

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 4 日現在

機関番号：34315

研究種目：基盤研究(A)

研究期間：2012～2014

課題番号：24249014

研究課題名(和文) 脳シナプス形成機構解明からの精神疾患関連分子標的探索

研究課題名(英文) Investigation of mental disorder-related molecules through brain synapse formation mechanisms

研究代表者

三品 昌美 (Mishina, Masayoshi)

立命館大学・総合科学技術研究機構・教授

研究者番号：80144351

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 34,700,000円

研究成果の概要(和文)：グルタミン酸受容体GluR 2 がneurexinの4量体化を促し、小脳皮質のシナプス形成を誘導することを明らかにした。知的障害と自閉症の原因分子であるIL1RAPL1の細胞内領域に結合するMcf2lとその下流のRhoA-ROCKシグナルが大脳皮質神経細胞のスパイン形成誘導に働くことを示した。また、IL-1RacPもシナプス前部のPTPと相互作用することにより興奮性シナプス形成を制御していることを見出した。さらに、IL1RAPL1-PTP複合体の結晶構造を解析し、PTPに挿入されたmini-exonペプチドがIL1RAPL1との相互作用に重要であることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：We showed that glutamate receptor GluR 2 triggers cerebellar synapse formation by clustering four neurexins through trans-synaptic interaction. In the cerebrum, IL1-receptor accessory protein-like 1 (IL1RAPL1) responsible for intellectual disability and autism spectrum disorder induces spine formation of cortical neurons through Mcf2l-RhoA-ROCK signaling. We found that in addition to IL1RAPL1, IL-1RacP also mediates synapse formation of cortical neurons through interaction with presynaptic PTP. Furthermore, by analyzing the structure of crystalized PTP-IL1RAPL1 complex, we showed that mini-exon peptides inserted into immunoglobulin-like domains of PTP play critical roles in the interaction with IL1RAPL1.

研究分野：神経科学

キーワード：神経科学 脳神経疾患 遺伝子 シナプス 学習 知的障害 自閉症

1. 研究開始当初の背景

近年、シナプス後部のグルタミン酸受容体は多様な PSD 蛋白と巨大な複合体を形成してシナプスにおける情報伝達を担っていることが明らかとなってきた。脳における様々な特徴を有するシナプスの多様性の基礎にはシナプス分子の多様性があるものと考えられる。一方、ヒトゲノム解析の進展により、統合失調症、自閉症、精神遅滞などの精神神経疾患の原因あるいは危険因子と考えられる遺伝子が次々と明らかにされ、これらの疾患関連分子はいずれも中枢シナプスの形成や機能に関与すると想定されている。このような状況の下、多数の中枢シナプス分子と疾患関連分子から創薬標的の同定に至る隘路は、機能解析である。

2. 研究の目的

高等動物の脳機能は多様な神経細胞が形成する膨大なネットワークに基づいている。遺伝情報と経験に基づく神経細胞の回路網形成の鍵となるシナプス形成の分子機構を解明することが、脳の発達と構築ならびに脳高次機能を理解し、その破綻から生じる脳神経疾患を克服するために必要不可欠である。最近、我々は世界に先駆けて脳におけるシナプス形成の分子機構を解明することに成功した (Cell, 2010)。これらの実績を基盤に、精神遅滞、自閉症、統合失調症等の精神疾患と関わる膜蛋白質によるシナプス形成の分子機構を中心に、脳シナプス形成の分子機構を解明することを目的とする。シナプス形成の障害と精神疾患との関係の解明に貢献し、バイオマーカーや治療薬開発に貢献することが期待される。

3. 研究の方法

脳の初代培養神経細胞を用いた *in vitro* 解析系と網羅的プロテオミクス解析に *in vivo* 機能解析系を組み合わせる手法を用いることにより、大脳神経細胞のシナプス形成を制御するシナプスオーガナイザーの多様性と役割を解明する。精神遅滞、自閉症、統合失調症等の精神疾患と関わりと推定されている膜蛋白質を対象に、培養神経細胞を用いるシナプス形成能解析と網羅的プロテオミクス解析により大脳シナプス形成に関わる中心分子を単離し、*in vivo* におけるシナプス形成機能を解析する。

4. 研究成果

(1) グルタミン酸受容体 GluR82 はシナプス前部の β -Neurexin と Cbln1 を介して結合することにより小脳皮質のシナプス形成を誘導する (Cell, 2010)。GluR82 によるシナプス形成誘導の機構を明らかにする目的で、GluR82/Cbln1/ β -Neurexin の三者複合体の量比を解析し、4 量体 GluR82 の 1 分子に 6 量体 Cbln1 が 2 分子、単量体 β -Neurexin が 4 分子の比率で結合していることを見だし

