

令和 3 年 6 月 7 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2017～2020

課題番号：17H03562

研究課題名（和文）補体様分泌因子とグルタミン酸受容体クロストークによるシナプス成熟の分子機構解明

研究課題名（英文）Molecular mechanism of synapse differentiation through crosstalk of C1q family molecules and glutamate receptors

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） 13,500,000円

研究成果の概要（和文）：C1qファミリー分子と結合するneurexin3のスプライシング特異的のノックアウトマウスを作製した。特異的抗体にて両者が共局在するシナプスを明らかとしたが、ノックアウトマウスにおいて両者のシナプス局在相互作用は見られなかった。しかし本マウスでシナプス前部機能に対し共通した異常が観察されたことから、両者が協働してシナプス前部に働きかける可能性を示唆した。また、同様にC1qファミリー分子と結合するカイニン酸受容体に、シナプス前部分化誘導能があることを発見した。この機能は、グルタミン酸作動性のシナプスに選択的で、C1qとの結合は必須ではなく、またneurexinの関与もないことを明らかとした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

グルタミン酸受容体の最もアミノ酸末端に存在する細胞外領域（ATD）は全長の3分の1を占めるにもかかわらず、機能は不明なままであった。申請者は、シナプス間隙に突き出たグルタミン酸受容体のATDが、Cblnなど分泌型のシナプス間隙分子と相互作用する足場としての機能を明らかとしてきた。そのみならず、グルタミン酸受容体ATD領域が、直接シナプス前部分と結合し、特異的なシナプス前部に対しシナプスを挟んでretrogradeに直接働きかけ、シナプス分化を直接司る機能を明らかとした。本研究成果は、これまでイオンチャンネルと考えられてきたグルタミン酸受容体の全く新しい機能を提唱できるものである。

研究成果の概要（英文）：Splicing specific knockout mouse of neurexin3 exon25b was established, which has been suggested to bind to C1q family molecules. With a specific antibody both, co-localized synapses were identified. But the interaction of these two molecules was not responsible for either synaptic localization. In splicing specific knockout mouse of neurexin3 exon25b, common abnormality in presynaptic function, defects in synaptic vesicle pooling was observed as C1q knockout mouse. This indicate that both collaborated and worked on the presynaptic region. In addition, it was discovered that N-terminal region in kainate receptor subunits have ability of presynaptic differentiation. This function was specific in glutamatergic synapse, and the combination with C1q was not indispensable and there was not the participation of neurexin.

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 カイニン酸受容体

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

申請者は C1q/TNF $\alpha$ ファミリーによるシナプス形成・成熟機構を明らかにしてきたが、このファミリーに属する Cbln1 は、シナプス前部から分泌され、シナプス間隙において、シナプス前部の neurexin 受容体とシナプス後部の GluD2 受容体に結合し、シナプスを跨いで neurexin-Cbln1-GluD2 複合体を形成する (Matsuda et al. *Science* '10, *EJN* '11, Elegheert J. et al. *Science* '16)。この複合体によってシナプス前部ではシナプス小胞分泌機構が構築され、シナプス後部のプルキンエ細胞では、長期抑圧現象を引き起こす分子基盤が構築される。さらに海馬においても、Cbln サブファミリーである Cbln4 が、シナプス後部受容体 GluD1 とともに、シナプス成熟をつかさどり、可塑性成立機構を特定のシナプスにおいて構築することを見出している。

Cbln サブファミリーのみならず、歯状回顆粒細胞に高発現する C1q/TNF $\alpha$ ファミリー分子である、C1q2 と C1q3 が海馬苔状線維 - CA3 シナプスにおいて、シナプス後部のカイニン酸型グルタミン酸受容体のアミノ末端領域に直接結合し、カイニン酸受容体局在をシナプス前部からシナプスを越えて規定すること、neurexin3 受容体に結合することを発見し (Matsuda et al. *Neuron* '16)、シナプスを跨いで neurexin3-C1q2/3-カイニン酸受容体複合体が形成されるという分子基盤を提唱した。

グルタミン酸受容体の最もアミノ酸末端に存在する細胞外領域 (ATD) は全長の 3 分の 1 を占めるにもかかわらず、チャンネルのサブユニット構成選択に関わる以外の機能は不明なままであった。申請者は、シナプス間隙に突き出たグルタミン酸受容体の ATD が、細胞外因子との相互作用領域として機能する可能性に着目した。グルタミン酸受容体の ATD 領域と C1q などの C1q/TNF $\alpha$ ファミリー分子 - neurexin 受容体との相互作用によって、シナプス興奮伝達を担うグルタミン酸受容体そのものが、シナプス後部前部の分化に関与するという全く新しい生理的機能に注目した。

