

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 30 年 6 月 1 日現在

機関番号：14501  
研究種目：若手研究(B)  
研究期間：2016～2017  
課題番号：16K19036  
研究課題名(和文) アファディンとその結合分子群によるシナプス維持機構の解明

研究課題名(英文) Synapse maintenance by afadin and its binding proteins

## 研究代表者

丸尾 知彦 (Maruo, Tomohiko)

神戸大学・医学研究科・医学研究員

研究者番号：10625114

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：アファディンとその結合分子マギンのノックアウトマウスを用いた解析により、PAJ分子がシナプス形成・維持を担い、その機能を制御していることが明らかとなった。一方で、シナプス結合及びPAJは、マウスを対象とする場合、実験的飼育環境下での加齢に予想外に強い抵抗性を示すことが明らかとなった。加齢に応じてPAJ分子集積の量的変動は認められたため、今後機能に対する影響を詳細に解析する必要があると考えたため、長期間飼育したこれらのノックアウトマウス、及びPAJ分子の集積に影響があるとされる実験モデル系における、シナプス結合及び機能の維持に果たす役割を解析する環境を整備した。

研究成果の概要(英文)：The investigations using knockout mice of afadin and its binding protein MAGUIN revealed that proteins localized at puncta adherentia junctions (PAJs) regulate synapse formation, maintenance, and resultant functions. On the other hand, synaptic junctions and PAJs are unexpectedly stable in the aged mouse hippocampus under the normal housing condition. There were quantitative alterations, to some extent, of PAJ protein accumulation at the sites of the hippocampal giant mossy fiber synapses, although further experiments would be required to clarify the functional significance of these changes. Toward this aim, I will study aged-afadin and MAGUIN knockout mice, and mouse models in which PAJ protein accumulation is affected.

研究分野：神経細胞生物学、生化学

キーワード：海馬苔状線維シナプス 加齢 アファディン ネクチン マギン

### 1. 研究開始当初の背景

シナプスの形成・維持が個体の学習・記憶の細胞基盤であることが、近年の研究により直接的に証明されつつある。このことから、シナプスの形成・維持機構の解明は、学習・記憶のしくみを明らかにし、加齢や種々の精神・神経疾患による学習・記憶力の低下の細胞基盤を理解する上で重要である。海馬歯状回顆粒細胞の苔状線維とCA3野錐体細胞樹状突起の間に形成される海馬苔巨大状線維シナプスは、海馬依存的な学習・記憶に必須である。本シナプスは2種類の接着構造をふくむ特徴的な形態を有している。すなわち、苔状線維終末と樹状突起シャフト間に上皮のアドヘレンスジャンクション(AJ)に類似の分子構成と電子顕微鏡レベルでの形態学的特徴を持つ接着構造プンクタドヘレンシアジャンクション(PAJ)が形成される。さらに、苔状線維終末が多く枝分かれを持ったスパイン(棘状瘤)を包み込み、約25個のシナプス結合が内包される特徴的な巨大な接着構造複合体が形成される。シナプス前部には神経伝達物質が包含された小胞とその開口放出の足場(アクティブゾーン)が存在し、シナプス後部には神経伝達物質受容体やシグナル分子を集積する足場(シナプス後肥厚部: PSD)が存在する。申請者は、所属研究室で見いだされた、細胞間接着分子である免疫グロブリンスーパーファミリーのネクチンとその結合分子アファディンに着目して本シナプスの形成機構を明らかにしてきたが、成熟したシナプスが、長期間にわたって維持される分子機構は不明である。その解明の手がかりとして、加齢によりネクチンとアファディン及びアファディン結合分子の脳での発現量が変動するという結果を得た。申請者は、これまでに確立した実験系を適用し、老齢および各種遺伝子ノックアウトマウスを調べることで、シナプスの維持機構とその破綻の影響について重要な知見を得ることができると考え、本研究の発案に至った。

### 2. 研究の目的

老齢マウス、またネクチン-1、ネクチン-3、アファディン、およびマギンのノックアウトマウスを用いて、その脳および培養細胞のシナプスを解析することを目的とした。本研究では、以下の二点の解析を計画した。(1)老齢マウスにおけるネクチンとアファディンおよびその結合分子の局在と複合体結合様式の解析:老化脳を継続して研究するために、一年以上前に生まれた野生型マウスを多数維持しており、貴重な老齢マウスを使用出来る環境を整えた。また、老齢マウスの巨大苔状線維シナプスで、電顕レベルでその機能低下を示唆する様々な形態的变化をとらえ始めている。そこで、老齢マウスを用いて、免疫染色法によるネクチンとアファディ

