

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 5 月 29 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26293042

研究課題名(和文)新規分泌性C1qファミリー分子による機能的シナプス回路形成および記憶学習制御

研究課題名(英文) Analysis of novel C1q-family proteins that regulate functional synaptic circuits and memory.

研究代表者

掛川 渉 (KAKEGAWA, WATARU)

慶應義塾大学・医学部・准教授

研究者番号：70383718

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,500,000円

研究成果の概要(和文)：神経細胞どうしをつなぐ「シナプス」の形態および機能を制御する分子機構の解明は、「記憶」の形成過程を理解する上で重要である。本研究において、私たちは補体C1qの機能ドメインを有する新規C1qファミリー分子群が、小脳や海馬の興奮性シナプスを動的に制御していることを明らかにした(Elegheert, Kakegawa et al., Science, '16; Matsuda et al., Neuron, '16; Kakegawa et al., Neuron, '15)。そのため、本成果は記憶を担う中枢シナプスの普遍的かつ新しい形成・動作原理を理解するうえで有益な情報を提供しうる。

研究成果の概要(英文)：It has been recently considered that synapses, which connect between neurons, are a basic element for the learning and memory. Therefore, to elucidate how synapses are formed and behave in vivo is a very important issue for understanding the process of learning and memory. In this study, we found that novel C1q-family proteins, which have a functional domain conserved in the C1q complement in immune system, regulate dynamically synapse morphology, functions and the localization of the synaptic proteins in the cerebellum and hippocampus (Elegheert, Kakegawa et al., Science, '16; Matsuda et al., Neuron, '16; Kakegawa et al., Neuron, '15). Interestingly, as C1q-family proteins are widely expressed in various brain regions throughout life, our findings may provide useful information to understand general and novel mechanisms for the synaptic integrity in the CNS.

研究分野：神経生理学

キーワード：シナプス 小脳 運動記憶 プルキンエ細胞 精神神経疾患 補体

## 1. 研究開始当初の背景

超高齢社会を迎えた我が国において、認知症や加齢に伴う記憶障害への対応は、喫緊の課題の1つである。記憶は脳内の神経細胞どうしをつなぐ「シナプス」に蓄えられるとされ、神経活動に伴う機能的および形態的なシナプスの変化、すなわち、シナプス可塑性こそが、記憶・学習の分子基盤であると考えられている。そのため、シナプス形成やシナプス可塑性のメカニズムを分子レベルで解明することはきわめて重要な課題である。

近年、自然免疫系を支える補体 C1q やその機能ドメインを有する C1q ファミリー分子が脳内に豊富に存在することが確認され、シナプス形態および機能を制御することが明らかにされつつある。例えば、補体 C1q は正常発達や加齢、そして病的過程でのシナプス除去 (刈り込み) にかかわる (Stephan et al., *Annu Rev Neurosci*, '12)。また私たちは、運動記憶・学習を担う小脳において、C1q ファミリーに属する Cbln1 が顆粒細胞軸索 (平行線維) 終末より分泌され、プルキンエ細胞とのシナプス (平行線維シナプス) 形成を促進し、シナプス可塑性を調節することを明らかにした (Hirai et al., *Nat Neurosci*, '05; Matsuda et al., *Science*, '10)。Cbln1 は、シナプス後部に発現するデルタ2型グルタミン酸受容体およびシナプス前部に発現する接着分子 Neurexin と3者複合体を構築することでシナプス形成を誘導する免疫関連分子であることから、これまでに報告のないまったく新しいタイプの分泌性シナプス形成因子 (シナプスオーガナイザー) として注目されている (Yuzaki, *Curr Opin Neurobiol*, '11, '17)。

