

令和 5 年 6 月 15 日現在

機関番号：13601

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H03334

研究課題名(和文) 脳神経回路網形成と機能制御の分子基盤

研究課題名(英文) Molecular basis of brain neural circuitry formation and function

研究代表者

植村 健 (Takeshi, Uemura)

信州大学・学術研究院総合人間科学系・准教授

研究者番号：00372368

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、脳神経回路形成と機能制御の分子基盤について以下の研究成果を得た。(1) シナプスオーガナイザー-Nrxnに結合し、NrxnとそのリガンドNlgnとの結合を阻害する分泌タンパクを同定した。この分子を過剰発現した神経細胞では、Nrxnによるシナプス形成が著しく阻害されていた。また、この分子を欠損させたマウスでは記憶学習能力の向上が観察され、この阻害分子の生理学的重要性が示唆された。(2) Nrxnが小脳において神経栄養因子の分泌を調節することで小脳顆粒細胞の生存に重要な役割を果たしていることを明らかにした。(3) リソリン脂質の1つが神経回路形成の制御分子として作用していることを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

脳機能を支える神経回路網は発達期におけるシナプスの形成と再編を経て構築される。発達期におけるこれらの調節機構の破綻は自閉症などの神経発達障害の発症と深く関わることが知られている。シナプス形成はシナプスオーガナイザーと呼ばれる特殊な細胞接着分子によって担われている。シナプス形成を担うシナプスオーガナイザーの脳形成過程における新たな機能についての知見とシナプスオーガナイザー自身の機能を修飾する分子を同定しその働きの一旦を明らかにした本研究は、脳神経回路形成のメカニズムの解明や自閉症などの神経発達障害に関わる今後の研究に役立つ知見になると期待される。

研究成果の概要(英文)：In this study, we obtained the following research results on the molecular basis of brain neural circuits' formation and functional regulation. (1) We identified a secreted protein that binds to the synaptic organizer Nrxn and inhibits the binding of Nrxn to its ligand Nlgn. In neurons overexpressing this molecule, Nrxn-induced synaptogenesis was severely inhibited. In addition, mice lacking this molecule showed enhanced learning and memory, suggesting the physiological importance of this inhibitory molecule. (2) Nrxn plays an important role in cerebellar granule cell survival by regulating neurotrophic factor secretion in the cerebellum. (3) We found that one of the lysophospholipids can act as a regulatory molecule of neural circuit formation.

研究分野：分子神経生物学

キーワード：脳神経回路形成 シナプス間接着分子 シナプス 形成と再編 阻害分子

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

脳機能を支える脳神経回路網は発達期におけるシナプスの形成と消失を経て構築される。成体の脳においてもシナプスは形成と消失を繰り返し、それらは高次脳機能発現に重要な役割を果たしている。申請者らは、2010年にシナプス形成を誘導し、それを維持する細胞接着分子 Neurexin (Nrxn)-Cbln1-GluD2 複合体を発見し、小脳においてシナプス形成因子の分子実態を明らかにした。この様なシナプス形成を担う一部の特殊な細胞接着分子はシナプスオーガナイザーと呼ばれ、現在までに、哺乳類の脳には少なくとも十数種のシナプスオーガナイザーが存在することが分かっている。シナプス構造はシナプスオーガナイザーと呼ばれる細胞接着分子同士の物理的会合が引き金となり誘導される。しかしながら、シナプスオーガナイザー分子同士の物理的会合がなぜシナプス形成を誘導することになるのか、またいったん構築されたシナプスがどのように消失するのか、メカニズムには不明な点が多い。発達期におけるシナプス形成、機能低下をはじめとする脳神経回路形成の異常は自閉症などの神経発達障害の発症と深く関わると考えられている。したがって、脳神経回路形成の機能制御の分子基盤の解明は、脳の神経回路構築と作動についての基本原理を解明する上で重要な研究テーマであるばかりでなく、神経回路形成異常に起因する精神疾患の病態や治療法の開発にとっても重要な研究課題である。

2. 研究の目的

近年、シナプスオーガナイザーの機能欠損によって生じるシナプス形成や機能異常、神経回路網形成異常が自閉症などの神経発達障害の発症と深く関連することが示唆されるに至り、その重要性が認識され国内外でシナプスオーガナイザーによる神経回路網形成と機能制御の分子メカニズム解明に向けた研究が活発に行われている。本研究では、シナプスオーガナイザーに働きかけてシナプス形成と再編を制御しうる分子に着目し、その働きを明らかにし、シナプス形成とその再編の分子基盤を解明することを目的とする。本研究では、シナプス前部の中心的なシナプスオーガナイザーであり、自閉症、統合失調症などの神経発達障害の原因遺伝子であることから、世界中でもっとも良く研究されているシナプスオーガナイザーの一つである neurexin(Nrxn)を中心に、上述の問題解決に取り組んだ。シナプス形成と再編をはじめとする脳神経回路形成の機能制御についての基礎的知見は、シナプス形成や機能の破綻に起因する神経発達障害の病態の解明や治療戦略の進展に寄与すると期待される。