## 2. 研究の目的

シナプス後部グルタミン酸受容体 - C1q/TNF $\alpha$ ファミリー分子 - シナプス前部neurexin受容体というシナプスを跨いだ複合体が、シナプス形成とシナプス特異性を制御する機構を以下の実験項目を達成することによって明らかにする。

(1) シナプス前部より分泌されるC1q2、C1q3がシナプス間隙にとどまり機能するため、足場となる受容体が必要と考えられる。そこでC1q2、C1q3のシナプス局在、さらにシナプス後部グルタミン酸受容体局在化活性に対する、シナプス前部C1q2、C1q3受容体であるneurexin3の関与を検討する。

(2) 申請者はC1q2、C1q3がAMPA型グルタミン酸受容体GluA1のアミノ酸領域に結合することも見出した。そこでneurexin受容体と共役したC1q2やC1q3との結合が、カイニン酸受容体やAMPA型グルタミン酸受容体の細胞外領域構造を変化させ、チャンネル機能を制御する可能性を検討する。

(3) シナプス後部のGluD2受容体のアミノ末端領域に結合したC1q/TNF $\alpha$ ファミリー分子のCbln1は、シナプス前部のneurexinとともに複合体を形成し、シナプス前部においてシナプス小胞分泌機構を構築し、軸索末端の形態変化を引き起こす。そこで興奮伝達を担うグルタミン酸受容体そのものがC1q/TNF $\alpha$ ファミリー分子と相互作用し、シナプス前部の分化を制御するretrogradeな効果を解明する。

## 3. 研究の方法

### (1) C1q2 C1q3と結合するneurexin3スプライシングアイソフォーム発現パターンの時空間的解析

スプライシング特異的な発現パターンを解析することは、ターゲットとなる領域の長さが短い場合、in situ hybridization解析は困難である。そこでneurexin3のexon25bを有するneurexin3アイソフォームがどの神経細胞で発現するかを明らかにする目的で、exon25bにス

トップコドンとPST配列-P2A配列-EGFP cDNAをノックインした、neurexin3 exon25b EGFP ノックインマウスを、新潟大学崎村研究室、ABIS支援の元で作製した。このマウスではexon25bを持つneurexin3を発現する細胞の粗面小胞体内でEGFPが発現し、この細胞から伸展する軸索を含む発現神経細胞がEGFP陽性となる。このマウスを使ってexon25bを有するneurexin3アイソフォームの発現パターンを時空間的に解析する。同時にこれまで当研究室で解析してきたC1qlファミリー分子やグルタミン酸受容体の発現パターンと比較し、どの脳領域のシナプスにおいて、いつグルタミン酸受容体 - C1ql分子 - neurexin3受容体複合体が存在するかを明らかにする。

## (2) シナプス前部neurexin3受容体による、C1ql2 C1ql3のシナプス局在化とグルタミン酸受容体機能制御

海馬苔状線維—CA3シナプスにおいて、C1ql2、C1ql3は苔状線維末端から分泌し、シナプス前部軸索末端表面を含むシナプス間隙に局在化する。この分泌機構やシナプス局在化機構へのneurexin3受容体の関与の可能性を探るため、neurexin3 ノックアウトマウスあるいはC1qlとの結合領域であるexon25bを欠いたneurexin3を発現するマウスにおいて、海馬苔状線維—CA3シナプスでのC1ql2の分泌とシナプス局在を免疫組織染色にて調べる。作成したneurexin3 exon25b EGFP ノックインマウスの組み換え遺伝子をhomoに持つマウスは、exon25bコード領域を欠損したneurexin3を発現するマウスにもなる。

培養細胞上に発現させたC1ql2、C1ql3とneurexin3受容体の複合体は、シナプス後部のカイニン酸受容体の集積を引き起こす。またC1ql2とC1ql3を欠損させたマウスの海馬苔状線維 - CA3シナプスでは、シナプス後部のカイニン酸受容体のシナプス局在が見られない。このC1ql2とC1ql3によるカイニン酸受容体局在化機構とチャンネル機能に、neurexin3との相互作用が関与するか明らかにする目的で、まずneurexin3 exon25b領域を欠損させたマウスのCA3シナプスでのカイニン酸受容体局在を観察する。

C1ql2、C1ql3 - neurexin 複合体とグルタミン酸受容体がシナプスを挟んで相互作用することに依存し、グルタミン酸受容体の動的安定性が変化させることが想起される。そこで、この複合体が CA3 シナプス可塑性へ与える影響を、C1ql2 C1ql3 ダブルノックアウトマウス、さらに neurexin3 exon25b 領域を欠損させたマウスにて電気生理学的に解析する。

