

平成 22 年 6 月 16 日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2008～2009

課題番号：20700295

研究課題名（和文） 神経系の新しいサイトカイン Cbln ファミリー分子の機能解析

研究課題名（英文） Characterization of neuronal cytokine Cbln

研究代表者

飯島 崇利（IIJIMA TAKATOSHI）

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：90383702

研究成果の概要（和文）：

C1q ファミリーは生命活動の多くのプロセスを制御する分泌因子である。最近このファミリーの一つである Cbln1 は小脳に豊富に発現し、成熟小脳におけるシナプスの形成・維持とともに可塑性の双方を制御する全く新しいシグナル分子である。神経系には他にも C1q ファミリーに属する分子が複数存在しているが、その詳細な発現や機能は未だ未解明なままである。本研究では、Cbln ファミリーに類似の、大脳皮質、海馬などで発現する、新しく分類された C1q-like (C1ql) ファミリーに注目して解析を行い、これらがシナプス機能を制御する分泌因子である可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：

C1q family, which is characterized by the C-terminal globular C1q (gC1q) domain, plays important roles in various intercellular processes. In addition, some of the C1q family members are expressed in the central nervous system. There are increasing evidences for the biological significance of C1q family in neurons. Nevertheless, their functions of C1q family proteins in CNS still remain unclear. Here we characterized C1q-like (C1ql) protein subfamily. These results indicate that, like Cbln subfamily, C1ql subfamily members may serve as a neuronal cytokine for synaptic functions in various brain regions.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	2,500,000	750,000	3,250,000
2009 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：神経科学・神経科学一般

キーワード：C1q, brain, Mouse, cytokine, Cbln, hippocampus, inferior olive

## 1. 研究開始当初の背景

我々は最近、Cbln1 と呼ばれる新しいサイトカインが径シナプ斯的にシナプス形成の維持やシナプス可塑性に関わることを報告した (Hirai et al., Nat. Neurosci., 2005)。Cbln1 ノックアウトマウスは小脳性の運動失調を呈し、平行線維-プルキンエ細胞間において運動学習の基本的メカニズムである長期抑圧 (LTD) が障害され、さらに "naked spine (裸のスパイン)" と呼ばれるシナプス前部との接触しにくいスパインが激増するという極めて特徴的なシナプス形態異常が多く観察される。興味深い事に、神経系には Cbln1 に他に 3 つのファミリー分子 (Cbln2-Cbln4)、そして新しく C1q 分子群に分類された C1q-like (C1ql) ファミリーなどが存在することが知られてきた。これらは構造的に Cbln1 とかなり類似しており、神経系で広範に発現していることから、ファミリー分子が成熟脳においてシナプスの機能と形態を同時に制御する新たな分子である可能性が示唆された。

## 2. 研究の目的

C1q ファミリーは C 末端側に globular ドメイン と呼ばれる特徴的な構造を持つ分泌タンパク質である (図 1)。神経系には複数の C1q ファミリーに属する分子が複数存在しており (図 2)、Cbln1 と同様にシナプス制御を含めた神経機能に重要な役割を果たしている可能性が予想される。しかしながら、その詳細な発現や機能は未だ未解明なままである。そこで、本研究では大脳皮質、海馬などで豊富に発現する C1ql ファミリーに注目し、まずその詳細な発現、生化学的特性の解析を行い、シナプス形成、維持に関わる新しい制御メカニズムの解明を目指す。

## 3. 研究の方法

### (1) C1ql ファミリーの神経系における詳細な mRNA 発現とタンパク質局在を明らかにする。

C1ql ファミリーは 4 種類の分子 (C1ql1-C1ql4) から成る。まず、これらの分子の神経系の発現を RT-PCR 法により解析したところ、一部が海馬、大脳皮質に強く発現し、小脳以外の領域でそれぞれが部位的、時期的にも非常に特徴的な発現をしていることがわかった。そこで第一に、これらの詳細な発現細胞 (部位) を北大との共同研究で in situ hybridization 法により同定する。次に、それぞれの抗体を作成して、免疫組織学的にタンパク質レベルでの局在を明らかにする。

### (2) C1ql ファミリータンパク質の神経系における機能を in vitro、in vivo の双方より解明する

このファミリー分子の cDNA をマウス脳よりクローニングし、HEK293 細胞に発現させ、その分泌能、多量体形成を調べる。次に培養神経細胞における分泌能、特異的結合部位の確認を行った後、神経系におけるこの分子の役割を調べるため、多量体構成や分泌能に重要な部位の変異を加えたドミナントネガティブ変異体を確立させて、これを初代培養神経細胞に発現させた時の異常の有無を形態学的に調べる。これに加え、申請者らは C1ql2 ノックアウトマウスを最近 Lexicon より購入予定しており、in vivo における解析も同時に進めていく。C1ql2 はファミリーの中で唯一 Allen institute のデータベース上に発現が公開されており、興味深いことに、その mRNA は海馬歯状回、赤核、視床前核といった部位に局所的に発現している。よって、この部位及びその投射領域に焦点を置き、その異常の有無を形態学的、生理学的に調べる。

### (3) C1ql ファミリータンパク質の結合因子を解析する

すでに申請者は C1ql1 に対する受容体候補因子を同定しており、上記の解析と平行し、まずこの分子のノックダウンなどによって、C1ql1 との生理的な相互作用を生化学的・細胞生物学的手法により解析していく。

