

## 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24年 5月28日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2011

課題番号：22700390

研究課題名（和文） グルタミン酸受容体（GluR） $\delta$ 2を介したシナプス形成の分子機構の解明研究課題名（英文） Study on molecular mechanisms of synapse formation by glutamate receptor (GluR)  $\delta$ 2

研究代表者

植村 健 (UEMURA TAKESHI)

東京大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：00372368

研究成果の概要（和文）：グルタミン酸受容体 GluR  $\delta$ 2 の N 末端細胞外領域に分泌蛋白質 Cbln1 を介して neurexin が結合することを見いだした。GluR  $\delta$ 2 および neurexin は共に Cbln1 の受容体であり、シナプス後部の GluR  $\delta$ 2 が分泌蛋白 Cbln1 を介してシナプス前部の neurexin と結合することで3者複合体を形成し、平行線維-プルキンエ細胞間のシナプス形成を制御しているといった全く新しいシナプス形成の様式を明らかにした。

研究成果の概要（英文）：The N-terminal domain of glutamate receptor GluR  $\delta$ 2 interacts with neurexins through secreted Cbln1. Cbln1 is a ligand for both GluR  $\delta$ 2 and neurexins. *Trans*-synaptic interaction of postsynaptic GluR  $\delta$ 2 and presynaptic neurexins through Cbln1 mediates parallel fiber-Purkinje cell synapse formation in the cerebellum.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2011年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：神経科学・神経化学・神経薬理学

キーワード：神経伝達物質・受容体

## 1. 研究開始当初の背景

神経細胞間のシナプス形成とその再編は発達期における神経回路の構築のみならず、記憶・学習といった脳高次機能の発現に重要な役割を果たしている。また、精神遅滞、自閉症などの精神疾患は脳のシナプス形成の不

全をはじめとする脳の発達障害が関係していると考えられている。近年、シナプス形成に関わる分子としていくつかの候補分子が同定されてきたが、これらの分子を欠損させたマウス脳ではシナプスは正常に形成されており、シナプス形成の分子機構は依然とし

て不明であった。グルタミン酸受容体 GluR $\delta$ 2 は in vivo で小脳シナプス形成に重要な役割を担う分子であり、培養神経細胞を用いた実験で、GluR $\delta$ 2 の N 末端細胞外領域 (NTD) が直接シナプス前終末を分化誘導する活性を有することが分かっていた。

## 2. 研究の目的

シナプス形成の分子基盤の解明は脳・神経がはたらくメカニズムの基本原理の理解のみならず脳精神疾患の病因の理解や新たな治療法の開発にとっても必須の重要課題であるが、中枢シナプス形成の分子基盤は不明な点が多い。そこで本研究では、in vivo で小脳平行線維-プルキンエ細胞間のシナプス形成に重要役割を果たしている分子である GluR $\delta$ 2 に着目し、GluR $\delta$ 2 の NTD に結合する分子をプロテオミクス解析により同定し、GluR $\delta$ 2 を介したシナプス形成の分子機構を明らかにすることで中枢シナプス形成の分子機構の解明を目指す。

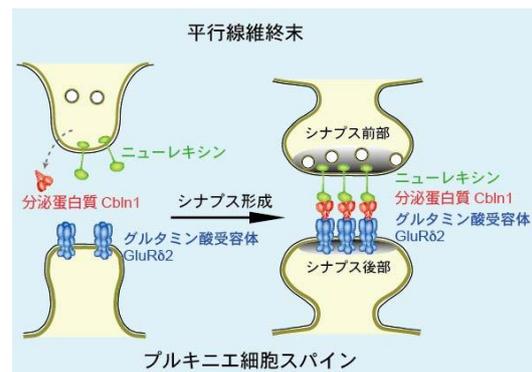
## 3. 研究の方法

磁気ビーズ上に GluR $\delta$ 2 の N 末端細胞外領域を結合させ、培養小脳顆粒細胞と共に培養する。磁気ビーズ上にシナプス前部の構造物を集積させた後、膜透過性蛋白質架橋剤を用いて結合分子を共有結合させる。次に、界面活性剤で蛋白質を可溶化した後、磁気ビーズを用いて効率良く結合蛋白質を精製する。精製した結合蛋白質は SDS-PAGE と銀染色またはネガティブ染色で解析し、ゲルに含まれる蛋白質をゲル内トリプシン消化した後、質量分析装置を用いて網羅的に解析する。この方法により、シナプス前終末の分化誘導の機能に直結した細胞質内蛋白質複合体を同定する。同定した分子と GluR $\delta$ 2 の結合は生化学的手法を用いて詳細に解析する。また、同定した分子に対する siRNA を作成し、培養小脳顆粒細胞で分子をノックダウンさせ、同定した分子が GluR $\delta$ 2 を介したシナプス前終末の分化誘導にどのように関わっているかを解析する。

