

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 2 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590354

研究課題名(和文) シナプス形成におけるアフアディンとネクチンの機能の解析

研究課題名(英文) Roles of afadin and nectins in synapse formation

研究代表者

萬代 研二 (MANDAI, Kenji)

神戸大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：50322186

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：海馬苔状線維シナプスの形成と機能発現におけるアフアディンの機能を解析した。アフアディンは、シナプスのブクダドヘレンシアジャンクションを構成するネクチンやカドヘリンなどの分子や、シナプス前部を構成するバスーンやVGLUT1などの分子の集積に必要であり、興奮性シナプスのシナプス前性と後性の機能を制御していることを明らかにした。さらに、発生期の脳においては、アフアディンは中脳水道の形態形成と、幹細胞から新しく生成された神経細胞の遊走や大脳新皮質の層形成に必要であることを明らかにした。一方、嗅球の僧帽細胞の樹状突起がネクチン-1を介した新しい接着装置によって接着していることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：We investigated the roles of afadin in synapse formation and synaptic functions in the hippocampus. At mossy fiber-CA3 pyramidal cell synapses, afadin was required for the accumulation of the PAJ components, nectin-1, nectin-3 and N-cadherin, and for the accumulation of the presynaptic components, VGLUT1 and bassoon. In addition, afadin regulated pre- and post-synaptic functions in cultured hippocampal excitatory neurons. We also investigated the roles of afadin in the developing brain. In the midbrain, afadin was required for morphogenesis of the cerebral aqueduct, and in the neocortex, afadin was required for the formation of the six-layered laminated architecture by regulating neural migration. Furthermore, we investigated the roles of nectin-1 in the olfactory bulb and showed that nectin-1 constituted a novel adhesion apparatus that tethered mitral cell dendrites in a dendritic meshwork structure of the developing mouse olfactory bulb.

研究分野：分子神経生物学

キーワード：シナプス形成 アフアディン ネクチン 海馬 大脳新皮質 中脳水道 嗅球 分子神経生物学

1. 研究開始当初の背景

神経シナプスは神経細胞間の特殊な細胞間接着であり、その特異性と可塑性の制御には細胞間接着分子が重要な役割を果たしている。研究代表者が見出したアフアディンとネクチンは、上皮細胞や線維芽細胞の細胞間の接着装置であるアドヘレンスジャンクションに局在する接着分子として機能している (Takai et al., *Annu Rev Cell Dev Biol.*, 2008)。ネクチンは、免疫グロブリンスーパーファミリーに属する接着分子で、4つのメンバーからなるサブファミリーを構成する。アフアディンは F-アクチンに結合する細胞内裏打ちタンパク質で、ネクチンをアクチン細胞骨格系に連結して細胞間接着を形成する。さらに、アフアディンは、細胞の運動時には、ネクチンと結合しないで、PDGF や VEGF などの走化性因子の作用によって運動先端で活性化される Rap と結合し、方向性を持った細胞運動を制御している。一方、海馬 CA3 野の錐体細胞と苔状線維終末とのシナプス (以下、苔状線維シナプス) には上皮細胞の細胞間接着装置と類似の構造であるプンクタアドヘレンシアジャンクション (PAJ) とよばれる構造が発達している。この PAJ はアクティブゾーンとシナプス後肥厚部 (PSD) を含むシナプス結合の直近に存在する。PAJ の前・後シナプス膜の形態は対称的で、PAJ にはネクチン-アフアディン系とカドヘリン-カテニン系が局在する。苔状線維シナプスでは、カドヘリンは PAJ の前・後シナプスに対称性に局在してトランスに結合しているが、ネクチン-1 とネクチン-3 はそれぞれ前シナプス膜と後シナプス膜に非対称に局在してトランスに結合している。一方、アフアディンはそれらの両方に対称的に局在する (Mizoguchi et al., 2002)。ネクチン-1 またはネクチン-3 欠損マウスでは、シナプス一つあたりの PAJ の数が減少し、正常なシナプスが形成されない。また、生後 2 週頃よりアフアディンの発現が海馬において欠損するアフアディンコンディショナルノックアウトマウスの解析により、シナプス結合の維持にはアフアディンは必須ではないが、シナプスの再構成に関与することが示唆されている (Majima et al., 2009)。一方、アフアディンは統合失調症の患者脳でその発現が低下していると報告されている。ネクチンにおいては、ネクチン-1 遺伝子変異が、精神発達遅滞を伴うマルガリータ島の遺伝性外胚葉異形成症候群 / Zlotogora-Ogur 症候群の原因であることが報告され、ネクチン-4 遺伝子についても遺伝子の変異が遺伝性外胚葉異形成症候群の原因となることが最近報告されている。さらに、ネクチン-2 遺伝子座の一塩基多型 (SNP) が晩発性認知症に関連することが報告されている。このように、研究代表者が見出したネクチンとアフアディンによる細胞間接着機構は、生体内で神経シナプスの形成や可塑性を制御している

