

平成 21 年 6 月 16 日現在

研究種目： 若手研究 (B)
 研究期間： 2007～2008
 課題番号： 19700349
 研究課題名 (和文) シナプス前部から分泌される新しいシナプス形成分子 Cbln1
 ～受容メカニズムの解析
 研究課題名 (英文) Cbln1, novel synaptogenic factor secreted from presynaptic site
 ～ The mechanism of its acceptance.
 研究代表者
 松田 恵子 (MATSUDA KEIKO)
 慶應義塾大学・医学部・助教
 研究者番号： 40383765

研究成果の概要：

Cbln1分子は小脳顆粒細胞軸索 - プルキンエ細胞間でのシナプスの形成・維持と機能的可塑性に必須である分泌性因子である。我々はCbln1全長がリガンドとして働き、その受容体がプルキンエ細胞神経棘上に特異的に局在することを示した。申請者はCbln1と共役して働く受容体候補の膜タンパク質を同定し、この受容体がCbln1によるシナプス形成において必須な受容体複合体の一部であることを見出した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,300,000	0	2,300,000
2008年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	300,000	3,600,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：神経科学・神経化学 神経薬理学

キーワード：細胞内情報伝達・シナプス・小脳

1. 研究開始当初の背景

個体における記憶、学習の実態はシナプス結合の強度変化(可塑性)である。標的細胞から分泌された神経栄養因子は、発達段階において、神経細胞の生存や選択的シナプス強化過程を制御する。回路網が完成した成人期においても神経活動依存的に、機能的、形態的にダイナミックなシナプス結合再改変が進行しているが、この過程は限局した領域に起こ

る非常に微細な変化であるため、分子的基盤については未解明な点が多い。神経栄養因子は、成熟脳においてもこの過程に重要な役割を果たしていることが近年明らかとなってきた。

16アミノ酸からなる小脳プルキンエ細胞特異的ペプチドとして同定されたセレブリンの機能は長らく不明であった。その後、

セレブリン前駆体分子 CbIn1 は、腫瘍壊死因子 (TNF α) /補体 (C1q) スーパーファミリーに属し、顆粒細胞で合成されることが判明してきた。さらに、CbIn1 遺伝子欠損マウスの解析から CbIn1 分子は顆粒細胞軸索 (平行線維) - プルキンエ細胞シナプスの形成・維持と機能的可塑性に必須であることが明らかとなった。

しかし、顆粒細胞で合成された CbIn1 分子が、どのようなプロセッシング過程を経てシナプス後部のプルキンエ細胞に働きかけるのか、は未だに明らかではなかった。例えば、CbIn1 分子が顆粒細胞側で部分分解されて、同定の元となったセレブリンペプチドとなった後に、初めてプルキンエ細胞に移行する可能性も示唆されていた。しかし、我々の実験結果から、初代培養細胞や急性小脳スライス標本において、部分分解を受けないリコンビナント野生型 CbIn1 が全長のまま、プルキンエ細胞樹状突起上の神経棘に選択的に結合することが明らかとなってきた。この実験事実は**セレブリンペプチドではなく、その前駆体分子と考えられていた CbIn1 そのものがシグナル分子として顆粒細胞から分泌され、シナプスを越えて、プルキンエ細胞神経棘上に存在する CbIn1 受容体に結合する**ことを強く示唆していた。

2 . 研究の目的

小脳顆粒細胞で合成された CbIn1 は軸索から放出され、シナプス後部であるプルキンエ細胞に働きかけ、その接触状態を制御する。CbIn1 欠損マウスでは接触状態の保たれているシナプスにおいてさえ、機能的可塑性である LTD が観察されないことから、CbIn1 はシナプス接触という構造的なシナプス形成過程のみならず、生理的に機能しうるシナプスを作り上げる過程にも関与する分子である。CbIn1 のシグナル伝達経路解明は、平行線維シナプスの形成過程と、可塑性を成立させる分子メカニズム、さらに両者の関連性解明に新たな知見を提供できる。

