

高井 義美

神戸大学大学院医学研究科・教授

## 海馬神経回路形成における細胞接着分子と関連分子の機能と作用機構

### §1. 研究実施の概要

海馬は記憶と学習に関連する重要な脳構造である。これまでに私どもは細胞間接着分子として見出したネクチンとその結合タンパク質アフアディンが、海馬において苔状線維の走行、CA3 野錐体細胞の樹状突起とのシナプス形成、およびシナプスの可塑性に関与するという知見を蓄積してきた。本研究では、海馬における神経回路の形成と機能発現における重要かつ未解決な課題のうち、(1) 神経回路形成における標的細胞認識機構、(2) シナプスの形態形成と機能制御、(3) シナプス可塑性におけるネクチンとアフアディンおよびその関連分子の機能と作用機構、を解明することを目指している。本年度は、今後の研究で中心となる海馬標本のスライス培養を用いた実験系の構築、苔状線維－錐体細胞間のシナプスに関する形態学的検討、および神経回路形成の解析のためのイメージングに必要な遺伝子改変マウスの作製を行った。

### § 2. 研究実施体制

#### (1) 高井グループ

- ① 研究分担グループ長: 高井 義美 (神戸大学大学院医学研究科、教授)
- ② 研究項目: 神経回路の形成と機能発現におけるネクチン、アフアディンおよびその関連分子による神経細胞の標的細胞認識機構や、シナプスの形態形成と機能制御、およびシナプス可塑性について、細胞生物学や電気生理学的手法およびライブイメージング技術などを用いて研究を行う。

#### (2) 三好グループ

- ① 研究分担グループ長: 三好 淳 (大阪府立成人病センター研究所、部門長)
- ② 研究項目: 海馬における神経回路の形成と機能発現の分子機構を細胞間接着分子とその関連分子の面から個体レベルで明らかにするのに必須となるノックアウトマウスの作製と維持・管理を行う。

#### (3) 溝口グループ

- ① 研究分担グループ長:溝口 明(三重大学大学院医学研究科、教授)
- ② 研究項目:共焦点顕微鏡と免疫電子顕微鏡を用いて、海馬における神経回路の形成と機能分子の発現を形態学的な観点から解析する。

### §3. 研究実施内容

平成22年度は、海馬神経回路形成における標的細胞認識の機構について、ネクチンとアフアディンに特に着目して研究を行った。具体的には、海馬スライス培養実験系によるライブイメージングと電気生理学実験を組み合わせた適切な実験系の検討、苔状線維-錐体細胞間のシナプス形成に関する形態学的知見の集積、ネクチン・アフアディン系欠失による苔状線維終末形態への影響の評価、およびイメージングに必要な遺伝子改変マウスの作製を実施した。

これまでにネクチンとアフアディンは、軸索と樹状突起を認識し、神経突起間の適切な相互作用を保ちながら軸索の伸長と誘導を調節する役割を有することが示唆されている。本年度はこれまでの知見に基づいて、以下の実験を行った。(1) 海馬スライス培養実験系によるライブイメージング実験系の検討:ネクチンとアフアディンのノックアウトマウスでは、海馬において歯状回から CA3 野錐体細胞に投射する苔状線維が、本来の投射領域である CA3 野透明層を越え、錐体細胞層にまで到達して、異所性シナプスを形成する。そこで、苔状線維と CA3 野錐体細胞間の相互作用においてネクチンとアフアディンがどのようにして標的認識に関わるのかを明らかにするため、苔状線維の伸長過程のライブイメージング実験を計画している。本年度は、海馬のスライス培養法の検討、電気生理学的手法を組み合わせるための観察方法の検討を行った。このような検討を通じ、苔状線維の標的認識におけるネクチンやアフアディンの機能が発生過程のどの段階でどのように必要であるかを明らかにしていく。

(2) ノックアウトマウスの海馬スライス培養を用いた苔状線維-錐体細胞間のシナプスの形態の解析:海馬 CA3 野では苔状線維が錐体細胞に対して巨大シナプス(直径 4-10  $\mu\text{m}$ )を形成する。ネクチンとアフアディンのノックアウトマウスの海馬では、苔状線維の走行に異常が見られ、本来の標的以外に異所性シナプスを形成している。また、ネクチンノックアウトマウス由来の培養海馬神経細胞では樹状突起スパインの形態がフィロポディア状に変化し、正常なシナプス形成が生じないことが明らかになっている。そこで、野生型とネクチンあるいはアフアディンノックアウトマウスから作製した海馬スライス培養標本を用いて、歯状回にある顆粒細胞にビオシチンを導入し免疫染色を行うことで神経細胞の形態の比較を行った。その結果、ネクチンあるいはアフアディンのノックアウトマウスの苔状線維終末は、野生型に比べて小さく、本来ならば苔状線維上に形成される終末部が、苔状線維の側枝上に多く形成されることが明らかになった。今後は、終末部の免疫染色、三次元電子顕微鏡解析を通じてネクチンとアフアディンのノックアウトマウスで見られた苔状線維終末の形態異常を詳細に解析し、異所性シナプスやシナプス微細構造の変化を明らかにする予定である。(3) 苔状線維特異的 EGFP 発現遺伝子改変マウスの作製:海馬スライス培養を用いた軸索伸長とシナプス形成のライブイメージングの際に、神経投射の観察を容易にする目的で、苔状線維だけが EGFP を

発現する遺伝子改変マウスの作製を行っている。これらのマウスが作製されれば、ライブイメージングが格段に容易になることが期待される。

#### §4. 成果発表等

##### (4-1) 原著論文発表

###### ●論文詳細情報

- 1) Kurooka, T., Yamamoto, Y., Takai, Y., and Sakisaka, T.: Dual regulation of RA-Rho-GAP activity by phosphatidic acid and Rap1 during neurite outgrowth. *J. Biol. Chem.* 286(8): 6832-6843 (2011). doi: 10.1074/jbc.M110.183772
- 2) Narita, H., Nakagawa, A., Yamamoto, Y., Sakisaka, T., Takai, Y., and Suzuki, M.: Refolding, crystallization and preliminary X-ray crystallographic study of the whole extracellular regions of nectins. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun.* 67(3):344-348 (2011). doi:10.1107/S174430911100337X
- 3) Narita, H., Yamamoto, Y., Suzuki, M., Miyazaki, N., Yoshida, A., Kawai, K., Iwasaki, K., Nakagawa, A., Takai, Y., and Sakisaka, T.: Crystal structure of the cis-Dimer of nectin-1: implications for the architecture of cell-cell junctions. *J. Biol. Chem.* 286(14): (2011). doi: 10.1074/jbc.M110.197368