ことが明らかになりつつある。さらに研究代表者は、アフアディンの発現が欠損した培養海馬神経細胞のシナプスにおいては、ネクチン-1、ネクチン-3、N-カドヘリンなどの接着分子や、シナプシン 1、PSD95 などの前・後シナプスを構成する分子の濃縮が低下し、正常なシナプスが形成されないことを見出している (未発表)。したがって、アフアディンはシナプス形成の中核をなす重要な制御因子と考えられ、その機能と制御機構を解析することにより、シナプス形成の分子機構が明らかにされると考えられる。本研究分野は、精神・神経疾患の病因の研究とも密接に関連し、国際的にも競争が激化しており緊急に推進すべき研究と位置づけられる。以上の学術的背景に加え、研究代表者は、世界に先駆けてネクチンとアフアディンを見出し、研究に必要な遺伝子、抗体などの試料、さらには、アフアディン flox マウス、ネクチン-1、ネクチン-2、ネクチン-3 ノックアウトマウス系統を使える環境にいる。このように、本申請研究課題に対する準備は整っており、その目的を達成することができると考えている。

2. 研究の目的

上述の背景のもと、本研究ではシナプス形成と機能発現におけるアフアディンとネクチンの機能と作用機構を、シナプスに局在する種々の分子との関連に着目して解明する。研究成果は精神・神経疾患の病因の解明と治療法の開発に寄与すると期待される。

3. 研究の方法

- (1) アフアディン欠損マウス、アフアディン欠損培養海馬神経細胞をもちいて、アフアディンのシナプス形成における機能を組織学的、電子顕微鏡学的、細胞生物学的、電気生理学的手法を用いて明らかにする。
- (2) アフアディンによるシナプス形成の機構を明らかにするため、アフアディンに結合する分子の同定を行う。
- (3) ネクチン欠損マウスとアフアディン欠損マウスを用い、これらの分子の神経回路形成における機能を解析する。

4. 研究成果

- (1) アフアディン欠損マウス (Afadin^{f/f};nestin-Cre) の海馬の苔状線維シナプスにおいて、カドヘリン、ネクチン-1 とネクチン-3、 β -カテニン、N-カドヘリンといった PAJ に存在する分子の集積がほぼ完全に消失していた。同様の解析によって、バスーンや VGLUT1 といったシナプス前膜の構成分子の集積も明らかに低下していた。さらに、アフアディン欠損培養神経細胞では、グルタミン酸の放出確率とシナプス小胞のリサイクリングが著しく低下していた (Toyoshima et al., 2014)。以上の結果は、アフアディンはシナプスにおいて、細胞接着因子、アクティブ

ゾーンとシナプス小胞を構成する分子を集積させることにより前シナプスの形成を促進する分子であることを示唆している。

(2) アファディンを欠損したマウスの海馬苔状線維シナプスの走査電子顕微鏡画像の三次元再構築法による解析では、PAJ はほぼ消失し、前シナプスのアクティブゾーンと後シナプスの PSD も断片化して小型化していた。また、放出可能プールのシナプス小胞の数も減少していた。一方、アファディンを欠損したマウスの培養海馬切片における苔状線維単位シナプス伝達の電気生理学的解析では、興奮性シナプスのシナプス前性とシナプス後性の機能が障害されていた。これらの結果から、アファディンが苔状線維シナプス構造の形成と機能を制御していることが明らかになった(論文準備中)。

(3) アファディンによるシナプス形成の分子機構を明らかにするために、脳の膜分画におけるアファディンの結合分子のプロテオミクス解析を行ない、特異的結合分子を同定した。現在、一部の分子について詳細な機能解析を開始している。

