

令和 2 年 7 月 2 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08485

研究課題名(和文) プルキンエ細胞シナプス後部におけるカルシニューリン依存の入力認識機構の解明

研究課題名(英文) Postsynaptic calcineurin regulates input-specific synapse formation

研究代表者

宮崎 太輔 (Miyazaki, Taisuke)

北海道大学・保健科学研究院・准教授

研究者番号：90374230

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：小脳のプルキンエ細胞では興奮性および抑制性入力に対し、それぞれ棘突起型非対称性シナプスおよび樹状突起型対称性シナプスを形成する。本研究では、シナプス伝達効率の長期可塑性に関わるカルシウム依存性脱リン酸化酵素カルシニューリンに着目し、この分子による発達期シナプス伝達効率変化が入力選択的なシナプス後部形成に関わっているという仮説を立てこの実験的証明を行った。その結果、カルシニューリンの触媒サブユニットであるCNB1が、小脳のプルキンエ細胞および抑制性介在ニューロンに発現しており、CNB1の機能欠失が興奮性および抑制性シナプス形成の入力特異性に大きく影響を与えていることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

中枢神経系の多くは興奮性および抑制性ニューロンに大別され、それらの入力を受けるシナプス後部ではそれぞれの神経伝達物質に対応したシナプス形成様式と神経伝達物質受容体発現が見られる。このようなシナプス形成様式は神経終末依存的な分子機構があると考えられてきたが、その実態については不明な点が多く残されていた。本研究の結果から、長期シナプス伝達に関わることが知られているカルシニューリンがシナプス後部において入力特異的なシナプス形成様式に関わっていることが示唆された。この研究により得られた成果はこれまでのシナプス形成様式モデルとは一線を画し、今後の発展が期待される学術的意義の高いものであると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Cerebellar Purkinje cells form axo-spinous and axo-dendritic synapse with excitatory and inhibitory terminals, respectively. It has been unclear what mechanism regulates the input-specific synapse formation. To understand mechanism of the input-specific synapse formation, the present analysis focused on calcium-dependent phosphatase calcineurin, which regulates long-term synaptic transmission. By anatomical investigation, CNB1, a catalytic subunit of calcineurin expressed at Purkinje cells and molecular layer interneuron which send inhibitory input to Purkinje cells. Moreover, in Purkinje cell specific CNB1-deficient model mice, inhibitory terminals frequently contacted to excitatory Purkinje cell spines whose postsynapse expressed both excitatory and inhibitory neurotransmitter receptors. This result indicates that postsynaptic CNB1 regulates input-specific synapse formation in the developing cerebellum.

研究分野：神経解剖学

キーワード：プルキンエ細胞 カルシニューリン GABA シナプス特異性 抑制性シナプス

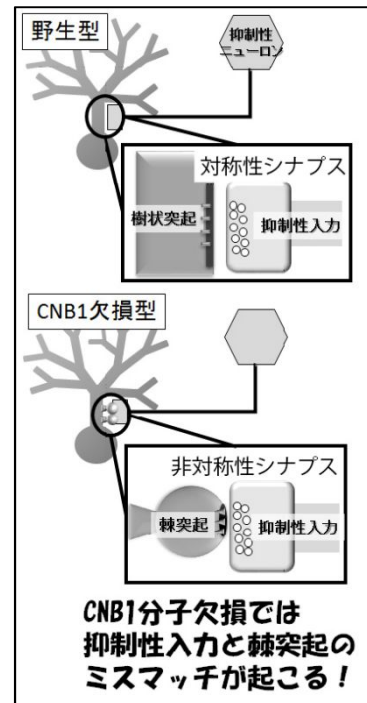
様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

小脳の主要なニューロンであるプルキンエ細胞は平行線維と登上線維による興奮性入力、バスケット細胞、星状細胞などの介在ニューロンによる抑制性入力を受けている。興奮性入力はプルキンエ細胞棘突起との間に非対称性シナプスを形成するのにに対し、抑制性入力は樹状突起との間に対称性シナプスを形成することが知られている。申請者は、小脳の興奮性回路形成における細胞内カルシウムシグナル伝達の機能解明に関する研究に従事し、形態学的手法を用いて P/Q 型電位依存性カルシウムチャネル Cav2.1 やグルタミン酸受容体 GluD2 などの分子が登上線維 - プルキンエ細胞の単一支配化や登上線維 - 平行線維間の入力均衡化といった小脳の興奮性回路形成に関わっていることを明らかにしてきた。(Miyazaki et al., 2004, *J Neurosci.*24:1734-43; Takeuchi and Miyazaki et al., 2005 *J Neurosci.* 25:2146-56 【two-top authored paper】; Miyazaki et al., 2010 *J Neurosci.*30:15196-209; Miyazaki et al., 2012, *J Neurosci.* 32: 1311-28.)

