

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 2012 年 4 月 28 日現在

機関番号:10101

研究種目:基盤研究(S)

研究期間:2007~2011

課題番号:19100005

研究課題名(和文):活動依存的カルシウム流入による競合的シナプス回路発達の共通原理の解明

研究課題名(英文):Molecular mechanisms for calcium-mediated refinement of competitive

synaptic wiring in the brain

研究代表者:

渡辺 雅彦(WATANABE MASAHIKO)

北海道大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号:70210945

研究成果の概要(和文):

生まれたばかりの個体のシナプス回路は、過剰で重複の多い混線回路である。生後早期の発達過程において、環境刺激や経験・訓練・学習に伴うシナプスの使用状況や神経活動の強弱に応じて、競合的なシナプス回路の強化と除去が起こる。その結果、未熟なシナプス回路は機能的で正確な投射関係を備えたシナプス回路へとリファインされ、正常な脳機能の発現基盤が完成する。この発達過程を経ることにより、ヒトでは臨界期と呼ばれる年少期において、ほとんどの高次神経機能—認知、言語、楽器演奏、スポーツ、知能、思考、性格、社会性などが飛躍的に発達する。現在、シナプスに発現するグルタミン酸受容体の活性化とそれによるシナプス後側ニューロンへのカルシウム流入が、この活動依存的シナプス選別過程を制御していることがわかっている。しかし、カルシウム濃度上昇が、一体どのような分子細胞メカニズムを通してシナプス回路の強化と除去を制御しているかについては、ほとんど不明であった。本研究では、カルシウム依存的な活動依存機構とこれに対抗する機構とが拮抗してシナプス回路発達を制御するという作業仮説を立て、これを神経解剖学・神経生理学・発生工学などの手法を用いて個体レベルで検証することを目的とした。本研究の推進により、小脳ではP/Q型カルシウムチャンネルが登上線維によるプルキンエ細胞支配の形成・維持を制御し、大脳ではNMDA型グルタミン酸受容体やその制御調節に関わるグルタミン酸トランスポーターが体性感覚系シナプス回路発達を制御することを明らかにした。また、平行線維によるプルキンエ細胞支配をGluD2-Cbln1-ニューレキシンによる分子間相互作用が媒介し、これがカルシウム依存的な形成・維持機構により促進される登上線維支配と拮抗していることも判明した。

研究成果の概要(英文):

Synaptic circuits in neonates are characterized by excess, overlapping and entangled wiring. These immature circuits are refined into functional and mature ones through use-dependent and activity-dependent strengthening and weakening/elimination of immature synapses. Through this process, almost all of higher brain functions develop robustly during sensitive or critical period of early postnatal life, including cognition, language, music performance, sports, intelligence, thought, personality, and sociality in the case of human beings. Now we understand that the activity dependent

synaptic circuit development is facilitated by glutamate receptor activation and subsequent calcium influx into postsynaptic neurons. However little is known about how calcium influx regulates competitive synaptic development. In this research project, we aimed to clarify this issue by focusing on calcium-dependent and -independent mechanisms using neuroanatomical, electrophysiological, and developmental biological technologies. Through this research project, I clarified that P/Q-type calcium channels promote the development and maturation of climbing fiber innervation to Purkinje cells in the cerebellum, while calcium-permeable glutamate receptors and transporters regulate synaptic circuit development in the somatosensory cortex. Moreover, the GluD2-Cbln1-neurexin system controls the connectivity of parallel fiber-Purkinje cell synapses to compete with climbing fiber innervation promoted by P/Q-type calcium channels.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	23,700,000	7,110,000	30,810,000
2008年度	18,000,000	5,400,000	23,400,000
2009年度	17,200,000	5,160,000	22,360,000
2010年度	16,300,000	4,890,000	21,190,000
2011年度	14,700,000	4,410,000	19,110,000
総計	899,000,000	26,970,000	116,870,000