## 4. 研究成果

### (1) C1ql ファミリー mRNA の発現、タンパク質局在

C1ql1-C1ql4 mRNA の発現を RT-PCR、および in situ hybridization 法により調べたところ、脳に強く発現しており (図 3) 神経系ではそれぞれ極めて特徴的発現パターンを示す事がわかった。C1ql1 は下オリブ核、C1ql2 は海馬歯状回、C1ql3 は海馬歯状回および大脳皮質に強く発現している事が明らかにされた (図 4) (Iijima et al., Eur. J. Neurosci. in press)。興味深い事に、C1ql2 タンパク質は歯状回-CA3 シナプス間隙に豊富に存在することがわかった。これは C1ql が順行性の分泌タンパク質であることを示唆する (未発表データ)。

### (2) リコンビナント C1ql ファミリータンパク質の生化学的特性

HEK293 細胞に発現させたところ、予想したように、これらは多量体を形成する分泌性のタンパク質であった。また、N 末端側のシステイン残基が、その多量体形成に重要な役割を果たしている事を明らかにした (Iijima et al., Eur. J. Neurosci. in press)。

### (3) C1ql ファミリータンパク質の神経系における特異的結合部位

HEK293 細胞で発現させたリコンビナント C1ql ファミリータンパク質を海馬、小脳の急性スライスに投与し、神経系における特異的結合部位の同定を試みたところ、C1ql1 はそれぞれ発現細胞の投射先の小脳分子層の登上線維シナプス、C1ql2 は CA3 領域に強く結合することが観察されている（未発表データ）。C1ql ファミリーは分泌タンパク質であることから、順行性に移行し、シナプス領域の特異的受容体と結合している可能性が示唆された（未発表データ）。

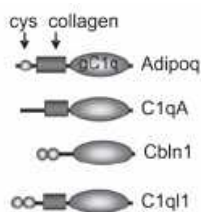


図 1 C1q ファミリータンパク質 (AdipoQ, C1qA, Cbln1, C1ql1) のドメイン構造

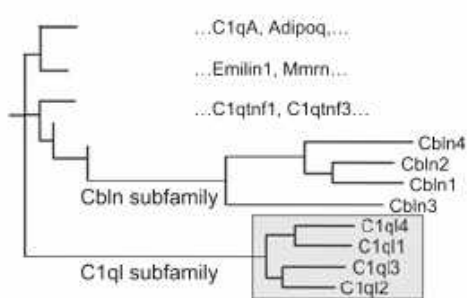


図 2 神経系に発現する C1q ファミリー分子群の系統樹

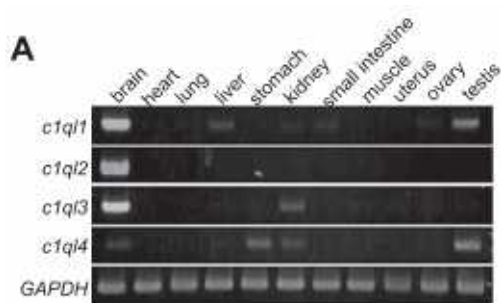


図 3 RT-PCR による C1ql ファミリー mRNA の発現解析  
C1ql ファミリー mRNA は脳に豊富に検出された。

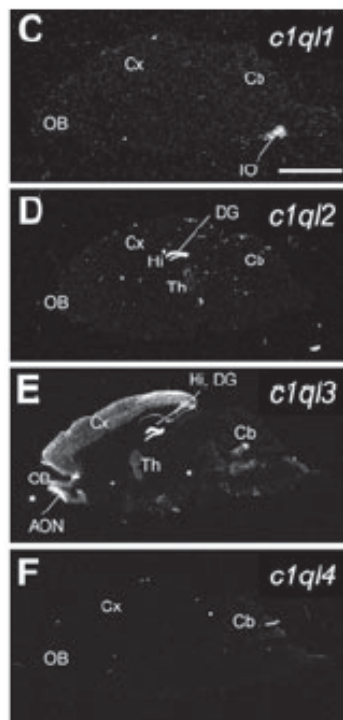


図 4 *in situ* ハイブリダイゼーションによる C1ql ファミリー mRNA の発現解析  
C1ql1 は下オリブ核、C1ql2 は海馬歯状回、C1ql3 は海馬歯状回および大脳皮質に強く発現していることが明らかにされた。

### 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2件)

- ・ Takatoshi Iijima, Eriko Miura, Masahiko Watanabe, Michisuke Yuzaki. Distinct expression of C1q-like family mRNAs in mouse brain and biochemical characterization of their encoded proteins. **European Journal of Neuroscience**, (in press, 2010). (査読有)
- ・ Takatoshi Iijima, Kyoichi Emi, Michisuke Yuzaki. Activity-dependent repression of Cbln1 expression: Mechanism for developmental and homeostatic regulation of synapses in cerebellum. **The Journal of Neuroscience**, 29: 5425-5435 (2009). (査読有)

[学会発表](計2件)

- . Takatoshi Iijima, Michisuke Yuzaki ( Dept, of Physiology, Keio University, School of Medicine ): Calcium-dependent regulation of cbln1 gene – a possible mechanism supporting hemeostatic plasticity in the cerebellum: Society for Neuroscience 2008 (2008. 11. 15-19., Washington DC, USA ) : Poster session.
- . Takatoshi Iijima, Michisuke Yuzaki ( Dept, of Physiology, Keio University, School of Medicine ) : Calcium-dependent gene regulation of cbln1 in cerebellar granule cells: Neuro2008 (2008. 07. 14., Tokyo, JPN) : Poster session.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

飯島 崇利 ( IIJIMA TAKATOSHI )  
慶應義塾大学・医学部・助教  
研究者番号：90383702

### (2)研究分担者

なし

### (3)連携研究者

なし