

令和元年6月7日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K14940

研究課題名(和文) 海馬シナプスの形成・機能を担うCbln1-GluD1結合の解析

研究課題名(英文) Functional analysis of Cbln1-GluD1 signaling in the synaptic formation of the hippocampus

研究代表者

大塚 信太郎(Otsuka, Shintaro)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・特任助教

研究者番号：30772397

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：ヒトは記憶・学習を行う際、海馬の神経ネットワークを変化させることで情報を保持すると考えられているが、この変化には海馬でのシナプス構造の変化が最も重要だと考えられている。シナプスは神経細胞間の情報を中継する微細構造体であり、記憶学習に応じて動的に形態が変化するが、どのような分子機序がその機能を担うかはよく分かっていない。

そこで我々は補体分子であるCblnとその受容体であるデルタ型グルタミン酸受容体に注目した。我々はこれらの分子が海馬にも豊富に存在すること、そして遺伝子改変マウスの解析からこれらの分子が海馬のシナプスの形成や可塑性に必須の役割を果たす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

記憶がどのようなメカニズムで実現されているかはまだ十分に解明されていない。その大きな理由は記憶・学習の基盤であるシナプスの形態や機能がどのような分子群によって制御されているか良く分かっていないからである。我々は当研究でCblnおよびその受容体であるデルタ型グルタミン酸受容体が海馬シナプスの形成や機能の制御に重要な役割を担うことを明らかにした。

またシナプス機能の理解はシナプス異常によって引き起こされると考えられ当ている知的障害や自閉症、統合失調症と言った「シナプス病」とも呼ばれる精神疾患の根治治療の開発にも繋がると考えられる。

研究成果の概要(英文)：In the learning and memory, information is through to be retained as alternations of the neural network of the hippocampus and synaptic change plays crucial roles for this alternation. The synapse is a dynamic microstructure which relays information between neurons, however, it is not well know what molecular mechanism regulates this function.

We had focused on the complement molecules Cbln and delta-type glutamate receptor, a receptor of Cbln and found they are abundantly expressed in the hippocampus. Furthermore, we had revealed that these molecules are necessary for synaptic formation and plasticity in the hippocampus.

研究分野：神経科学・電気生理

キーワード：Cbln シナプス

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

シナプスは発達期に形成されるだけでなく、神経活動に応じて生涯に渡って常に形成・除去を動的に繰り返すことで記憶や学習などあらゆる精神活動を担うと考えられている。実際にこれまで様々なシナプス形成因子をコードする遺伝子とヒトの精神疾患の関連性が明らかになってきたが、これらのシナプス形成分子がどのような局面でどのように機能するかはよく分かっていない。研究代表者はこれまで分泌性タンパク質である Cbln とその受容体であるデルタ型グルタミン酸受容体が海馬でのシナプス形成に必須である事、そして海馬依存的な学習に必須であることを予備実験で明らかにしてきた。また海馬では成熟個体でも恒常的に神経細胞が新生され既存回路に組み込まれることで記憶学習に寄与することが知られているが、Cbln 欠損マウスではその新生神経の生存率に異常が見られることも明らかにしてきた。また Cbln およびデルタ型グルタミン酸受容体はヒトにおいてうつや統合失調症などの精神疾患との関連も多数報告されてきており、さらにデルタ型グルタミン酸受容体を欠損した家系では重篤な認知機能低下を引き起こすことも報告されている。これらのことから Cbln およびデルタ型グルタミン酸受容体は海馬においてシナプス形成を通してこれら高次機能を制御している可能性が高いが Cbln-デルタ型グルタミン酸受容体シグナルがどのようにしてシナプス形成を引き起こすのかはまだ分かっていなかった。そこで研究代表者は Cbln-デルタ型グルタミン酸受容体がどのようにシナプス形成・機能を制御し、それが大人新生神経にどのような影響を与えるか明らかにすることにした。

2. 研究の目的

- (1) Cbln およびデルタ型グルタミン酸受容体が海馬歯状回および CA1 のシナプス形成や受容体の局在、長期可塑性についてどのような役割を果たすか形態および電気生理学的解析によって明らかにする。
- (2) Cbln-デルタ型グルタミン酸受容体シグナルが海馬歯状回における未成熟な大人新生神経細胞のシナプスでどのような機能を制御するか明らかにする。
- (3) Cbln-デルタ型グルタミン酸受容体シグナルの上流および下流の分子シグナルについて明らかにする。
- (4) 海馬シナプスが減少するアルツハイマーのモデルマウスの海馬に Cbln を投与することで症状が緩和されるか調べる。

