

平成 30 年 9 月 4 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04274

研究課題名(和文) 小脳グルタミン酸作動性tripartiteシナプス膜の分子ネットワークと生理機能

研究課題名(英文) Molecular network and physiological function of glutamatergic tripartite synapse in the cerebellum

研究代表者

木下 専 (KINOSHITA, MAKOTO)

名古屋大学・理学研究科・教授

研究者番号：30273460

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,900,000円

研究成果の概要(和文)：重合性GTPaseセブチンは脳で高発現し、細胞骨格や足場としてシナプス前・後・周囲(グリア)膜直下に集積し、多様なシナプス関連分子と相互作用する多機能蛋白質ファミリーであるが、シナプス伝達や精神・神経病態における役割には不明な点が多い。応募者らは、ユニークな構造と細胞内局在を示すセブチン・サブユニットを欠損するマウスが報告例のない空間認知・弁別障害を呈することを発見し、その責任領域である嗅内皮質-海馬歯状回顆粒細胞間シナプスを詳細に解析した。

研究成果の概要(英文)：The perforant path (pp)-granule cell (GC) synapse is poorly characterized at molecular/subcellular level. Here we show that mice that lack a pan-neuronal subunit of the septin cytoskeleton, pass hippocampus-dependent tasks. However, they consistently underperform in specific tasks that require discrimination among distinct spatial contexts. Hippocampal dentate gyrus (DG) neuron-selective supplementation of the septin subunit restores their performance, while the local depletion recapitulates the defects in wild-type mice. EM morphometry of three major hippocampal subregions shows normal synapse density, PSD area, and spine volume, but reveals a significant scarcity of spine apparatus that is most severe in the pp-GC synapse. Live imaging of septin-depleted primary cultured DG neurons reveals low frequency in ER entry from dendritic shafts into spines. These and other findings indicate a septin-mediated postsynaptic mechanism required in pp-GC synapses for spatial pattern separation.

研究分野：分子神経生物学

キーワード：シナプス 細胞骨格 足場 セブチン 認知機能 マウス 電子顕微鏡

1. 研究開始当初の背景

臨床研究により、精神・神経疾患とセプチン・ファミリー (SEPT1-14) に関する知見が独立に蓄積してきた: a) 遺伝性末梢神経障害 (Hereditary Neuralgic Amyotrophy) の原因遺伝子が優性変異型 SEPT9 であること (Nat Genet 2005 等) b) 統合失調症の大規模 GWAS において SEPT3 が責任遺伝子候補として同定されたこと (Nature 2014) c) 統合失調症や双極性障害の患者死後脳 (背外側前頭前皮質) 多数例における SEPT5, SEPT6, SEPT11 の増加 (Mol Psychiatry 2008 等) d) 常染色体劣性若年性パーキンソニズム (PARK2) の責任蛋白質 Parkin (ユビキチン E3 リガーゼ) の機能喪失によって蓄積し得る基質 (SEPT4, SEPT5, α -synuclein 等) であること (PNAS 2000 等) など。

セプチンは多様な組み合わせでフィラメント状に重合して足場や細胞骨格として機能するユビキチン GTP 結合蛋白質であり、特に最終分化したニューロンやグリアで高発現する。しかし、上記も含めて精神・神経病態における役割や、神経系での生理機能に関して解決すべき課題が多く残されている。

2. 研究の目的

重合性 GTPase セプチンは細胞膜直下の細胞骨格や足場とされているが、複合体の組成や分子機能の多様性のためにシナプス伝達や精神・神経病態における作用メカニズムの詳細は不明である。セプチンは小脳で高発現し、平行線維-プルキンエ細胞間 tripartite シナプスを構成する前膜 (Pre) / 後膜 (Post) / グリア突起膜 (Peri) の 3 つの膜ドメイン直下に集積し、各ドメインで異なるシナプス分子と会合する。これら独自の知見に基づき、動作確認済の 2 系統の遺伝子改変マウスを活用して 1) 必須サブユニット SEPT7 をプルキンエ細胞選択的に欠損させて後シナプス膜領域のセプチン複合体を破綻させる。2) バグマングリア選択的に発現する上流因子 CDC42EP4 を欠損させてグリア突起膜領域のセプチン複合体を破綻させる。変異体の行動、シナプス形態、グルタミン酸受容体やグルタミン酸トランスポーターへの影響の評価などを通じてシナプス膜ドメインにおける分子ネットワークの実体解明を試みた。