3. 研究の方法

(1) Nrxn の細胞外領域を固定化したビーズを培養大脳皮質神経細胞に添加し、ビーズ上に人工的にシナプス様構造物を誘導させ、構成分子を網羅的にスクリーニングすることにより単離された Nrxn1 に結合する分泌タンパク質(仮称 Inrx1)の生化学的解析を行う。哺乳類細胞を用いてヒスチジンタグを付加した Inrx1-His の発現・精製を行い、Nrxn1 に対する結合部位を同定するとともに、Inrx1 が Nrxn1-Nlgn1 複合体形成に与える影響についても解析する。

(2) 培養神経細胞を用いて Inrx1 の分子局在、分子機能の解析を行う。人工的シナプス誘導アッセイを用いて、Inrx1 がシナプス前部、シナプス後部のどちらに発現しているかを解析するとともに、Inrx1 を過剰発現がシナプス形成に及ぼす影響の解析を行う。

(3) ゲノム編集技術 CRISPR/Cas9 システムを用いて Inrx1 欠損マウスを作成し、Inrx1 の分子機能と生理的役割をマウス個体レベルで解析する。シナプスタンパク質に対する抗体を用いて免疫組織学的解析を行うとともに、行動実験をおこなうことで Inrx1 欠損によってもたらされる脳機能の変化について解析する。

(4) Nrxn の小脳神経回路形成における役割の全貌を明らかにするために、小脳顆粒細胞特異的 Nrxn1,2,3 トリプルノックアウトマウス (Nrxns TKO マウス)の解析を行う。Nrxns TKO マウス胎児から培養小脳顆粒細胞を作成し、Nrxn の分子機能の解析を行う。また、Nrxn1 の細胞内領域の欠損変異体を発現させて解析することで、Nrxn1 の細胞内ドメインの働きを明らかにする。

(5) 神経回路形成を制御する新たな分子のスクリーニングを行う。培養神経細胞にさまざまな種類のリン脂質を添加し、神経突起伸長の促進作用を指標に解析を行う。さらに、神経突起伸長の促進作用を示したリン脂質については、どのようなシグナルを介して作用しているかを阻害剤などを使って解析する。

4. 研究成果

(1) 機能解析ならびに生化学的解析に用いる組換え Inrx1-Hi の発現・精製法について条件検討を行い、細胞培養の培地中にヘパリンを添加することで効率的に精製 Inrx1-His を得ることが出来た。組換えタンパク質として得られた Inrx1-His を用い、Nrxn1 に変異を導入し、生化学的解析を行う。

学的に結合を解析した結果、Inrx1 は Nrnx1 の硫酸化糖鎖と結合していることが明らかになった。さらに、硫酸化糖鎖修飾されないNrnx1 を発現させた場合においても Inrx1 とNrnx1 との結合は残存していることから、Nrnx1 の硫酸化糖鎖とタンパク質領域の両方に Inrx1 が結合することが明らかとなった。さらに、Inrx1 は Nrnx2 、Nrnx3 ならびにNrnx1 とも結合することが分かった。また、Inrx1 とNrnx1 との結合はカルシウム非依存的であること、Nrnx1 のスプライスサイトの有無は結合に影響を与えないことも明らかとなった。生化学的解析、培養細胞での結合実験から、Inrx1 がNrnx1 -Nlgn1 複合体形成を阻害することが明らかとなった。これらの結果は、分泌タンパク質 Inrx1 がNrnx1-Nlgn1 複合体の阻害因子として働いていることを示唆するものであった。

(2) Nlgn1 結合ビーズでシナプス前終末を、Nrnx1 結合ビーズを用いてシナプス後部をそれぞれ誘導させ、そこに Inrx1 が集積しているかを解析した。抗 Inrx1 抗体を用いた免疫染色を行った結果、Nrnx1 結合ビーズで誘導したシナプス後部には Inrx1 シグナルの集積が観察されたが、Nlgn1 結合ビーズで誘導したシナプス前終末には Inrx1 シグナルは検出されなかった。次に、シンドビスウイルスをもちいて Inrx1 を神経細胞に過剰発現させ、Inrx1 がNrnx1 -Nlgn1 を介したシナプス形成にどのように影響を与えるのかを解析した。その結果、Inrx1 過剰発現によりNrnx1 のシナプス形成能が著しく抑制されることが明らかとなった。これらの結果は、Inrx1 はシナプス後部から分泌し、Nrnx1 -Nlgn1 の結合を阻害することでNrnx1 によるシナプス形成を阻害する機能を有している分子であることを示唆していた。

