

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 5 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26430023

研究課題名(和文) 補体C1qファミリー分子による海馬CA3シナプス形成と成熟の分子機構解明

研究課題名(英文) The molecular mechanism of synapse organization and modulation via C1q family proteins

研究代表者

松田 恵子 (Matsuda, Keiko)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・講師

研究者番号：40383765

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：カイニン酸型グルタミン酸受容体(KAR)が、海馬歯状回顆粒細胞の軸索(苔状線維：MF)とCA3細胞間のシナプス後部に局在化する機構は不明であったが、シナプス前部MFから放出されるC1q2およびC1q3が、シナプスを越えてシナプス後部細胞に発現するKARと直接結合することによって、局在化を制御する機構を明らかとした。C1q2およびC1q3を二重欠損させたマウスではMF-CA3シナプス後部でKARが消失し、てんかん誘発モデルでの異常分枝シナプスにもKARが集積しなかった。このようにC1q2/3はシナプス後部へのKARの組み込みと機能を制御することで適切な神経ネットワーク活動を作り上げる。

研究成果の概要(英文)：Kainate-type ionotropic glutamate receptors (KARs) are highly expressed at synapses between mossy fibers (MFs) and CA3 pyramidal neurons in the hippocampus and important modulators of neural circuit activities. Although diverse KAR roles depend on their subcellular localization, how they are targeted to specific sites is currently unknown. We have demonstrated that the C1q-like proteins C1q2 and C1q3, produced by MFs, interact with the amino-terminal domains of postsynaptic GluK2 and GluK4 KAR subunits to determine location and function of KARs. In C1q2/3-double null mice, CA3 synaptic responses lost the slow, KAR-mediated, components. Furthermore, despite induction of MF sprouting in a temporal lobe epilepsy model, KARs were not recruited to postsynaptic sites in C1q2/3-double null mice, leading to reduced recurrent circuit activities. C1q-family proteins, broadly expressed, are likely to modulate KAR function throughout the brain.

研究分野：神経科学

キーワード：シナプス グルタミン酸受容体 補体 海馬

1. 研究開始当初の背景

免疫系古典的補体経路の標的認識タンパク質である C1q や、腫瘍壊死因子 TNF α 、脂肪細胞から分泌される Adiponectin は、高度に保存された gC1q ドメインを持ち、C1q/TNF α ファミリーと総称される。このファミリー分子は、gC1q ドメインによって 3 量体を形成し、さらに高次多量体化を引き金として細胞間のシグナル因子として機能する。申請者らはこのファミリーに属する Cbln1 がシナプス前部にて Neurexin、シナプス後部にて $\delta 2$ グルタミン酸受容体 (GluD2) という 2 つの受容体に同時に結合し、小脳平行線維 - プルキンエ細胞シナプスの形成・維持と、機能的シナプス可塑性に必須であることを明らかにした (*Science* '10) (*Eur J Neurosci*, '11)。一方、補体タンパク質 C1q 分子は、網膜神経節細胞 - 外側膝状体シナプスにおいてシナプスの刈り込みを制御する。このように C1q/TNF α ファミリー分子はシナプス機能を調節する新たなファミリー群として、脳神経系での機能が注目され始めていた。

C1q/TNF α ファミリーに属する新たな分泌タンパク質である C1q 様分子 (C1q-like: C1ql) は高度に保存された gC1q ドメインを持ち、この領域によって 3 量体を形成し、またアミノ酸末端領域に存在するシステイン残基によってさらなる高次構造をとる。興味深いことに、これまで我々が研究してきた Cbln ファミリーとは相補的な部位のシナプスに局在することが分かっていた。

この発現パターンと両者の構造の類似性から、申請者は、C1ql2 及び C1ql3 が合成、分泌される海馬歯状回苔状線維 - CA3 シナプス形成機構に注目した。歯状回顆粒細胞では、成熟後においても神経新生が継続しており、苔状線維シナプスは生涯にわたって形成される。それに呼応するように C1ql2,3 は成熟後も合成し続けている。またてんかん患者やそのモデル動物においては、海馬歯状回苔状線維の異常発芽が観察され、シナプス終末が歯状回内側分子層に投射し反回性回路を形成、これにより歯状回の興奮性が上昇し、てんかんの悪化や慢性化の引き金になると考えられている。C1ql ファミリー分子は海馬において障害刺激や、てんかんモデルとして知られるカイニン酸投与によって遺伝子発現が増強することが報告されていた。これら