3. 研究の方法

1) セプチン重合の必須サブユニット SEPT7 に着目して作製し、動作確認済の Sept7 floxed (条件破壊) マウス (Nat Commun 2013) を、プルキンエ細胞 (PC) 選択的に組み換え酵素 Cre を発現する L7 (Pcp-2)-Cre 系統と交配する。(PF-PC)/BG tripartite シナプスのうち後シナプス領域を構成するプルキンエ細胞選択的に SEPT7 を欠損させることにより、樹状突起棘 (スパイン) に集積するセプチン・クラスターのみを破綻させる。

2) グリア突起が被覆するシナプス周囲領域: PF-PC シナプスを包囲するバグマングリア葉状突起の細胞膜直下に集積する CDC42EP4 に着目して独自に作製した Cdc42ep4 欠損マウスを精査する。CDC42EP/BORG ファミリーは、細胞の形態・極性制御シグナル分子である低分子量 G 蛋白質 CDC42 の下流に位置するエフェクターに分類される (研究計画の項に詳細説明)。GTP 結合型 CDC42 とセプチン・ヘテロオリゴマーに相互排他的に会合するが (Nat Cell Biol 2001)、この分子間相互作用の神経化学的/生理的意義は全く不明である。バグマングリア選択的に発現する CDC42EP4 を欠損させることで、(PF-PC)/BG tripartite シナプスのうちグリア/シナプス周囲領域のセプチン系を破綻させる。独自に見出した機能未解明の分子ネットワーク CDC42 CDC42EP セプチン グルタミン酸輸送体に着目して生理機能にアプローチする。

4. 研究成果

神経伝達物質の迅速な再取り込みは、シナプス伝達の時間分解能の向上、過活動抑制、恒常性維持に必須である。小脳皮質に高密度に存在する興奮性シナプスからグルタミン酸を除去するトランスポーター GLAST は、バグマングリア細胞 (大型化し、高度に分化した放射状アストログリア) の突起に大量に集積するが、集積の分子機構や生理的意義は不明であった。本研究では、セプチン、非筋型ミオシン B/MYH10、CDC42EP4 などを含む蛋白質複合体がシナプス周囲のグリア突起膜直下に集積していることを見出した。CDC42EP4 欠損マウス小脳試料の生化学的、微細形態学的、電気生理学的、行動学的解析により、1) GLAST がセプチンから解離して 2) シナプスから遠ざかり、3) グルタミン酸が残留して神経伝達が過剰となり、4) 軽度の運動学習障害を呈し、5) 正常個体には無効な低用量のトランスポーター阻害剤に過敏に反応して著しい運動障害を呈した。以上および先行研究から、上記複合体が GLAST をシナプス近傍に集積させる足場ないし拡散障壁としてグルタミン酸クリアランスの効率化に寄与していることがわかった。GLAST は一部の運動失調症、てんかん、統合失調症、緑内障の原因遺伝子であり、統合失調症脳では CDC42EP4 やセプチンの発現ないし含有量に量的異常がみられることから、上記および関連する遺伝子改変マウス系統の異常を病態モデルと想定して解析を続けている。

統合失調症の一部で報告されているグルタミン酸トランスポーターの遺伝子変異や発現異常、死後脳での CDC42EP4 やセプチンの量的異常は、上記と類似したメカニズムで精神病態に関与する可能性がある。いずれも網膜の放射状グリアである Müller 細胞にも発現しており、CDC42EP4 欠損マウス網膜の解析 (共同研究による未発表データ) から、放

射状グリアに共通する傍シナプス装置としてグルタミン酸代謝に寄与することが示唆されている。小脳と網膜以外ではアストログリアのGLT-1/EAAT2が主要なグルタミン酸トランスポーターであるが、CDC42EP4/セプチンは脳全域のアストログリアにも発現しているため、統合失調症における両者の量的異常はグルタミン酸代謝を介して病態を修飾している可能性があり、さらなる検討が必要である。

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11件)

