

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 1 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22500356

研究課題名（和文）シナプス形成・維持における基底膜による分子集積の解析

研究課題名（英文）Analysis of molecular integration by basal membrane in synapse formation and maintenance.

研究代表者

細川浩（HOSOKAWA HIROSHI）

京都大学 大学院情報学研究科 講師

研究者番号：90359779

研究成果の概要（和文）：基底膜に間接的に結合するスカフォールドタンパク質 MAGI1 に注目することで、シナプスにおける分子集積の生理機能の解析を行った。生化学的解析及び、組織化学的な解析の結果、MAGI1 は脳において神経細胞に発現しておりシナプスに存在することが示唆された。また、MAGI1 欠損マウスは不安や注意に関連する行動について異常を示した。以上のことから、シナプスへの分子集積はシナプス機能に必要であり、情動行動を制御していることが明らかになった。

研究成果の概要（英文）：A physiological roles of molecular integration in synapse was studied by analysis of MAGI1 which indirectly binds to basal membrane. Biochemical and histochemical analysis revealed that MAGI1 was expressed in neuronal cells and localized on post synapse in brain. MAGI1 knockout mice showed abnormal anxiety – like and attention behaviour. In conclusion, molecular integration was required for normal synapse function and behavior.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
22 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
23 年度	800,000	240,000	1,040,000
24 年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：脳神経科学・神経・筋肉生理学

キーワード：ニューロン・シナプス・神経回路・基底膜

1. 研究開始当初の背景

正常な神経シナプスの機能は正常な脳機能の発現に重要である。シナプスにはシナプス機能に必要な多数のタンパク質分子群が集積しているが、その集積がどのような分子メ

カニズムでおきるのかは、未だに不明な点が多い。シナプスの構築には、液性因子、神経細胞膜表面分子、細胞外マトリクスとの相互作用が不可欠であるが、本研究ではそのなかでもシナプス間隙に存在する基底膜に注目

した。

申請者は、基底膜と基底膜受容体ジストログリカンの相互作用に注目し研究を行ってきており、ジストログリカンは基底膜成分ラミニン α 5の受容体であり、細胞の接着、増殖、遊走、管腔形成を制御すること (J Biol Chem. 1999; 274(17): 11995-2000. J Cell Sci. 2002 115(Pt 7):1487-96.) を明らかにしてきた。申請者は基底膜と基底膜受容体ジストログリカンの機能研究をさらにすすめる目的で、シナプス基底膜と後シナプスに局在するジストログリカンの機能に着目した。

ジストログリカンは神経系での機能については、不明な点が多い。しかし、ジストログリカンは基底膜に結合できない病態 (福山形筋ジストロフィ、MEB 病) やそのモデルマウスにおいては、脳形態形成異常や精神遅滞など神経機能に異常が見られ、また基底膜に存在するジストログリカンのリガンド (ピカチュリン、メロシン) の欠損マウスでは、シナプス形成異常や脳形態形成異常が起こることから、基底膜と基底膜受容体ジストログリカンの結合は正常な神経情報伝達に必須の役割を果たすと考えられる。

申請者は神経系でのジストログリカンの機能を調べる目的で、脳からジストログリカンの細胞内結合タンパク質の探索を行い、MAGI1 を同定した。MAGI1 は MAGUK ファミリーに属するタンパク質結合領域を7箇所もつ足場タンパク質であり、シナプスに存在していた。以上のことから、「基底膜は基底膜受容体ジストログリカン周囲に足場タンパク質 MAGI-1 を介してタンパク質を集積させることで正常なシナプス伝達を起こす」という仮説に至った。

2. 研究の目的

中枢神経系における正常なシナプス形成や機能維持は、正常な脳機能に必須であり、その異常が様々な神経系疾患を起こすことから、神経科学的にも医学的にも重要視されている。シナプスへは、様々なタンパク質分子の集積が起こり、維持されているが、そのしくみや生理的意味については不明な点が多く集積機構の解明は学問的にも医学的にも重要である。申請者は、シナプス基底膜に着目し、基底膜受容体ジストログリカンと足場タンパク質 MAGI-1 による新しい分子集積の仕組みを明らかにしつつある。本研究では

この研究をさらにすすめ、足場タンパク質 MAGI-1 に着目し、シナプス形成・維持における新しい分子集積のしくみと、その生理機能を解析する。

3. 研究の方法

3.1 基底膜が集積させる分子群の同定とその機能の解析

基底膜受容体ジストログリカンは MAGI-1 と細胞内で結合している。MAGI-1 はタンパク質ドメインを8つ持つ足場タンパク質で、そのうちの WW ドメインを用いてジストログリカンと結合している。基底膜によるタンパク質集積の機能解析をするために、MAGI-1 がどのようなタンパク質複合体を形成しているかを決定する。

3.2 基底膜による分子集積の生理的意味の解析

MAGI-1 を破壊してしまうと、基底膜と基底膜受容体はシナプス直下に MAGI-1 結合タンパク質を集積させることができない。そこで、基底膜によるシナプスへのタンパク質集積の生理機能を調べる目的で、MAGI-1 欠損マウスの解析を行う。予備実験により MAGI-1 欠損マウスは既に作製しており、見かけ上野生型と差はなく、子を産むこともできるため、成熟期での神経機能の解析が可能である。そこで、行動解析、組織学的解析及び、電気生理学的解析を行う。