新しい分泌型シナプス形成、可塑性調節因

子としての CbIn1 のシグナル伝達経路を解明することが本研究の目的である。これを達成するために4つの個別目標を挙げた。

CbIn1 受容体 - CbIn1 リガンド結合様式の解明

プルキンエ細胞神経棘上に存在する CbIn1 受容体の同定

CbIn1 リガンド結合によって活性化されるシグナル伝達経路の探索

内在性 CbIn1 機能阻害による CbIn1 機能探索

3 . 研究の方法

(1) CbIn1 受容体 - CbIn1 リガンド結合様式の解明

哺乳類細胞系から得られたリコンビナント野生型 CbIn1 分子が、培養プルキンエ細胞および急性小脳スライス標本において、プルキンエ細胞樹状突起上の神経棘に特異的に結合することを見出していた。またリコンビナント CbIn1 分子が成熟小脳から調製したシナプトソーム分画に強い結合を示すことを明らかにしていた。この実験事実は CbIn1 受容体タンパク質がプルキンエ細胞神経棘膜上に存在することを示す。この受容体 CbIn1 リガンドの結合様式を明らかにする目的で、CbIn1 受容体 リガンド結合キネティックス、CbIn1 受容体 リガンド解離キネティックス、CbIn1 受容体 リガンド結合を解離させる条件を明らかとする。これらの実験はすべて内在性リガンドの影響の及ばない CbIn1 欠損マウス小脳から調整したシナプトソーム分画を用いる。ここから得られる情報は、(2) における受容体タンパク質精製へ強力な情報を呈する。

(2) プルキンエ細胞神経棘上に存在する CbIn1 受容体の同定

(1) で得られた情報を元に、精製 CbIn1 を利用したカラムに高親和性で付着する結合タンパク質を精製、質量分析法により CbIn1 受容体の同定を試みる。

(3) Cbln1リガンド結合によって活性化されるシグナル伝達経路の探索

リコンビナントCbln1がCbln1欠損マウスにおいてシナプス低形成を回復させる能力を有することが明らかとなったため、Cbln1リガンドがプルキンエ細胞において、どのような情報伝達系を活性化するか、従来シナプス形成過程に関わると考えられている代表的経路について、Cbln1欠損マウスの急性単離小脳スライス片において生化学的に解析する。あるいは培養プルキンエ細胞を用いた蛍光顕微鏡観察により検討する。

(4) 内在性Cbln1機能障害によるCbln1機能探索

TNFAファミリーのコラーゲンXでは、3量体が形成できない突然変異によって、Schmidt型骨端軟骨形成不全症が発症する。同じファミリーに属するCbln1にもSchmidt型突然変異部位に対応するアミノ酸残基が保存されている。我々の最近の実験結果では、Cbln1のSchmidt型突然変異相当部位での変異体は分泌できないこと、野生型Cbln1に対して優位に分泌阻害効果を著すことが観察された。レンチウイルスベクターによって、このドミナントネガティブ効果を持つCbln1のSchmidt型変異体を顆粒細胞へ遺伝子導入し、内在性Cbln1分泌抑制効果を確認する。つぎに小脳分散培養系において上記の成果から得られたウイルスベクターを用い、内在性Cbln1の顆粒細胞からの分泌を抑制させる。このときのプルキンエ細胞平行線維シナプス形成を検討するし、一旦構築されたシナプス回路網の維持に対して、Cbln1がどのように機能しているのかを明らかにする。

4. 研究成果

(1) 我々は培養細胞を用いた発現系から調整、粗精製したCbln1が、培養プルキンエ細胞や短期培養小脳スライス標本において、プルキンエ細胞樹状突起上に存在する神経棘に選択的に結合することを明らかにした。この実験事実はCbln1そのものがリガンドであるこ

と、Cbln1受容体がプルキンエ細胞神経棘上に特異的に局在することをはっきり示している。また、成熟小脳から調製したシナプトソーム分画、およびPSD分画にCbln1分子と強い結合を示す、受容体タンパク質の存在を示唆する結果も得ることができた。またCbln1は6量体を形成していること、この6量体構造はアミノ末端側に存在する2つのシステイン残基に依存しており、このシステイン残基変異体は3量体であって6量体を形成せず、プルキンエ細胞への結合能、及びシナプトソーム分画への結合能を欠如することを見出した。これらの知見をEuropean Journal of Neuroscience誌に発表した。

(2) Cbln1欠損マウスから調整した培養プルキンエ細胞では、*in vivo*での結果と同様に平行線維シナプスの低形成が異常所見として観察され、Cbln1投与後約24時間でシナプス低形成が回復することを発見した。すなわちCbln1がシナプス形成を外的に制御できる新しい分子であることを示唆できた。またCbln1欠損マウスへのリコンビナントCbln1投与によって、シナプス形成が引き起こされ、急速に運動失調が回復すること、この効果は一過性のものであったことが明らかとなってきた。これらの結果は、Cbln1が成熟動物においてもシナプス接触を制御する機能的シグナリング分子で、シナプスの形成のみならず、いったん形成されたシナプスの維持をも制御することを示している。これらの結果はJournal of Neuroscience誌に発表した。

(3) 上記のように小脳においてCbln1は顆粒細胞から分泌され、シナプスを越えて、プルキンエ細胞神経棘上に存在するCbln1受容体に結合することを示してきた。Cbln1は小脳以外の領域でも発現している。代表的な領域としては海馬歯状回顆粒細胞に投射している嗅内皮質がある。成果1と同様に、海馬急性スライス標本においてリコンビナントCbln1の結合部位を調べたところ、Cbln1を発現している嗅内皮質の投射先である海馬