1. Ageta-Ishihara N, Yamazaki M, Konno K, Nakayama H, Abe M, Hashimoto K, Nishioka T, Kaibuchi K, Hattori S, Miyakawa T, Tanaka K, Huda F, Hirai H, Hashimoto K, Watanabe M, Sakimura K, Kinoshita M. A CDC42EP4/septin-based perisynaptic glial scaffold facilitates glutamate clearance. *Nature Communications* 6:10090, 2015.
2. Hattori Y, Okamoto Y, Nagatsuka K, Takahashi R, Kalara RN, Kinoshita M, Ihara M. SIRT1 attenuates severe ischemic damage by preserving cerebral blood flow. *NeuroReport* 26, 113-117, 2015.
3. Kitao Y, Ageta-Ishihara N, Takahashi R, *Kinoshita M, *Hori O. (*shared correspondence) Transgenic supplementation of SIRT1 fails to alleviate acute loss of nigrostriatal dopamine neurons and gliosis in a mouse model of MPTP-induced parkinsonism. *F1000Research* 4:130, 2015.
4. Parajuli LK, Ageta-Ishihara N, Ageta H, Fukazawa Y, Kinoshita M. Methods for immunoblot detection and electron microscopic localization of septin subunits in mammalian nervous systems. *Methods in Cell Biology* 136, 285-294, 2016.
5. Torii H, Yoshida A, Katsuno T, Nakagawa T, Ito J, Omori K, Kinoshita M, Yamamoto N. Septin7 regulates inner ear formation at an early developmental stage. *Developmental Biology* 419, 217-228, 2016.
6. Mujal AM, Gilden JK, Gérard A, Kinoshita M, Krummel MF. A septin requirement differentiates autonomous and contact-facilitated T cell proliferation. *Nature Immunology* 17, 315-322, 2016.
7. Horigane S, Ageta-Ishihara N, Fujii H, Kinoshita M, Takemoto-Kimura S, Bito H. Facilitation of axon outgrowth via a Wnt5a-CaMKK-CaMKI α pathway during neuronal polarization. *Molecular Brain* 9:8, 2016.
8. Yamada S, Isogai T, Tero R, Tanaka-Takiguchi Y, Ujihara T, Kinoshita M, Takiguchi K. Septin interferes with temperature-dependent domain formation and disappearance of lipid bilayer

- membranes. *Langmuir* 32, 12823-12832, 2016.
9. Ageta-Ishihara N, Konno K, Yamazaki M, Abe M, Sakimura K, Watanabe M, Kinoshita M. CDC42EP4, a perisynaptic scaffold protein in Bergmann glia, is required for glutamatergic tripartite synapse configuration. *Neurochemistry International*, 119, 190-198, 2018.
 10. Shindo A, Audrey A, Takagishi M, Takahashi M, Wallingford JB, Kinoshita M. Septin-dependent remodeling of cortical microtubule drives cell reshaping during epithelial wound healing. *Journal of Cell Science* 131, 2018. in press
 11. Ageta H, Ageta-Ishihara N, Hitachi N, Karayel O, Onouchi T, Yamaguchi H, Kahyo T, Hatanaka K, Ikegami K, Yoshioka Y, Nakamura K, Kosaka N, Nakatani M, Uezumi A, Ide T, Tsutsumi Y, Sugimura H, Kinoshita M, Ochiya T, Mann M, Setou M, Tsuchida K. A novel UBL3 modification influences protein sorting to small extracellular vesicles. *Nature Communications* 2018. in press

[学会発表](計13件) 国際のみ

1. January 15, 2015. Ageta-Ishihara N, Masuda H, Mano Y, Yano Y, Fukazawa Y, Kinoshita M. Filling the gap between genetic and behaviors traits at ultrastructural level. IGER International Symposium "Frontiers in Biological Research with Advanced Electron Microscope Technologies" (Nagoya, Japan).
2. March 1-6, 2015. Ageta-Ishihara N, Yamazaki M, Konno K, Nakayama H, Abe M, Miyakawa T, Hashimoto K, Watanabe M, Sakimura K, Kinoshita M. CDC42EP4-septin complex in parasynaptic domains of Bergmann glia regulates cerebellar motor learning via GLAST-mediated glutamate clearance from the parallel fiber-Purkinje cell synapses. Gordon Research Conference "Glial Biology: Functional Interactions Among Glia & Neurons" (Ventura, CA, USA)
3. March 3, 2015. Ageta-Ishihara N, Konno K, Nakayama H, Hashimoto K, Watanabe M, Kinoshita M. CDC42EP4/septin-based perisynaptic glial scaffold that facilitates glutamate clearance. The 18th iCeMS International Symposium / The 15th International Membrane Research Forum (Kyoto, Japan).
4. January 24-27, 2016. Ageta-Ishihara N, Kinoshita M. Septins as multifunctional cytoskeletal scaffold for the structural and functional organization of axons and synapses. Keystone Symposia "Axons: From Cell Biology to Pathology" (Santa Fe, NM, USA)
5. March 3, 2016. Ageta-Ishihara N, Yamada T, Y. Suzuki Y, A. Sawada A, Takao K, Miyakawa T, Okamura M, Bito H, Inokuchi K, Kinoshita M. Spatial discrimination defects caused by chronic, systemic loss of a septin subunit is recapitulated