4. 研究成果

MAGI1 結合タンパク質の探索と同定を Yeast two hybrid 法で行った。MAGI-1 の GuK ドメイン、及び5つの PDZ ドメインそれぞれをベイトとして、マウス脳 cDNA ライブラリーのスクリーニングを行った。その結果、数種のタンパク質の同定に成功した。これらのタンパク質にはセロトニンの受容体等シナプスに存在することが確認されている数種のタンパク質の同定に成功した。

次に、これらのタンパク質と MAGI1 との生体内での結合を確認する目的で、ウサギを用いて抗体の作成を試み、抗体を得た。得られた抗体を用いて、免疫沈降法を行ったところ、脳の組織において MAGI1 と候補タンパク質が共免沈されることを確認した。また、免疫組織化学法を用いて解析を行ったところ、MAGI1 と候補タンパク質は同じ細胞で発現していることが確認できた。発現は脳全体で見られたが、特に GABA 性の神経細胞で発現が見られた。

以上の結果から、MAGI1 はシナプスに存在しており、いくつかのシナプス信号伝達に関与するタンパク質と共存していることが示唆され、とくにセロトニン受容体との関連性が

考えられた。但し、セロトニン経路についても MAGI1 の関与については電気生理学的手法を用いた解析を進める必要があり、今後検討が必要である。

生体内での MAGI1 の役割を明らかにする目的で、MAGI1 の欠損マウスを作成し解析を進めた。MAGI1 の欠損マウスは、MAGI1 遺伝子に Neo 遺伝子を挿入した ES 細胞からキメラマウスを作成し、掛け合わせを行うことで得た。

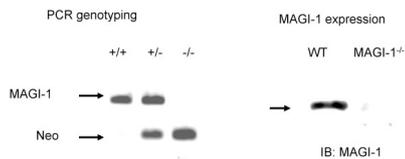


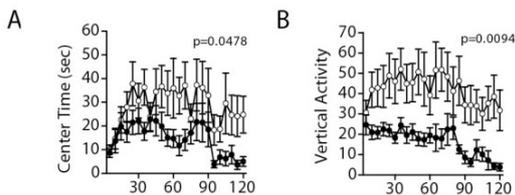
図1 MAGI1 欠損マウスでは MAGI1 がゲノムから欠損しており、タンパク質が存在しない。MAGI1 欠損マウスのゲノム (左) の PCR 下のタイピング。MAGI1 抗体による脳のタンパク質のウェスタンブロットティング (右)

得られたヘテロマウス MAGI1^{+/-}を C57BL6 を用いてバッククロスを行い、MAGI1^{+/-}の純系を得た。得られた MAGI1^{+/-}を掛け合わせることで MAGI1^{-/-}及びその対照となる MAGI1^{+/+}を得た。MAGI1^{-/-}は、MAGI1 遺伝子座に Neo が挿入されており、MAGI1 タンパク質は野生型では検出されたが、MAGI1^{-/-}では検出されなかった。MAGI1 の発現解析を MAGI1 欠損マウスのヘテロマウスを用いて行った。MAGI1^{+/-}は MAGI1 遺伝子座に LacZ を挿入しているため LacZ 活性を観測することにより MAGI1 の発現解析が可能である。



図2 MAGI1 ヘテロマウスを用いた MAGI1 の発現解析 LacZ 活性を Xgal を用いて可視化を行った。

発現解析を行ったところ、脳のほとんどの部分の神経細胞に LacZ 活性が存在することが確認された。この結果は野生型のマウスを用いた免疫組織化学法による MAGI1 の発現解析の結果を同じ傾向を示していた。



次に、MAGI1 欠損マウスの行動解析を行った。ヘテロマウスを掛け合わせることで野生型及び MAGI1 欠損マウスの雄をそれぞれ 16 匹得、解析を行った。MAGI1 欠損マウスは、毛並みなどの見た目、体重、成長曲線等、痛み感受性、握力等に異常は見られなかった。不安用行動について、オープンフィールドテストを行った (図3)。

図3 オープンフィールドテスト 中心滞在時間 (A) 立ち上がり回数 (B) を評価した。○野生型マウス ●MAGI1 欠損マウス

オープンフィールドテストを行った結果、MAGI1 欠損マウスは中心滞在時間が野生型に比べ有意な低下を示し、また立ち上がり回数の有意な低下を示した (図3) 以上の結果から、MAGI1 欠損マウスにおいては不安様行動の増強が示唆された。そこで、明暗箱試験及び、高架式十字迷路試験によって、不安様行動の増強について検討を行ったが、明暗箱試験、高架式十字迷路試験のいずれにおいても MAGI1 欠損マウスは野生型に比べ、有意な行動異常を示さなかった。