## 4. 研究成果

GluR $\delta$ 2 の NTD をコートした磁気ビーズを培養神経細胞に添加し、シナプス前終末を分化誘導させた。その後、クロスリンカーで処理し、磁気ビーズを回収することで結合蛋白質を単離し、質量分析法にて解析した。その結果、GluR $\delta$ 2 の NTD に分泌蛋白質 Cbln1 を介して  $\beta$ -neurexin が結合することを見いだした。また、GluR $\delta$ 2 および  $\beta$ -neurexin は共に Cbln1 の受容体であることが明らかになった。Cbln1 欠損マウス由来の小脳顆粒細胞では、野生型マウス由来の小脳顆粒細胞で見られる GluR $\delta$ 2 のシナプス前終末の分化誘導能が消失していた。また、小脳顆粒細胞におい

て neurexin をノックダウンすると GluR $\delta$ 2 のシナプス前終末の分化誘導能が抑制されていた。さらに、Cbln1 のシナプス誘導活性には GluR $\delta$ 2 と Cbln1 の結合および neurexin と Cbln1 の結合が共に必要であることが明らかとなった。シナプス後部の GluR $\delta$ 2 が分泌蛋白質 Cbln1 を介してシナプス前部の neurexin と結合することで 3 者複合体を形成し、シナプス形成を制御しているといった全く新しいシナプス形成の様式を見出した。



シナプス後部の GluR $\delta$ 2 がシナプス前部の Neurexin と分泌蛋白質 Cbln1 を介して結合することにより三者複合体を形成することで小脳シナプス形成を調節していることが明らかとなった。これらの蛋白質のうち、Cbln1 は Cbln ファミリーに属する蛋白質で Cbln1, 2, 3, 4 が脳に存在し、小脳以外の脳部位においては Cbln1, 2, 4 が発現していることが報告されているが分子機能は不明であった。Cbln1, 2, 4 の前脳における受容体候補分子との結合を表面プラズモン共鳴法、pull-down 法等の生化学的手法を用いて解析した結果、Cbln1, Cbln2 は splice segment4 を有する neurexin1  $\alpha$ 、neurexin1  $\beta$ 、neurexin3  $\beta$ 、neurexin3  $\beta$  と強く結合し、さらに GluR $\delta$  ファミリーに属する GluR $\delta$ 1 とも強く結合することが明らかとなった。一方、Cbln4 は  $\alpha$ -,  $\beta$ -Neurexin、GluR $\delta$ 1 とは非常に弱い結合能しか有しないことが明らかになった。大脳皮質初代培養神経を用いて Cbln1, 2, 4 の分子機能を解析した結果、Cbln1, Cbln2 は大脳皮質神経細胞においてはシナプス前部の neurexin を介して興奮性、抑制性のシナプス前終末を共に分化誘導する活性を有することが示唆された。また、大脳皮質神経細胞において Cbln1, 2 は興奮性に比べ抑制性のシナプス前部をより強く分化誘導する活性を有することが示唆された。

## 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6件)

- ① Yasumura M, Yoshida T, Lee S, Uemura T, Joo J, Mishina M. (2012) Glutamate receptor  $\delta 1$  induces preferentially inhibitory presynaptic differentiation of cortical neurons by interacting with neurexins through cerebellin precursor protein subtypes. The Journal of Neurochemistry 121, 705-716. 査読有. doi: 10.1111/j.1471-4159.2011.07631.x.
- ② Lee S, Uemura T, Yoshida T, Mishina M. (2012) GluR  $\delta 2$  assembles four neurexins into trans-synaptic triad to trigger synapse formation. The Journal of Neuroscience 32, 4688-4701. 査読有. doi: 10.1523/JNEUROSCI.5584-11.2012
- ③ Yoshida T, Shiroshima T, Lee S, Yasumura M, Uemura T, Chen X, Iwakura Y, Mishina M. (2012) Interleukin-1 receptor accessory protein organizes neuronal synaptogenesis as a cell adhesion molecule. The Journal of Neuroscience 32, 2588-2600. 査読有. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4637-11.2012
- ④ Yoshida T, Yasumura M, Uemura T, Lee S, Ra M, Taguchi R, Iwakura Y, Mishina M. (2011) IL-1 receptor accessory protein-like 1 associated with mental retardation and autism mediates synapse formation by *trans*-synaptic interaction with protein tyrosine phosphatase  $\delta$ . The Journal of Neuroscience 31, 13485-13499. 査読有. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2136-11.2011
- ⑤ Joo J, Lee S, Uemura T, Yoshida T, Yasumura M, Watanabe M, Mishina M. (2011) Differential interactions of cerebellin precursor protein (Cbln) subtypes and neurexin variants for synapse formation of cortical neurons. Biochemical and Biophysical Research Communications 406, 627-632. 査読有. doi: 10.1016/j.bbrc.2011.02.108
- ⑥ Uemura T, Lee S, Yasumura M, Takeuchi T, Yoshida T, Ra M, Taguchi R, Sakimura K, Mishina M. (2010) *Trans*-synaptic interaction of GluR  $\delta 2$  and neurexin

