

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(A)

研究期間：2007～2010

課題番号：19200026

研究課題名(和文)成熟脳におけるシナプス維持と記憶の形成 新しい順行性シグナルの解明

研究課題名(英文) Synapse formation and maintenance in adult brain: characterization of a new anterograde signal

研究代表者

柚崎 通介 (YUZAKI MICHISUKE)

慶應義塾大学・医学部・教授

研究者番号：40365226

研究成果の概要(和文):

記憶・学習は神経活動によって引き起こされるシナプスの機能的・形態的な可塑的变化として蓄えられる。この分子機構を解明するために、小脳をモデルとして、 $\delta 2$ 型グルタミン酸受容体($\delta 2$ 受容体)とCbln1という2つの分子に着目した。 $\delta 2$ 受容体のアミノ末端に小脳顆粒細胞が分泌するCbln1が結合することによってシナプス形成が制御され、そのカルボキシル末端によって、機能的シナプス可塑性が誘導されることを初めて明らかにした。

研究成果の概要(英文):

Memories are believed to be stored as functional and morphological changes at synapses. To understand the underlying molecular mechanisms, we focused on two molecules, the $\delta 2$ glutamate receptor and Cbln1, which play essential roles in cerebellar functions, including motor memory. We found that Cbln1, released from cerebellar granule cells, binds directly to the amino terminus of the $\delta 2$ receptor and regulate synapse formation. Furthermore, the carboxyl terminus of the $\delta 2$ receptor regulates induction of functional synaptic plasticity.

交付決定額

(金額単位:円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	13,900,000	4,170,000	18,070,000
2008年度	8,000,000	2,400,000	10,400,000
2009年度	8,000,000	2,400,000	10,400,000
2010年度	8,000,000	2,400,000	10,400,000
総計	37,900,000	11,370,000	49,270,000

研究分野：神経科学

科研費の分科・細目：神経科学・神経科学一般

キーワード：シナプス形成、記憶、長期抑圧、小脳、シナプス可塑性、グルタミン酸受容体

1. 研究開始当初の背景

神経回路網はいったん完成したあとも、生涯にわたって神経活動に応じてシナプス結合強度を変化させ、長期増強(LTP)・長期抑圧(LTD)といったシナプス可塑性を示す。このような機能的な可塑性に加えて、成熟脳においてもシナプスの形態的变化が起きることが、近年判明してきた。しかし、このような成熟脳における機能的可塑性を支える分子的基盤については未だに不明な点が多い。この問題の解明は、基礎科学上の観点のみでなく、高

齢社会に伴う認知症への対策や、成体脳において再生医学による神経回路網の再構築を目指すためにも重要な課題となっている。

2. 研究の目的

私たちは小脳プルキンエ細胞に特異的に発現する $\delta 2$ 型グルタミン酸受容体($\delta 2$ 受容体)と、小脳顆粒細胞から分泌されるCbln1という2つの分子が、協調して機能的および形態的可塑性を制御することを見いだした。そこで本研究ではこの2つの分子に着目して、成熟脳に

おける機能的・形態的シナプス可塑性機構を明らかにすることを目的とした。具体的には以下の3つの研究目標に沿って研究を進めた。
 (1) Cbln1 と $\delta 2$ 受容体がどのようにして機能的可塑性 (LTD) を制御するのかを解明する。
 (2) Cbln1 と $\delta 2$ 受容体がどのようにして平行線維 プルキンエ細胞シナプス形成と維持を制御するのかを解明する。
 (3) $\delta 2$ 受容体の内因性リガンドと Cbln1 に対する特異的受容体を同定し、これらの分子群がどのように神経活動によって調節されるのかを解明する。

3. 研究の方法

Cbln1 と $\delta 2$ 受容体による、LTD 制御機構およびシナプス形成・維持制御機構の解明を図るために、以下のように変異 $\delta 2$ 受容体を用いた「機能的レスキュー実験」を行った。すなわち、 $\delta 2$ 受容体は他のチャンネル型グルタミン酸受容体と同様に、最アミノ末端、リガンド結合部位、チャンネル、カルボキシル末端などの機能ドメインが存在すると類推される。そこで、これらの各ドメインに変異を導入し、 $\delta 2$ 受容体欠損マウスのプルキンエ細胞に発現させることにより、(1) LTD や運動学習のために必要な $\delta 2$ 受容体の機能ドメイン、(2) シナプス形成・維持のために必要な機能ドメインについてそれぞれ検討した。