次に、MAGI1 が鬱傾向について強制水泳試験 (図4) 及び、尾懸垂試験 (図5) によって検討した。

図4 強制水泳試験 不動時間を示した。○野生型マウス ●MAGI1 欠損マウス

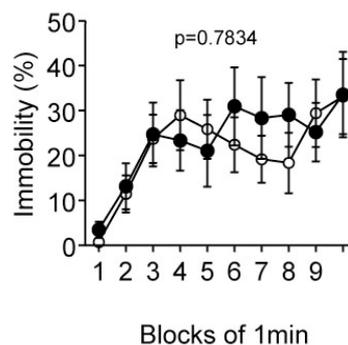
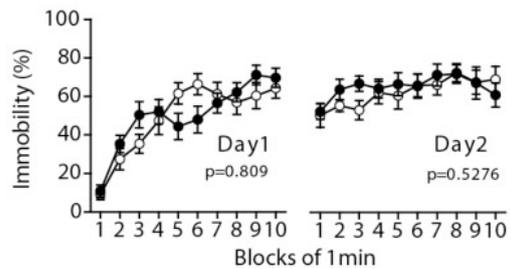


図5 尾懸垂試験

不動時間を示した。○野生型マウス ● MAGI1 欠損マウス

強制水泳試験、微懸垂試験のいずれにおいても MAGI1 欠損マウスは野生型と比べ有意な異常は示さなかったことから、MAGI1 は鬱様の行動には関与しないことが示唆された。

近年、自閉症スペクトラムにおいては興奮性と抑制性の神経伝達のバランス異常が原因ではないかと考えられている。MAGI1 欠損マウスにおいては不安様行動が上昇すること、また MAGI1 が抑制性神経の GABA シナプスに発現が認められようことから、社会性行動について検討を加えた。Crawly らの方法に従い社会性行動について検討を行った。フィールド内に今まで同じケージで飼育していたマウスと違うケージで飼育していたマウスのそれぞれをケージにいれ、テストされるマウスはどちらのケージの周囲に滞在しているかを検討することで社会性行動の評価を行った。

図 6 社会性試験 黒：同じケージで飼育していたマウスの周囲にいた滞在時間、白：初めて見るマウスの周囲にいた滞在時間。左：野生型 右：MAGI1 欠損マウス

野生型では、同じケージで飼育されていたマウスよりも初めて見るマウスの周囲にいる滞在時間のほうが長い傾向がみられたが、有意差はなかった。一方、MAGI1 欠損マウスでは、初めて見るマウスと同じケージで飼育されていたマウスと初めて見るマウスの周囲の滞在時間はほぼ同じであった。以上の結果から、MAGI1 は社会性に弱いながらも関与することが示唆された。

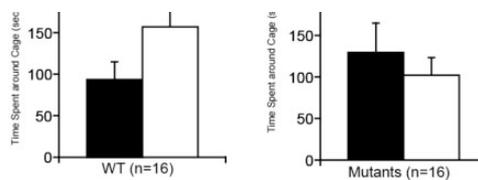
これらの結果から、MAGI1 は (1) 脳においては神経細胞に発現し、シナプスに局在が見られシナプス直下にシナプス情報伝達タンパク質を集積させている可能性があること・ (2) 不安様行動および社会性行動に関与している可能性があること が示唆された。MAGI1 の生理的機能においては、まだ研究の余地があるが、当初予定していた MAGI1 を介した基底膜構造の生理的意義については、一定の成果が得られた。

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 4 件)

1. Intragastric administration of allyl isothiocyanate reduces hyperglycemia in



intraperitoneal glucose tolerance test (IPGTT) by enhancing blood glucose consumption in mice. Mori N, Kurata M, Yamazaki H, Hosokawa H, Nadamoto T, Inoue K, Fushiki T. J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo). 2013;59(1):56-63.

2. The distribution of transient receptor potential melastatin-8 in the rat soft palate, epiglottis, and pharynx.

Sato T, Fujita M, Kano M, Hosokawa H, Kondo T, Suzuki T, Kasahara E, Shoji N, Sasano T, Ichikawa H.

Cell Mol Neurobiol. 2013 Mar;33(2):161-5. doi: 10.1007/s10571-012-9888-1. Epub 2012 Nov 7.

3. Intragastric administration of allyl isothiocyanate increases carbohydrate oxidation via TRPV1 but not TRPA1 in mice.

Mori N, Kawabata F, Matsumura S, Hosokawa H, Kobayashi S, Inoue K, Fushiki T.

Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. 2011 Jun;300(6):R1494-505.

4. Cooling-sensitive TRPM8 is thermostat of skin temperature against cooling.

Tajino K, Hosokawa H, Maegawa S, Matsumura K, Dhaka A, Kobayashi S.

PLoS One. 2011 Mar 2;6(3):e17504

[学会発表] (計 0 件)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

○取得状況 (計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

[その他]

ホームページ等

<http://www.bioinfo.ist.i.kyoto-u.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

細川浩 (HOSOKAWA HIROSHI) 京都大学 大学院情報学研究科 講師

研究者番号 : 90359779

(2) 研究分担者

()

研究者番号 :

(3) 連携研究者

()

研究者番号 :