## 2. 研究の目的

プルキンエ細胞は、平行線維に加えて、延髄下オリブ核から投射する登上線維により強い興奮性入力を受ける (登上線維シナプス)。登上線維は、運動学習時のエラー信号を、教師信号としてプルキンエ細胞に送ることによって、小脳依存性運動記憶・学習の獲得に必須な役割を果たすと考えられている (Ito, *Physical Rev*, '01)。興味深いことに、私たちは最近、Cbln1 と同じ C1q ファミリーに属する C1q 様分子 1 (C1q-Like protein 1; 以下、C1qL1 と略す) が、登上線維シナプスから分泌されることを見出した (Iijima et al., *Eur J Neurosci*, '10)。この所見は、補体 C1q や C1q ファミリー分子である Cbln1 の機能と同様、登上線維シナプスから分泌される C1qL1 が、登上線維シナプスの形態および機能を制御し、運動記憶・学習を調節している可能性を強く示唆する。

そこで、本計画では、登上線維シナプス形成における C1qL1 の関与について解析するとともに、同シナプスでの C1qL1 の作用がシナプス可塑性および運動記憶・学習に及ぼす影響について追究することにした。

## 3. 研究の方法

本研究では、C1qL1 の発現を欠く C1qL1 欠損マウス (C1qL1-KO マウス) および C1qL1 の候補受容体として考えられる脳特異的血管新生阻害因子 3 (brain-specific angiogenesis inhibitor 3; BAI3) を小脳プルキンエ細胞でのみ欠失した遺伝子欠損マウス (PC-BAI3-KO マウス) を作製し、各マウスにおける表現型を、電気生理学、形態学および行動学的手法を用いて解析した。

## 4. 研究成果

(1) 野生型 (wild-type; WT) マウスにおいて、生後発達期のプルキンエ細胞は複数の未熟な登上線維によって入力を受けるが (多重支配)、その後、登上線維間で強弱が生まれ、強い登上線維はより強化されるとともに、弱い登上線維は刈り込まれ、成熟期では、1つのプルキンエ細胞に対して1本の強い登上線維のみが投射する (1本支配; Watanabe & Kano, *Eur J Neurosci*, '11)。しかし、C1qL1-KO マウスを解析してみると、登上線維間に強弱は生まれるものの、シナプス数が激減することで強い登上線維入力がそれ以上強くなれず、成熟期においても弱い登上線維入力が残存していた。この異常表現型は、KO マウスへの外来性 C1qL1 発現により完全に回復したことから、C1qL1 が登上線維シナプスの刈り込み過程に直接的に関与していることが示唆される (Kakegawa et al., *Neuron* '15)。

(2) 次に、生後直後の WT マウスに C1qL1 を過剰発現させた際の影響について検討した。C1qL1 の過剰発現は、登上線維シナプスのもとの強さにかかわらず、発現したすべての登上線維シナプスにおいてその強度を亢進させた。それと同時に、強い登上線維シナプスの1本化過程が顕著に促進されることが分かった。これらの結果から、C1qL1 は強い登上線維シナプスをより強化し、それに伴って、弱いシナプスの除去にかかわるシグナリングを駆動させることが分かった (Kakegawa et al., *Neuron* '15)。

(3) これまで、培養海馬ニューロンを用いた *in vitro* 実験において、C1qL1 は BAI3 に結合することが報告されている (Bolliger et al., *Proc Natl Acad Sci USA*, '11)。BAI3 は細胞接着型 G タンパク質共役受容体ファミリーに属し、プルキンエ細胞の樹状突起に豊富に発現する。そこで、プルキンエ細胞に発現する BAI3 が C1qL1 の受容体である可能性を確かめるために、両分子の特異抗体を用いた超解像蛍光顕微鏡観察を行った。その結果、C1qL1 と BAI3 が登上線維シナプス上に並んで局在する像が観察された。次に、プルキンエ細胞に発現する BAI3 を選択的に欠失させた PC-BAI3-KO マウスの登上線維シナ

