

「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

H24 年度 実績報告

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

- ・Cbln1 による小脳シナプス前部形成機構の解明
- ・GluD2 を介したシグナル伝達機構の解明
- ・小脳における Cbln1 分泌機構の解明
- ・GluD1 を介したシグナル伝達機構の解明
- ・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/C1qL 分子群の特異抗体開発
- ・Cbln/C1qL 分子群と免疫組織化学による分子発現解析
- ・Cbln の受容体候補分子 GluD1 のシナプス発現解析
- ・Cbln と GluD1 の相互作用に関する分子形態学的解析

(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
- ・グルタミン酸受容体サブユニットの定量的解析

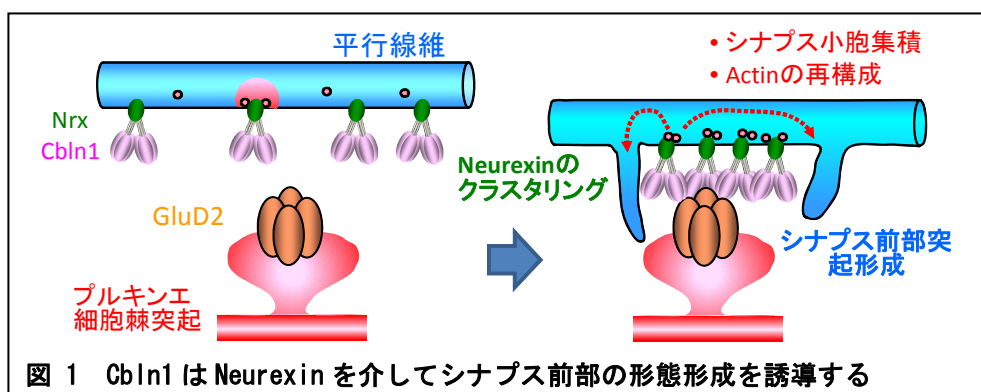
§2. 研究実施内容

2-1. 柚崎グループ

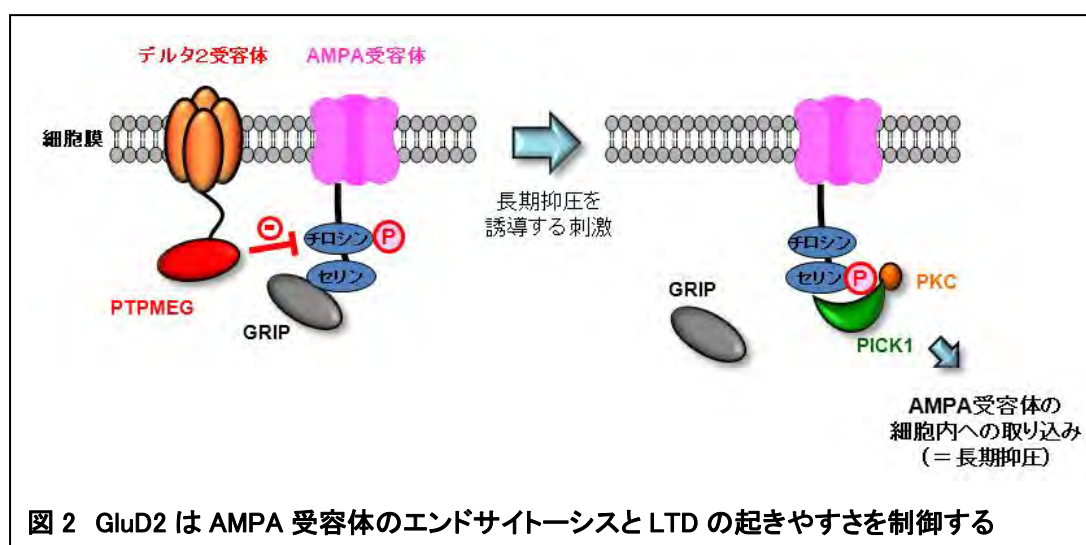
成熟後の脳におけるシナプスの維持・形成過程の分子的基盤については未だに解明されていない点が多い。本研究グループは、小脳顆粒細胞より分泌される Cbln1 が、成熟後においても強力なシナプス形成・維持作用をもつことを発見した(Hirai, et al, Nat Neurosci 2005)。さらに Cbln1 が属する C1q ファミリーの類縁分子(Cbln1-Cbln4, C1qL1-C1qL4)が海馬や小脳のさまざまなシナプスに特徴的なパターンで発現することが分かってきた(Yuzaki, Cell Mol Life Sci 2008)。これまでシナプス形成・維持機構は海馬や大脳皮質をモデルと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 三者複合体を形成し、平行線維-プルキンエ細胞シナプスが形成・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)。

一般に、興奮性シナプスでは、シナプス前部(軸索終末ボタン)が棘突起上に存在するシナプス後部に結合する。しかしどのようにシナプス前部と後部が協調してシナプスが形成されるのかについてはよく分かっていない。これまでに平行線維-プルキンエ細胞シナプスにおいてはシナプス前部が無くとも棘突起が形成されることが分かっていたが、どのようにシナプス前部形成が誘導されるのかは謎であった。今回、ライブイメージングと電子顕微鏡解析の結果、平行線維表面に散在している Cbln1 が、プルキンエ細胞の棘突起上(シナプス後部)の GluD2 と接触することによってクラスタ化することが引き金となることが判明した。引き続いて、Neurexin のクラスタ化と Neurexin の C 末端に結合する Actin 再構成分子の活性化を介して平行線維から突起伸展が誘導された(図 1)。これはシナプス形態形成過程を初めて分子レベルで解明した研究である¹⁾。



