

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 30 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23500469

研究課題名(和文)分泌型シナプス形成因子と受容体の複合体によるシナプス分化及び神経回路構築機構

研究課題名(英文)Molecular mechanism of synapse differentiation and circuit formation by complex formation of secreted synapse organizer with its receptors

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円、(間接経費) 1,260,000円

研究成果の概要(和文)：分泌型シナプス形成因子であるCbln1は、2つの受容体GluD2とNeurexinの機能をリンクさせ、シナプスの形成と分化を制御する。海馬CA1神経細胞においては最も遠位部のTA層に、GluD2に類縁するGluD1受容体が限局して局在しており、TAシナプスで観察されるLTDの成立に関与することが明らかとなった。またノックアウトマウスの解析からGluD1の区画化には、Cbln1、Cbln4が必須であることを見出した。このことはneurexin-Cbln-GluDタンパク質複合体が小脳以外でのシナプス形成および神経回路構築においても機能することを強く示唆するものである。

研究成果の概要(英文)：We had proposed a new molecular mechanism underlying cerebellar parallel fiber synapse formation; secreted Cbln1 links its two receptors, GluD2 and Neurexin, across synaptic cleft, leading bidirectional synaptic differentiation. In hippocampal CA1 pyramidal neurons, most related receptor, GluD1 is restrictedly localized in TA layer which is the most distal part in CA1 dendrites, where GluD1 is responsible for establishment of LTD. Analysis in Cbln1 or Cbln4 knockout mice, restricted localization of GluD1 in TA layer requires its ligands Cbln1 and Cbln4. Thus we now propose the more general function of protein complex, Neurexin-Cbln-GluD in synapse formation and establishment of neuronal circuit precisely, not only in cerebellum but also in hippocampus.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：脳神経科学、神経・筋肉生理学

キーワード：シナプス形成 シナプス可塑性 神経栄養因子

1. 研究開始当初の背景

記憶、学習などの脳機能は、神経細胞と神経細胞間の情報の伝達、貯蔵の総和で表現される。シナプスは神経細胞同士が物理的に接触し、情報伝達する場である。神経細胞が正しいターゲット細胞と接着すると、機能的なシナプス前部、後部の領域を兼ね備えたシナプスが形成され、引き続き、外界情報を受けてシナプス伝達効率が変動するという可塑性を獲得した機能的シナプスへと分化する。シナプスを形成、分化させる活性を持つタンパク質はシナプスオーガナイザーと呼ばれ、neuroligin, neurexin, SynCAM, LRRTMなどの膜タンパク質型のもの、FGF、Wnt、NARPなど分泌型のものが報告されてきた。申請者は、分泌性タンパク質Cbln1が小脳顆粒細胞軸索(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を発表してきた。従来の分泌型シナプスオーガナイザーが、シナプスを挟んで対峙する神経細胞のうち的一方に作用するのとは異なり、Cbln1はシナプス前部後部の両方向にシナプス分化、および成熟を引き起こす。これはCbln1と相互作用する受容体がシナプス前部後部の両部位に存在することを示唆するものであった。申請者は欠損マウスの表現型がCbln1欠損マウスと酷似しているDelta2型グルタミン酸受容体(GluD2)に着目し、Cbln1が直接GluD2の細胞外領域に結合することがCbln1によるシナプス形成に必須であることを世界に先駆けて発表した(Matsuda et al. Science 2010)。さらにCbln1がneuroligin - neurexinによるシナプス形成を阻害することを見出し、ここからシナプス前部に発現する特定のneurexinアイソフォームがもう一方側での受容体であることに着想するに至った。

シナプス形成と分化は、軸索と樹状突起の接着を引き金とし、シナプス前部と後部において同期して進む。平行線維シナプスでは、シナプス前部分化にはシナプス前部のneurexinとCbln1の相互作用が必須であること。シナプス後部であるプルキンエ細胞においては、GluD2とCbln1の相互作用によって、GluD2依存的に後シナプス肥厚部の細胞質タンパク質が集積し、シナプス可塑性を引き起こす分子基盤を構築することを明らかとした。以上から**Cbln1はシナプスを**

はさんで対峙する2つの受容体の機能をリンクし、それぞれに結合する細胞内タンパク質をシナプス部に集積させ、両方向性にシナプスの形成と分化を制御するという分子基盤モデルを打ち立てた。

多くの神経細胞は複数の神経細胞からの投射を受け、形成するシナプスは、形態やどのような可塑性を表現するか、それぞれに特性がある。機能的に特異化されたシナプスが樹状突起上の特定の領域に局在化する結果、シナプス伝達や可塑性様式が樹状突起上で区画化される。Cbln1やGluD2欠損マウスのプルキンエ細胞では、平行線維シナプス不全と共に、もう一方の興奮性入力である登上線維シナプス投射位置に異常が観察された。このようにCbln1 - GluD2複合体は、個々のシナプスレベルのみならず、**樹状突起上のシナプス特異性を区画化し、どの神経細胞が次の神経細胞の樹状突起のどこにどのようなシナプスで接続するかという神経回路構築をも規定する**といえよう。

我々はGluD2に最も類縁するGluD1受容体が、同じくCbln1と結合すること、シナプス形成能を有することを見出した。さらにGluD1受容体やCblnファミリー分子が小脳以外の神経細胞でも発現していることが示唆されてきた。neurexinには3つのファミリー分子があり、広範囲の神経細胞で発現している。申請者は海馬CA1神経細胞などにおいてCbln、GluDファミリーが、区画化された樹状突起上のシナプスのうち、一種類に限局している可能性を見出した。