プス機能を解析した。すると、興味深いことに、PC-BAI3-KO マウスは C1qL1-KO マウスと酷似しており、登上線維シナプス数が激減するとともに、成熟期においても登上線維シナプスの多重支配を受けるプルキンエ細胞が数多く認められた。また、C1qL1 と結合できない変異型 BAI3 (BAI3<sup>ΔC1qL1</sup>) を設計し、PC-BAI3-KO マウスのプルキンエ細胞に導入すると、正常型 BAI3 (BAI3<sup>WT</sup>) は、KO マウスの異常をほぼ完全に回復させたが、BAI3<sup>ΔC1qL1</sup> の導入では、その回復がまったく認められなかった。したがって、BAI3 は C1qL1 の受容体として働き、両者の相互作用が登上線維シナプスの刈り込み過程を制御していることが明らかになった (Takegawa et al., *Neuron* '15)。

(4) 登上線維入力、平行線維シナプスで観察される代表的なシナプス可塑性であり、運動記憶・学習の分子基盤とされる長期抑圧現象 (long-term depression; LTD) の誘導に必須な役割を果たす (Ito, *Physical Rev*, '01)。事実、これまで同定されてきた LTD 誘導にかかわる多くの分子群の機能を阻害すると、重篤な運動記憶・学習障害を示す (Ito, *Physical Rev*, '01)。そこで、C1qL1-KO マウスより、LTD 記録および運動記憶学習課題を行った。すると、C1qL1-KO マウスでは、LTD が起こらず、また、小脳依存的な運動記憶・学習も有意に低下していた。この異常表現型は、PC-BAI3-KO マウスでも同様に観察された (Takegawa et al., *Neuron* '15)。

(5) C1qL1 の類似分子には、C1qL2-4 が存在し、とりわけ、C1qL2 および C1qL3 は陳述記憶や空間記憶を担う海馬の顆粒細胞苔状線維 (mossy fiber; MF)-CA3 錐体細胞間シナプス (MF-CA3 シナプス) に選択的に局在している。そこで、C1qL1 の機能と同様、C1qL2 および C1qL3 が MF-CA3 シナプスの形成や機能に関与しうるかを確かめるため、C1qL2/C1qL3 両分子の発現を欠くダブル KO マウスを作製した (C1qL2/3-DKO マウス)。その結果、C1qL2/3-DKO マウスの MF-CA3 シナプスは形態的に大きな異常を呈さないものの、同シナプスに選択的に局在するカイニン酸型グルタミン酸受容体 (kainate receptor; KAR) がほぼ完全に消失していることが明らかになった (Matsuda et al., *Neuron* '16)。

以上の結果から、C1q ファミリーに属する C1qL 分子群は、生後発達期における機能的シナプス回路形成、シナプス可塑性、記憶・学習および受容体局在をダイナミックに制御するきわめて重要な分子群であることが示唆された。本研究の成果は、「シナプス形成・機能を担う C1q ファミリー分子の普遍的かつ新しい動作原理」を確立するための有益な情報を提供しうるものと期待される。将来、

認知症や記憶障害を伴う様々な疾患に対して、C1q ファミリー分子を標的とした有効な治療開発が展開されることを期待する。

#### <引用文献>

- Stephan et al., *Annu Rev Neurosci*, '12  
Hirai et al., *Nat Neurosci*, '05  
Matsuda et al., *Science*, '10  
Yuzaki, *Curr Opin Neurobiol*, '11  
Yuzaki, *Curr Opin Neurobiol*, '17  
Ito, *Physical Rev*, '01  
Iijima et al., *Eur J Neurosci*, '10  
Watanabe & Kano, *Eur J Neurosci*, '11  
Takegawa et al., *Neuron* '15  
Bolliger et al., *Proc Natl Acad Sci USA*, '11

#### 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7件)

Wakayama S, Kiyonaka S, Arai I, Takegawa W, Matsuda S, Ibata K, Nemoto YL, Kusumi A, Yuzaki M, Hamachi I: Chemical labeling for visualizing native AMPA receptors in live neurons. *Nature Communications* 8: 14850 (open access) (2017) 査読有 doi: 10.1038/ncomms14850.

Elegheert J, Takegawa W, Clay EJ, Shanks N, Behiels E, Matsuda K, Kohda K, Miura E, Rossmann M, Mitakidis N, Motohashi J, Chang TV, Siebold C, Greger HI, Nakagawa T, K, Yuzaki M, Aricescu RA: Structural basis for integration of GluD receptors within synaptic organizer complexes. *Science* 353: 295-299 (2016) 査読有 doi: 10.1126/science.aae0104.

Matsuda K, Budisantoso T, Mitakidis N, Sugaya Y, Miura E, Takegawa W, Yamasaki M, Konno K, Uchigashima M, Abe M, Watanabe I, Kano M, Watanabe M, Sakimura K, Aricescu RA, Yuzaki M: Transsynaptic modulation of kainite receptor functions by C1q-like proteins. *Neuron* 90: 752-767 (2016) 査読有 doi: 10.1016/j.neuron.2016.04.001.

Takeo YH, Takegawa W, Miura E, Yuzaki M: ROR $\alpha$  regulates multiple aspects of dendrite development in cerebellar Purkinje cells in vivo. *The Journal of Neuroscience* 35: 12518-12534 (2015) 査読有

doi:10.1523/JNEUROSCI.0075-15.2015.

Takegawa W, Mitakidis N, Miura E, Abe M, Matsuda K, Takeo YH, Kohda K, Motohashi J, Takahashi A, Nagao S, Muramatsu S, Watanabe M, Sakimura K, Aricescu AR, Yuzaki M: Anterograde C1ql1 signaling is required in order to determine and maintain a single-winner climbing fiber in the mouse cerebellum. *Neuron* 85: 316-329 (2015) 査読有  
doi: 10.1016/j.neuron.2014.12.020.

Sadakata T, Takegawa W, Shinoda Y, Hosono M, Katoh-Semba R, Sekine Y, Sato Y, Saruta C, Ishizaki Y, Yuzaki M, Kojima M, Furuich T: Axonal localization of Ca<sup>2+</sup>-dependent activator protein for secretion 2 is critical for subcellular locality of brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 release affecting proper development of postnatal mouse cerebellum. *PLoS One* 9, e99524 (2014) 査読有  
doi: 10.1371/journal.pone.0099524.

Ito-Ishida A, Takegawa W, Kohda K, Miura E, Okabe S, Yuzaki M: Cbln1 down-regulates formation and function of inhibitory synapses in the cerebellar Purkinje cells. *European Journal of Neuroscience* 39, 1268-1280 (2014) 査読有  
doi: 10.1111/ejn.12487.

〔学会発表〕(計10件)

掛川 渉: シナプス分子群がもたらす運動記憶ダイナミズムの解明. 新学術領域研究 次世代脳プロジェクト 冬のシンポジウム (東京都・千代田区) 2016年12月21日

掛川 渉, 柚崎 通介: A novel D-serine signaling for synaptic plasticity and motor learning. 新学術領域研究「記憶ダイナミズム」班会議 (静岡県・掛川市) 2016年6月28日

掛川 渉, 柚崎 通介: D-セリン - デルタ受容体シグナリングを介する新規グリア - ニューロン相互作用の解明. 新学術領域研究「グリアアセンブリ」班会議 (東京都・港区) 2016年1月9日

掛川 渉: 分泌性補体ファミリー分子を

介する小脳シナプス回路形成・機能制御. 国立精神・神経医療研究センター (東京都・小平市) 2015年11月19日

Takegawa W, Yuzaki M: A novel mechanism underlying synaptic competition and maturation through C1q-family proteins. 第38回日本神経科学学会大会シンポジウム (兵庫県・神戸市) 2015年7月29日

掛川 渉, 柚崎 通介: 脳内 D-セリンによる記憶・学習制御. 第38回日本神経科学学会大会ランチョンセミナー (兵庫県・神戸市) 2015年7月28日

掛川 渉, 柚崎 通介: 新規 C1q ファミリー分子を介する小脳シナプス回路形成・制御機構. 平成27年度生理学研究所研究会 (愛知県・岡崎市) 2015年6月18日

掛川 渉, 柚崎 通介: D-セリン - デルタ受容体シグナリングを介する新規グリア - ニューロン相互作用の解明. 新学術領域研究「グリアアセンブリ」班会議 (東京都・文京区) 2015年1月24日

Takegawa W: D-Serine controls learning and memory through ionotropic glutamate receptors. 第2回 D-アミノ酸国際学会 (栃木県・宇都宮市) 2014年9月4日

掛川 渉: D-セリン - デルタ2型グルタミン酸受容体相互作用: シナプス機能および記憶を制御する新しい脳内 D-セリンシグナリング. 資生堂キラルサイエンスセミナー (栃木県・宇都宮市) 2014年9月3日

〔図書〕(計8件)

河野 まや, 掛川 渉, 柚崎 通介: 中外医学社, *Clinical Neuroscience*, 中枢神経の可塑性とは. 2017, 5, 632 ページ (523-527)

掛川 渉, 柚崎 通介: 羊土社, *実験医学*, シナプスに架かる記憶への架け橋: Neurexin-Cbln1-GluD2 三者複合体構造. 2016, 34, 143 ページ (3181-3184)

Takegawa W, Yuzaki M: Springer Books, *D-Amino Acids: Physiology, Metabolism, and Application: Physiological functions of D-serine mediated through  $\delta 2$  glutamate*

receptors in the cerebellum. 2016, 358  
ページ (65-80)

Kohda K, Kakegawa W, Yuzaki M:  
Springer Books, Encyclopedia of  
Signaling Molecules-2nd edition: Delta  
glutamate receptor. 2016, 2029 ページ  
(514-518)

Kohda K, Kakegawa W, Yuzaki M:  
Springer Books, Essentials of  
cerebellum and cerebellar disorders:  
Long-term depression (LTD). 2016, 656  
ページ (329-334)

掛川 涉, 松田 恵子, 柚崎 通介: 中  
外医学社, Annual Review 神経 2016,  
「補体ファミリー分子」とシナプス形  
成・維持. 2016, 270 ページ (35-43)

掛川 涉, 柚崎 通介: 羊土社, 実験医  
学, 「強きを助け弱きをくじく」- シナ  
プス刈り込みを担う新規 C1ql1 シグナリ  
ング. 2015, 33, 139 ページ (1777-1780)

掛川 涉, 柚崎 通介: 秀潤社, 細胞工  
学, GRAPHIC HOT PRESS - C1ql1 : 脳  
内シナプスの形態と機能を制御する新し  
い分子. 2015, 7, 91 ページ (692-693)

掛川 涉, 柚崎 通介: D-アミノ酸学  
会, D-アミノ酸学会誌, 記憶・学習をささ  
える脳内 D-アミノ酸の機能. 2015, 3, 14  
ページ (1-6)

掛川 涉, 柚崎 通介: 生物工学, D-アミ  
ノ酸の神経生理、脳内 D-セリンによる記  
憶・学習制御. 2014, 12, 57 ページ  
(657-660)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.yuzaki-lab.org/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

掛川 涉 (Kakegawa, Wataru)  
慶應義塾大学・医学部・准教授  
研究者番号：70383718

### (2) 研究分担者

鈴木 邦道 (Suzuki, Kunimichi)  
慶應義塾大学・医学部・助教  
研究者番号：10713703

竹尾 ゆかり (Takeo, Yukari)  
慶應義塾大学・医学部・助教  
研究者番号：90624320

### (3) 連携研究者

柚崎 通介 (Yuzaki, Michisuke)  
慶應義塾大学・医学部・教授  
研究者番号：40365226

三浦 会里子 (Miura, Eriko)  
慶應義塾大学・医学部・研究員  
研究者番号：10571169

### (4) 研究協力者

なし