ンおよびマギンを中心としたアファディン結合分子の局在を解析する。また生化学的手法を用いて、それらを核としたタンパク質複合体や、シナプス分画の加齢による変化を解析し、老化によって低下するシナプス維持機構を明らかにする。(2)ネクチンとアファディンおよびマギンのノックアウトマウスを用いたシナプス維持機構の解析:ネクチンとアファディンおよびマギンはシナプス維持に障害があると予想される知能障害や統合失調症の原因遺伝子である。申請者は、ネクチン-1ノックアウトマウスで野生型老齢マウスに類似したシナプス構造変化を示唆するデータを得ている。また、マギンが欠失したヒト家系が複数見つかри、共通した症状として知能障害と言語退行が観察されており、マギンが一度形成された脳機能の維持機構に関与している可能性が示唆されている。そこで、これらノックアウトマウスの巨大苔状線維シナプスをモデルとして、その形態の維持機構を解析する。また、同時に各種マーカーで染色し、(1)の老齢マウスの解析結果との照合を行う。さらに、これらノックアウトマウスから得た培養神経細胞を用いて、分子生物学的な介入実験を行い、シナプス維持の分子機構の詳細を明らかにする。

### 3. 研究の方法

老齢マウスの海馬巨大苔状線維シナプスにおける、ネクチンとアファディンおよびマギンを中心とするアファディン結合分子の局在を、各々に対する特異的抗体を用いて検討する。生化学的方法によるアファディンとその結合分子の相互作用を解析するため、すでに確立している脳の膜分画からプロテオミクス的手法を応用してアファディンを核とする超分子複合体を精製・解析する方法を応用する。苔状線維がまばらに蛍光タンパク質で標識されるトランスジェニックマウスを用い、ネクチンとアファディンおよびマギンのノックアウトマウスと掛け合わせ、その形態を野生型と比較する。形態の定量化とともに、様々なPAJ、PSDマーカーを染色し、電子顕微鏡での観察像と併せて巨大苔状線維シナプス形態の変容が、どの構造の変化と関連しているかを解析する。これにより、シナプス形態と機能分子の発現様式の維持機構を明らかにする。また、おのおののノックアウトマウス由来の培養神経細胞を用いて試験管内でシナプス維持機構の破綻を再現し、分子生物学的介入実験によりこの時点までに得られた結果の分子メカニズムの詳細を明らかにする。

### 4. 研究成果

(1)老齢マウスにおけるネクチンとアファディンおよびその結合分子の局在と複合体結合様式の解析:すでに加齢に伴い、シナプス分子及びPAJ分子が減少する傾向を捉えていたが、これをシステムティックにウェス

タンブロットング法を適用し、さらに詳細に検討した。その結果、このシナプス分子及び PAJ 分子は、加齢に伴い、いくつかのグループに分類される発現量の変動を示した。特に、PAJ 分子は概ね減少傾向にあり、またマギンは直線的な加齢依存性の発現上昇を示した。この成果は、学会及び論文発表した（発表論文、学会発表）。次に、3ヶ月齢マウスと24ヶ月齢老齢マウスの海馬 CA3 野透明層における巨大苔状線維シナプスでの、PAJ 分子ネクチン・アフアディン・カドヘリン・カテニン、及びシナプス結合に局在する分子群の局在を、免疫染色法によって検討した。その結果、加齢による顕著な質的な変化は認められなかった。このように、シナプス結合及び PAJ という神経接着構造は、加齢というファクターに対して相当程度堅牢であることが分かった。PAJ 分子においては、上記の研究成果を一部裏付ける軽微な量的変化の傾向が免疫染色法での解析においても認められたため、サンプル数を増やし現在引き続き検討中である。老齢マウスについては、全体にバックグラウンドが高く、個体ごとのばらつきも大きい傾向が認められたため、この改善にも着手した。また、生化学的にアフアディンやカドヘリン・カテニンを核とする分子複合体の精製も、すでに確立した技術を適用可能であることがわかったため、継続して解析を行っている。マギンに関しては、計6種類の抗体を自作し、また2種類の市販抗体、1種類の研究者からの供与抗体とあわせ、ノックアウトマウスから調整した試料を陰性コントロールとして、免疫染色法に適用可能なものをスクリーニングしたが、全て使用不可であった。ウェスタンブロットング法には適用可能であり、ノックアウトマウスから調整した試料には反応しないものが5種得られた。