のことから海馬歯状回顆粒細胞で発現する C1ql2 及び C1ql3 は、海馬歯状回苔状線維が形成するシナプスにおいて重要な生理的機能をもつことが強く期待されていた。

中枢神経での神経細胞間の速い情報伝達は AMPA 型グルタミン酸受容体が担う。一方、カイニン酸型グルタミン酸受容体 (KAR) はチャネルの閉口過程が遅いため、KAR を介した神経伝達は神経ネットワーク活動を時間的あるいは空間的に統合する機能を持つと考えられている。KAR は、海馬歯状回苔状線維と CA3 錐体細胞間のシナプス後部にとりわけ多く、かつ選択的に局在する。しかし、KAR が特定のシナプス後部に局在するメカニズムは不明であった。

そこで、申請者は海馬歯状回苔状線維が形成するシナプスにおいて、C1ql2 及び C1ql3 による、KAR を含むシナプス後部構築機構に着目した。

2. 研究の目的

1) C1ql2 および C1ql3 の受容体を同定し、
2) C1ql2,3 による歯状回苔状線維 - CA3 錐体細胞シナプス構築、維持機構を解明、さらに
3) てんかんモデルにおける苔状線維の異常発芽における C1ql2,3 の機能を解明することにより、海馬歯状回顆粒細胞に高発現する分泌性 C1q / TNF α ファミリータンパク質、C1ql2 と C1ql3 が苔状線維 - CA3 シナプスにおいてどのような生理的機能をもつか明らかにすることが本研究の目的であった。

3. 研究の方法

海馬歯状回苔状線維 - CA3におけるC1ql2およびC1ql3の局在

特異的抗体を用いた、超解像顕微鏡法および免疫電子顕微鏡法を用いて C1ql2 および C1ql3 タンパク質の局在を観察したところ、C1ql2、C1ql3 は MF-CA3 シナプスにおいて、MF 終末部分および MF-CA3 シナプス間隙に観察された。この結果から歯状回顆粒細胞で合成された C1ql2 および C1ql3 は、MF から放出され、MF - CA3 シナプス間隙において機能することが示唆された。

C1ql2,3両遺伝子欠損マウスにおける海馬苔状線維(MF)-CA3神経細胞シナプス前部構築

C1ql2 と C1ql3 による機能代償の可能性を

排除するためにC1ql2とC1ql3遺伝子両方を欠損するマウス (C1ql2/3DKO) を作製したところ、海馬に大まかな形態異常は認められなかった。またMF - CA3シナプスにおいて、シナプス後部マーカーであるPSD95やシナプス前部マーカーであるVGluT1の輝度値や大きさには変化がなかった。C1ql2やC1ql3はMF - CA3シナプス形成過程そのものには関与していないことが明らかとなった。

C1ql2,3両遺伝子欠損マウスにおける海馬苔状線維-CA3神経細胞シナプス後部カイニン酸受容体局在

KARは、海馬歯状回苔状線維 (MF) とCA3錐体細胞間のシナプス後部にとりわけ多く、かつ選択的に局在する。C1ql2やC1ql3の局在パターンはKARサブユニットGluK2と非常に類似していることに着目した。

C1ql2/3DKOではMF - CA3シナプスそのものは正常に形成されたが(上記) このシナプスに多量に存在するはずのGluK2サブユニットがほぼ消失していることがわかった。

さらに電気生理学的手法を用いて、MF - CA3シナプスの応答のうちKARによって担われる遅い成分を計測したところ、C1ql2/3DKOでは、GluK2欠損マウスと同じくKAR成分がほぼ消失していた。このようにC1ql2/3DKOではMF - CA3シナプス後部のKARの局在と機能が障害されていた。

リコンビナントタンパク質を用いた結合実験

リコンビナントタンパク質とHEK細胞を用いた結合実験系で確認したところ、我々はC1ql2,3に最も類縁するタンパク質であるC1ql1の受容体タンパク質として既に報告されてきたGタンパク質共役型受容体BAI3が、C1ql2,3にも受容体として*in vitro*にて結合することを見出した。

同様に、同じくC1qファミリーに属するCbln1がグルタミン酸受容体、GluD2に結合することから、同様の方法にてC1ql2、C1ql3と各グルタミン酸受容体サブユニットとの結合を検討した。するとC1ql2 C1ql3はカイニン酸型グルタミン酸受容体サブユニットである

