

「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22年度採択研究代表者

H24 年度 実績報告
----------------

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。
- 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などの作成と維持・管理を行う。

### (2) 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系研究科、教授)

#### ② 研究項目

- 電子顕微鏡による海馬苔状線維終末の微細形態の解析
- 海馬における神経回路の形成とシナプス可塑性の機構の形態学的解析

## §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シナプス終末を形成する。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とそこでの極性形成に不可欠な機能を果している。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、ネクチンは内耳の聴覚上皮の感覚細胞と支持細胞間の接着に代表される異種細胞間の接着を促進する。さらに病態においては、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の発症との遺伝学的関連性が報告されている。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、I. 神経回路形成における標的細胞認識、II. シナプスの形態形成と機能制御、III. 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。

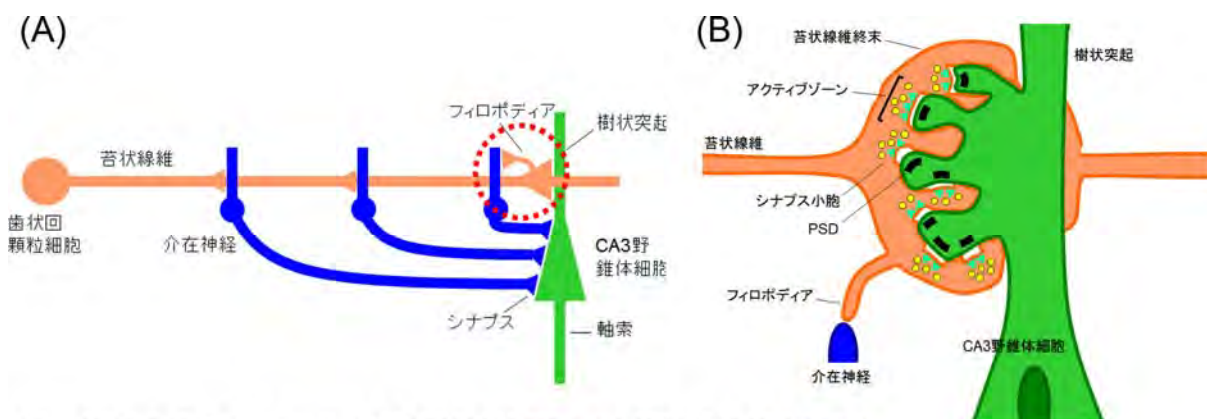


図1 海馬歯状回-CA3における局所神経回路(A)と苔状線維終末部(B)

### 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て研究を行い、平成24年度は以下の成果を得ている。Ⅰ. アフアディンはシナプスにおいて、ネクチン、カドヘリンなどの細胞接着関連分子やシナプス前膜・後膜に局在する分子の集積、ならびにシナプス前膜・後膜の電気生理学的機能を果たすために必要不可欠な分子であることを明らかにした。Ⅱ. 培養海馬切片標本の歯状回顆粒細胞をホールセルパッチクランプ記録して、蛍光色素とカルシウム感受性色素を導入し、二光子レーザー顕微鏡を用いた巨大苔状線維終末の形態のイメージングとカルシウムイメージングを同時に行う実験系を確立した。この実験系を用い、LTP誘導刺激によるシナプス前終末の微細形態変化とカルシウム応答の関連を解析することが可能となった。さらに、巨大苔状線維終末の形態変化を電気生理学的に誘発する実験条件をほぼ確立した。Ⅲ. 前年度からひき続いてネクチン-1と-3によるシナプス応答の制御を解析し、興奮性シナプス伝達には両者の有意な関与が認められなかったが、ネクチン-1はシナプス後性に抑制性シナプス伝達を抑制することを明らかにした。

以上の研究に付随して、下記の事実を見出した。Ⅳ. アフアディンは大脳皮質の層形成にも重要な機能を果していることを明らかにした。すなわち、アフアディンは神経前駆細胞の増殖・分化と産生された細胞の移動を制御している可能性が示唆される。さらに、Ⅴ. 高齢ネクチン-2欠損マウスが大脳皮質の菲薄化、内包が細くなるといった変化を野生型に比べ顕著に示すこと、Ⅵ. 培養海馬神経細胞において、アフアディンと結合する細胞接着関連分子ZO-1は樹状突起の形態形成とシナプスの形成を制御すること、Ⅶ. 嗅球においてネクチン-1は外網状層の樹状突起同士の接着部位に濃縮して、樹状突起の分岐と形態形成を制御することを見出した。

#### 今後の見通し

今後は、研究が先行している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解析と、LTPを誘発する電気刺激による苔状線維シナプス前終末の微細形態変化の解析を中心にすえつつ、神経回路形成における標的細胞認識機構の研究を進めたい。具体的には以下の項目に研究の力点を置く。Ⅰ. アフアディンによるシナプスの形成と機能の制御機構を分子レベルで明らかにする。Ⅱ. 苔状線維巨大シナプスの可塑性について、シナプス終末形態変化とシナプス伝達効率の変化との関係について明らかにし、シナプス終末でのカルシウム濃度変化、グルタミン受容体などの神経伝達物質受容体の関与について解析する。さらに、ここでのシナプス可塑性におけるネクチンとアフアディンの役割を明らかにする。Ⅲ. マウスレポーターラインや蛍光物質のエレクトロ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。

本研究の成果は、海馬のみならず、脳そ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. Matsui C, Inoue E, Kakita A, Arita K, Deguchi-Tawarada M, Togawa A, Yamada A, Takai Y, Takahashi, H (2012) Involvement of the  $\gamma$ -secretase-mediated EphA4 signaling pathway in synaptic pathogenesis of Alzheimer's disease. *Brain Pathology* 22:776-787. (DOI: 10.1111/j.1750-3639.2012.00587.x)

#### (3-2) 知財出願

- ① 平成 24 年度特許出願件数(国内 2 件)