## (3) C1ql2,3による海馬苔状線維-CA3神経細胞シナプス前部成熟機構の解明

ファミリー分子である Cbln1 は、小脳平行線維—プルキンエ細胞シナプスにおいて、シナプス前部と後部に存在する、neurexin 受容体とデルタ型グルタミン酸受容体と複合体を形成することで、シナプス前部を形態的、機能的に分化させる。そこでC1ql2、C1ql3が、シナプス後部のみならず、シナプス前部をも分化させる可能性を探る。

近年カイニン酸受容体を欠損させたマウスでは、幼若期の海馬 CA3 シナプスにおいて、苔状線維軸索末端の形状が未成熟であるという報告がなされた。そこでカイニン酸受容体がシナプス形態を成熟させる効果が、C1ql2、C1ql3を間に挟みシナプス前部の neurexin3 と相互作用することに依存する可能性を探るため、以下の実験を行う。

苔状線維 - CA3 シナプスにおいて、シナプス後部のカイニン酸受容体はC1ql2 C1ql3がシナプス局在するのに必須である。そのためカイニン酸受容体欠損マウスで観察された未成熟シナプス前部は、C1ql2 C1ql3 がシナプスに安定化しないことに起因している可能性が想起される。この可能性を C1ql2 C1ql3 ダブルノックアウトマウス、neurexin3 exon25b 領域を欠損させたマウスの苔状線維軸索末端の微細な形態をLight sheet 顕微鏡、二光子レーザー顕微鏡、さらに電子顕微鏡にて詳細に解析することで明らかとする。本実験は連携研究員である竹尾研究員と協働して行う。

直接C1ql2あるいはC1ql3がシナプス前部の分化を誘導しうる可能性を探るため、リコンビナントC1qlを固相化したビーズ、あるいはカイニン酸受容体を発現させたHEK細胞を培養神経細胞に添加、あるいは共培養し、ビーズやHEK細胞上に、シナプス前部の接着および、VGluT1凝集などのシナプス前部分化が観察されるか検討する。

#### (4) マウス個体におけるC1qlファミリー分子 - neurexin3複合体の生理的機能解明

上記neurexin3-C1ql2/3-カイニン酸受容体複合体形成に依存して制御されるシナプス特異性の生理的な意義を明らかとする目的で、neurexin3ノックアウトマウスやneurexin3 exon25b領域を欠損させたマウスにおける、学習成立維持機構を解析する。類縁ファミリー分子であるC1ql1がC1ql2 C1ql3と同じくneurexin3に結合することを見出した。C1ql1は小脳登上線維-プルキンエ細胞シナプスの強化に参与し、小脳依存的な運動学習を司る (Kakegawa et al. *Neuron* '15)。近年C1ql3が扁桃体基底外側部-前頭前野シナプスに発現し、C1ql3ノックアウトマウスではこのシナプスに依存する恐怖条件付け学習を完遂できないことも発表された (Martinelli et al. *Neuron* '16)。これらのシナプスにおける学習成立機構に、C1qlファミリー分子 - neurexin3複合体に依存するシナプス特異化機構が関与する可能性を検討する目的で、neurexin3 exon25b領域を欠損させたマウスの行動解析を行う。

#### 4. 研究成果

##### (1) C1ql2 C1ql3と結合するneurexin3スプライシングアイソフォーム発現パターンの時空間的解析

Neurexin3 exon25b EGFPノックインマウスにおいては伸展する軸索を含む発現神経細胞がEGFP陽性となる。このマウスを使ってexon25bを有するneurexin3アイソフォームの発現パターンを時空間的に解析したところ、海馬において強い発現がみられたのは、海馬台の苔状細胞であった。この細胞はこれまでの実験結果からC1ql3を発現する細胞であったため、この苔状細胞軸索が作る苔状細胞-歯状回分子層最内層シナプスで両者が共存することが明らかとなった。そこで、neurexin3 exon25bにコードされる領域に対する特異的抗体を得ることができた。この抗体を用い、実際にneurexin3 +exon25b産物は苔状細胞-歯状回分子層最内層シナプスに局在していることを明らかとした。

一方、neurexin3 exon25b EGFPノックインマウスにおいて、C1ql2、C1ql3タンパク質が最も顕著に発現する歯状回顆粒細胞では、成熟期にはGFPシグナルは見られず、特異的抗体を用いた結果からも、neurexin3 +exon25b産物は海馬苔状線維-CA3シナプスにほとんど局在していない。しかし幼若期にのみ一過性に発現、海馬苔状線維-CA3シナプスに局在することが明らかとなった。このため、C1ql2、C1ql3とneurexin3+exon25b産物の機能的相互作用はシナプスの種類、時期によって限局しているものと考えられた。