た。したがって、GluR82 が Cbln1 を介して結合することによりシナプス前部に存在する Neurexin の 4 量体化を促し、シナプス形成を誘導することを明らかにした。Neurexin の 4 量体化により C 末端を介する蛋白質相互作用が引き起こされ、シナプス前部の神経伝達物質放出装置 active zone を構成する蛋白質群の組織化が進むことがシナプス形成の引き金になることが推察された。

(2) 知的障害と自閉症の原因分子として知られる IL1-receptor accessory protein-like 1 (IL1RAPL1) がシナプス前部の受容体型チロシン脱リン酸化酵素 PTP6 と相互作用することにより、大脳皮質神経細胞のシナプス形成を制御していることを明らかにし、IL1RAPL1 の欠損は神経ネットワーク形成の不全を引き起こし、知的障害と自閉症の引き金となっていることを提唱した。IL1RAPL1 による大脳皮質神経細胞シナプス形成の分子機構を明らかにするために、affinity chromatography により単離した IL1RAPL1 の細胞内領域に結合する 5 種類の細胞内分子の機能を調べた。IL1RAPL1 によるスパイン形成誘導に必要な TIR domain に結合する分子に焦点を絞り、大脳皮質神経細胞の Mcf2l をロックダウンすると IL1RAPL1 によるスパイン形成誘導能が障害されることを見いだした。さらに、Mcf2l シグナルの下流の RhoA 及び ROCK シグナルを阻害すると IL1RAPL1 によるスパイン形成誘導が低下することを明らかにした。また、IL1RAPL1 から Mcf2l を経由する RhoA-ROCK シグナルが AMPA 型グルタミン酸受容体のシナプス膜挿入を制御し、興奮性シナプスの安定化に寄与することを明らかにした。

(3) IL1RAPL1 と類似した構造を持つ IL1 受容体ファミリーの全てについてシナプス形成誘導能を検定し、IL-1 receptor accessory protein (IL-1RAcP) がシナプス前部の PTP6 と相互作用し、シナプス間接着分子として働くことにより大脳皮質神経細胞の興奮性シナプス形成を制御していることを明らかにした。脳に発現する IL-1RAcP の二つのアイソフォームは共にシナプス前部形成誘導能を示したが、シナプス後部形成誘導能は IL-1RAcPb のみが有していた。すなわち、IL-1RAcP は免疫・炎症反応と脳シナプス形成に関与することが示され、免疫系と神経系との間に分子的連関が見いだされたことは興味深い。

(4) 脳に発現する PTP6 には minixons にコードされた数アミノ酸の有無による splice variants が存在し、シナプス形成能および IL1RAPL1 との結合に大きく影響した。PTP6 と IL1RAPL1 の細胞膜外領域を Freestyle 293-F 細胞に発現させ、精製した両タンパク質の複合体を結晶化し、その立体構造を明らかにした。PTP6 の immunoglobulin-like domain 2 (Ig2) の中央

に挿入された miniexon A ペプチドは IL1RAPL1 の Ig1 との結合部位を構成した。一方、PTP6 の Ig2 と Ig3 の境界に挿入された miniexon B ペプチドは IL1RAPL1 の Ig1 を挟み込むための spacer として機能した。したがって、miniexon ペプチドは中枢シナプスオーガナイザー相互作用の特異性決定に重要であることが明らかとなった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 22 件)

Atsushi Yamagata, Tomoyuki Yoshida, Yusuke Sato, Sakurako Goto-Ito, Takeshi Uemura, Asami Maeda, Tomoko Shiroshima, Shiho Iwasawa-Okamoto, Hisashi Mori, Masayoshi Mishina and Shuya Fukai (2015) Mechanisms of splicing-dependent *trans*-synaptic adhesion by PTP6-IL1RAPL1/IL-1RAcP for synaptic differentiation. **Nat. Commun.** 6, 6926 (11 pages) (査読有り).

DOI: 10.1038/ncomms7926

Jakob von Engelhardt, Christina Bocklisch, Lars Tönges, Anne Herb, Masayoshi Mishina and Hannah Monyer (2015) GluN2D-containing NMDA receptors mediate synaptic currents in hippocampal interneurons and pyramidal cells in juvenile mice. **Front. Cell. Neurosci.** 9, 96 (16 pages) (査読有り).