(4) 上記(1)(2)の研究の過程で、アファディンが中脳水道の形成に必要であることを明らかにした(Yamamoto et al., 2013)。また、大脳皮質特異的なアファディン欠損マウス(Afadin f/f;Emx1-Cre)を作成し、アファディンが新生神経細胞の遊走と大脳新皮質の層形成に重要な機能を果していることを明らかにした(Yamamoto et al., 2015)。

(5) 嗅球の僧帽細胞の樹状突起間および顆粒細胞との樹状突起間にネクチン-1 が対称的に局在し、新しい接着装「ネクチン-1 スポット」を形成していることを明らかにした(Inoue et al., 2015)。

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 8 件、総説を含む)

Yamamoto, H., Mandai, K., Konno, D., Maruo, T., Matsuzaki, F., & Takai, Y. Impairment of radial glial scaffold-dependent neuronal migration and formation of double cortex by genetic ablation of *afadin*. *Brain Res.*, 査読有、印刷中、2015、doi: 10.1016/j.brainres.2015.05.012.

Inoue, T., Fujiwara, T., Rikitake, Y., Maruo, T., Mandai, K., Kimura, K., Kayahara, T., Wang, S., Itoh, Y., Sai, K., Mori, M., Mori, K., Mizoguchi, A., & Takai, Y. Nectin-1 spots as a novel adhesion apparatus that tethers

mitral cell lateral dendrites in a dendritic meshwork structure of the developing mouse olfactory bulb. *J Comp Neurol.*, 査読有、印刷中、2015、doi: 10.1002/cne.23762.

Toyoshima, D., Mandai, K., Maruo, T., Supriyanto, I., Togashi, H., Inoue, T., Mori, M., & Takai, Y. Afadin regulates puncta adherentia junction formation and presynaptic differentiation in hippocampal neurons. *PLoS One*, 査読有、2014、9(2):e89763. doi: 10.1371/journal.pone.0089763.

Mandai, K., Rikitake, Y., Shimono, Y., & Takai, Y. Afadin/AF-6 and Canoe: roles in cell adhesion and beyond. *Prog Mol Biol Transl Sci.*, 査読有、116 巻、2013、pp. 433-454.

〔学会発表〕(計 5 件)

Fujiwara, T., Wang, S., Itoh, Y., Sai, K., Kaito, A., Miyazaki, N., Murata, K., Maruo, T., Yamamoto, H., Mandai, K., Takai, Y., & Mizoguchi, A. SBF-SEM 3D reconstitution analysis reveals alterations in composition and morphology of mouse hippocampal mossy fiber synapses by afadin knockout. 第 120 回日本解剖学会総会・全国学術集会・第 92 回日本生理学会大会合同大会、2015.3.21、神戸国際会議場・展示場(兵庫県)

Toyoshima, D., Mandai, K., Maruo, T., Supriyanto, I., Togashi, H., Inoue, T., Mori, M., & Takai, Y. Afadin plays an important role in formation of puncta adherentia junction and differentiation of presynapses in hippocampal neurons. Neuroscience 2014 Annual Meeting - Society for Neuroscience, 2014.11.19. ワシントン DC, (アメリカ)

Yamamoto, H., Mandai, K., Maruo, T., Konno, D., & Matsuzaki, F. Pathophysiological roles of afadin in the brain development. 第 37 回日本神経科学学会大会、2014.9.12、パシフィコ横浜(神奈川県)

Yamamoto, H., Mandai, K., Konno, D., Maruo, T., Matsuzaki, F., & Takai, Y. Abnormal radial glial scaffold for migrating neurons leads to formation of the double cortex in *afadin*-deficient mice. Cold Spring

Harbor Laboratory Meeting, Glia in
Health & Disease, 2014.7.20、Cold
Spring Harbor, (アメリカ)

〔図書〕(計 1 件)

Mandai, K., Rikitake, Y., Mori, M., &
Takai, Y. Academic Press、Cellular
adhesion in development and disease、
2015、517 (197-231).

6 . 研究組織

(1)研究代表者

萬代 研二 (MANDAI, Kenji)

神戸大学・大学院医学研究科・准教授

研究者番号：5 0 3 2 2 1 8 6