

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. 研究実施体制

### (1) 高井グループ

① 研究代表者: 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の機構について、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 主たる共同研究者: 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ために必要となるノックアウトマウスの作成と維持・管理を行う。

### (3) 溝口グループ

① 主たる共同研究者: 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。

## § 2. 研究実施内容

### 研究のねらい

学習と記憶に関わる脳の部位である海馬の CA3 野は連合学習を担う回路を形成する。CA3 野では、歯状回の顆粒細胞から伸長した苔状線維が、錐体細胞との間に巨大な苔状線維シナプスを形成する。同時に、この巨大終末から伸びたフィロポディアや苔状線維膨大部が抑制性介在神経細胞とシナプスを形成し、錐体細胞に対してフィードフォワード抑制のシグナルを伝達する (図 1A)。歯状回-CA3 野では 3 種類の神経細胞がこのようなシナプスを介して局所的な神経回路を形成し、興奮性と抑制性の回路出力を制御している。苔状線維終末は、伝達物質の放出部位を数多く有し、錐体細胞の樹状突起スパインを包みこむような特徴的な構造を持っている (図 1B)。しかし、苔状線維終末が興奮性と抑制性の細胞との間に特徴的な形態のシナプスを形成し、CA3 野における局所的な神経回路を形成する機構や、学習と記憶に伴ってシナプスの形態が変化し回路出力を調節する可塑性の機構の詳細は不明である。一方、上皮細胞の細胞間の接着装置として研究代表者らによって見出されたネクチンとアフアディンは、カドヘリン依存性の細胞間接着の形成に不可欠な機能を果している<sup>1)</sup>。苔状線維終末の巨大シナプスにおいては、ネクチンとアフアディンは、上皮細胞の細胞間接着装置と類似の構造を持つ Puncta adherentia junction にカドヘリンとともに存在し、シナプスの形成と維持に機能していることが明らかになりつつある。また、内耳においては、ネクチン-1と-3は聴覚上皮の感覚細胞と支持細胞による市松模様様のパターン形成を促進する<sup>2)</sup>。病態においては、ネクチン-1の遺伝子変異が、精神発達遅滞を伴う遺伝性外胚葉異形成症候群の原因の一つであることや、ネクチン-2と晩発性アルツハイマー病<sup>3)</sup>の発症との遺伝学的関連性が報告されている。そこで本研究では、歯状回-CA3 野における神経回路の形成と機能発現における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、(2)シナプスの形態形成と機能制御、(3)シナプス可塑性の3つの項目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的とする。

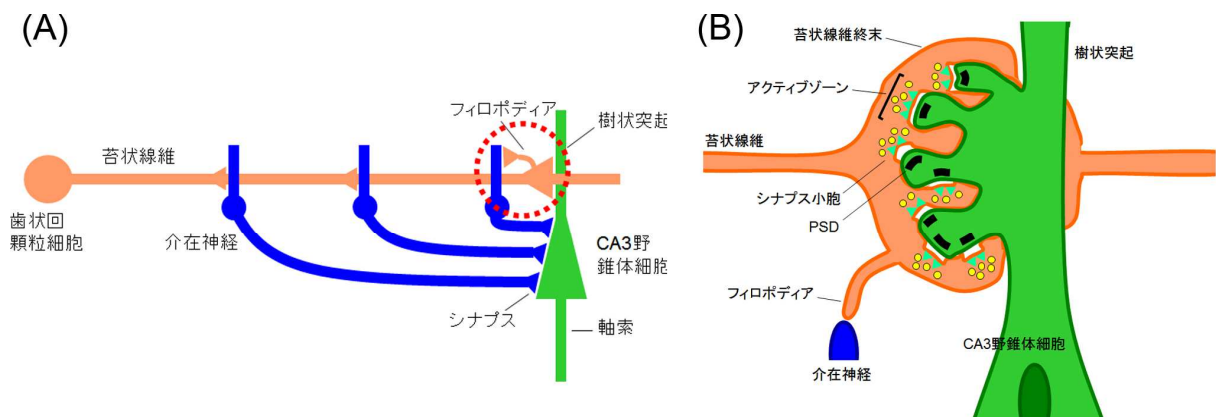


図1 海馬歯状回-CA3における局所神経回路(A)と苔状線維終末部(B)