##### (2) シナプス前部neurexin3受容体による、C1ql2 C1ql3のシナプス局在化とグルタミン酸受容体機能制御

マウス受精卵へのCAS9インジェクションによって、neurexin3 exon25b領域を含むスプライシングアイソフォーム特異的ノックアウトマウスを得ることができた。このマウス、あるいはneurexin3 conventionalノックアウトマウスの海馬切片における、C1ql2タンパク質のシナプス局在、またC1ql2、C1ql3によってシナプス局在が決定されるカイニン酸受容体、GluK5サブユニットの局在を検討したところ、上記(1)の結果と対応し、成熟脳海馬苔状線維-CA3シナプスにおいて局在の変化はなかった。また、成熟脳においてneurexin3 +exon25b産物およびC1ql3が共局在するシナプスである苔状細胞-歯状回分子層最内層シナプスにおいても、カイニン酸受容体は局在変化しなかった。このことはneurexin3 exon25b領域を含むスプライシングアイソフォームはC1ql2、C1ql3と強い特異的結合を示すものの、成熟脳においてC1ql2やC1ql3のシナプス局在を規定することはなく、その結果シナプス後部のカイニン酸受容体の局在にも機能しないことを示唆する。

##### (3) C1ql2,3による海馬苔状線維-CA3神経細胞シナプス前部成熟機構の解明

C1ql2、C1ql3 およびこれらによってシナプス後部局在が規定されるカイニン酸受容体が、シナプス後部のみならず、シナプス前部をも分化させる可能性を検討した。するとカイニン酸受容体のアミノ酸末端に存在する細胞外領域(ATD)そのものに、シナプス前部分化誘導能があることが分かった。

この分化誘導能は C1ql1、C1ql2、C1ql3 トリプルノックアウトマウスから調整した海馬神経細胞においても観察されたこと、これまで C1ql 類に結合しないと考えられてきたカイン酸受容体である GluK1 や GluK3 の ATD 領域にも、このシナプス前部誘導能が見られたということから、C1ql 類とカイン酸受容体 ATD 領域の結合とは独立した機能であると考えられた。しかし、海馬苔状線維—CA3 シナプスでは、シナプス後部のカイン酸受容体のシナプス局在は C1ql2、C1ql3 が規定するので間接的関与はみられると考えられる。

また、グルタミン酸作動性のシナプスに選択的で、neurexin の関与もないことを明らかにした。つまりカイン酸受容体 ATD は、C1ql - neurexin との複合体形成以外のターゲット分子を持ち、シナプス前部分化能を呈すると考えられた。

グルタミン酸受容体の最もアミノ酸末端に存在する細胞外領域 (ATD) は全長の 3 分の 1 を占めるにもかかわらず、機能は不明なままであった。申請者は、これまで、シナプス間隙に突き出たグルタミン酸受容体の ATD が、Cbln など分泌型のシナプス間隙分子と相互作用する足場としての機能を明らかとしてきた。本研究により、この機能のみならず、グルタミン酸受容体の ATD 領域が直接シナプス前部分子と結合し、特異的なシナプス前部に対しシナプスを挟んで retrograde に直接働きかけ、シナプス分化を直接司る機能を明らかとした。本研究成果は、これまでイオンチャンネルと考えられてきたグルタミン酸受容体に全く新しい機能を提唱できるものである。

#### (4)マウス個体におけるC1qlファミリー分子 - neurexin3複合体の生理的機能解明

C1ql2、C1ql3と同様にneurexin3 +exon25bスプライシングアイソフォームに結合するC1ql1が共局在するシナプスである、小脳登上線維—プルキンエ細胞シナプスにおいて、neurexin3 exon25b遺伝子欠損による顕著なシナプス機能の変化を明らかとした。C1ql1 ノックアウトマウスで観察された登上線維—プルキンエ細胞シナプスの多重支配は、exon25b ノックアウトマウスでは観察されなかった。小脳運動学習の一つであるOKRの運動学習にも変化は見られなかった。しかし、シナプス前部機能を詳細に検討した結果、synaptic vesicle poolの枯渇が早いという表現型が観察された。この所見は、幼若期においてneurexin3 +exon25b産物、およびC1ql2、C1ql3が共局在するシナプスである海馬苔状線維—CA3シナプスにおいて、C1ql2、C1ql3ダブルノックアウトマウスで見られる所見と同様であった。これらの結果は、シナプス前部に局在するneurexin3 +exon25b産物を介して、C1qlがシナプス前部の機能に関わる可能性を強く示唆するものである。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Nozawa K., Hayashi A., Motohashi J., Takeo YH., Matsuda K., Yuzaki M.	4. 巻 17
2. 論文標題 Cellular and Subcellular Localization of Endogenous Neuroigin-1 in the Cerebellum.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cerebellum	6. 最初と最後の頁 709-721
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s12311-018-0966-x.	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 -