研究分野：神経解剖学

科研費の分科・細目：神経科学・神経科学一般

キーワード：シナプス回路、シナプス刈込み、グルタミン酸受容体、カルシウムイオン

1. 研究開始当初の背景

小脳プルキンエ細胞の近位樹状突起を一本の登上線維が独占支配し、遠位樹状突起を数十万本の平行線維が支配する。研究開始当初までに、研究代表者は、プルキンエ細胞に発現するグルタミン酸受容体 GluR2 (GluD2) と顆粒細胞が分泌するセレベリン1 (Cbln1) とが平行線維シナプス形成を強化し、P/Q型カルシウムチャネルが近位樹状突起における一本の登上線維の独占的支配を促進する分子機構であることを明らかにした。この小脳における分子機構を、大脳シナプス回路発達のそれと比較すると、活動依存的な $[Ca^{2+}]_i$ 上昇が強化と除去を基盤とするシナプス回路発達を媒介している点で共通する一方 GluD2 のような特殊な分子機構が、 $[Ca^{2+}]_i$ 依存的機構に拮抗して特定のシナプスを選択的に安定化するという構図が浮上してきた。

2. 研究の目的

本研究では大脳と小脳におけるシナプス回路発達の分子機構の相似性と相違性を追求することにより、脳における共通原理を解明する研究プロジェクトを企画した。その解析対象分子として、(1) グルタミン酸受容体とカルシウムチャネル、(2) これらの機能制御分子、(3) $[Ca^{2+}]_i$ 依存的な細胞内シ

グナル分子に焦点を当て、神経活動の受容からその下流の細胞内過程の各階層に属する機能分子がシナプス回路発達のどの局面をどのように制御しているのかを、個体レベルで解明することを目的とした。

3. 研究の方法

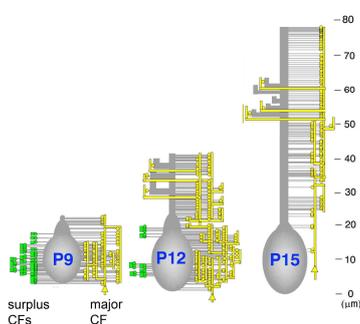
その手段として、遺伝子改変マウスモデルを開発しその表現型解析を行う上でベストと考えられる研究チームを組織し、最先端の神経解剖学・神経生理学・発生工学・行動学の手法を駆使して研究を推進した。

4. 研究成果

5年間の研究期間により得られた研究成果は、157編の英文原著論文と5編の英文総説として出版し、その主な概要は以下のとおりである。

1) 登上線維の単一支配化機構と成体期における維持機構

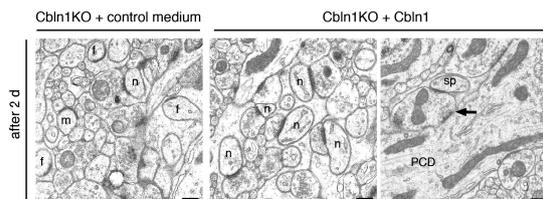
・生後第2週に樹状突起支配へとトランスロケートするのは優勢な1本の登上線維のみで、この過程をP/Q型カルシウムチャネルが制御する。成体期においても、このカルシウムチャネルは優勢な1本の登上線維による単一支配の維持に不可欠である。



- ・生後第2週に起こるもう一つの変化は、登上線維が周囲のプルキンエ細胞に投射する側枝の除去で、この過程を代謝型グルタミン酸受容体 mGluR1 が制御する。
- ・成体期において勝ち残った登上線維の上行枝は側方側枝を派出する。グルタミン酸受容体 GluD2 やグルタミン酸トランスポーター GLAST は、この側枝のシナプス形成能を抑制することで単一支配が維持される。

2) 小脳平行線維シナプスの形成と維持の分子機構

- ・顆粒細胞からの分泌後、Cbln1 は Cbln3 と複合体を形成して平行線維シナプスのシナプス間隙に濃縮して局在する。
- ・Cbln1 と GluD2 は直接分子結合を行い、さらにプレシナプス側のニューレキシンと結合することで、平行線維シナプスの形成と維持に関わる。