一方、 $\delta 2$ 受容体の内因性リガンドと Cbln1 に対する特異的受容体を同定するために、それぞれの分子への特異的抗体を用いた免疫電子顕微鏡による高解像度解析や組換え Cbln1 を用いた結合部位の詳細な生化学的解析を進めた。さらに、神経活動による Cbln1 の発現調節機構については培養小脳顆粒細胞の神経活動を亢進ないし抑制した後に見られる Cbln1 mRNA の発現量の変化とそれに伴うシナプス形態の変化について検討した。

4. 研究成果

上述の機能的レスキュー実験の結果、(1) $\delta 2$ 受容体のリガンド結合部位やチャンネル部位は LTD や運動学習に必須でないこと、(2) LTD や運動学習には、 $\delta 2$ 受容体のカルボキシル (C) 末端部分が必須であること、(3) $\delta 2$ 受容体の最アミノ (N) 末端は平行線維 シナプスの形成と個体レベルにおける失調歩行の回復に必須であること、などが判明した。すなわち、 $\delta 2$ 受容体はチャンネル型グルタミン酸受容体に属するものの、少なくともシナプス可塑性やシナプス形成・維持といった機能の発現には、グルタミン酸の結合やイオンチャンネル活性は必要でない、という驚くべき発見に至った (図 1)。この新しい概念はいくつかの総説やグルタミン酸受容体についての単行本にも取り上げられ、Gordon や

Keystone などの国際会議で発表した。

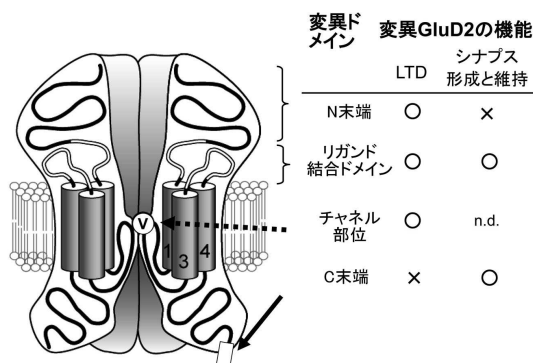


図 1 $\delta 2$ 受容体(GluD2)の機能ドメインの解析

一方、シナプス形成・維持に關与する $\delta 2$ 受容体の N 末端部分には内因性リガンドとして、Cbln1 が直接結合することを明らかにした。Cbln1 は平行線維から分泌され、シナプス後部の $\delta 2$ 受容体とシナプス前部の Neurexin (Nrx) にそれぞれ結合し、Nrx-Cbln1- $\delta 2$ 受容体という三者複合体がシナプス後部とシナプス前部に作用する、新しいシナプス形成因子として作用することを明らかにした (図 2)。

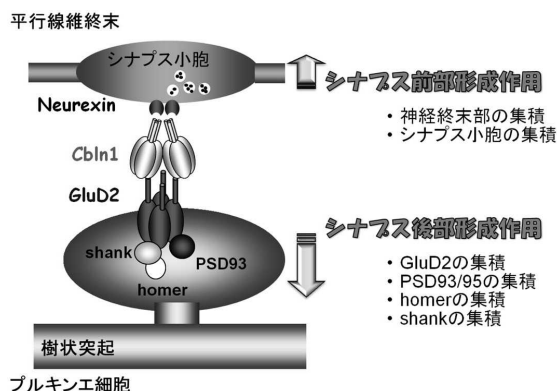


図 2 Cbln1 と $\delta 2$ 受容体(GluD2)によるシナプス形成作用

さらに、小脳顆粒細胞の神経活動(脱分極)が数時間亢進すると、細胞内への Ca 流入とカルシニューリンに依存して、Cbln1 遺伝子発現がほぼ完全にストップし、平行線維 プルキンエ細胞シナプスが減少することを発見した。幼若時の顆粒細胞は持続的に脱分極していることから、この機構は成熟に伴う Cbln1 の発現制御と平行線維シナプス形成に關わっていると考えられる。また、成熟後において神経活動が亢進することによって引き起こされる神経回路の再編機構にも關与している可能性がある (次ページ図)。