### 研究内容

シナプスは細胞間接着の特殊な型であり、そこにはシナプス伝達に関わる分子以外に多くの細

胞接着分子やその裏打ちタンパク質が濃縮している。また、シナプスは神経活動依存性に形態と機能を変化させることが知られている。研究代表者らはシナプ스에濃縮する細胞接着関連分子がこのようなシナプスの機能を制御すると仮定し、細胞接着分子ネクチン、それを裏打ちするアフアディンに着目した。アフアディンをシナプス形成期より前に脳特異的にノックアウトするコンディショナルノックアウトマウス (*Afadin<sup>flox/flox</sup>;nestin-Cre*) では、CA3 野の苔状線維終末において、ネクチン-1と-3、N-カドヘリンおよび  $\beta$ -カテニンの集積が著しく低下していた。同部位における、アクティブゾーン構成因子 Bassoon とシナプス後肥厚構成因子 PSD-95 の集積についてもほぼ同様に低下していた。アフアディンの発現が欠損した初代培養の海馬神経細胞では、樹状突起のスパインはフィロポディア様の形態を呈し、上記シナプス関連タンパク質の集積が低下していた。苔状線維シナプスでは、ネクチン-1と-3はそれぞれシナプス前膜と後膜に存在する。そこで、ネクチン-3または-1を発現する線維芽細胞と海馬神経細胞を共培養したところ、アフアディン依存性にシナプス顆粒構成因子 VGLUT1 陽性の人工シナプス、PSD-95 陽性の人工シナプスをそれぞれの線維芽細胞が誘導した。以上の結果は、ネクチンがシナプス形成を誘導し、さらにアフアディンがシナプス形成において必須の機能を果していることを示唆する。このように、ネクチン、アフアディンは海馬神経細胞のシナプスの形態形成を制御していることが明らかになった。

#### 今後の見通し

今後は、ネクチンとアフアディンによる海馬神経細胞のシナプスの形態形成と機能の制御機構の全貌の解明を目指す。さらに、イメージング技術や電気生理学を駆使し、分子、細胞、組織および個体のレベルで、ネクチンとアフアディンが苔状線維シナプス伝達において果す機能と作用機構を解明する。とりわけ、海馬培養切片を用いてライブイメージングと電気生理学的計測を同時に行うことにより、苔状線維シナプスの形成やその可塑性の機構を明らかにする。具体的には以下の項目に研究の力点を置く。(1)マウスレポーターラインや蛍光物質の電極ポレーションを用いて、軸索と樹状突起それぞれの形態解析を行い、苔状線維終末の成長円錐の糸状仮足が標的細胞とシナプスを形成する過程におけるネクチンとアフアディンの果す機能を解析する。(2)ネクチンとアフアディンのノックアウトマウスの培養海馬切片標本において、電気刺激によるシナプス応答電流、あるいは微小シナプス電流を評価し、海馬苔状線維回路を構成するシナプスにおけるこれらの分子による制御機構を解析する。(3)培養海馬切片標本を用いて、二光子レーザー顕微鏡による苔状線維シナプスの微細形態の観察とシナプス応答記録を同時に行い、苔状線維シナプスの LTP の機構を解明し、そこでのネクチンとアフアディンの役割を明らかにする。本研究の成果は、海馬のみならず、脳の他の部位における神経回路の形成と機能発現の機構の理解にも役立つと期待される。さらに、神経回路形成や神経細胞間の情報伝達調節の機構が理解され、新たな脳機能の解明や疾患の発症機構の理解に繋がると考えられる。

### §3. 成果発表等

#### (3-1) 原著論文発表

- 論文詳細情報

1. Kurita S, Ogita H, Takai Y. Cooperative role of nectin-nectin and nectin-afadin interactions in formation of nectin-based cell-cell adhesion. *J Biol Chem.* 286: 36297-36303, 2011. (DOI:10.1074/jbc.M111.261768)
2. Togashi H, Kominami K, Waseda M, Komura H, Miyoshi J, Takeichi M, Takai Y. Nectins establish a checkerboard-like cellular pattern in the auditory epithelium. *Science.* 333:1144-1147, 2011. (DOI:10.1126/science.1208467)
3. Matsui C, Inoue E, Kakita A, Arita K, Deguchi-Tawarada M, Togawa A, Yamada A, Takai Y, Takahashi H. Involvement of the  $\gamma$ -secretase-mediated EphA4 signaling pathway in synaptic pathogenesis of Alzheimer's disease. *Brain Pathol.* in press. (DOI:10.1111/j.1750-3639.2012.00587.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)