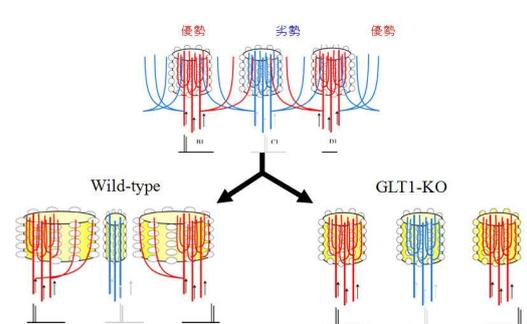


3) 興奮性神経支配と抑制性神経支配の競合と制御

- ・小脳プルキンエ細胞の細胞体は当初複数の登上線維により多重支配を受けているが、生後第2週に樹状突起にトランスロケートすると同時に、バスケット細胞が抑制性シナプスを形成する。その際、登上線維が支配していたスパインと AMPA 型グルタミン酸受容体を引き継ぐようにバスケット細胞終末が結合し、その間にスパインが退縮し AMPA 受容体が GABA 受容体にスイッチする。
- ・カルシウムイオン依存的な脱リン酸化酵素カルシニューリンは興奮性シナプスと抑制性シナプスの形成部位の選別に関わる。

4) 体性感覚野のバレルの臨界期発達と臨界期可塑性の分子機構

- ・高いカルシウムイオン透過性を有する NMDA 型グルタミン酸受容体の GluN2B はバレルの形成から臨界期終了までの時間的発達を早め、GluN2D はこれを送らせるように拮抗する。
- ・グルタミン酸受容体の活性化を制御するグルタミン酸トランスポーター GLT1 は、発達期における障害誘導性の臨界期可塑性を増大させる分子機構である。



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 162 件)

原著論文:

1. Nakayama H, Miyazaki T, Kitamura K, Hashimoto K, Yanagawa Y, Obata K, Sakimura K, Watanabe M, Kano M: GABAergic inhibition regulates developmental synapse elimination in the cerebellum. *Neuron*, in press. (査読有)
2. Miyazaki T, Yamasaki M, Hashimoto K, Yamazaki M, Abe M, Usui H, Kano M, Sakimura K, Watanabe M: Cav2.1 in cerebellar Purkinje cells regulates competitive excitatory synaptic wiring, cell survival, and cerebellar biochemical compartmentalization. *J. Neurosci.* 32:1311-1328, 2012 (査読有)
3. Ichikawa R, Yamasaki M, Miyazaki T, Konno K, Hashimoto K, Tatsumi H, Inoue Y, Kano M, Watanabe M: Developmental switching of perisomatic innervation from climbing fibers to basket cell fibers in cerebellar Purkinje cells. *J. Neurosci.* 31:16916-16927, 2011. (査読有)
4. Hashimoto K, Tsujita M, Miyazaki T, Kitamura K, Yamazaki M, Shin HS, Watanabe M, Sakimura K, Kano M: Postsynaptic P/Q-type Ca^{2+} channels in cerebellar Purkinje cells mediate synaptic competition among multiple climbing fiber inputs during postnatal development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 108:9987-9992, 2011. (査読有)
5. Straub C, Hunt DL, Yamasaki M, Kim KS, Watanabe M, Castillo PE, Tomita S: Modulation of postsynaptic kainate receptor function by auxiliary subunits. *Nat. Neurosci.*, 14:866-873, 2011. (査読有)
6. Uchigashima M, Yamazaki M, Yamasaki M, Tanimura A, Sakimura K, Kano M, Watanabe M: Molecular and morphological configuration for 2-arachidonoylglycerol-mediated retrograde signaling at mossy cell-granule cell

