

平成 30 年 5 月 21 日現在

機関番号：32612

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15183

研究課題名(和文) シナプス機能および記憶学習を制御する細胞接着型GPCRの新しい活動機構

研究課題名(英文) A novel role of adhesion-GPCR in synaptic functions and motor learning.

研究代表者

掛川 渉 (Kakegawa, Wataru)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・准教授

研究者番号：70383718

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：近年、記憶・学習を担う「シナプス」を制御する分子として、細胞接着型Gタンパク共役受容体(adhesion-GPCR; ADGR)が注目されている。ADGRは種々の機能ドメインを有する細胞外領域と、GPCRに共通な7回膜貫通部位およびGタンパクと結合する細胞内領域からなるユニークな分子であるが、シナプスでどのように働いているかは不明な点が多い。本研究では、ADGRメンバーのBAI3が、運動記憶を担う小脳のプルキンエ細胞に発現し、延髄下オリブ核登上線維(climbing fiber; CF)間で形成されるCFシナプスの形態・機能に重要であることを明らかにし、その活動様式を追究した。

研究成果の概要(英文)：Recently, adhesion-type G protein-coupled receptors (ADGRs) have been intensively studied as molecules which regulate synapse integrity and learning & memory in the CNS. ADGR has a unique structure which contains an extracellular N-terminal domain with various types of functional domains, a seven-transmembrane region and an intracellular domain interacting with several signal molecules including G proteins. Despite its unique structure, the mechanisms by which ADGR behaves at synapses have remained unclear. In this study, we demonstrated that a brain-specific angiogenesis inhibitor 3 (BAI3), an ADGR member abundantly expressed at the synapses between climbing fiber (CF) and Purkinje cell in the cerebellum, plays crucial roles in synapse morphology, synaptic plasticity and cerebellar motor learning.

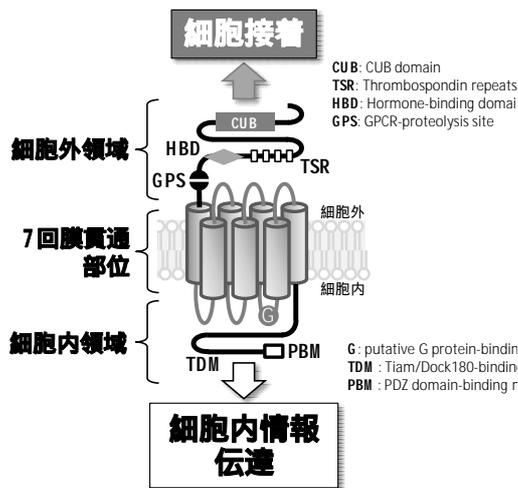
研究分野：神経生理学

キーワード：細胞接着 Gタンパク質共役型受容体 シナプス 記憶・学習

1. 研究開始当初の背景

脳内の神経細胞どうしを結ぶ「シナプス」は、記憶・学習および種々の精神・神経疾患に関わる特殊な構造体であり、これまでシナプス形成を担う接着分子や分泌因子が数多く同定されている。シナプスは一度形成された後も、経験や環境に応じてダイナミックに改変される。この過程で、細胞外の情報がどのように細胞内に伝わり、シナプスに作用するかは、興味深い重要な問題である。

近年、シナプスを制御する接着分子の1つとして、細胞接着型 G タンパク共役受容体 (Adhesion-GPCR, ADGR) が注目されている (Hamann et al., *Pharmacol Rev*, 2015)。ADGR は、種々の機能ドメインを有する長鎖の細胞外領域と、GPCR に共通な 7 回膜貫通領域および G タンパクや他のシグナル分子と結合しうる細胞内領域からなるユニークな分子である (図 1)。これまで ADGR に関して、細胞内外の領域がそれぞれ独立して細胞接着や細胞内情報伝達系を制御する所見が報告されているが、その詳細な仕組みや、同受容体を活性化させるリガンドの存在、そして、細胞内外領域間の相互作用の有無など不明な点が多い。しかし、その特徴的な構造から、ADGR は神経活動に応じて細胞内外に信号を伝える系として最適な分子であると考えられる。



(図1)細胞接着型GPCR (BAI3)の膜構造

2. 研究の目的

私たちは最近、運動記憶をささえる小脳回路の要衝を担う、延髄下オリブ核登線上線維 (climbing fiber, CF) - 小脳プルキンエ細胞間シナプス (以下、CF シナプスと略す) において、シナプス前部から分泌される補体 (C1q) ファミリー分子の C1ql1 (C1q-like protein 1) が、プルキンエ細胞に発現する ADGR ファミリーメンバーの BAI3 (brain-specific angiogenesis inhibitor 3) に結合し、同シナプスの形成や機能を制御していることを明らかにした (Kakegawa et al., *Neuron*,

