

令和 6 年 6 月 4 日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K06177

研究課題名（和文）大脳皮質とシナプスの形成における細胞接着関連分子の機能と作用機構

研究課題名（英文）Functions and mechanisms of action of cell adhesion-related molecules in the formation of the cerebral cortex and synapses

研究代表者

萬代 研二（Mandai, Kenji）

北里大学・医学部・教授

研究者番号：50322186

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,100,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、接着結合の裏打ち分子のアファディンのスプライスバリエーションのs-アファジンに結合するタンパク質として、てんかんを伴う知的障害の原因遺伝子のマギンを見出し、マギンがアファジンと同様に興奮性のシナプス伝達を制御していることを明らかにした。また、アファジンはシナプスの接着装置のパンクタアドヘレンシアジャンクションの形成において、N-カテニンに比べ、より本質的な機能を果たしていることも明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、シナプスの接着装置のパンクタアドヘレンシアジャンクション（PAJ）を含む中枢神経系の細胞間接着が、カテニンやアファジンといった既知の分子だけでは説明出来ない未解明な機構によって制御されていることを明らかにした。また、PAJが興奮性シナプス伝達に果す分子機構の一端を解明すると共に、てんかんを伴う知的障害に関わる因子とアファジンとの分子連関を発見した。これらの成果は、PAJを介した新しい脳機能制御の仕組みを発見する端緒となる可能性がある。さらに、本研究はアファジン、およびマギンとの関連性が指摘されている統合失調症などの疾患の機構の解明と新規治療法開発の基盤となることが期待される。

研究成果の概要（英文）：In this study, MAGUIN, which is known to be a causative molecule for intellectual disability accompanied by epilepsy, was isolated as a protein that binds to s-afadin, a shorter splice variant of afadin, which is a scaffolding protein at adherens junctions. It was also demonstrated that MAGUIN regulates the excitatory synaptic transmission as afadin does. Moreover, it was demonstrated that afadin plays a more pivotal role than N-catenin in the formation of puncta adherentia junctions, which are synaptic adhesion apparatuses.

研究分野：神経科学

キーワード：細胞間接着 シナプス パンクタアドヘレンシアジャンクション アファジン N-カテニン マギン

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

細胞間接着は多細胞生物の生命現象の根幹をなす細胞機能である。個体発生過程では、新生神経細胞は脳の適切な場所に移動し、突起を伸張して他の神経細胞とシナプスを形成し、神経回路に組み込まれる。細胞間接着はこれらの過程において重要な機能を果たしている。大脳新皮質においては、新生興奮性神経細胞は放射状グリア細胞の突起と細胞間接着を形成し、突起に沿って定められた層まで移動する。一方、シナプスは極性をもった特殊な細胞間接着で、上皮細胞の接着結合に類似した接着装置が存在する。

本研究では、大脳新皮質の形成、ならびにシナプスの形成および機能発現における細胞間接着の役割とその分子機構の解明を研究テーマとする。

(1) 大脳新皮質の形成：ほ乳類の大脳新皮質は層構造を成している。興奮性神経細胞は、発生期の脳の脳室周囲を取り囲む細胞層の脳室帯に存在する神経幹細胞の放射状グリア細胞の細胞分裂によって産生される。放射状グリア細胞は、脳室面から大脳新皮質の外表面の基底面まで放射状突起を伸張させている。産生された新生興奮性神経細胞は、放射状グリア細胞の放射状突起に接着し、この突起を足場にして移動し、大脳新皮質の特定の層に定着して神経回路に組み込まれる。

研究代表者は、自身が見出した接着結合裏打ち分子のアファディンの大脳新皮質の形成に果たす機能について研究してきた。大脳新皮質と海馬の神経細胞とグリア細胞の前駆細胞の放射状グリア細胞において条件付にアファディンが欠損するマウス (*Afdn*^{fl};*Emx1-cre*) の大脳新皮質は、二重構造、すなわち皮質下帯状異所性灰白質 (別名、二重皮質) を形成していた (*Brain Res*, 2015)。この変異マウスの胎生後期の大脳新皮質では、放射状グリア細胞の接着結合が破壊されており、その脳室側面の放射状突起の形成の異常と、新生興奮性神経細胞の移動の異常が認められた。このように、アファディンは、放射状グリア細胞の放射状突起の形態形成を介して新生興奮性神経細胞の大脳新皮質への移動を制御することによって、大脳新皮質の形成機構に関与していることを明らかにした。一方、N-カドヘリンも大脳新皮質の層形成に関与している。しかし、新生興奮性神経細胞と放射状グリア細胞の突起との間の細胞間接着の機能とそこでのアファディンとカドヘリン-カテニン系の機能とそれらの分子連関についての理解は不十分である。