歯状回顆粒細胞の樹状突起からなる歯状回分子層に結合が見られた。つまり小脳でも海馬でも、Cbln1 を作り出している神経細胞の投射先に Cbln1 が結合するということが明らかとなった（投稿準備中）。

（４）Cbln1 によるシグナル伝達経路解明にはその受容体の同定が必須である。我々は Cbln1 と結合する Cbln1 受容体は、リコンビナント Cbln1 が結合した領域に発現しているという予測のもと Cbln1 と共役して働く受容体候補の一つとして膜タンパク質 CBR を同定した。Cbln1 は CBR を強制発現させた HEK293 細胞に選択的に結合することを明らかにした。また、先に述べたとおり、Cbln1 欠損マウス由来の初代小脳培養神経細胞では、in vivo の結果と同様シナプス低形成が所見として観察され、リコンビナント Cbln1 はそれを回復させる能力を有する。一方、Cbln1 の受容体である CBR 欠損マウス由来の小脳培養神経細胞でも、Cbln1 欠損マウスと同様な著明なシナプス低形成が見られることを発見した。しかし Cbln1 欠損マウス由来培養細胞とはことなり、CBR 欠損マウスの培養細胞ではリコンビナント Cbln1 投与によるシナプス形成能は全く観察されなかった。また、海馬培養神経細胞に CBR を発現させると、リコンビナント Cbln1 投与に依存して著明なシナプス形成が見られることも発見した。これらのことから、CBR が Cbln1 によるシナプス形成において必須な受容体複合体の一部であることが強く示唆された（投稿準備中）。現在、これまでの予備実験の結果を踏まえて CBR がどのようにして Cbln1 と共役して強力なシナプス形成能を示すのかを解明することを最大の目標として研究を進めている。CBR が直接 Cbln1 と結合するのか、他の分子を介して受容体複合体を形成するのかを HEK293 細胞を用いた強制発現系や CBR 欠損マウス・野生型マウスを用いた結合実験により明らかにし、次に Cbln1 と CBR によって誘導されるシナプスの特異性（興奮性・抑制性）と、その選択機構を培養細胞および in vivo

標本を用いて示したうえ、これまでの成果とあわせ、発表する予定である。

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)

Kakegawa, W., Miyazaki, T., Kohda, K., Matsuda, K., Emi, K., Motohashi, J., Watanabe, M., Yuzaki, M.

The N-terminal domain of GluR2 (GluR 2) recruits presynaptic terminals and regulates synaptogenesis in the cerebellum in vivo.

Journal of Neuroscience 29:5738-5748, 2009
査読あり

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.

European Journal of Neuroscience
29:707-717, 2009.

査読あり

Miura, E., Matsuda K., Morgan, J.L., Yuzaki, M., Watanabe, M.
Cbln1 accumulates and colocalizes with Cbln3 and GluR 2 at parallel fiber-Purkinje cell synapses in the mouse cerebellum.

European Journal of Neuroscience
29:693-706, 2009.

査読あり

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.

Journal of Neuroscience 28:5920-5930, 2008.

査読あり

Matsuda S., Miura E., Matsuda K., Kakegawa W., Kohda K., Watanabe M., Yuzaki M. Accumulation of AMPA Receptors in Autophagosomes in Neuronal Axons Lacking Adaptor Protein AP-4.

Neuron 57: 730-745, 2008.

査読あり

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 GluRdelta2. **Journal of Neuroscience** 28:1460-1468, 2008.

査読あり

Iijima I, Miura E, Matsuda K., Kamekawa Y, Watanabe M, Yuzaki M Characterization of a transneuronal cytokine family Cbln: Regulation of secretion by heteromeric assembly.

European Journal of Neuroscience 25:1049-1057, 2007

査読あり

〔学会発表〕(計 2件)

松田恵子 柚崎通介

神経細胞におけるイオンチャンネル足場タンパク質から核への信号伝達経路の解析
第30回日本分子生物学会 第80回日本生化学会合同大会 横浜 2007年 12月11日~14日

Matsuda, K., Kondo, T., Iijima, T., Ishida, A., Yuzaki, M.

Mechanism of hexameric Cbln1 ligand binding to PSD fraction prepared from cerebellum: implication of Cbln1 receptor protein in Purkinje cells.

The 30th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society. 横浜 2007年 9月10日~12日

〔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〕

6. 研究組織
(1) 研究代表者
松田 恵子 (MATSUDA KEIKO)
慶應義塾大学・医学部・助教
研究者番号: 40383765

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者