(3) Inrx1 欠損マウスの組織ホモジネートにおいて、Inrx1 タンパク質の消失が抗 Inrx1 抗体を用いたウエスタンブロットによって確認され、Inrx1 欠損マウス系統の樹立が確認された。Inrx1 欠損マウスは正常に発育し、交配も可能であった。Inrx1 欠損マウスの脳スライスを作成し、組織学的解析を行ったが、目立った異常は観察されなかった。Inrx1 欠損マウスの学習能力を評価するために恐怖条件づけテストを行った。Inrx1 欠損マウスは野生型コントロールマウスに比べて文脈条件付け恐怖記憶テスト、音条件付け恐怖記憶テストのいずれの課題においても高いFreezing 率を示しており、記憶学習能力が増強されていることが示唆された。

(4) Nrnxns TKO マウスは発達に伴って小脳顆粒細胞が細胞死を起こすことで小脳が萎縮し、Nrnxn が小脳顆粒細胞の生存に必要な不可欠な分子であることが分かった。細胞生存における Nrnxn 要求性は培養小脳顆粒細胞でも再現され、Nrnxn を欠損させた培養小脳顆粒細胞では、活動電位によって誘発される軸索へのカルシウム流入が低下し、脳由来神経栄養因子 BDNF の分泌が減少していた。また、細胞死は BDNF を添加することで改善された。培養小脳顆粒細胞同士は殆どシナプスを作らないが、軸索上にコブ状の膨らみが存在し、多数のシナプス小胞を含むシナプス前終末様の構造を有していることが知られている。Nrnxn を欠損させると、このシナプス前終末様の構造が正しく作られないことが明らかになった。このことは、Nrnxn がシナプスとは無関係に小脳顆粒細胞の生存に必要な軸索からの神経栄養因子の放出機構の組織化に重要な役割を担うことを示唆していた。また、このNrnxn の働きにはNrnxn の細胞内領域が必要不可欠であることも明らかとなった。これら一連の解析により、小脳の神経回路形成の制御機構に新たな仕組みを発見することができた。

(5) 培養大脳皮質神経細胞に lysophosphatidylcholine、lysophosphatidylethanolamine、phosphatidylinositol、sphingomyelin、phosphatidylserine、phosphatidylcholine、phosphatidylethanolamine、cardiolipin、phosphatidic acid、cerebrosides をそれぞれ添加し、神経突起伸長に与える影響を解析した。その結果、lysophosphatidylethanolamine (LPE) を添加すると、神経突起伸長が著しく促進することが明らかとなった。また、G タンパク質阻害剤を用いた実験から、炭素鎖の異なる LPE 分子種は異なる G タンパク質共役型受容体に作用していることが示唆された。さらに、LPE はグルタミン酸毒性にたいする神経細胞保護作用を有していることも明らかとなった。これらの結果は、リゾリン脂質 LPE による脳神経回路形成と機能制御機構の存在を示唆するものであった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Uchigashima Motokazu, Konno Kohtarou, Demchak Emily, Cheung Amy, Watanabe Takuya, Keener David G, Abe Manabu, Le Timmy, Sakimura Kenji, Sasaoka Toshikuni, Uemura Takeshi, Imamura Kawasaki Yuka, Watanabe Masahiko, Futai Kensuke	4. 巻 9
2. 論文標題 Specific Neuroligin3- Neurexin1 signaling regulates GABAergic synaptic function in mouse hippocampus	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 eLife	6. 最初と最後の頁 e59545
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.7554/eLife.59545	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Hisano Kazutoshi, Kawase Shiori, Mimura Tetsuhiko, Yoshida Hironori, Yamada Hiroki, Haniu Hisao, Tsukahara Tamotsu, Kurihara Taiga, Matsuda Yoshikazu, Saito Naoto, Uemura Takeshi	4. 巻 534
2. 論文標題 Structurally different lysophosphatidylethanolamine species stimulate neurite outgrowth in cultured cortical neurons via distinct G-protein-coupled receptors and signaling cascades	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 179 ~ 185
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2020.11.119	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Hisano Kazutoshi, Yoshida Hironori, Kawase Shiori, Mimura Tetsuhiko, Haniu Hisao, Tsukahara Tamotsu, Kurihara Taiga, Matsuda Yoshikazu, Saito Naoto, Uemura Takeshi	4. 巻 170
2. 論文標題 Abundant oleoyl-lysophosphatidylethanolamine in brain stimulates neurite outgrowth and protects against glutamate toxicity in cultured cortical neurons	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The Journal of Biochemistry	6. 最初と最後の頁 327 ~ 336
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jb/mvab046	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Uemura Takeshi, Suzuki-Kouyama Emi, Kawase Shiori, Kurihara Taiga, Yasumura Misato, Yoshida Tomoyuki, Fukai Shuya, Yamazaki Maya, Fei Peng, Abe Manabu, Watanabe Masahiko, Sakimura Kenji, Mishina Masayoshi, Tabuchi Katsuhiko	4. 巻 39
2. 論文標題 Neurexins play a crucial role in cerebellar granule cell survival by organizing autocrine machinery for neurotrophins	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 110624 ~ 110624
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2022.110624	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Yoshida T, Yamagata A, Imai A, Kim J, Izumi H, Nakashima S, Shiroshima T, Maeda A, Iwasawa-Okamoto S, Azechi K, Osaka F, Saitoh T, Maenaka K, Shimada T, Fukata Y, Fukata M, Matsumoto J, Nishijo H, Takao K, Tanaka S, Okabe S, Tabuchi K, Uemura T, Mishina M, Mori H, Fukai S	4. 巻 12
2. 論文標題 Canonical versus non-canonical transsynaptic signaling of neuroligin 3 tunes development of sociality in mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 1848
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-021-22059-6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