through Cbln1 mediates synapse formation in the cerebellum. Cell 141, 1068-1079. 査読有. doi: 10.1016/j.cell.2010.04.035

[学会発表] (計23件)

- ① 吉田知之、安村美里、植村健、李聖眞、羅紋眞、田口良、岩倉洋一郎、三品昌美. 精神遅滞、自閉症の原因遺伝子産物 IL1RAPL1 はPTP  $\delta$  とトランスシナプティック複合体を形成して興奮性シナプス形成を誘導する. 第85回日本薬理学会年会. 2012年3月16日(京都国際会議場、京都府)
- ② 李聖眞、植村健、吉田知之、三品昌美. GluR  $\delta 2$  はNeurexinを四量体化する事によってシナプス形成を誘導する. 第85回日本薬理学会年会. 2012年3月14日(京都国際会議場、京都府)
- ③ 植村健. 小脳シナプス形成をつかさどる GluR  $\delta 2$  -Cbln1-Neurexin三者複合体. Advanced Imaging Seminar 東京大学・ライカマイクロシステムズ イメージングセンター5周年記念. 2011年11月29日(東京大学薬学部総合研究棟2階講堂、東京都)
- ④ 植村健. GluR  $\delta 2$  -Cbln1-Neurexin三者複合体による小脳シナプス形成の制御. 包括脳ネットワーク研究会 大阪大学蛋白質研究所セミナー第2回神経科学と構造生物学の融合. 2011年11月21日(岡崎コンファレンスセンター中会議室、愛知県)
- ⑤ 安村美里、吉田知之、李聖眞、植村健、朱宰烈、三品昌美. Glutamate receptor  $\delta 1$  preferentially stimulates inhibitory synapse formation of cortical neurons. Society for Neuroscience 41th Annual Meeting. 2011年11月14日(ウォルター ワシントン コンベンションセンター、アメリカ合衆国)
- ⑥ 李聖眞、植村健、吉田知之、三品昌美. Tetrameric GluR  $\delta 2$  for cerebellar synapse formation. Society for Neuroscience 41th Annual Meeting. 2011年11月14日(ウォルター ワシントン コンベンションセンター、アメリカ合衆国)
- ⑦ 三品昌美、吉田知之、安村美里、植村健、李聖眞. IL1RAPL1 Associated with Mental Retardation and Autism Organizes