2015)。そこで私たちは、CF シナプスにおける C1ql1 - BAI3 シグナルを解析することによって、これまで未知であった ADGR ファミリー分子による神経細胞内外の情報伝達機構を理解できるものと着想した。そこで本計画では、CF シナプス形態・機能や小脳依存性運動記憶に重篤な障害を示す、プルキンエ細胞選択的 BAI3 欠損 (BAI3^{PC-KO}) マウスや BAI3^{PC} を急性除去した野生型マウスを用い、正常型あるいは各機能を欠失させた変異型 BAI3 を導入することで観察される、異常表現型からの回復度合いを解析することにした (Phenotype レスキュー実験)。

3. 研究の方法

BAI3^{PC-KO} マウスは、生後発達期での CF シナプス競合、成熟期での CF シナプス維持、シナプス可塑性 (LTD)、小脳運動学習に重篤な障害を示す (Kakegawa et al., *Neuron*, 2015)。そこで、BAI3^{PC-KO} マウスや BAI3^{PC} を急性除去した野生型マウスのプルキンエ細胞に、正常型 BAI3 あるいは各機能ドメインに変異を加えた変異型 BAI3 を導入し、BAI3^{PC-KO} マウスに見られる異常表現型からの回復度合いを指標に、脳内における BAI3 の活動様式を電気生理学、形態学および行動学的手法を用いて解析した。

4. 研究成果

(1) まず、成熟期小脳において完成された CF シナプスでの BAI3 の役割について解析を行った。具体的には、プルキンエ細胞選択的に BAI3 発現を欠く BAI3^{PC-KO} マウスを用い、成熟期での CF シナプス様式を観察すると、CF 上に形成されるシナプスの数が野生型マウスに比べて激減し、それに伴って、CF の支配領域が顕著に退縮していることが分かった。

(2) 成熟した野生型マウスのプルキンエ細胞に発現する BAI3 を RNA 干渉法により急性除去すると、BAI3^{PC-KO} マウスで観察された異常表現型が認められた。

(3) 成熟 BAI3^{PC-KO} マウスのプルキンエ細胞に外来的に BAI3 遺伝子を導入すると、cKO マウスに見られた異常表現型が劇的に改善された。

上記(1)-(3)の所見は、成熟期において完成された CF シナプスの維持および改変過程に BAI3 が深く関与していることを示唆している (論文投稿準備中)。

(4) 次に、BAI3 細胞内シグナルの重要性について解析を行った。具体的には、BAI3 の細胞内領域に位置する様々な細胞内シグナル分子結合部位をつぶした変異型 BAI3 を設計し、BAI3^{PC-KO} マウスのプルキンエ細胞に導入すると、BAI3^{PC-KO} マウスに観察された

CF シナプス異常がほぼ完全に回復することが分かった。

(5) また、野生型成熟マウス小脳プルキンエ細胞に BAI3 を過剰発現させると、CF 投射領域の拡大が観察され、興味深いことに、この CF 投射領域の拡大は、細胞内領域に変異を加えた BAI3 においても同様に観察された。これらの結果から、BAI3 は細胞内シグナル系とは独立して CF シナプス形成をもたらしている可能性が示唆された。

(6) 一方、私たちは、筋芽細胞の融合過程を制御する BAI3 の活動過程に、細胞内のシグナル伝達系が必須であることを共同研究により明らかにした (改定論文投稿準備中)。小脳 CF シナプスにおいて、BAI3 を介する細胞内シグナリングが必須であるかについては、より詳細に解析していきたい。

興味深いことに、BAI3 やそのリガンドである C1ql1 の同族分子 (BAI1, 2 および C1ql2, 3) は、小脳だけでなく、大脳や海馬など脳全域に恒常的に発現する (Kee et al., *FEBS Lett*, 2004; Iijima et al., *Eur J Neurosci*, 2010)。そのため、本研究で得られた成果は、「中枢シナプスの形成・機能における普遍的かつ新しい動作原理」を確立するための大きな足がかりになりうることを期待する。

<引用文献>

Hamann et al., *Pharmacol Rev*, 2015

Takegawa et al., *Neuron*, 2015

Kee et al., *FEBS Lett*, 2004

Iijima et al., *Eur J Neurosci*, 2010

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 3件)

Wakayama S, Kiyonaka S, Arai I, Takegawa W, Matsuda S, Ibata K, Nemoto YL, Kusumi A, Yuzaki M, Hamachi I: Chemical labeling for visualizing native AMPA receptors in live neurons. *Nature Communications* 8: 14850 (open access) (2017) 査読有 doi: 10.1038/ncomms14850.