- synapses in the dentate gyrus. **J. Neurosci**, 31:7700-7714, 2011. (査読有)
7. Yoshida T, Uchigashima M, Yamasaki M, Katona I, Yamazaki M, Sakimura M, Kano M, Yoshioka M, Watanabe M: Unique inhibitory synapse with particularly rich endocannabinoid signaling machinery on pyramidal neurons in basal amygdaloid nucleus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 108:3059-3064, 2011. (査読有)
 8. Miyazaki T, Yamasaki M, Uchigashima M, Matsushima A, Watanabe M: Cellular expression and subcellular localization of Secretogranin II in the mouse hippocampus and cerebellum. **Eur. J. Neurosci.**, 33:82-94, 2011. (査読有)
 9. Yamasaki M, Miyazaki T, Azechi H, Abe M, Natsume R, Hagiwara T, Aiba A, Mishina M, Sakimura K, Watanabe M: Glutamate receptor GluRd2 is essential for input pathway-dependent regulation of synaptic AMPAR contents in cerebellar Purkinje cells. **J. Neurosci.**, 31:3362-3374, 2011. (査読有)
 10. Miyazaki T, Yamasaki M, Takeuchi T, Sakimura K, Mishina M, Watanabe M: Ablation of glutamate receptor GluRd2 in adult Purkinje cells causes multiple innervation of climbing fibers by inducing aberrant invasion to parallel fiber innervation territory. **J. Neurosci.**, 30:15196-15209, 2010. (査読有)
 11. Yamazaki M, Fukaya M, Hashimoto K, Yamasaki M, Tsujita M, Itakura M, Abe M, Natsume R, Takahashi M, Kano M, Sakimura K, Watanabe M: TARPs g-2 and g-7 are essential for AMPA receptor expression in the cerebellum. **Eur. J. Neurosci.**, 31:2204-2220, 2010. (査読有)
 12. Yamasaki M, Matsui M, Watanabe M: Preferential localization of muscarinic M1 receptor on dendritic shaft and spine of cortical pyramidal cells and its anatomical evidence for volume transmission. **J. Neurosci.** 30: 4408-4418, 2010.
 13. Matsuda K, Miura E, Miyazaki T, Kakegawa W, Emi K, Narumi S, Fukazawa Y, Itoh-Ishida A, Kondo T, Shigemoto R, Watanabe M, Yuzaki M: Cbln1 is a ligand for an orphan glutamate receptor d2, a bidirectional synaptic organizer. **Science**, 328:363-368, 2010. (査読有)
 14. Tanimura A, Yamazaki M, Hashimoto Y, Uchigashima M, Kawata S, Abe M, Kita Y, Hashimoto K, Shimizu T, Watanabe M, Sakimura K, Kano M: The endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol produced by diacylglycerol lipase mediates retrograde suppression of synaptic transmission. **Neuron** 65:320-32, 2010. (査読有)
 15. Akashi K, Kakizaki T, Kamiya H, Fukaya M, Yamasaki M, Abe M, Natsume R, Watanabe M, Sakimura K: NMDA receptor GluN2B (GluRe2/NR2B) subunit 1s crucial for channel function, postsynaptic macromolecular organization, and actin cytoskeleton at hippocampal CA3 synapses. **J. Neurosci.** 29:10869-10882, 2009. (査読有)
 16. Hashimoto K, Ichikawa R, Kitamura K, Watanabe M, Kano M: Translocation of a "winner" climbing fiber to the Purkinje cell dendrite and subsequent elimination of "losers" from the soma in developing cerebellum. **Neuron** 63:106-118, 2009. (査読有)
 17. Miura E, Matsuda K, Morgan JI, Yuzaki M, Watanabe M: Cbln1 accumulates and colocalizes with Cbln3 and GluRd2 at parallel fiber-Purkinje cell synapses in the mouse cerebellum. **Eur. J. Neurosci.**, 29:693-706, 2009. (査読有)
 18. Fukaya M, Uchigashima M, Nomura S, Hasegawa Y, Kikuchi H, Watanabe M: Predominant expression of phospholipase Cb1 in telencephalic principal neurons and cerebellar interneurons, and its close allocation with related signaling molecules in somatodendritic neuronal elements. **Eur. J. Neurosci.** 28:1744-1759, 2008. (査読有)
 19. Matsuda S, Miura E, Matsuda K, Kakegawa W, Kohda K, Watanabe M, Yuzaki M: Accumulation of AMPA receptors in autophagosomes in neuronal axons lacking adaptor protein AP4. **Neuron** 57:730-745, 2008. (査読有)
 20. Ito-Ishida A, Miura E, Emi K, Matsuda K, Iijima K, Narumi S, Kondo T, Kohda K, Watanabe M, Yuzaki M: Cbln1 Regulates