GluK2の細胞外領域に特異的に結合し、GluK2と相同性が高いGluK1やGluK3には結合しないことが明らかとなった。一方、高親和型のカイニン酸型グルタミン酸受容体サブユニットのGluK4にも非常に強く結合するがGluK5には結合しなかった。

興味深いことにC1ql2およびC1ql3は、他のグルタミン酸受容体サブファミリーであるAMPA型グルタミン酸受容体のGluA1サブユニットにも特異的に結合した。

実際に、GluK2を欠損したマウスのMF-CA3シナプスでは、内在性C1ql2およびC1ql3のシナプス局在が激減していた。同様にGluK4を欠損したマウスのMF-CA3シナプスにおいても、内因性C1ql2とC1ql3のシナプス局在は減少していた。これらの結果は*in vivo*においてもGluK2とGluK4はC1ql2およびC1ql3の受容体として機能していることを示唆している。

同様に結合が見出されたGluA1の欠損マウス、あるいはGタンパク質共役型受容体BAI3の欠損マウスのCA3シナプスでは、内在性C1ql2の局在は野生型の場合と変わりがなかったことから、GluK2やGluK4とは異なり、GluA1、BAI3は少なくとも*in vivo*の海馬においては、C1ql2 C1ql3をシナプスに繋ぎ止める受容体として機能していないと考えられる。

海馬苔状線維-CA3神経細胞シナプスにおけるC1ql2及びC1ql3を介してのシナプス前部受容体ニューレキシン(NRX)によるカイニン酸受容体 (KAR) 局在化機構

筆者らは、C1ql2/3と同じC1qファミリーに属するCbln1が、シナプス前部に存在する受容体であるニューレキシン(NRX)に結合することによってシナプスに呈示されることを報告した (*Eur J Neurosci*, '11)。そこで、C1ql2およびC1ql3にもNRXとの結合能があるかを、リコンビナントC1ql2やC1ql3を用いて検討したところ、NRX3に選択的に結合することが明らかとなった。Cbln1とNRX1、2および3への結合は、NRXのスプライスサイト4 (SS4) 領域に依存しているが、C1ql2、C1ql3とNRX3の結合は、NRX3

のスプライスサイト 5 (SS5) 領域に存在し exon25b にコードされる 17 アミノ酸領域に依存していた。シナプス前部受容体である NRX を HEK 細胞に発現させ、培養海馬神経細胞と共培養すると、シナプス後部のニューロリギンに NRX が結合することによって、PSD95 の集積などシナプス後部の分化を引き起こす。この時 SS5 を持つ NRX3 と C1ql2、または C1ql3 を共発現させると、PSD95 の集積に加え、カイニン酸受容体 GluK2 サブユニットの集積が起きることが分かった。すなわち、シナプス前部に発現する NRX3 受容体によって C1ql2 及び C1ql3 はシナプスにとどめられ、シナプス後部の KAR の集積を引き起こすという、NRX3(SS5+) - C1ql2/3 - KAR からなる 3 者複合体モデルを提唱するに至った。

てんかん時に形成される異常シナプスへの C1ql2/3 によるカイニン酸受容体 (KAR) 集積

側頭葉てんかん患者やそのモデル動物では、海馬歯状回顆粒細胞の軸索である MF が異常に伸び、自分自身の樹状突起近位部に反回性シナプスが形成される。このシナプス後部に KAR が動員されることが神経ネットワーク活動の異常を引き起こし、てんかんを発症しやすくさせると考えられている。興味深いことに、側頭葉てんかんを引き起こす pilocarpine 処理によって、C1ql2/3DKO マウスでは MF の反回性異常シナプスは形成されるものの、シナプス後部に KAR が動員されないことが明らかとなった。その結果、海馬における異常発火が抑えられるために、C1ql2/3DKO で GluK2 欠損マウスと同様に てんかん発作の起こりやすさが軽減されることが分かった。

4 . 研究成果

カイニン酸型グルタミン酸受容体 (KAR) は、記憶・学習に重要な脳部位である海馬において、歯状回顆粒細胞の軸索 (苔状線維: MF) と CA3 錐体細胞間のシナプス後部にとりわけ多く、かつ選択的に局在する。しかし、これまで KAR が特定のシナプス後部に局在