一連の研究の中で、申請者はカルシウム依存性脱リン酸化酵素カルシニューリンがプルキンエ細胞シナプスにおける長期抑圧や運動学習に関わっていることに着目した。カルシニューリンの調節サブユニット CNB1 をプルキンエ細胞特異的に欠失させた

CNB1^{lox/lox}::GluD2^{cre/+} マウスの形態解析を行ったところ、登上線維の支配領域近位縮小化、単一支配化不全といった興奮性回路形成不全だけでなく、本来興奮性終末とシナプスを形成する棘突起が抑制性終末との間にシナプスを形成する異所性の抑制性シナプスが有意に増加しているという事実を見出した。さらにこの非対称性シナプス後部は GABA 作動性終末と結合しているにも関わらず、グルタミン酸受容体などの興奮性シナプス分子を発現しており、「抑制性入力とプルキンエ細胞シナプス後部間のミスマッチ」が起きていること強く示唆するものであった。以上の背景から申請者は**プルキンエ細胞シナプス後部にはカルシニューリン依存的な入力認識機構が存在し、入力選択的なシナプス後部形成に関わっているという仮説を持つに至った。**



2. 研究の目的

本研究は上記の作業仮説の証明を目的として、カルシニューリンの中樞神経系での局在解析とシナプス形成における機能解析を行った。カルシニューリン触媒サブユニットである CNB1 に着目し、その特異抗体、分子機能欠失モデルマウスを用いて、中樞神経系組織における CNB1 局在解析、神経回路発達におけるシナプス後部 CNB1 機能解明、シナプス後部受容体発現様式におけるシナプス後部 CNB1 機能解明を目的として行った。

3. 研究の方法

本課題では以下の研究を行った。項目 については野生型マウスを、項目 についてはプルキンエ細胞特異的 CNB1 欠損マウスと遺伝子導入型 CNB1 機能欠失マウスの両方で検討した。

(1) 小脳における CNB1 発現局在解析

申請者はすでに CNB1 特異抗体を入手しており、その特異性もすでに確認している。この抗体を用いた免疫染色法、免疫電顕法および In situ hybridization 法を用いて小脳における CNB1 発現局在を詳細に調べた。

(2) CNB1 欠損プルキンエ細胞における興奮性、抑制性シナプス結合様式の発達変化

抑制性終末マーカー VIAAT 抗体を用いた包埋前免疫電顕法を行い、抑制性終末 - プルキンエ細胞棘突起間の異所性シナプス形成が CNB1 欠損プルキンエ細胞において有意に増加することを発達期解析から見出した。同様に平行線維、登上線維終末マーカーである VGluT2, VGluT1 抗体（を用い、興奮性シナプス結合様式の超微細構造レベルの変化についても同様に検討した。