- Rapid Formation and Maintenance of Excitatory Synapses in Mature Cerebellar Purkinje Cells in vitro and in vivo. **J. Neurosci.** 28:5920-5930, 2008. (査読有)
21. Takasaki C, Okada R, Mitani A, Fukaya M, Yamasaki M, Fujihara Y, Shirakawa T, Tanaka K, Watanabe M. Glutamate transporters regulate lesion-induced period plasticity in the developing somatosensory cortex. **J. Neurosci.** 28:4995-5006, 2008. (査読有)
 22. Nishiyama H, Fukaya M, Watanabe M, Linden D: Axonal motility and its modulation by activity are branch-type specific in the intact adult cerebellum. **Neuron** 56:472-487, 2007. (査読有)
 23. Nomura S, Fukaya M, Tsujioka T, Wu D, Watanabe M: Phospholipase CB3 is distributed in both somatodendritic and axonal compartments and localized around perisynapse and smooth endoplasmic reticulum in mouse Purkinje cell subsets. **Eur. J. Neurosci.** 25:659-672, 2007. (査読有)
 24. Uchigashima M, Narushima M, Fukaya M, Katona I, Kano M, Watanabe M: Subcellular arrangement of molecules for 2-arachidonoyl-glycerol-mediated retrograde signaling and its physiological contribution to synaptic modulation in the striatum. **J. Neurosci.**, 27:3663-3676, 2007. (査読有)
 25. Nishiyama H, Fukaya M, Watanabe M, Linden D: Axonal motility and its modulation by activity are branch-type specific in the intact adult cerebellum. **Neuron** 56:472-487, 2007. (査読有)
3. Hashimoto K, Yoshida T, Sakimura K, Mishina M, Watanabe M, Kano M: Influence of parallel fiber-Purkinje cell synapse formation on postnatal development of climbing fiber-Purkinje cell synapses: Lessons from GluR2 knockout mice. **Neuroscience**, 162:601-611, 2009. (査読有)
 4. Kano M, Ohno-Shosaku T, Hashimoto Y, Uchigashima M, Watanabe M: Endocannabinoid-mediated control of synaptic transmission. **Physiol. Rev.** 89:309-380, 2009. (査読有)
 5. Watanabe M: Molecular mechanisms governing competitive synaptic wiring in cerebellar Purkinje cells. **Tohoku J. Exp. Med.** 214:175-190, 2008. (査読有)

[学会発表] (計 6 9 件)

1. Masahiko Watanabe. Molecular and morphological configuration for 2-arachidonoylglycerol-mediated retrograde signaling at mossy cell-granule cell synapses in the dentate gyrus. 8th IBRO World Congress of Neuroscience. Florence, Italy, 2011.7.14-18.
2. Masahiko Watanabe. Glutamate transporter GLAST is essential for cytodifferentiation of Bergmann glia and maintenance of cerebellar excitatory wiring. 小脳興奮性回路網維持とパーグマングリアの形態分化におけるグルタミン酸トランスポーター GLAST の機能的役割. 第 34 回日本神経科学大会 Neuro2011, パシフィコ横浜 (神奈川), 2011.9.14-17

[図書] (計 2 件)

渡辺雅彦: 脳・神経科学入門講座 改訂版、前編、羊土社、2008 年、190

渡辺雅彦: 脳・神経科学入門講座 改訂版、後編、羊土社、2008 年、173

[その他]

ホームページ等

<http://www.med.hokudai.ac.jp/~anat-2w/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

渡辺 雅彦 (Watanabe Masahiko)

北海道大学・大学院医学研究科・教授

総説 :

1. Watanabe M, Kano M: Climbing fiber synapse elimination in cerebellar Purkinje cells. **Eur. J. Neurosci.**, 34:1697-1710, 2011. (査読有)
2. Miyazaki T, Watanabe M: Development of anatomical technique visualizing the mode of climbing fiber innervation in Purkinje cells and its application to mutant mice lacking GluRδ2 and Ca_v2. **Anat. Sci. Int.** 86:10-18, 2011. (査読有)

研究者番号：70210945

(2)研究分担者

崎村 建司(Sakimura Kenji)

新潟大学・脳研究所・教授

研究者番号：40162325

狩野 方伸(Kano Masanobu)

東京大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：40185963

(H19→H20 連携研究者)

饗場 篤(Aiba Atsu)

東京大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：20271116

(H19→H20 連携研究者)

深谷 昌弘(Fukaya Masahiro)

北里大学・医学部・講師

研究者番号：10360900

(H19→H20 連携研究者)

山崎 美和子(Yamasaki Miwako)

北海道大学・大学院医学研究科・講師

研究者番号：10431305

(H19→H20 連携研究者)

宮崎 太輔(Miyazaki Taisuke)

北海道大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号：90374230

(H19→H20 連携研究者)