するメカニズムは不明であり、シナプス後部の神経細胞において足場となるタンパク質と結合することによってシナプスに局在すると考えられてきた。

筆者らは、シナプス前部の MF から放出される分泌性タンパク質 C1ql2 および C1ql3 が、シナプス後部の神経細胞に存在する KAR に結合することによって、「シナプスを越えて」制御する新しい機構を初めて明らかとした。C1ql2 および C1ql3 を二重欠損させたマウスでは MF-CA3 シナプス後部で KAR が消失した。側頭葉てんかんでは異常分枝した MF が顆粒細胞自身とシナプスを形成し、同シナプスに KAR が集積することによって てんかん焦点を作ると考えられているが、C1ql2/3 二重欠損マウスにてんかん誘発刺激を与えると、異常 MF 反回枝は形成されるもののそのシナプス後部に KAR が集積しないことが分かった。C1ql2/3 はさまざまな脳部位にも存在し、それぞれの神経回路のシナプス後部への KAR の組み込みと機能を制御することで適切な神経ネットワーク活動を作り上げると考えられる。

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5件)

Synapse organization and modulation via C1q family proteins and their receptors in the central nervous system.

Matsuda K

Neuroscience Research 116: 46-53, 2017.

doi.org/10.1016/j.neures.2016.11.004

査読有

Trans-synaptic modulation of kainate receptor functions by C1q-like proteins.

Matsuda K, Budisantoso T, Mitakidis N,

Sugaya Y, Miura E, Kakegawa W,

Yamasaki M, Konno K, Uchigashima M,

Abe M, Watanabe I, Kano M, Watanabe M, Sakimura K, Aricescu AR, Yuzaki M.

Neuron 90:752-67, 2016.

doi: 10.1016/j.neuron.2016.04.001.

査読有

Structural basis for integration of GluD receptors within synaptic organizer complexes.

Elegheert J, Kakegawa W, Clay JE, Shanks N, Behiels E, **Matsuda K**, Kohda K, Miura E, Rossmann M, Mitakidis N, Motohashi J, Chang VT, Siebold C, Greger IH, Nakagawa T, Yuzaki M, Aricescu AR.

Science 353:295-299, 2016.

doi: 10.1126/science.aae0104.

査読有

Anterograde C1ql1 signaling is required in order to determine and maintain a single-winner climbing fiber in the mouse cerebellum.

Kakegawa W, Mitakidis N, Miura E, Abe M, **Matsuda K**, Takeo YH, Kohda K, Motohashi J, Takahashi A, Nagao S, Muramatsu SI, Watanabe M, Sakimura K, Aricescu AR, Yuzaki M.

Neuron 85:316-329, 2015.

doi: 10.1016/j.neuron.2014.12.020.

査読有

Enriched expression of GluD1 in higher brain regions and its involvement in parallel fiber-interneuron synapse formation in the cerebellum

Konno K., **Matsuda K.**, Nakamoto C., Uchigashima M., Miyazaki T., Yamasaki M., Sakimura K., Yuzaki M., Watanabe M.

Journal of Neuroscience 34:7412-7424, 2014.

doi: 10.1523/JNEUROSCI.0628-14.2014.

査読有

{学会発表}(計3件)

Matsuda K., Yuzaki M.

Synapse organization and modulation via C1q family proteins and their receptors.

第94回日本生理学会 {招待講演}

2017年3月28日 30日

浜松アクトシティコンgresセンター(静岡県浜松市)

Matsuda K., Yuzaki M.

Trans-synaptic modulation of hippocampal CA3 neurons through mossy fiber derived-secreted molecules, C1ql2 and C1ql3.

第39回日本神経科学会

2016年7月20 22日

パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

Matsuda K., Yuzaki M.

Synapse organization and regulation through novel type of complement C1q family.

第38回日本神経科学会

2015年7月28 31日

神戸国際会議場(兵庫県神戸市)

{図書}(計2件)

Cbln1

Matsuda K., Yuzaki M.

Encyclopedia of Signaling Molecules, Edited by Choi S., Springer, New York, 2016. 4 pages.

補体C1qファミリー分子」とシナプス形成・維持

掛川渉 **松田恵子** 柚崎通介

Annual Review 神経 中外医学社 2016 35-44

{産業財産権}

出願状況(計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況(計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

{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

松田 恵子 (Keiko Matsuda)

慶應義塾大学・医学部・専任講師

研究者番号：40383765

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

ブディスアントソ ティモセウス

(Budisantoso Timotheus)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：70724681

(4) 研究協力者

()