(2) シナプスの形成：シナプスは神経伝達が起こる細胞間接着で、高頻度の刺激によって膨大化し、形態が複雑化し、伝達効率が向上する。この現象はシナプス可塑性と呼ばれ、学習・記憶の細胞生物学的基盤である。そのため、シナプスの形態形成とシナプス伝達に関わる分子機構の解明は、脳の高次機能の機構を理解する目的において必須である。海馬歯状回顆粒細胞の、苔状線維と呼ばれる軸索の終末と、CA3 野錐体細胞の細胞体近位部の樹状突起との間に形成されるシナプス (以下、苔状線維シナプス) では、機能が不明なパンクタアドヘレンシアジャンクション (PAJ) と呼ばれる、上皮細胞の接着結合に類似した接着装置が良く発達している。PAJ は、シナプス結合と呼ばれる神経伝達を担う接着装置の近傍に独立して配置されている。研究代表者は、苔状線維シナプスの PAJ にアファディン、それに結合する接着分子のネクチン、および N-カドヘリン-カテニン複合体が集積していることに着目して本シナプスの形成におけるアファディンの機能について研究してきた (*Mol Cell Neurosci*, 2018; *J Comp Neurol*, 2017; *Genes Cells*, 2017)。その結果、アファディンが、PAJ とシナプス結合の形成、シナプスの形態形成、シナプス分子の集積、苔状線維シナプスの数、および興奮性シナプス伝達を制御していることを解明した。このアファディンによる PAJ の形成は、アファディンのスプライスバリエーションの 1-アファディンと N-カテニンの分子連関を介していた。しかし、N-カテニンも、アファディンと同様に生体内で PAJ の形成、ならびにそれを介したシナプス結合の形成とシナプス機能発現に関わっているかについては十分にわかっていない。

2. 研究の目的

上述した背景のもと、本研究課題ではアファディンと N-カテニンの分子連関に着目して以下の 2 点の解明を目指す。(1) 新生興奮性神経細胞と放射状グリア細胞の突起間の細胞間接着の機能の解明。(2) シナプスの接着装置 PAJ の形成機構の解明。

3. 研究の方法

(1) 新生興奮性神経細胞と放射状グリア細胞の突起間の細胞間接着の機能の解明

新生興奮性神経細胞において遺伝子組換えが起こる条件付アファディン欠損マウス (*Afdn*^{fl};*Nex-cre*) を用いて、新生興奮性神経細胞と放射状グリア細胞の突起間の細胞間接着におけるアファディンが果たす役割を解明する。

アファディンは N-カテニン (*Ctnna2*) に結合するため、新生興奮性神経細胞と放射状グリア

ア細胞の突起間の細胞間接着においても N-カテニンが機能している可能性が高い。そこで、N-カテニン flox アレルを作成し、条件付 N-カテニン欠損マウス (*Ctnna2^{flf};Nestin-cre*) を用いて、この細胞間接着における N-カテニンが果たす役割を解明する。

(2) シナプスの接着装置 PAJ の形成機構の解明

種々の条件付き N-カテニン欠損マウスを用い、PAJ の形成における N-カテニンの機能を解明する。同時に条件付きアファディン欠損マウスの表現型と比較する。

アファディンによる PAJ およびシナプスの形成の機構を解明するため、アファディンに結合する分子をシナプス膜分画から生化学的に単離し、質量分析によって同定してその機能を解明する。

4. 研究成果

(1) 新生興奮性神経細胞と放射状グリア細胞の突起間の細胞間接着の機能

新生興奮性神経細胞において遺伝子組換えが起こる条件付アファディン欠損マウス (*Afdn^{flf};Nex-cre*) は、神経幹細胞において組換えが起こる条件付アファディン欠損マウス (*Afdn^{flf};Emx1-cre*) とは異なり、6 週齢において大脳新皮質の層は正常対照とほぼ同等に形成されていた。よって、アファディンは、新生興奮性神経細胞が放射状グリア細胞の突起に接着して移動する過程では必須ではないことが解明された (論文準備中)。