(3) 興奮性、抑制性シナプス後部分子発現の定量的解析

包埋後免疫電顕法を用いて、興奮性および抑制性シナプス分子発現について定量的解析を行った。

4. 研究成果

上記の解析を通じて、CNB1 を欠失させると、抑制性神経終末と興奮性プルキンエ細胞スパインとの間に異所性のシナプス形成が見られることが明らかとなった。さらにこのような異所性シナプス後部では、興奮性および抑制性神経伝達物質受容体が混在して発現していることが明らかとなった。正常マウスを用いたプルキンエ細胞特異的遺伝子欠失モデルの解析から、上記の表現型はシナプス後部の CNB1 機能欠失でも再現されることが明らかとなった。本研究の結果から、シナプス後部におけるカルシニューリンが入力特異的なシナプス形成様式を制御していることが示唆された。この研究により得られた成果は、これまでのシナプス形成様式モデルとは一線を画するものであり、国内外の学会で発表された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Nakamoto C, Konno K, Miyazaki T, Nakatsukasa E, Natsume R, Abe M, Kawamura M, Yamasaki M, Sakimura K, Watanabe M.	4. 巻 528(6)
2. 論文標題 Expression mapping, quantification, and complex formation of GluD1 and GluD2 glutamate receptors in adult mouse brain	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J. Comp. Neurol.	6. 最初と最後の頁 1003-1027
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/cne.24792	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 Ogawa Yuki, Kakumoto Kyoko, Yoshida Tetsu, Kuwako Ken-ichiro, Miyazaki Taisuke, Yamaguchi Junji, Konno Ayumu, Hata Junichi, Uchiyama Yasuo, Hirai Hirokazu, Watanabe Masahiko, Darnell Robert B., Okano Hideyuki, Okano Hiroataka James	4. 巻 8
2. 論文標題 Elavl3 is essential for the maintenance of Purkinje neuron axons	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Sci Rep.	6. 最初と最後の頁 2722
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-018-21130-5	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Good JM, Mahoney M, Miyazaki T, Tanaka KF, Sakimura K, Watanabe M, Kitamura K, Kano M.	4. 巻 21(8)
2. 論文標題 Maturation of Cerebellar Purkinje Cell Population Activity during Postnatal Refinement of Climbing Fiber Network.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Cell Rep.	6. 最初と最後の頁 2066-2073
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.1016/j.celrep.2017.10.101.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Choo M, Miyazaki T, Yamazaki M, Kawamura M, Nakazawa T, Zhang J, Tanimura A, Uesaka N, Watanabe M, Sakimura K, Kano M.	4. 巻 8(1)
2. 論文標題 Retrograde BDNF to TrkB signaling promotes synapse elimination in the developing cerebellum.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Nat Commun.	6. 最初と最後の頁 195
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-017-00260-w.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Nakai N, Nagano M, Saitow F, Watanabe Y, Kawamura Y, Kawamoto A, Tamada K, Mizuma H, Onoe H, Watanabe Y, Monai H, Hirase H, Nakatani J, Inagaki H, Kawada T, Miyazaki T, Watanabe M, Sato Y, Okabe S, Kitamura K, Kano M, Hashimoto K, Suzuki H, Takumi T.	4. 巻 3(6)
2. 論文標題 Serotonin rebalances cortical tuning and behavior linked to autism symptoms in 15q11-13 CNV mice.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Sci Adv.	6. 最初と最後の頁 e1603001
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1126/sciadv.1603001. eCollection	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Miyazaki T, Yamasaki M, Hashimoto K, Kohda K, Yuzaki M, Shimamoto K, Tanaka K, Kano M, Watanabe M.	4. 巻 114(28)
2. 論文標題 Glutamate transporter GLAST controls synaptic wrapping by Bergmann glia and ensures proper wiring of Purkinje cells.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Proc Natl Acad Sci U S A.	6. 最初と最後の頁 7438-7443
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.1617330114. Epub	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Aikawa T, Watanabe T, Miyazaki T, Mikuni T, Wakamori M, Sakurai M, Aizawa H, Ishizu N, Watanabe M, Kano M, Mizusawa H, Watase K.	4. 巻 26(16)
2. 論文標題 Alternative splicing in the C-terminal tail of Cav2.1 is essential for preventing a neurological disease in mice.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Hum Mol Genet.	6. 最初と最後の頁 3094-3104
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/hmg/ddx193.	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 Taisuke Miyazaki, Miwako Yamasaki, Kenji F. Tanaka, Masahiko Watanabe
2. 発表標題 小脳ルガ口細胞の帯状構造特異的な入力様式と介在ニューロンへの抑制性支配様式
3. 学会等名 Neuro2019 (新潟県新潟市)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Taisuke Miyazaki, Matthijs Verhage, Masahiko Watanabe, Susumu Tomita
2. 発表標題 Principal rule of neurotransmitter receptor localization at synapse
3. 学会等名 Current Trends and Future Directions of Synapse-Circuit Plasticity Research (静岡県御殿場市) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Taisuke Miyazaki, Miwako Yamasaki, Kenji F. Tanaka, Masahiko Watanabe
2. 発表標題 小脳ルカゴ細胞の帯状構造特異的な入出力様式
3. 学会等名 第125回日本解剖学会総会・全国学術集会(オンライン開催)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Taisuke Miyazaki, Miwako Yamasaki, Kenji F. Tanaka, Masahiko Watanabe
2. 発表標題 Morphological classification of cerebellar interneurons and their connections
3. 学会等名 Synaptic transmission Gordon Research Conference August 12-17, 2018 (Waterville Valley, NH) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 宮崎 太輔, 山崎 美和子, 崎村 建司, 渡辺 雅彦
2. 発表標題 カルシウムチャンネルCav2.1は成体期プルキンエ細胞の生存、バンド状発現、神経支配テリトリーの維持に不可欠である
3. 学会等名 第63回東北・北海道連合支部学術集会(青森県弘前市)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Taisuke Miyazaki, Kenji Sakimura, Masahiko Watanabe
2. 発表標題 プルキンエ細胞に発現するカルシニューリンB1サブユニットは抑制性シナプス形成過程において適切なプレ・ポストシナプスの接着に関わっている
3. 学会等名 第40回日本神経科学大会(千葉県幕張市)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Taisuke Miyazaki, Kenji Sakimura, Masahiko Watanabe
2. 発表標題 Calcineurin B1 subunit CNB1 in Purkinje cells regulates precise pre- and postsynaptic matching in inhibitory synapse formation
3. 学会等名 第8回新潟大学脳研究所共同研究拠点国際シンポジウム(新潟県新潟市)(国際学会)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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