- Synapse Formation through Trans-Synaptic Interaction with PTP  $\delta$ . Cell Symposia: Autism Spectrum Disorders: From Mechanisms to Therapies. 2011年11月12日(ウォルター ワシントン コンベンションセンター、アメリカ合衆国)
- ⑧ 李聖眞、植村健、吉田知之、三品昌美. Interaction among GluR  $\delta$  2, Cbln1 and NRXN1  $\beta$  in the trans-synaptic triad essential for cerebellar synapse formation. The 4th Molecular and cellular cognition society-ASIA Symposium. 2011年9月19日(ソウル大学、韓国)
- ⑨ 安村美里、吉田知之、李聖眞、植村健、朱宰烈、三品昌美. Trans-synaptic interaction of Glutamate receptor  $\delta$  1 and neurexins through Cbln subtypes induces preferentially inhibitory presynaptic differentiation of cortical neurons. The 4th Molecular and cellular cognition society-ASIA Symposium. 2011年9月19日(ソウル大学、韓国)
- ⑩ 吉田知之、安村美里、植村健、李聖眞、羅紋眞、田口良、岩倉洋一郎、三品昌美. IL1RAPL1 associated with mental retardation and autism organizes synaptogenesis through trans-synaptic interaction with PTP  $\delta$ . The 4th Molecular and cellular cognition society-ASIA Symposium. 2011年9月19日(ソウル大学、韓国)
- ⑪ 朱宰烈、李聖眞、植村健、吉田知之、安村美里、渡辺雅彦、三品昌美. Presynaptic differentiation of cortical neurons by cerebellin precursor protein (Cbln) subtypes and Neurexin variants interaction. The 4th Molecular and cellular cognition society-ASIA Symposium. 2011年9月19日(ソウル大学、韓国)
- ⑫ 植村健、李聖眞、安村美里、吉田知之、三品昌美. Trans-synaptic triad of postsynaptic GluR  $\delta$  2, Cbln1, and presynaptic NRXN essential for cerebellar synapse formation. The 4th Molecular and cellular cognition society-ASIA Symposium. 2011年9月19日(ソウル大学、韓国)
- ⑬ 朱宰烈、李聖眞、植村健、吉田知之、安村美里、渡辺雅彦、三品昌美. 大脳Cblnサブタイプは neurexin の特異的バリエーションと相互作用することにプレシナプスの分化を誘導する. 第34回日本神経科学大会. 2011年9月16日(パシフィコ横浜、神奈川県)
- ⑭ 安村美里、吉田知之、李聖眞、朱宰烈、植村健、三品昌美. グルタミン酸受容体  $\delta$  1はCblnサブタイプを介してNeurexinと相互作用することで、大脳皮質の抑制性プレシナプスの分化をより強く誘導する. 第34回日本神経科学大会. 2011年9月15日(パシフィコ横浜、神奈川県)
- ⑮ 植村健、李聖眞、安村美里、吉田知之、三品昌美. グルタミン酸受容体  $\delta$  2はCbln1を介して $\alpha$ -および $\beta$ -neurexinと結合し小脳シナプス形成を調節する. 第34回日本神経科学大会. 2011年9月15日(パシフィコ横浜、神奈川県)
- ⑯ 安村美里、吉田知之、李聖眞、朱宰烈、植村健、三品昌美. グルタミン酸受容体  $\delta$  1との結合の親和性はCblnファミリー間で差がある. 第84回日本薬理学会年会. 2011年3月24日(紙上開催)
- ⑰ 植村健、李聖眞、安村美里、竹内倫徳、吉田知之、羅紋眞、田口良、崎村建司、三品昌美. GluR  $\delta$  2-Cbln1-NRXN三者複合体による小脳シナプス形成の調節. 第84回日本薬理学会年会. 2011年3月24日(紙上開催)
- ⑱ 朱宰烈、李聖眞、植村健、吉田知之、安村美里、三品昌美. 大脳皮質ニューロンのプレシナプスの分化誘導におけるCblnサブタイプとneurexinバリエーションの相互作用. 第84回日本薬理学会年会. 2011年3月22日(紙上開催)
- ⑲ 李聖眞、植村健、三品昌美. Stoichiometry of GluR  $\delta$  2-Cbln1-Neurexin1  $\beta$  triad. 第84回日本薬理学会年会. 2011年3月22日(紙上開催)
- ⑳ 植村健、李聖眞、安村美里、竹内倫徳、吉田知之、羅紋眞、田口良、崎村建司、三品昌美. *Trans*-synaptic interaction of glutamate receptor  $\delta$  2 and neurexin through Cbln1 mediates cerebellar synapse formation. 40<sup>th</sup> Annual Meeting of the Society for Neuroscience. 2010年11月15日(サンディエゴコンベンションセンター、アメリカ合衆国)

⑳ 安村美里、竹内倫徳、植村健、崎村建司、三品昌美. Control of synaptic connection by inducible and granule cell-specific knockout of Cbln1 in the adult cerebellum. 第33回日本神経科学大会. 2010年9月3日 (神戸コンベンションセンター、兵庫県)

㉑ 植村健、李聖眞、安村美里、吉田知之、羅紋眞、田口良、三品昌美. Glutamate receptor  $\delta 2$  regulates cerebellar synapse formation by interacting with presynaptic Neurexin through Cbln1. 第33回日本神経科学大会. 2010年9月3日 (神戸コンベンションセンター、兵庫県)

㉒ 李聖眞、植村健、三品昌美. Biochemical study of novel synaptic triad, GluR  $\delta 2$ -Cbln1-Neurexin. 第33回日本神経科学大会. 2010年9月2日 (神戸コンベンションセンター、兵庫県)

[その他]

ホームページ

<http://www.pharmacol2.m.u-tokyo.ac.jp/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

植村 健 (UEMURA TAKESHI)

東京大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：00372368

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし