

令和 3 年 6 月 14 日現在

機関番号：32713

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06492

研究課題名(和文) シナプス形成因子Cbln1によるシナプス後部成熟過程の分子機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the molecular mechanism of the postsynaptic maturation process by the synaptic organizer Cbln1

研究代表者

井端 啓二 (IBATA, KEIJI)

聖マリアンナ医科大学・医学部・講師

研究者番号：30462659

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：神経活動依存的に分泌されるシナプス形成因子であるCbln1は、シナプス前部のニューレキシンおよびシナプス後部のGluD2と3者複合体を形成して、シナプスの形成・維持を実現する。本研究では神経活動依存性に分泌されたCbln1がシナプス後部のGluD2に結合した後、どのようにシナプス形成因子としての効果を発揮するかについて検討した。その結果、Cbln1によってGluD2の局在変化が引き起こされることが明らかになった。シナプス後部の成熟過程でGluD2の局在変化が何らかの役割を果たしていることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、シナプスの異常が多くの精神疾患の本体であると考えられてきている。本研究では、平行線維 - プルキンエ細胞シナプスにおけるシナプス後部の成熟のメカニズムの一部を明らかにした。本成果とさらなる研究によってシナプスの形成・維持およびその可塑性の分子メカニズムを明らかにすることで、脳機能のメカニズムを理解し、同時に、その病態を解明することにつながると思っている。

研究成果の概要(英文)：Cbln1, a synapse organizer secreted in an activity-dependent manner, forms a tripartite complex with presynaptic neurexin and postsynaptic GluD2 to form and maintain synapses. In this study, we investigated how Cbln1 exerts its effects after binding to postsynaptic GluD2. We found that Cbln1 induces a change in the localization of GluD2. Our results suggest that GluD2 localization changes play a role in the postsynaptic maturation process.

研究分野：神経科学

キーワード：プルキンエ細胞 シナプス形成

1. 研究開始当初の背景

中枢神経の神経回路形成には、シナプス前部や後部に作用するシナプス形成分子が必要である。発達後の脳ではシナプスにおいて神経活動依存的な可塑的变化が生じる。また近年、シナプスの異常が多くの精神疾患の本体であると考えられてきており、シナプスの形成・維持およびその可塑性の分子メカニズムを明らかにすることは、脳機能のメカニズムを理解することと同時に、その病態を解明することにつながる。研究代表者らは、小脳の顆粒細胞軸索である平行線維とプルキンエ細胞の間のシナプス形成・維持とシナプス可塑性の分子メカニズムを Cbln1 - デルタ2グルタミン酸受容体 (GluD2) 系に注目して研究を進めてきた。その結果、Cbln1 は平行線維において神経活動依存的にライソソームから分泌されるシナプス形成因子であり、また Cbln1 はシナプス前部に存在するニューレキシン (NRX) とシナプス後部であるプルキンエ細胞のスパインに存在する GluD2 の細胞外 N 末端領域に結合して 3 者複合体を形成することで、シナプスの形成・維持を実現することを明らかにした。しかしながら、神経活動依存的に分泌された Cbln1 がシナプス後部の GluD2 に結合した後、どのようにシナプス形成因子としての効果を発揮するかについての詳細な分子機構は未解明である。一方、GluD2 はイオン透過型グルタミン酸受容体でありながら、イオンチャネルとしては機能せず、その細胞内領域は平行線維 - プルキンエ細胞シナプスの可塑性の一つである長期抑圧 (LTD) に関与している。LTD には Cbln1 も必要であるため、Cbln1 が GluD2 に結合することによって引き起こされるシナプス後部の変化が、LTD の誘導を可能にすることを示唆するが、その分子機構は分かっていない。本研究ではシナプス後部で起こる成熟機構をプルキンエ細胞のスパインにおける様々な分子の動態を解析、操作することによって追究してゆく。

2. 研究の目的

小脳平行線維 - プルキンエ細胞シナプスの形成および維持において極めて重要な作用をする Cbln1 が、GluD2 に結合することによってシナプス後部にいかなる変化を誘導し、LTD を可能にするかについての詳細な分子機構は明らかになっていない。NRX - Cbln1 - GluD2 系はこれらの 3 者複合体がシナプス形成を行うとともに、その可塑性に関与するという非常に特異なシステムであり、この詳細な分子メカニズムを明らかにすることが本研究の目的である。また、Cbln およびデルタ型グルタミン酸受容体はそれぞれファミリーをなし、他のサブタイプは中枢神経系の様々な部位に発現しているがその機能は明らかになっていない。従って、本研究で明らかにされる Cbln1-GluD2 系の分子メカニズムは、単に小脳の平行線維 - プルキンエ細胞シナプスのみならず、他の脳部位に発現する他の Cbln - GluD 系の機能的意義を解明することを可能にする。

3. 研究の方法

(1) Cbln1 分泌、GluD2 の挙動を観察するために pH 依存性蛍光タンパク質を各 cDNA に繋げてタイムラプスイメージングを行なった。緑色蛍光タンパク質として Super-ecliptic pHluorin (SEP)、赤色蛍光タンパク質として mOrange2 や pHuji を用いた。小脳顆粒細胞に遺伝子導入し、落射蛍光顕微鏡と共焦点顕微鏡で観察した。また免疫染色像を撮影するためにも落射蛍光顕微鏡と共焦点顕微鏡を用いた。

(2) Cbln1 タンパク質の精製は、His タグを付加した Cbln1、Cbln1-CS を HEK293 細胞で過剰発現させ、培養上清からニッケルカラムを用いて精製した。

(3) Cbln1 分泌に関わる分子のドミナントネガティブ変異体は、SNARE 分子である、Syntaxin の膜貫通領域の欠失変異体と SNAP の C 末端欠失変異体をそれぞれ作製した。これらのコンストラクトを顆粒細胞で発現させ Cbln1 の分泌が阻害されるかを調べた。

4. 研究成果

(1) 神経活動依存的な Cbln1 分泌に関わる分子の同定

本研究を開始するまでに、Cbln1 の分泌様式のひとつとして軸索のライソソームからの神経活動依存的な Cbln1 分泌が起こることが明らかになっていた。神経細胞が可塑的な変化を起こす際にも、シナプス前部側の活動が必要である場合が知られており、神経活動依存的な Cbln1 分泌に関わる分子を同定することで、可塑的变化時の Cbln1 の役割を解明することが可能になる。そこで、分泌小胞に関わる SNARE 分子のドミナントネガティブ変異体を発現させ、神経活動依存的な Cbln1 分泌への影響を調べた。その結果、SNAP29 と Syntaxin4 のドミナントネガティブ変異体が神経活動依存的な Cbln1 分泌を阻害することが判明した。一方、シナプス小胞からの分泌に関わる SNAP25 と Syntaxin1 のドミナントネガティブ変異体では阻害されなかった。このライソソームの Cbln1 は分解酵素であるカテプシン B と共に分泌されるため、細胞外環境の分解と、シナプスの形成が同じ場所で発生することを可能にするメカニズムの存在が初めて示唆され、これらの成果を報告した(文献1)。

(2) Cbln1 処理による GluD2 集積の形態解析

Cbln1-KO マウス由来のプルキンエ細胞に精製 Cbln1 を添加し、プルキンエ細胞のスパインの形態、GluD2 の局在変化を免疫染色法で調べた。その結果、精製 Cbln1 添加後の GluD2 の局在が大きく変化するのが観察された。さらに pH 依存性の蛍光タンパク質をつなげた SEP-GluD2 を用いたタイムラプスイメージングで GluD2 の局在変化を調べた。まず、GluD2 のどの場所に SEP をつなげるかを検討した。その結果、プルキンエ細胞のスパインに局在し、Cbln1 との結合を阻害しないコンストラクトが得られた。この SEP-GluD2 を Cbln1-KO マウス由来のプルキンエ細胞で発現させ、精製 Cbln1 を添加し、タイムラプスイメージングを行った。その結果、免疫染色法と同様に SEP-GluD2 の局在が大きく変化するのが観察された。これらの結果から、Cbln1 によって引き起こされるシナプス後部の成熟過程で GluD2 の局在変化が何らかの役割を果たしていることが示唆された。さらに、野生型および変異を入れた Cbln1 を添加することで GluD2 とスパインの動態をより詳細な解析を試みた。変異型 Cbln1 として、6 量体を形成できずニューレキシンに結合できない変異型 Cbln1 (Cbln1-CS) および GluD2 に結合できない変異型 Cbln1 (Cbln1-m3) を精製した。Cbln1-KO マウス由来のプルキンエ細胞に各 Cbln1 タンパク質を添加し、4 日後に細胞を観察した。その結果、すでに知られている様に、Cbln1-CS、および Cbln1-m3 を添加したプルキンエ細胞では GluD2 の局在変化はみられなかった。

今後の実験として神経活動依存的に分泌された Cbln1 の効果を検討する必要がある。小脳初代培養系で高濃度塩化カリウム - グルタミン酸 (高 KCl-Glu) 処理を行うと、プルキンエ細胞の表面 GluA 受容体量が減少する chemical LTD が生じるが、高 KCl 処理だけでは Cbln1 は分泌されるものの、chemical LTD は誘発されない。そこで、シナプス形成後も神経活動依存的に放出される Cbln1 のシナプス後部への効果を検討するために、野生型マウス由来の小脳初代培養系において、高 KCl-Glu 処理、高 KCl 処理及び未処理の場合のプルキンエ細胞スパインにおける GluD2 動態を検討することで、神経活動依存的に分泌される Cbln1 と LTD 刺激によって分泌され

る Cbln1 の機能的な差異を明らかにする。また、(1) で得られた情報を元に、SNAP29 と Syntaxin4 のドミナントネガティブ変異体を顆粒細胞に発現させ高 KCl-Glu 処理を行い、Cbln1 の分泌を阻害することでも同様の実験を行う。

文献 1 .

Ibata K, Kono M, Narumi S, Motohashi J, Kakegawa W, Kohda K, Yuzaki M. Activity-dependent secretion of synaptic organizer Cbln1 from lysosomes in granule cell axons. *Neuron* 102: 1184-1198, 2019

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Ibata K, Kono M, Narumi S, Motohashi J, Kakegawa W, Kohda K, Yuzaki M.	4. 巻 102
2. 論文標題 Activity-dependent secretion of synaptic organizer Cbln1 from lysosomes in granule cell axons	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Neuron	6. 最初と最後の頁 1184-1198
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.neuron.2019.03.044	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Ibata K, Kono M, Narumi S, Motohashi J, Kakegawa W, Kohda K, Yuzaki M.
2. 発表標題 Activity-dependent secretion of Cbln1 from lysosomes in granule cell axons
3. 学会等名 Neuroscience2019（国際学会）
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	幸田 和久 (Kohda Kazuhisa) (40334388)	聖マリアンナ医科大学・医学部・教授 (32713)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------