1. 著者名 Suzuki K, Elegheert J, Song I, Sasakura H, Senkov O, Matsuda K, Kakegawa W, Clayton AJ, Chang V., Ferrer-Ferrer M, Miura E, Kaushik R, Ikeno M, Morioka Y, Takeuchi Y, Shimada T, Otsuka S, Stoyanov S, Watanabe M, Takeuchi K, Dityatev A, Aricescu AR, Yuzaki M.	4. 巻 369
2. 論文標題 A synthetic synaptic organizer protein restores glutamatergic neuronal circuits.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Science	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1126/science.abb4853	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 該当する

1. 著者名 Kim H, Kim D, Kim J, Lee HY, Park D, Kang H, Matsuda K, Sterky FH, Yuzaki M, Kim JY, Choi SY, Ko J, Um JW.	4. 巻 295(27)
2. 論文標題 Calsyntenin-3 interacts with both - and -neurexins in the regulation of excitatory synaptic innervation in specific Schaffer collateral pathways.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Biol Chem.	6. 最初と最後の頁 9244-9262
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1074/jbc.RA120.013077	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 該当する

〔学会発表〕 計10件（うち招待講演 8件/うち国際学会 6件）

1. 発表者名 松田恵子
2. 発表標題 補体ファミリーが作り上げるシナプスの橋 ~両方向性シナプス構築と伝達制御~
3. 学会等名 先端モデル動物支援プラットフォーム平成30年度成果発表会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Keiko Matsuda
2. 発表標題 The C1q complement family proteins and glutamate receptors; bridge over the synaptic cleft
3. 学会等名 Neuro2019 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Keiko Matsuda, Manabu Abe, Masahiko Watanabe, Kenji Sakimura, Michisuke Yuzaki
2. 発表標題 Trans-synaptic control of iGluR localization and function through C1q families
3. 学会等名 CNRS - Jacques Monod conference (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Keiko Matsuda
2. 発表標題 A glutamate receptor complex across the synaptic cleft
3. 学会等名 IINS talk "Molecular Mechanisms of Glutamate Receptor Signaling " (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Keiko Matsuda
2. 発表標題 Bridge across synaptic cleft via ionotropic glutamate receptor toward proper circuit formation
3. 学会等名 第43回日本神経科学会 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Keiko Matsuda
2. 発表標題 The C1q complement family proteins and glutamate receptors ~bridge over the synaptic cleft
3. 学会等名 日本生理学会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Keiko Matsuda
2. 発表標題 The C1q complement family proteins and glutamate receptors ~bridge over the synaptic cleft
3. 学会等名 山梨大学先端脳科学特別教育プログラム国際シンポジウム（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Keiko Matsuda
2. 発表標題 The C1q complement family proteins and glutamate receptors ~bridge over the synaptic cleft
3. 学会等名 第95回生理学会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Keiko Matsuda
2. 発表標題 Regulation of glutamate receptors with dancing partner in synaptic cleft.
3. 学会等名 第44回日本神経科学会（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2021年



1. 発表者名 松田恵子
2. 発表標題 グルタミン酸受容体によるシナプス形成機構
3. 学会等名 2020 年度 生理学研究所研究会（招待講演）
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 松田恵子 掛川渉 柚崎通介	4. 発行年 2018年
2. 出版社 化学同人	5. 総ページ数 380 (担当部分10ページ)
3. 書名 17章 中枢神経系における分泌型シナプス形成因子 脳神経化学 脳はいま化学の言葉でどこまで語れるか	

1. 著者名 松田恵子	4. 発行年 2021年
2. 出版社 アドスリー	5. 総ページ数 233 (担当部分 23ページ)
3. 書名 3章 中枢神経系におけるグルタミン酸受容体と分泌型シナプス形成因子のクロストーク ブレインサイエンス・レビュー2021	

〔産業財産権〕

〔その他〕

<a href="http://www.yuzaki-lab.org/">http://www.yuzaki-lab.org/</a>
---

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	荒井 格  (ARAI Itaru)  (00754631)	慶應義塾大学・医学部(信濃町)・助教     (32612)	

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