Elegheert J, Takegawa W, Clay EJ, Shanks N, Behiels E, Matsuda K, Kohda K, Miura E, Rossmann M, Mitakidis N, Motohashi J, Chang TV, Siebold C, Greger HI, Nakagawa T, K, Yuzaki M, Aricescu RA: Structural basis for integration of GluD receptors within synaptic organizer complexes. *Science* 353: 295-299 (2016) 査読有

doi: 10.1126/science.aae0104.

Matsuda K, Budisantoso T, Mitakidis N, Sugaya Y, Miura E, Takegawa W, Yamasaki M, Konno K, Uchigashima M, Abe M, Watanabe I, Kano M, Watanabe M, Sakimura K, Aricescu RA, Yuzaki M: Transsynaptic modulation of kainite receptor functions by C1q-like proteins. *Neuron* 90: 752-767 (2016) 査読有

doi: 10.1016/j.neuron.2016.04.001.

[学会発表](計 3件)

掛川 渉, 柚崎 通介: A novel D-serine signaling which underlies synaptic plasticity and motor learning in the cerebellum. 第39回日本生物学的精神医学会シンポジウム 2017年

Takegawa W: Synergistic action of two different GluD2 ligands on D-serine signaling in the cerebellum. The 3rd International Conference of D-Amino Acid Research 2017年

掛川 渉: シナプス分子群がもたらす運動記憶ダイナミズムの解明。次世代脳プロジェクト 冬のシンポジウム 2016年

[図書](計 8件)

掛川 渉, 柚崎 通介: 羊土社, 実験医学, 特集 - スクラップ&ビルドで発達する脳神経回路と高次脳機能: スクラップ&ビルドによる小脳神経回路の動的制御. 2018年 (予定)

掛川 渉, 柚崎 通介: 医学書院社, BRAIN and NERVE - 神経研究の進歩, 記憶・学習の分子機構 - そのときシナプスでは何が起きているのか. 2018年 (予定)

河野 まや, 掛川 渉, 柚崎 通介: 中外医学社, *Clinical Neuroscience*, 中枢神経の可塑性とは. 2017, 5, 5 ページ (523-527)

掛川 渉, 柚崎 通介: 羊土社, 実験医学, シナプスに架かる記憶への架け橋: Neurexin-Cbln1-GluD2 三者複合体構造. 2016, 34, 4 ページ (3181-3184)

Takegawa W, Yuzaki M: Springer Books, *D-Amino Acids: Physiology, Metabolism, and Application: Physiological functions of D-serine mediated through $\delta 2$ glutamate receptors in the cerebellum*. 2016, 16 ペ

ージ (65-80)

Kohda K, Kakegawa W, Yuzaki M: Springer Books, Encyclopedia of Signaling Molecules-2nd edition: Delta glutamate receptor. 2016, 5 ページ (514-518)

Kohda K, Kakegawa W, Yuzaki M: Springer Books, Essentials of cerebellum and cerebellar disorders: Long-term depression (LTD). 2016, 6 ページ (329-334)

掛川 渉, 松田 恵子, 柚崎 通介: 中外医学社, Annual Review 神経 2016, 「補体ファミリー分子」とシナプス形成・維持. 2016, 9 ページ (35-43)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

洋書翻訳

Principles of Neurobiology, edited by Liqun Luo (スタンフォード神経生物学) 第2章担当

班会議

掛川 渉, 柚崎 通介: A novel D-serine signaling for synaptic plasticity and motor learning. 新学術領域研究「記憶ダイナミズム」班会議 2018 年

掛川 渉, 柚崎 通介: 運動学習をささえる小脳シナプス回路シフト. 新学術領域研究「適応回路シフト」班会議 2017 年

掛川 渉, 柚崎 通介: A novel D-serine signaling for synaptic plasticity and motor learning. 新学術領域研究「記憶ダイナミズム」班会議 2016 年

アウトリーチ活動

一般市民を対象として、講義「シナプスとは何？」と実習を実施。2017 年 11 月 4 日研究室にて。

一般市民を対象として、講義「シナプスとは何？」と実習を実施。2016 年 11 月 6 日研究室にて。

ホームページ等

<http://www.yuzaki-lab.org/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

掛川 渉 (KAKEGAWA, Wataru)

慶應義塾大学・医学部 (信濃町)・准教授
研究者番号: 70383718

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

柚崎 通介 (Yuzaki, Michisuke)

慶應義塾大学・医学部 (信濃町)・教授
研究者番号: 40365226

三浦 会里子 (Miura, Eriko)

慶應義塾大学・医学部 (信濃町)・研究員
研究者番号: 10571169

本橋 淳子 (Motohashi, Junko)

慶應義塾大学・医学部 (信濃町)・研究員
研究者番号: 10407083

(4) 研究協力者

なし