(2) ネクチンとアフアディンおよびマギンのノックアウトマウスを用いたシナプス維持機構の解析：まず、アフアディンが海馬巨大苔状線維シナプスの機能と構造の形成・維持に果たす役割を明らかにするため、一連の解析を試みた。その結果、アフアディンは海馬 CA3 野錐体細胞の分化と配列、苔状線維を形成する歯状回顆粒細胞の配列に重要な役割を果たすことが明らかになった。この結果、アフアディンノックアウトマウスの巨大苔状線維シナプスはその数が減り、形成・維持される位置異常が生じることが明らかになった。苔状線維の進展には影響がなかった。これらの結果は、学会及び論文発表した（発表論文、学会発表）。次に、電顕及び電顕立体再構築法を適用し、成獣のアフアディンノックアウトマウスで形成・維持される巨大苔状線維シナプスの超微細形態の解析を試みた。その結果、ノックアウトマウスの PAJ は完全に消失しているわけではなく、極めて肥厚の薄い接着様構造として、野生型とほぼ同数存在していることが分かった。また

解析の結果、ノックアウトマウスの巨大苔状線維シナプスはその複雑性が有意に減少し、シナプス小胞全体及びシナプス結合にドックしているシナプス小胞の数が減少し、シナプス後肥厚部の密度が減少することが明らかになった。これらの結果は、論文発表した（発表論文）。また、アフアディンノックアウトマウスの海馬から樹立した分散培養神経細胞と培養切片において、シナプス結合強度が有意に減少し、その一端がシナプス後部の AMPA 受容体の集積に起因することを見出した（発表論文）。以前に発表したシナプス前部の構造・機能の発達・維持に果たす役割と合わせて、アフアディンが PAJ とシナプス結合の、構造の形成・維持に重要な役割を果たしており、それが機能の発達・維持に繋がっていることを明らかにできた。また、NGL-3 を介したシナプス前部誘導過程がアフアディン依存的事であること（発表論文、学会発表）。アフアディンによる PAJ 及びシナプス結合の形成・維持過程がアフアディンのスプライスバリエントにより大きく異なること（学会発表）が判明した。これらの成果は、さらに論文投稿中である。

マギンは、脳膜分画及び培養細胞に発現させた再構成系の両者で、短いスプライスバリエントである s-アフアディンに t-アフアディンよりも強い結合を示す。しかしながら、研究代表者が作成したノックアウトマウスを用いた実験では、他の研究者が RNAi などを用いた実験で報告しているようなシナプス構造の著しい減弱といった現象は観察されず、アフアディンノックアウトマウスと同様に、その表現系は培養細胞では PSD タンパク質の集積量の減少にとどまった。また、in vivo においても、生後数ヶ月までの海馬苔状線維シナプスでのシナプス結合・PAJ には、強い表現系は見受けられなかった。そこでマギンノックアウトマウスより樹立した分散培養神経細胞の電気生理学的検討を行ったところ、そのシナプス強度が野生型に比して有意に減少しており、これはアフアディンノックアウトマウスで得られた結果と同質のものであった。また、s-アフアディンのマギン結合部位を同定し、その欠失体を用いた実験により、s-アフアディンとマギンの結合が、シナプス後部でのタンパク質複合体の形成・維持を強化することを確かめた。現在、詳細な観察と、生化学的な検討を行っている。

以上の解析から、シナプス結合及び PAJ は、マウスを対象とする場合、実験的飼育環境下での加齢に予想外に強い抵抗性を示すことが明らかとなった。一方で、アフアディンとその結合分子のノックアウトマウスを用いた解析により、PAJ 分子がシナプス形成・維持を担い、その機能を制御していることが明らかとなった。また加齢に応じて PAJ 分子集積の量的変動は認められたため、今後機能に対する影響を詳細に解析する必要がある。現在、長期間飼育したこれらのノック

アウトマウス、及び PAJ 分子の集積に影響があるとされる実験モデル系における、シナプス結合及び機能の維持に果たす影響を解析している。

#### 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7件)

Sakakibara S, Maruo T, Miyata M, Mizutani K, Takai Y. (2018) Requirement of the F-actin-binding activity of I-afadin for enhancing the formation of adherens and tight junctions. *Genes Cells*. 査読有、23(3):185-199.