3. 研究の方法

- (1) Cbln およびデルタ型グルタミン酸受容体が海馬歯状回および CA1 でどのようにシナプス形成に関わるか調べるため、それぞれの遺伝子欠損マウスでのシナプス数について電子顕微鏡を用いて解析した。また神経伝達効率、PPR、長期増強および NMDA/AMPA 比について電気生理解析を用いて調べた。

(2) NestinCreERT²/mTFP/デルタ型グルタミン酸受容体-null マウスを用いてタモキシフェン投与後1月後の大人新生神経の神経伝達効率、PPR および NMDA/AMPA 比について電気生理解析を用いて調べた。

(3) Cbln の局在を免疫組織化学を用いて調べた。またシナプス形成分子である Neurexin やデルタ型グルタミン酸受容体との結合性について in vitro binding assay によって解析する。

4. 研究成果

(1) CA1 において Cbln およびデルタ型グルタミン酸受容体が多く存在する海馬歯状回分子層および CA1 網状分子層のシナプス密度を電子顕微鏡で解析した結果 CA1 網状分子層では Cbln 欠損マウスで有意なシナプスの減少が見られること、また歯状回分子層では Cbln 欠損マウスおよびデルタ型グルタミン酸受容体欠損マウスの両方でシナプス密度が減少していることが明らかとなった。

次に CA1 網状分子層および歯状回分子層の神経伝達効率を調べたところ、形態解析の結果と一致して歯状回分子層では Cbln 欠損マウスおよびデルタ型グルタミン酸受容体欠損マウスの両方で神経伝達効率の低下が見られ、CA1 網状分子層では Cbln 欠損マウスのみでシナプス伝達効率の低下が見られた。

次に Cbln-デルタ型グルタミン酸受容体シグナルが長期可塑性にどのように影響するか調べた。海馬急性切片を作製し LTD を誘導する低頻度刺激を加えたところ、Cbln 欠損マウスでは LTP が引き起こされることが明らかとなった。

次にこの可塑性の変化がどのようなシナプス異常で引き起こされているのか調べるため、CA1 網状分子層での NMDA/AMPA 比の解析を行った。その結果 Cbln 欠損マウスおよびデルタ型グルタミン酸受容体欠損マウスの両方で NMDA/AMPA 比が大きく亢進していることが明らかとなった。このことから Cbln はシナプスにおける NMDA 受容体と AMPA 受容体の局在を制御することでシナプス可塑性の方向を制御していることが明らかとなった。

(2) 大人マウスの未成熟な大人新生神経からシナプス応答を記録するため Nestin CreERT² (+); mTFP (+/-); デルタ型グルタミン酸受容体 (-/-) マウスに tamoxifen を投与後、1月後に海馬急性切片を作製しシナプス応答を記録したところ、デルタ型グルタミン酸受容体を欠損した新生神経のシナプス応答は有意に低下していることが明らかとなった。さらに NMDA/AMPA 比を調べたところ野生型よりも低下しており発達期に誕生した成熟歯状回顆粒細胞とは受容体の発現量が異なることも明らかとなった。

歯状回の大人新生神経はパターン分離学習に重要な働きを担うことが知られている。そこで次にデルタ型グルタミン酸受容体欠損マウスにオペラント課題を用いてパターン分離課題を課した所、課題を覚えるのに要する試行数が野生型よりも有意に増加し、パターン分離学習が低下していることも明らかとなった。

(3) 最後に Cbln が Neurexin と結合するか調べるため in vitro binding assay を行った。その結果 Neurexin と結合できることが明らかとなった。また Cbln は海馬培養細胞のプレシナプスを誘導できること、そしてこのシナプス形成はスプライスサイト S4 を含む Neurexin のデオイペプチドで阻害されたことからこのシグナルは Neurexin S4 サイトが必要であることも明らかとなった。

5. 主な発表論文等

〔その他〕

本研究の遂行の過程でマウスが恐怖を感じた際に示すフリーズング行動を市販の Web カメラを用いて定量的に解析するソフトを開発し、所属研究室のホームページ (<http://www.yuzaki-lab.org/publication/software>)で公開している。

6 . 研究組織

(1)研究分担者

なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。