Nrxn-Cbln1-GluD2 三者複合体は発達期におけるシナプス形成のみでなく、発達後においてもシナプス可塑性を制御する。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) が起きる。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。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も LTD が誘導できない。LTD の分子的な実体は、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から、Cbln1-GluD2 によるシナプス後部のシグナリングによって、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されることが分かる。これまでに、GluD2 は細胞内の C 末端部分に複数のタンパク質と結合することにより LTD を制御することが示唆されていたが、そのシグナリングの実体については謎であった。LTD が誘導されるためには、AMPA 受容体 GluA2 サブユニットの細胞内部分にあるセリン残基 (S880) がリン酸化され、シナプス繫留分子から外れることが必須である。今回、GluD2 の C 末端部分はチロシン脱リン酸化酵素 PTPMEG と結合することによって、GluA2 の S880 の 4 つ前のチロシン残基 (Y876) を脱リン酸化し、そのことによって S880 のリン酸化と LTD の起きやすさを制御することを初めて明らかにした²⁾。逆に、GluD2 欠損マウスや Cbln1 欠損マウスにおいても、Y876 を脱リン酸化すると、LTD が誘導できることも分かった。このことは、Cbln1-GluD2 シグナリングは、PTPMEG 活性を介して LTD の起きやすさを制御する「マスター鍵」として機能していることを示唆する (図 2)。



2-2. 渡辺グループ

平成 23 年度までの研究活動により、Cbln1,3,4 および C1qL2 に対する特異抗体の作成に成功している。24 年度は Cbln2, C1qL1,3,4 に対して、それぞれ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と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た。しかし、これらの分子に対する特異抗体は未だに得られていない。次年度は、分泌された 6 量体の精製 Cbln2 を抗原としてモノクローナル抗体に挑戦することを計画している。

Cbln1,3,4 に対する特異抗体を用いて、転写レベルで豊富な発現を示す海馬における分子局在を検討した。Cbln1,4 は海馬の貫通線維投射領域(歯状回分子層の中間層およびアンモン角の網状分子層)に集積していた。この発現分布は GluD1 の高発現領域と一致し、両者の点状反応は近接して向かい合っていた。さらに、一方の分子欠損により他方も消失することから、Cbln1,4 と GluD1 が海馬において相互作用していることが強く示唆された。

一方、昨年作成に成功した GluD1 特異抗体を用いて、GluD1 の脳内発現分布とシナプス局在を小脳において検討した。その結果、GluD1 は小脳分子層の介在ニューロンに発現し、平行線維シナプスに局在していた。興味深いことに、平行線維シナプスは介在ニューロンの細胞体と樹状突起に形成されるが、GluD1 は細胞体シナプスに選択的であった。今後、この細胞体シナプスにおける GluD1 の結合パートナーが Cbln1,4 であるのかどうか、シナプス結合の形成や維持に関与しているのか、などを検討する必要がある。

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。

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 ノックインマウスと floxed マウスの樹立に成功した。C1qL3 遺伝子 floxed マウスに関してもマウスを樹立し、Cre ドライバーマウスと交配させて解析に供する。また、GluD1 及び GluD2 floxed マウスの樹立に成功した。

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成を現在進めている。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 型遺伝子を持つマウスの樹立に成功した。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。Conditional KO を作出するために、プルキンエ細胞、バグマングリア、小脳顆粒細胞等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研究に利用する。さらに、カイニン酸受容体ノックアウトマウス等新たに研究に必要なマウスを供与している。また、グルタミン酸受容体各サブユニットの定量をおこない、NMDA 型受容体サブユニットを除きほぼ定量を終わった。

§3. 成果発表等

(3-1) 原著論文発表

● 論文詳細情報

1. Ito-Ishida A, Miyazaki T, Miura E, Matsuda K, Watanabe M, Yuzaki M, Okabe S (2012) Presynaptically released Cbln1 induces dynamic axonal structural changes by interacting with GluD2 during cerebellar synapse formation. *Neuron*. 76:549-64. (DOI:10.1016/j.neuron.2012.07.027)
2. Kohda K, Kakegawa W, Matsuda S, Yamamoto T, Hirano H, Yuzaki M (2013) The $\delta 2$ glutamate receptor gates long-term depression by coordinating interactions between two AMPA receptor phosphorylation sites. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 110:E948-57. (DOI:10.1073/pnas.1218380110)
3. Yuzaki M (2012) Cerebellar LTD vs. motor learning-Lessons learned from studying GluD2. *Neural Netw.* (DOI:10.1016/j.neunet.2012.07.001).
4. Nishiyama J, Hayashi Y, Nomura T, Miura E, Kakegawa W, Yuzaki M (2012) Selective and regulated gene expression in murine Purkinje cells by in utero electroporation. *Eur J Neurosci*. 36:2867-76. (DOI:10.1111/j.1460-9568.2012.08203.x)
5. Takeuchi E, Sato Y, Miura E, Yamaura H, Yuzaki M, Yanagihara D (2012) Characteristics of gait ataxia in $\delta 2$ glutamate receptor mutant mice, ho15J. *PLoS One*. 7:e47553. (DOI: 10.1371/journal.pone.0047553)