DOI: 10.3389/fncel.2015.00095

Rachel Anne Daut, Erica Faye Busch, Jessica Ihne, Daniel Fisher, Masayoshi Mishina, Seth Grant, Marguerite Camp and Andrew Holmes (2015). Tolerance to ethanol intoxication after chronic ethanol: role of GluN2A and PSD-95. **Addict. Biol.** 20, 259-262 (査読有り).

DOI: 10.1111/adb.12110

安村美里, 吉田知之, 三品昌美 (2015) IL1RAPL1 欠損マウスの表現型解析. 日薬理誌 145, 187-192 (査読なし).

DOI: 10.1254/fpj.145.187.

Misato Yasumura, Tomoyuki Yoshida, Maya Yamazaki, Manabu Abe, Rie Natsume, Kouta Kanno, Takeshi Uemura, Keizo Takao, Kenji Sakimura, Takefumi Kikusui, Tsuyoshi Miyakawa and Masayoshi Mishina (2014). IL1RAPL1 knockout mice show spine density decrease, learning deficiency, hyperactivity and reduced anxiety-like behaviours. **Sci. Rep.** 4, 6613 (12 pages) (査読有り).

DOI: 10.1038/srep06613

Kristin Marquardt, Monica Saha, Masayoshi Mishina, Jared W. Young and Jonathan L. Brigman (2014). Loss of GluN2A-containing NMDA receptors impairs extra-dimensional set-shifting. **Genes Brain Behav.** 13, 611-617 (査読有り).

DOI: 10.1111/gbb.12156.

Miwako Yamasaki, Rieko Okada, Chihiro Takasaki, Shima Toki, Rie Natsume, Kenji Sakimura, Masayoshi Mishina, Tetsuo Shirakawa and Masahiko Watanabe (2014). Opposing role of NMDA receptor GluN2B and GluN2D in somatosensory development and maturation. **J. Neurosci.** 34, 11534-11548 (査読有り).

DOI: 10.1523/JNEUROSCI.1811-14.2014

Takeshi Harayama, Miki Eto, Hideo Shindou, Yoshihiro Kita, Eiji Otshubo, Daisuke Hishikawa, Satoshi Ishii, Kenji Sakimura, Masayoshi Mishina and Takao Shimizu (2014) Lysophospholipid acyltransferases mediate phosphatidylcholine diversification to achieve the physical properties required in vivo. **Cell Metab.** 20, 295-305 (査読有り).

DOI: 10.1016/j.cmet.2014.05.019.

Yuichiro Hayashi, Yoko Nabeshima, Katsunori Kobayashi, Tsuyoshi Miyakawa, Koichi Tanda, Keizo Takao, Hidenori Suzuki, Eisaku Esumi, Shigeru Noguchi, Yukiko Matsuda, Toshikuni Sasaoka, Tesuo Noda, Jun-ichi Miyazaki, Masayoshi Mishina, Kazuo Funabiki and Yo-ichi Nabeshima (2014) Enhanced stability of hippocampal place representation caused by reduced magnesium block of NMDA receptors in the dentate gyrus. **Mol. Brain** 7, 44 (17 pages) (査読有り).

DOI: 10.1186/1756-6606-7-44

Masaru Ikegami, Takeshi Uemura, Ayumi Kishioka, Kenji Sakimura and Masayoshi Mishina (2014) Striatal dopamine D1 receptor is essential for contextual fear conditioning. **Sci. Rep.** 4, 3976 (10 pages) (査読有り).

DOI: 10.1038/srep03976

Hideko Yamamoto, Etsuko Kamegaya, Wakako Sawada, Ryota Hasegawa, Toshifumi Yamamoto, Yoko Hagino, Yukio Takamatsu, Kazuhide Imai, Hisashi Koga, Masayoshi Mishina and Kazutaka Ikeda (2013). Involvement of the N-methyl-D-aspartate receptor GluN2D subunit in phencyclidine-induced motor impairment, gene expression, and increased Fos immunoreactivity. **Mol. Brain** 6, 56 (16 pages) (査読有り).

DOI: 10.1186/1756-6606-6-56

Katsunori Tomiyama, Risako Kato, Yaeko Hara, Masayuki Kobayashi, Masayoshi Mishina, Yuchio Yanagawa, Anthony Kinsella, Noriaki Koshikawa and John L. Waddington (2013) Phenotypic characterization of orofacial movement topography in mutants with disruption of

amino acid mechanisms: glutamate N2A/B/D [GluR ϵ 1/2/4] subtypes and the GABA synthesizing enzyme GAD65. **Neuroscience** 250, 743-754 (査読有り).