以上の研究成果が発端となり、2009 年度下半期より、Cbln1 とその類縁分子群による

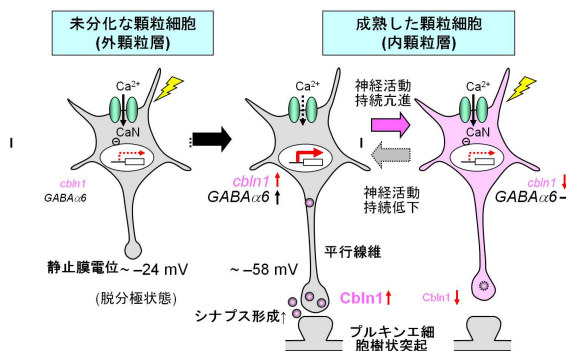


図 3 神経活動による Cbln1 遺伝子発現調節

シナプス制御機構について包括的に検討を進めることを目指した科学技術振興機構 CREST 研究に繋がった。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 19 件) 全て査読有り。

Emi, K., Kohda, K., Kakegawa, W., Narumi, S., Yuzaki, M.. A new rapid protocol for eyeblink conditioning to assess cerebellar motor learning. *Neurochem. Res.* in press 2011

Matsuda K, Yuzaki M. Cbln1 and the Delta2 Glutamate Receptor An Orphan Ligand and an Orphan Receptor Find Their Partners, *Cerebellum*, in press 2011

Yuzaki M Cbln1 and its family proteins in synapse formation and maintenance. *Curr Opin Neurobiol* 21:215-220, 2011.

Matsuda K, Miura E, Miyazaki T, Kakegawa, W., Emi K, Narumi S, Fukazawa Y, Ito-Ishida A, Kondo T, Shigemoto R, Watanabe M, Yuzaki M. Cbln1 is a ligand for an orphan glutamate receptor $\alpha 2$, a bidirectional synapse organizer. *Science*, 328, 363-368, 2010

Iijima T, Miura E, Watanabe M, Yuzaki M. Distinct expression of C1q-like family mRNAs in mouse brain and biochemical characterization of their encoded proteins. *Eur J Neurosci* 31:1606-1615, 2010.

Yuzaki M. Synapse formation and maintenance by C1q family proteins: a new class of secreted synapse organizers. (In: Special Issue: Formation, Regulation & Plasticity of Glutamatergic Synapse). *Eur J Neurosci* 32:191-197, 2010.

Kakegawa W., Miyazaki T, Kohda K., Matsuda K, Emi K, Motohashi J, Watanabe M, Yuzaki M. The N-terminal domain of GluR $\alpha 2$ (GluR $\alpha 2$) recruits

presynaptic terminals and regulates synaptogenesis in the cerebellum in vivo. *J. Neurosci.*, 29, 5738-5748, 2009.

Miura E, Matsuda K, Morgan J I, Yuzaki M., Watanabe M. Cbln1 accumulates and colocalizes with Cbln3 and GluR $\alpha 2$ at parallel fiber-Purkinje cell synapses in the mouse cerebellum. *Eur. J. Neurosci.* 29:693-706, 2009.

Matsuda K, Kondo T, Iijima T, Matsuda, S, Watanabe M, Yuzaki M. Cbln1 binds to specific postsynaptic sites at parallel fiber-Purkinje cell synapses in the cerebellum. *Eur. J. Neurosci.* 29:707-717, 2009.

Iijima T, Emi K, Yuzaki M. Activity-dependent repression of Cbln1 expression: mechanism for developmental and homeostatic regulation of synapses in the cerebellum. *J. Neurosci.*, 29, 5425-5434, 2009.

Yuzaki M. New (but old) molecules regulating synapse integrity and plasticity: Cbln1 and the delta2 glutamate receptor. *Neuroscience* 162, 633-643, 2009.

Ito-Ishida A, Miura E, Emi K, Matsuda K, Iijima T, Kondo T, Kohda K., Watanabe M, Yuzaki M. Cbln1 regulates rapid formation and maintenance of excitatory synapses in mature cerebellar Purkinje cells in vitro and in vivo. *J. Neurosci.*, 28:5920-5930, 2008.

Nakagami R, Kohda K, Kakegawa W., Kondo T, Kato N, and Yuzaki M. Phosphorylation of delta2 glutamate receptors at serine 945 is not required for cerebellar long-term depression. *Keio J. Med.*, 57:105-110, 2008.

Kakegawa W., Miyazaki T, Emi K, Matsuda K, Kohda K., Motohashi J, Mishina M, Kawahara S, Watanabe M, Yuzaki M. Differential regulation of synaptic plasticity and cerebellar motor learning by the C-terminal PDZ-binding motif of GluR $\alpha 2$. *J. Neurosci.*, 28, 1460-1468, 2008.