N-カテニン flox アレルを、ゲノム編集技術を用いて作成した。神経幹細胞において組換えが起こる条件付 N-カテニン欠損マウス (*Ctnna2^{flf};Nestin-cre*) は、胎生 18.5 日齢において大脳新皮質の層は正常対照とほぼ同等に形成されていた。よって、N-カテニンも、新生興奮性神経細胞が放射状グリア細胞の突起に接着して移動する過程では、必須ではないことが解明された (論文準備中)。以上の結果は、新生興奮性神経細胞と放射状グリア細胞の突起間の細胞間接着は、アファディンと N-カテニンだけでは説明できない未知の機構によって形成されていることを示唆している。今後、この未知の機構を解明することによって、本細胞接着の機能を明らかにすることができると思われる。

(2) シナプスの接着装置 PAJ の形成機構の解明

上述した神経幹細胞において組換えが起こる条件付 N-カテニン欠損マウス (*Ctnna2^{flf};Nestin-cre*) の胎仔海馬由来の培養神経細胞では、PAJ 様構造物の形成が障害されていた。同じく上述した新生興奮性神経細胞において遺伝子組換えが起こる条件付 N-カテニン欠損マウス (*Ctnna2^{flf};Nex-cre*) は、苔状線維シナプスのシナプス後部で N-カテニンを欠損するが、8 週齢において PAJ の形成の異常は軽微であった。しかし、同じく *NEX-cre* 依存性の Afadin 条件付き欠損マウス (*Afdn^{flf};Nex-cre*) では、PAJ の形成が、N-カテニン欠損マウス (*Ctnna2^{flf};Nex-cre*) より高度に障害されていた (論文準備中)。以上の結果は、PAJ の形成において、N-カテニンの役割は状況によっては必須であるが、アファディンは、(N)-カテニンより本質的な機能を果していることを示唆している。

シナプスにおけるアファディンの作用の機構を解明する目的で、アファディン結合分子の単離・同定を行い、アファディンの神経特異的短鎖バリエーションの s-アファディンが、てんかんを伴う X 染色体連鎖性知的障害の原因遺伝子で、シナプスに局在するマギン (*Cnksr2*) と結合し、協働してシナプス後肥厚部の形成と興奮性シナプス伝達を制御していることを解明した (Maruo et al., 2023)。一方、マギンの欠損によって、てんかんの誘発易性は認められず、先行研究やヒトの病態とは異なった結果であった。以上の実験結果は、マギンはアファディンと同様に興奮性のシナプス伝達を制御することと、マギンの欠損によるてんかんの誘発はマギン以外の因子が関与していることを示唆している。

本研究は、シナプスの接着装置の PAJ を含む中枢神経系の細胞間接着が、カテニンやアファディンといった既知の分子だけでは説明出来ない未解明な機構によって制御されていることを明らかにした。また、PAJ が興奮性シナプス伝達に果たす分子機構の一端を解明すると共に、てんかんを伴う知的障害に関わる因子マギンとアファディンとの分子連関を発見した。これらの成果は、PAJ を介した新しい脳機能制御の仕組みを発見する端緒となる可能性がある。さらに、本研究はアファディン、およびマギンとの関連性が指摘されている統合失調症などの疾患の機構の解明と新規治療法開発の基盤となることが期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Maruo T, Mizutani K, Miyata M, Kuriu T, Sakakibara S, Takahashi H, Kida D, Maesaka K, Sugaya T, Sakane A, Sasaki T, Takai Y, Mandai K	4. 巻 299:
2. 論文標題 s-Afadin binds to MAGUIN/Cnksr2 and regulates the localization of the AMPA receptor and glutamatergic synaptic response in hippocampal neurons	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 J Biol Chem	6. 最初と最後の頁 103040
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jbc.2023.103040	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2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 前坂光輝、丸尾知彦、菅谷津貴子、萬代研二
2. 発表標題 マウスの脳におけるアフアディンのスプライシングバリエーションの局在
3. 学会等名 第94回日本生化学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 高橋初典朱、丸尾知彦、菅谷津貴子、萬代研二
2. 発表標題 PSD-95結合分子マギンは興奮性シナプスに局在する
3. 学会等名 第94回日本生化学会大会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

研究成果
https://www.kitasato-u.ac.jp/jp/kugsms/research_result/2023/04/s-afadin-binds-to-maguincksr2-and-regulates-the-localization-of-the-ampa-receptor-and-glutamatergic.html

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
研究協力者	丸尾 知彦 (Maruo Tomohiko) (10625114)	北里大学 (32607)	

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		
ベルギー	Ghent University		