DOI: 10.1016/j.neuroscience.2013.07.038

Ning Bai, Tomomi Aida, Michiko Yanagisawa, Sayaka Katou, Kenji Sakimura, Masayoshi Mishina and Kohichi Tanaka (2013) NMDA receptor subunits have different roles in NMDA-induced neurotoxicity in the retina. **Mol. Brain** 6, 34 (9 pages) (査読有り).

DOI:10.1186/1756-6606-6-34

Masayuki Miyazaki, Yukihiko Noda, Akihiro Mouri, Kazuto Kobayashi, Masayoshi Mishina, Toshitaka Nabeshima and Kiyofumi Yamada (2013) Role of convergent activation of glutamatergic and dopaminergic systems in the nucleus accumbens in the development of methamphetamine psychosis and dependence. **Int. J. Neuropsychopharmacol.** 16, 1341-1350 (査読有り).

DOI:10.1017/S1461145712001356

Takashi Hayashi, Tomoyuki Yoshida, Moonjin Ra, Ryo Taguchi and Masayoshi Mishina (2013) IL1RAPL1 associated with mental retardation and autism regulates the formation and stabilization of glutamatergic synapses of cortical neurons through RhoA signaling pathway. **PLoS ONE** 8, e66254 (12 pages) (査読有り).

DOI:10.1371/journal.pone.0066254

Ning Bai, Hideki Hayashi, Tomomi Aida, Kazuhiko Namekata, Takayuki Harada, Masayoshi Mishina and Kohichi Tanaka (2013) Dock3 interaction with a glutamate-receptor NR2D subunit protects neurons from excitotoxicity. **Mol. Brain** 6, 22 (11 pages) (査読有り).

DOI:10.1186/1756-6606-6-22

Ayumi Kishioka, Takeshi Uemura, Fumiaki Fukushima and Masayoshi Mishina (2013) Consolidation of auditory fear memories formed by weak unconditioned stimuli requires NMDA receptor activation and *de novo* protein synthesis in the striatum. **Mol. Brain** 6, 17 (9 pages) (査読有り).

DOI: 10.1186/1756-6606-6-17

Keita Sasaki, Tatsuro Yamasaki, Idowu O Omotuyi, Masayoshi Mishina and Hiroshi Ueda (2013) Age-dependent dystonia in striatal Gy7 deficient mice is reversed by the dopamine D2 receptor agonist pramipexole. **J. Neurochem.** 124, 844-854 (査読有り).

DOI: 10.1111/jnc.12149

Lauren Debrouse, Benita Hurd, Carly Kiselycznyk, Aaron Plitt, Alyssa Todaro,

Masayoshi Mishina, Seth Grant, Marguerite Camp, Ozge Gunduz Cinar and Andrew Holmes (2013) Probing the modulation of acute ethanol intoxication by pharmacological manipulation of the NMDAR glycine coagonist site. **Alcohol. Clin. Exp. Res.** 37, 223-233 (査読有り).

DOI: 10.1111/j.1530-0277.2012.01922.x.

Masayoshi Mishina, Takeshi Uemura, Misato Yasumura and Tomoyuki Yoshida (2012) Molecular mechanism of parallel fiber-Purkinje cell synapse formation. **Front. Neural Circuits** 6, 90 (9 pages) (査読有り).

DOI: 10.3389/fncir.2012.00090

²¹ Sung-Jin Lee, Takeshi Uemura, Tomoyuki Yoshida and Masayoshi Mishina (2012) GluR δ 2 assembles four neuroligins into *trans*-synaptic triad to trigger synapse formation. **J. Neurosci.** 32, 4688-4701 (査読有り).

DOI: 10.1523/JNEUROSCI.5584-11.2012

²² Tomoyuki Yoshida, Tomoko Shiroshima, Sung-Jin Lee, Misato Yasumura, Takeshi Uemura, Xigui Chen, Yoichiro Iwakura and Masayoshi Mishina (2012) Neuronal isoform of an essential subunit of receptors for interleukin-1 family cytokines organizes synaptogenesis in the brain. **J. Neurosci.** 32, 2588-2600 (査読有り).

DOI: 10.1523/JNEUROSCI.4637-11.2012

[学会発表](計12件)

Tomoyuki Yoshida, Tomoko Shiroshima, Maya Yamazaki, Manabu Abe, Atsushi Yamagata, Shuya Fukai, Hisashi Mori, Kenji Sakimura, Yoichiro Iwakura and Masayoshi Mishina. Regulatory mechanism of central synapse formation by IL-1 receptor family proteins. The 37th Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan, 2014年11月26日, パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市).