Kakegawa W., Kohda K., Yuzaki M. The $\alpha 2$ "ionotropic" glutamate receptor functions as a non-ionotropic receptor to control cerebellar synaptic plasticity. *J. Physiol.*, 584, 89-96, 2007.

Kakegawa W, Miyazaki T, Hirai H, Motohashi J, Mishina M., Watanabe M, Yuzaki M. Ca²⁺ permeability of the channel pore is not essential for the $\alpha 2$ glutamate receptor to regulate synaptic plasticity and motor coordination. *J. Physiol.*, 579, 729-735, 2007.

Kohda K, Kakegawa W, Matsuda S, Nakagami R, Kakiya N, Yuzaki M. The extreme C-terminus of GluR α 2 is essential for induction of long-term depression in cerebellar slices. *Eur. J. Neurosci.*, 25, 1357-1362, 2007.

Iijima I, Miura E, Watanabe M, Yuzaki M. Characterization of a transneuronal cytokine family Cbln regulation of secretion by heteromeric assembly. *Eur. J. Neurosci.*, 25, 1049-1057, 2007.

Motohashi J, Kakegawa W, Yuzaki M. Ho15J—a new hotfoot allele in a hot spot in the gene encoding the delta2 glutamate receptor. *Brain Res.*, 1140, 153-160, 2007.

[学会発表](計7件)

柚崎通介: チャネル型グルタミン酸受容体 構造生物学で解けていない問題, 大阪大学蛋白質研究所セミナー「神経科学と構造生物学の融合」2010年10月29日大阪

松田恵子, 柚崎通介: 分泌因子 Cbln1 とその受容体による小脳平行線維シナプス形成の分子機構, 第33回日本神経科学大会シンポジウム「精神・神経活動の基盤としてのシナプス研究の最近の進歩」2010年9月4日, 神戸

柚崎通介: AMPA 受容体のダイナミクスと局在化を制御する新しい機構, 第33回日本神経科学大会シンポジウム「やわらかい脳を支えるイオンチャネル、受容体の局在化機構」2010年9月2日, 神戸

Yuzaki M. Cbln1 and its receptor: a unique and essential bidirectional synaptic organizer complex. Invited Talk at the Keystone Symposia on Synapses: Formation, Function and Misfunction, Snowbird, Utah, USA, April 13, 2010.

Yuzaki M. Cbln family proteins and their receptors: unique presynaptic organizers in the cerebellum and hippocampus, Selected Talk at the

Gordon Conference on Excitatory Synapses and Brain Function, Les Diablerets, Switzerland, September 8, 2009.

Yuzaki M. Toward functional recovery of neuronal circuits—two new molecules regulating formation and maintenance of synapses in adult brain. The 2nd Symposium on Brain and Mind Research in the Asia/Pacific (BMAP), Singapore, September 2, 2008.

柚崎通介, 飯島崇利, 松田恵子, 石田綾, 三浦絵里子, 江見恭一, 幸田和久, 近藤哲朗, 渡辺雅彦, Cbln1 ファミリータンパク質: 成熟脳において急速かつダイナミックにシナプス形成と可塑性を制御する因子, 第85回日本生理学会大会2008年3月25日, 東京

[図書](計3件)

柚崎通介: 京都廣川書店, リガンド作動性チャネル In: トランスポートソームの世界 膜輸送研究の源流から未来へ (金井、竹島、森、久保編) 2011. 49-65(490)

Yuzaki M. Glutamate Receptors: NMDA and Delta Receptors. In: Handbook of Neurochemistry and Molecular Neurobiology (Lajtha, A. ed), Springer, New York, 2009. 315-331(632)

Yuzaki M. Delta receptors. In: The Glutamate Receptors. (Gereau, R.W., and Swanson, G.T. eds), The Humana Press, New Jersey, 2008. 159-178 (576)

[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.yuzaki-lab.org/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

柚崎 通介 (YUZAKI MICHISUKE)

慶應義塾大学・医学部・教授

研究者番号: 40365226

(2) 研究分担者

幸田 和久 (KOHDA KAZUHISA)

慶應義塾大学・医学部・講師

研究者番号: 40334388

掛川 渉 (KAKEGAWA WATARU)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号: 70383718

(3) 連携研究者

該当者なし