[学会発表] 計7件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 6件)

1. 発表者名 Kazutoshi Hisano, Shiori Kawase, Hisao Haniu, Tamotsu Tsukahara, Yoshikazu Matsuda, Naoto Saito, Takeshi Uemura.
2. 発表標題 Effect of phospholipids on neurite outgrowth of cortical neurons in culture
3. 学会等名 The 43rd annual meeting of the japan neuroscience society (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Hironori Yoshida, Kazutoshi Hisano, Shiori Kawase, Tetsuhiko Mimura, Hisao Haniu, Tamotsu Tsukahara, Taiga Kurihara, Yoshikazu Matsuda, Naoto Saito, Takeshi Uemura
2. 発表標題 Lysophosphatidylethanolamines with different fatty acid lengths stimulate neurite outgrowth in cultured cortical neurons through distinct signaling cascades
3. 学会等名 The 94th Annual Meeting of the Japanese Pharmacological Society (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Uchigashima Motokazu, Konno Kohtarou, Demchak Emily, Cheung Amy, Watanabe Takuya, Keener David G, Abe Manabu, Le Timmy, Sakimura Kenji, Sasaoka Toshikuni, Uemura Takeshi, Imamura Kawasaki Yuka, Watanabe Masahiko, Futai Kensuke
2. 発表標題 Specific Neuroligin3- Neurexin1 Trans-synaptic Interaction Regulates GABAergic Synaptic Function in an Input Cell Type-Dependent Manner
3. 学会等名 第126回 日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Atsushi Yamagata, Sakurako Goto-Ito, Yusuke Sato, Tomoko Shiroshima, Asami Maeda, Tomoyuki Yoshida, Takeshi Uemura, Shuya Fukai
2. 発表標題 Structural basis of transsynaptic interactions between type IIa receptor protein tyrosine phosphatases and their synaptic organizer partners
3. 学会等名 The 43rd annual meeting of the Japan Neuroscience Society (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takeshi Uemura
2. 発表標題 Functional roles of synapse organizers in the cerebellum
3. 学会等名 The 42nd annual meeting of the Japan Neuroscience Society (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Aoi William Omi, Kazutoshi Hisano, Hironori Yoshida, Shiori Kawase, Tetsuhiko Mimura, Ryoya Nakada, Hisao Haniu, Tamotsu Tsukahara, Taiga Kurihara, Yoshikazu Matsuda, Naoto Saito, Takeshi Uemura
2. 発表標題 Abundant oleoyl-lysophosphatidylethanolamine in brain exerts stimulation of neurite outgrowth and protection against glutamate toxicity in cultured cortical neurons
3. 学会等名 The 45th annual meeting of the Japan Neuroscience Society (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Chikara Sato, Takaaki Kinoshita, Takeshi Uemura, Naoki Kasahata, Mari Sato, Shoko Nishihara, Masami Naya
2. 発表標題 Correlative Light-Electron Microscopy of Neurons and brains in Liquid
3. 学会等名 The 5th International Conference on In-situ and Correlative Electron Microscopy 2021 (CISCHEM 2021) (国際学会)
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	惣谷 和広 (Sohya Kazuhiro) (80415207)	佐賀大学・医学部・准教授 (17201)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関		
米国	Univ of Massachusetts Med Sch		