrograde transport of autophagosomes in neuronal axons. *Autophagy* 20;6(3) :378 - 385, 2010 DOI: 10.4161/auto.6.3.11262
- 9) 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*, 31(9):1606-1615, 2010. DOI:10.1111/j.1460-9568.2010.07202.x