by its acute, local depletion in the hippocampal dentate gyrus. International Symposium on Adaptive Circuit Shift 2016 “Integrative Neural Network Linking Multiple Brain Areas for Behavioral Adaptation” (Kyoto, Japan).

6. October 7, 2016. Ageta-Ishihara N, Kinoshita M. Septins as multifunctional cytoskeletal scaffold for the structural and functional organization of neurites and synapses. The 4th Neural Circuits Joint Workshop (Nagoya, Japan).

7. October 26-28, 2016. Ageta-Ishihara N, Kinoshita M. Septins as multifunctional cytoskeletal scaffold for the structural and functional organization of neurites and synapses. NIPS Symposium “Decoding Synapse” (Okazaki, Japan).

8. December 6, 2016. Ageta-Ishihara N, Kinoshita M. CDC42EP4/BORG4-septin complex beneath perisynaptic membrane domains of Bergmann glial processes facilitates GLAST-mediated glutamate clearance and motor learning. ASCB Annual Meeting 2016 (San Francisco, USA).

9. February 19-20, 2017. Elhanbaly E, Ishikawa T, Ageta-Ishihara N, Kinoshita M, Fukazawa Y. A FIB-SEM-based Method for High-Resolution Measurement of Morphological Parameters of Axospinous Synapses. The 1st ABiS Symposium (Okazaki, Japan).

10. May 28, 2017. Ageta-Ishihara N, Fukazawa Y, Takao K, Miyakawa T, Bito H, Inokuchi K, Kinoshita M. A septin-mediated synaptic regulation required for spatial discrimination. Gordon Research Conference “Excitatory Synapses & Brain Function” (Les Diablerets, Switzerland).

11. October 13, 2017. Kinoshita M. CDC42EP4, a major septin-binding protein in astroglia, is required for glutamatergic tripartite synapse configuration. EMBO Workshop on Molecular and Cell Biology of Septins (Berlin, Germany).

12. December 19, 2017. Ageta-Ishihara N, Fukazawa Y, Takao K, Miyakawa T, Bito H, Inokuchi K, Kinoshita M. Entorhinal cortex-hippocampal dentate gyrus synapse anomaly underlying spatial discrimination defects in Sept3-null mice. International Symposium on Adaptive Circuit Shift 2017 “Integrative Neural Network Linking Multiple Brain Areas for Behavioral Adaptation” (Tokyo, Japan).

13. February 10, 2018. Kinoshita M. Unexpected motor and histopathological phenotype found in cerebellum-selective Sept7 knockout mice. The 8th Brain Research Institute International Symposium “Innovative progress of neuroscientific research through the use of advanced animal models” (Niigata, Japan)

{ 図書 } (計 1 件)

木下 専 「19 章： 神経ネットワークの形と機能を制御する細胞骨格系分子群」 DOJIN BIOSCIENCE SERIES 28 脳神経化学 脳はいま化学の言葉でどこまで語れるか (森泰生、尾藤晴彦編) 京都廣川書店

{ 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.bio.nagoya-u.ac.jp/paper/2016-26/01.html>
http://www.bio.nagoya-u.ac.jp/topics/151207_kinoshitaageta.pdf

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

木下 専 (MAKOTO KINOSHITA)

名古屋大学・大学院理学研究科・教授

研究者番号：30273460

(3) 連携研究者

上田-石原奈津実 (NATSUMI AGETA-ISHIHARA)

名古屋大学・大学院理学研究科・講師

研究者番号：60547561