

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. 研究実施体制

### (1) 柚崎グループ

- ① 研究代表者: 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 主たる共同研究者: 渡辺 雅彦 (北海道大学大学院医学研究科、教授)
- ② 研究項目
  - ・Cbln 群各分子および C1ql 群各分子の特異抗体開発
  - ・GluD1 抗体作成とその発現分布解析

### (3) 崎村グループ

- ① 主たる共同研究者: 崎村 建司 (新潟大学脳研究所、教授)
- ② 研究項目
  - ・Cbln 分子群及び C1ql 分子群のコンディショナルノックアウトマウスの作成
  - ・Cbln 分子群及び C1ql 分子群に相互作用する分子群のノックアウトマウスの作成
  - ・新規 Cre ドライバーマウスの開発

## § 2. 研究実施内容

### 2-1. 柚崎グループ

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発見した(Hirai, et al, Nat Neurosci 2005)。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(Yuzaki, Cell Mol Life Sci 2008)。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。

前年度までに、小脳平行線維—プルキンエ細胞シナプスにおいて、Cbln1 はシナプス後部の受容体であるデルタ 2 グルタミン酸受容体 (GluD2) とシナプス前部の受容体である Neurexin (Nrxn) に結合し、Nrxn-Cbln1-GluD2 三者複合体を形成すること、この三者複合体がシナプス前部とシナプス後部に働きかけることにより、平行線維—プルキンエ細胞が形成され、そして維持されることを明らかにした(Matsuda et al, Science 2010; Matsuda & Yuzaki, Eur J Neurosci, 2011)。

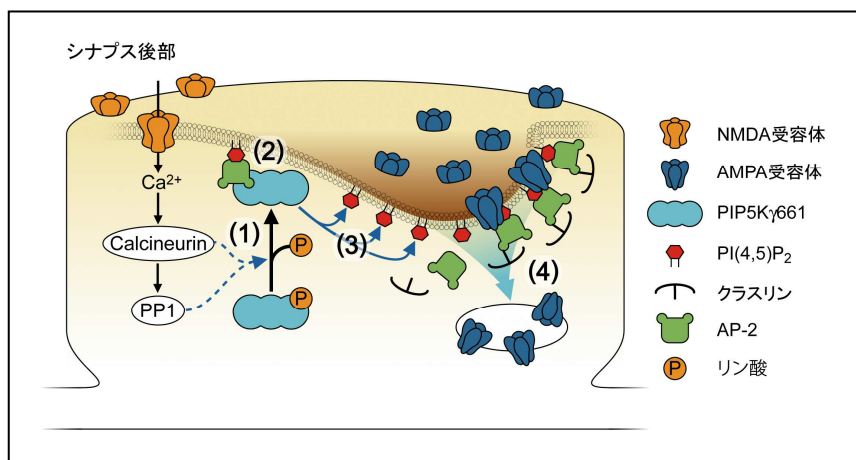
Nrxn-Cbln1-GluD2 三者複合体は発達期におけるシナプス形成能のみでなく、発達後においても平行線維—プルキンエ細胞シナプスにおけるシナプス可塑性現象を制御する。平行線維の活動と同期して登上線維が発火する状況が続くと、平行線維—プルキンエ細胞シナプスにおけるシナプス伝達が長期的に低下する「長期抑圧 (LTD)」現象が起きることが知られている。LTD は個体レベルにおける運動学習の実体の一つであると考えられている。興味深いことに、Cbln1 や GluD2 を欠損するマウスにおいては、一見正常に見える残存シナプスにおいて LTD が誘導できない。LTD の分子的な実体は、小脳・海馬・大脳皮質を問わず、シナプス後部の AMPA 受容体のクラスリン依存性エンドサイトーシスであることが分かっている。すなわち Cbln1-GluD2 によるシナプス後部のシグナリングの一つは、神経活動依存的な AMPA 受容体のエンドサイトーシスを誘起する方向に収束することが示唆される。そこで、Cbln1-GluD2 シグナリングの実体を明らかにするために、平成 23 年度には神経活動依存性 AMPA 受容体エンドサイトーシス制御機構についての検討を進めた。