Maruo T, Mandai K, Miyata M, Sakakibara S, Wang S, Sai K, Itoh Y, Kaito A, Fujiwara T, Mizoguchi A, Takai Y. (2017) NGL-3-induced presynaptic differentiation of hippocampal neurons in an afadin-dependent, nectin-1-independent manner. *Genes Cells*. 査読有、22(8):742-755.

Geng X, Maruo T, Mandai K, Supriyanto I, Miyata M, Sakakibara S, Mizoguchi A, Takai Y, Mori M. (2017) Roles of afadin in functional differentiations of hippocampal mossy fiber synapse. *Genes Cells*. 査読有、22(8):715-722.

Sai K, Wang S, Kaito A, Fujiwara T, Maruo T, Itoh Y, Miyata M, Sakakibara S, Miyazaki N, Murata K, Yamaguchi Y, Haruta T, Nishioka H, Motojima Y, Komura M, Kimura K, Mandai K, Takai Y, Mizoguchi A. (2017) Multiple roles of afadin in the ultrastructural morphogenesis of mouse hippocampal mossy fiber synapses. 査読有、*J. Comp. Neurol.* 525(12):2719-2734.

Shiotani H, Maruo T, Sakakibara S, Miyata M, Mandai K, Mochizuki H, Takai Y. (2017) Aging-dependent expression of synapse-related proteins in the mouse brain. *Genes Cells*. 査読有、22(5):472-484.

Miyata M, Maruo T, Kaito A, Wang S, Yamamoto H, Fujiwara T, Mizoguchi A, Mandai K, Takai Y. (2016) Roles of afadin in the formation of the cellular architecture of the mouse hippocampus and dentate gyrus. *Mol. Cell. Neurosci.* 査読有、79:34-44.

Miyata M, Mandai K, Maruo T, Sato J, Shiotani H, Kaito A, Itoh Y, Wang S, Fujiwara T, Mizoguchi A, Takai Y, Rikitake Y. (2016) Localization of

nectin-2 at perivascular astrocytic endfoot processes and degeneration of astrocytes and neurons in nectin-2 knockout mouse brain. *Brain Res*. 査読有、1649(Pt A):90-101.

##### [学会発表](計6件)

丸尾 知彦、萬代 研二、宮田 宗明、榊原 正太郎、王 淑杰、崔 煌植、伊藤 優、垣内 愛加、藤原 武志、耿 瀟奇、イルワン スプリヤント、溝口 明、森 正弘、高井 義美、海馬神経細胞のシナプス前部の分子のおよび機能的な分化におけるアフアディンの関与、第40回日本神経科学大会、2017年7月20日-23日、幕張メッセ(千葉県)

宮田 宗明、萬代 研二、丸尾 知彦、佐藤 淳哉、塩谷 元、垣内 愛加、伊藤 優、王 淑杰、藤原 武志、溝口 明、高井 義美、力武 良行、脳におけるネクチン-2の局在と機能、第40回日本神経科学大会、2017年7月20日-23日、幕張メッセ(千葉県)

王 淑杰、垣内 愛加、崔 煌植、萬代 研二、丸尾 知彦、高井 義美、溝口 明、マウス網膜における Nectin-1 を介した Self-to-Self 新規接着機構の解析、第40回日本神経科学大会、2017年7月20日-23日、幕張メッセ(千葉県)

丸尾 知彦、萬代 研二、榊原 正太郎、伊藤 優、藤原 武志、王 淑杰、崔 煌植、垣内 愛加、耿 瀟奇、森 正弘、溝口 明、高井 義美、海馬苔状線維シナプス分化における2つのアフアディンスプライスバリエントの役割、第39回日本神経科学大会、2016年7月20日-22日、パシフィコ横浜(神奈川県)

宮田 宗明、丸尾 知彦、山本 昆明、垣内 愛加、王 淑杰、藤原 武志、溝口 明、萬代 研二、高井 義美、海馬発生におけるアフアディンの役割、第39回日本神経科学大会、2016年7月20日-22日、パシフィコ横浜(神奈川県)

塩谷 元、萬代 研二、宮田 宗明、丸尾 知彦、垣内 愛加、王 淑杰、藤原 武志、溝口 明、望月 秀樹、高井 義美、ネクチン-2 とマウス手綱核、第39回日本神経科学大会、2016年7月20日-22日、パシフィコ横浜(神奈川県)

##### [図書](計0件)

##### [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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

丸尾 知彦 (MARUO Tomohiko)

神戸大学・大学院医学研究科・特命助教 /

医学研究員

研究者番号：10625114