Masayoshi Mishina, Masaru Ikegami, Takeshi Uemura, Ayumi Kishioka and Kenji Sakimura. Striatal dopamine D1 receptor is essential for contextual fear conditioning. The 37th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society, 2014年9月13日, パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市).

Misato Yasumura and Masayoshi Mishina. Phenotypic analysis of IL1RAPL1 knockout mice. The 87th Annual Meeting of The Japanese Pharmacological Society, 2014年3月21日, 仙台国際センター(宮城県・仙台市).

Hideko Yamamoto, Etsuko Kamegaya, Yoko Hagino, Yukio Takamatsu, Toshifumi Yamamoto, Masayoshi Mishina and

Kazutaka Ikeda. Negative emotional states in the GluN2D subunit knockout mice. The 43rd Annual Meeting of the Society for Neuroscience, November 13, 2013, San Diego (California, USA).

Masayoshi Mishina. Synapse formation in the brain and developmental disorders. The 12th Meeting of Asia Pacific Federation of Pharmacologists, July 10, 2013, Shanghai (China).

Misato Yasumura, Tomoyuki Yoshida, Keizo Takao, Maya Yamazaki, Manabu Abe, Takeshi Uemura, Tsuyoshi Miyakawa, Kenji Sakimura and Masayoshi Mishina. Behavioral phenotypes of IL1RAPL1 knockout mice. The 36th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society, 2013年6月22日, 国立京都国際会館 (京都府・京都市).

Takashi Hayashi, Tomoyuki Yoshida and Masayoshi Mishina. IL1RAPL1 regulates the formation and stabilization of glutamatergic synapses of cortical neurons through RhoA signaling pathway. The 36th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society, 2013年6月20日, 国立京都国際会館 (京都府・京都市).

Takashi Hayashi, Tomoyuki Yoshida and Masayoshi Mishina. IL1RAPL1 associated with mental retardation and autism regulates the formation and stabilization of glutamatergic synapses of cortical neurons through RhoA signaling pathway. The 86th Annual Meeting of The Japanese Pharmacological Society, 2013年3月23日, 福岡国際会議場 (福岡県・福岡市).

Noriko Isoo, Takae Ohno, Mutsumi Isowaki, Naoyuki Murabe, Masayoshi Mishina and Masaki Sakurai. Closure of the critical period in developmental corticospinal plasticity could be regulated by the synaptic expression levels of GluN2B-subunit containing NMDA receptors. The 35th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society, 2012年9月21日, 名古屋国際会議場 (愛知県・名古屋市).

Takeshi Uemura, Sung-Jin Lee, Tomoyuki Yoshida and Masayoshi Mishina. GluRδ2 regulates synapse formation by clustering four neurexins through triad formation. The 35th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society, 2012年9月20日, 名古屋国際会議場 (愛知県・名古屋市).

Tomoyuki Yoshida, Tomoko Shiroshima, Sung-Jin Lee, Misato Yasumura, Takeshi Uemura, Xigui Chen, Yoichiro Iwakura and Masayoshi Mishina. Interleukin-1 receptor accessory protein functions as a neuronal cell adhesion molecule to organize synaptogenesis. The 35th Annual

Meeting of the Japan Neuroscience Society, 2012年9月20日, 名古屋国際会議場 (愛知県・名古屋市).

Takae Ohno, Mutsumi Isowaki, Noriko Isoo, Naoyuki Murabe, Hitoshi Maeda, Satoshi Fukuda, Masayoshi Mishina and Masaki Sakurai. Is it possible to manipulate the critical period? The 35th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society, 2012年9月18日, 名古屋国際会議場 (愛知県・名古屋市).

〔図書〕(計2件)

三品昌美他、分子脳科学、化学同人(2015)、312頁

Masayoshi Mishina, Tomoyuki Yoshida, Misato Yasumura and Takeshi Uemura (2013) Synapse formation in the brain. In “**Cortical Development: Neural Diversity and Neocortical Organization**” (Ryuichiro Kageyama and Tetsuo Yamamori eds), pp. 229-247, Springer Japan.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

三品 昌美 (MISHINA, Masayoshi)
立命館大学・総合科学技術研究機構・教授
研究者番号：80144351

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

吉田 知之 (YOSHIDA, Tomoyuki)
富山大学・大学院医学薬学研究部・准教授
研究者番号：90372367

植村 健 (UEMURA, Takeshi)
信州大学・医学部・准教授
研究者番号：00372368