クラスリン依存性エンドサイトーシスは多くの分子が関与する細胞現象であるが、その初期過程において細胞膜の微量構成リン脂質 PI(4,5)P2 (phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate) がアダプタータンパク質 AP-2 (adaptor protein complex-2) などのエンドサイトーシス分子を細胞膜へと集積させることがクラスリン被覆小胞の形成に重要と考えられている。哺乳動物において

PI(4,5)P<sub>2</sub> を産生する主要な代謝酵素は PIP5K (phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase) であり、とりわけ脳においては PIP5K アイソザイムの一種である PIP5K $\gamma$ 661 が PI(4,5)P<sub>2</sub> の産生に必須であることが知られる。そこで、まず海馬 CA1 領域において低頻度刺激によって引き起こされる NMDA 受容体依存的 LTD における PIP5K $\gamma$ 661 活性化機構を検討した。その結果、(1)NMDA 受容体を介したカルシウムイオン流入により活性化された Calcineurin が PIP5K $\gamma$ 661 を脱リン酸化し、(2)脱リン酸化型 PIP5K $\gamma$ 661 がシナプス後部においてアダプタータンパク質 AP-2 と結合する。(3)AP-2 の結合により PIP5K $\gamma$ 661 酵素活性が上昇し、局所的な PI(4,5)P<sub>2</sub> 産生をもたらし、(4)PI(4,5)P<sub>2</sub> は AP-2 などのエンドサイトーシス分子を局所的に集積させることにより、クラスリン依存性エンドサイトーシスによる AMPA 受容体の取り込みを亢進させる。

その結果、シナプス後膜の AMPA 受容体の数が減少して LTD が引き起こされる(図)という新しいモデルを提唱することができた<sup>1)</sup>。

一方、小脳平行線維—プルキンエ細胞シナプスにおける LTD は、海馬 LTD とは正反対



の性質を持つことが示唆されてきた。例えば小脳 LTD は海馬 LTD とは異なり、Calcineurin には非依存的で、Calcineurin 遺伝子ノックアウトマウスでも障害されないと報告された。小脳 LTD の特異性を GluD2 や Cbln1 が規定している可能性もあるため、まず小脳 LTD における Calcineurin の必要性について再検討した。その結果、小脳 LTD においても Calcineurin の活性化は必須であることが分かった<sup>2)</sup>。興味深いことに、小脳 LTD における PIP5K $\gamma$ 661 の活性化機構には、上述の NMDA 受容体—Calcineurin 経路は使われていないことが示唆されている。Calcineurin は AMPA 受容体の副サブユニットである stargazin を脱リン酸化こそが AMPA 受容体のエンドサイトーシスに必須であることが判明した<sup>2)</sup>。現在さらに、GluD2 や Cbln1 によるシグナリングがどのように AMPA 受容体のエンドサイトーシスを制御するかについて検討を進めている。

## 2-2. 渡辺グループ

平成 23 年度も引き続き、本研究課題の中心的な分子である Cbln ファミリー (Cbln1-4)、C1ql ファミリー (C1ql1-4)、GluD ファミリー (GluD1,2) に対する抗体作成を行った。昨年度までに Cbln2 を除いた Cbln ファミリー抗体作成に成功しており、23 年度は Cbln2 抗体作成に挑戦したが、特異抗体は得られなかった。C1q ファミリー (C1ql1-4) に対しても、残念ながら特異抗体は得られなかった。一方 GluD ファミリーについては、本年度の成果報告会でもポスター発表したように、

選択的な GluD1 抗体作成に成功し、その分子検出法も含め大きな進展があった。

この GluD1 特異抗体を用いて、この分子が通常の灌流固定の脳切片では検出が困難であることが判明し、その検出法を検討した。その結果、光学顕微鏡レベルの検出には、新鮮凍結切片が特異的な GluD1 シグナル検出に威力を発揮することが判明し、この分子の脳における分布と存在様式が明らかになった。GluD1 は、小脳も含め成体の脳において広範な分布を示し、特に海馬、扁桃核、分界条床核、線条体などの辺縁系に豊富な発現を示す。この分子は特定のニューロン種の樹状突起や細胞体に発現し、シナプス膜およびシナプス外膜に局在していた。現在、海馬を中心に GluD1 の発現局在に関する論文を執筆中である。この進展により、GluD1 が小脳外における Cbln ファミリーの受容体としてどのような機能制御に関わっていくかを検証するための準備段階が整った。

### 2-3. 崎村グループ

本研究の目的は、Cbln 分子群と C1ql 分子群を介するシナプス形成・維持機構を、分子—回路—個体レベルにおいて統合的に解明することであるが、我々はこの目的遂行のために、Cbln 分子群、C1ql 分子群、さらにこれらの分子群と相互作用を有する分子群を標的とした conditional KO マウス等を作成する。具体的に作成するマウスとして、当初 Cbln1-4 の 4 種類の floxed マウス及び C1ql1-EGFP ノックインマウスを計画した。また、特定の細胞で Cre を発現するマウスなどのドライバーマウスの樹立を進めてきた。さらに、研究の進捗にしたがい C1ql3-floxed マウス、さらに C1ql 分子群の機能に関連すると考えられる新規遺伝子の改変マウスの作出などを計画してきた。

これまでに4種類の Cbln1-4 floxed マウスを樹立して、特定の細胞で Cre を発現するマウスと交配させ、解析対象動物を作出し解析に供してきた。また、特定の神経細胞で Cbln1-4 を欠損する conditional KO を作出するために、細胞特異的に Cre を発現するマウスの樹立を進めてきた。さらに C1ql 群分子のうち、C1ql1-EGFP ノックインマウスの樹立に成功した。C1ql3 遺伝子 floxed マウスについてもマウスを樹立し、現在ネオマイシン耐性カセットを除去した floxed マウスの作出を進めており、今後特定の細胞で Cre を発現するドライバーマウスと交配させる。また、GluD1 floxed マウスの作製も進めている。

C1ql 群分子と相互作用する可能性が示唆されている分子群のノックアウトマウスの作製を現在進めている。すでにこのファミリーに属する分子の幾つかについては、floxed 型遺伝子を持つキメラが誕生しており、今後 null 型ノックアウトマウスを作出し解析に供する他、neo カセットを除去し conditional KO を作出する準備をおこなう。

特定の神経細胞で conditional KO を作出するために、特定神経細胞特異的 Cre 発現マウスの樹立を進めてきた。具体的にはプルキンエ細胞に選択性高く発現する新たな Cre マウスを作出したので、今後その評価をおこなう。また、小脳顆粒細胞選択的に Cre を発現するマウスの組換え特異性の評価を進めており、今後研究に利用する。さらに、遺伝子改変マウスから効率よくネオマイシン耐性遺伝子カセットを除くための Flp 発現マウス ActB-Flp と、発生初期に高効率で floxed 領域を組換えるドライバーマウス ActB-Cre を新規に樹立して実験に供している。

### §3. 成果発表等

#### (3-1) 原著論文発表

- 論文詳細情報

- 1 Unoki T, Matsuda S, Kakegawa W, Van NT, Kohda K, Suzuki A, Funakoshi Y, Hasegawa H, Yuzaki M, Kanaho K. NMDA receptor-mediated PIP5K activation to produce PI(4,5) P<sub>2</sub> is essential for AMPA receptor endocytosis during LTD. *Neuron*. 73:135-148, 2012. (DOI: 10.1016/j.neuron.2011.09.034)
- 2 Nomura T, Kakegawa W, Matsuda S, Kohda K, Nishiyama J, Takahashi T, Yuzaki M. Cerebellar long-term depression requires dephosphorylation of TARP in Purkinje cells. *Eur. J. Neurosci.* 35:402-410, 2012. (DOI: 10.1111/j.1460-9568.2011.07963.x)
- 3 Yamasaki M, Miyazaki T, Azechi H, Abe M, Natsume R, Hagiwara T, Aiba A, Mishina M, Sakimura K, Watanabe M. Glutamate receptor  $\delta 2$  is essential for input pathway-dependent regulation of synaptic AMPAR contents in cerebellar Purkinje cells. *J. Neurosci.*, 31:3362-3374, 2011. (DOI:10.1523/jneurosci.5601-10.2011)
- 4 Miyazaki T, Yamasaki M, Uchigashima M, Matsushima A, Watanabe M. Cellular expression and subcellular localization of secretogranin II in the mouse hippocampus and cerebellum. *Eur. J. Neurosci.* 33:82-94, 2011. (DOI:10.1111/j.1460-9568.2010.07472.x)
- 5 Yoshida T, Uchigashima M, Yamasaki M, Katona I, Yamazaki M, Sakimura M, Kano M, Yoshioka M, Watanabe M. Unique inhibitory synapse with particularly rich endocannabinoid signaling machinery on pyramidal neurons in basal amygdaloid nucleus. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 108:3059-3064, 2011. (DOI:10.1073/pnas.1012875.108)
- 6 Uchigashima M, Yamazaki M, Yamasaki M, Tanimura A, Sakimura K, Kano M, Watanabe M. Molecular and morphological configuration for 2-arachidonoylglycerol-mediated retrograde signaling at mossy cell-granule cell synapses in the dentate gyrus. *J. Neurosci.*, 31:7700-7714, 2011. (DOI:10.1523/jneurosci.5565-10.2011)
- 7 Hashimoto K, Tsujita M, Miyazaki T, Kitamura K, Yamazaki M, Shin HS, Watanabe M, Sakimura K, Kano M. Postsynaptic P/Q-type Ca<sup>2+</sup> channels in Purkinje cell mediate synaptic competition and elimination in developing cerebellum. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 108:9987-9992, 2011. (DOI:10.1073/pnas.1101488108)

- 8 Ichikawa R, Yamasaki M, Miyazaki T, Konno K, Hashimoto K, Tatsumi H, Inoue Y, Kano M, Watanabe M. Developmental switching of perisomatic innervation from climbing fibers to basket cell fibers in cerebellar Purkinje cells. *J. Neurosci.* 31:16916-16927, 2011. (DOI:10.1523/jneurosci.2396-11.2011)
- 9 Hashimoto Y, Ohno-Shosaku T, Yamazaki M, Sakimura K, Kano M. Neuronal protease-activated receptor 1 drives synaptic retrograde signaling mediated by the endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol. *J. Neurosci.* 31:3104-9, 2011. (doi 10.1523/jneurosci.6000-10.2011)
- 10 Wu S, Esumi S, Watanabe K, Chen J, Nakamura KC, Nakamura K, Kometani K, Minato N, Yanagawa Y, Akashi K, Sakimura K, Kaneko T, Tamamaki N. Tangential migration and proliferation of intermediate progenitors of GABAergic neurons in the mouse telencephalon. *Development.* 138:2499-509, 2011. (doi 10.1242/dev.063032)
- 11 Gray JA, Shi Y, Usui H, Durrant DJ, Sakimura K, Nicoll RA. Distinct modes of AMPA receptor suppression at developing synapses by GluN2a and GluN2b: single-cell NMDA receptor subunit deletion in vivo. *Neuron.* 71:1085-101, 2011. (doi 10.1016/j.neuron.2011.08.007)
- 12 Miyazaki T, Yamasaki M, Hashimoto K, Yamazaki M, Abe M, Usui H, Kano M, Sakimura K, Watanabe M. Cav2.1 in cerebellar Purkinje cells regulates competitive excitatory synaptic wiring, cell survival, and cerebellar biochemical compartmentalization. *J. Neurosci.* 32:1311-1328, 2012. (doi 10.1523/jneurosci.2755-11.2012)
- 13 Kakegawa W, Miyoshi Y, Hamase K, Matsuda S, Matsuda K, Kohda K, Emi K, Motohashi J, Konno R, Zaitsev K, Yuzaki M. D-Serine regulates cerebellar LTD and motor coordination through the  $\delta 2$  glutamate receptor. *Nat Neurosci.* 14:603-611, 2011. (DOI:10.1038/nn.2791)
- 14 Emi K, Kohda K, Kakegawa W, Narumi S, Yuzaki M. A new rapid protocol for eyeblink conditioning to assess cerebellar motor learning. *Neurochem Res.* 36:1314-1322, 2011. (DOI: 10.1007/s11064-010-0392-z)
- 15 Matsuda K, Yuzaki M. Cbln family proteins promote synapse formation by regulating distinct neurexin signaling pathways in various brain regions. *Eur. J. Neurosci.*, 33:1447-1461, 2011. (DOI: 10.1111/j.1460-9568.2011.07638.x)

### (3-2) 知財出願

- ① 平成 23 年度特許出願件数(国内 0 件)
- ② CREST 研究期間累積件数(国内 0 件)