このことはneurexin - Cbln - GluDタンパク質複合体が小脳以外でのシナプス形成および神経回路構築においても機能することを強く示唆するものである。

2. 研究の目的

本研究により、**neurexin - Cbln - GluD タンパク質複合体がシナプス間隙を跨いで形成され、それにより両方向性に機能的なシナプスを作り上げる分子基盤が、小脳のみならずグローバルに機能することを、海馬TA-CA1シナプスをモデルにして明らかにすることが本申請課題の目的である。**1)小脳以外の神経細胞でのCbln1 - GluD1タンパク質複合体の局在解明。2)海馬CA1神経細胞における

Cbln1 - GluD1 のシナプス形成、神経回路網構築への関与、3)可塑性成立への関与を解明。
4)Cbln ファミリーである Cbln2 のシナプス形成機能を解明という個別目標を成し遂げることによって達成する。

3 . 研究の方法

本研究によって、Cbln ファミリーと GluD 受容体ファミリータンパク質が、小脳平行線維シナプスにおける Cbln1 - GluD2 と同様に、脳全体でグローバルにシナプスオーガナイザーとして機能することを明らかにするが、まず小脳以外の神経細胞、特に海馬神経細胞、線条体中型有棘神経細胞などにおいて、Cbln1 や Cbln2 が GluD 受容体ファミリーと共局在していることを、特異的抗体を用いて明らかにする。次に海馬 CA1 神経細胞をモデルとして、Cbln ファミリー - GluD 受容体ファミリー複合体によるシナプス形成とそのシナプス形成部位の領域化を、シナプスマーカーの局在観察、詳細な電子顕微鏡観察によって明らかにする。シナプス伝達、可塑性への関与は電気生理学的方法にて解析する。

4 . 研究成果

これまでの研究から、小脳以外の神経細胞、特に海馬 CA1 細胞 TA シナプスと海馬歯状回シナプスにおいて、Cbln1 - GluD1 タンパク質が強く共局在することを明らかにした。GluD1 は、海馬 CA1 細胞では最も遠位部の TA 層に、歯状回顆粒細胞においては、分子層中部に集中して局在化していた。このように GluD1 は樹状突起に一様に存在するのではなく特異的な領域に区画化されていることが明らかとなった。さらに GluD1 ノックアウトマウスの解析から海馬 CA1 細胞において TA シナプスで観察される LTD が障害されていることも明らかとなった。

また小脳においても平行線維 - プルキンエ細胞以外に、平行線維と interneuron 間のシナプス形成に GluD1 が必須であることが見出され論文発表に至った。

GluD1 受容体に対するリガンドである Cbln1、Cbln4、あるいは両遺伝子のノックアウトマウスの解析から GluD1 が樹状突起上

において区画化して局在するには、Cbln1 および Cbln4 が必須であることを見出した。また新たに、Cbln1 とは結合せず Cbln4 に対してのみ特異的に結合する受容体として DCC を見出した。Cbln4 によってシナプス後部受容体 GluD1 とシナプス前部の DCC 受容体が繋ぎ止められていることも見出した。また DCC-Cbln4 の結合は、neurexin-Cbln1 によって形成されるシナプス結合を増強していることを見出した。

本研究では、小脳で見いだされてきた neurexin - Cbln1 - GluD2 タンパク質複合体と同様に、海馬においては neurexin - Cbln1/4 - GluD1 複合体が機能し、脳全体で普遍的な分子基盤であることを解明した。一方、Cbln4 は小脳シナプスには存在していないので、小脳には存在していなかった新たな DCC - Cbln4 - GluD1 という分子基盤が海馬シナプスに存在することを明らかとした。

このように申請者は Cbln1 が従来の膜タンパク質型、分泌タンパク質型のシナプスオーガナイザーとは異なる新しい機構を持つ第 3 のカテゴリーに属するオーガナイザーであることを明らかにしてきた。本申請テーマの元になったこれまでの我々の研究は、GluD2 および Cbln1 分子の機能を、小脳平行線維シナプスに焦点を絞って研究を進めてきた。本申請研究はそれを Cbln1 - GluD1 ファミリー分子へ拡大し、脳全体での普遍性が明らかになったと考えられる。

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 3 件)

1. Konno K., Matsuda K., Nakamoto C., Uchigashima M., Miyazaki T., Yamasaki M., Sakimura K., Yuzaki M., Watanabe M. Enriched expression of GluD1 in higher brain regions and its involvement in parallel fiber-interneuron synapse formation in the cerebellum

Journal of Neuroscience in press 2014

査読有

2. Ito-Ishida A., Miyazaki T., Miura E., Matsuda K., Watanabe M., Yuzaki M., Okabe S.

Presynaptically released Cbln1 induces dynamic axonal structural changes by interacting with GluD2 during cerebellar synapse formation.

Neuron 76:549-564, 2012.

査読有

doi: 10.1016/j.neuron.2012.07.027.

3. **Matsuda K.**, Yuzaki M.

Cbln1 and the Delta2 Glutamate Receptor-An Orphan Ligand and an Orphan Receptor Find Their Partners.

Cerebellum 11:78-84, 2012.

査読無

doi: 10.1007/s12311-010-0186-5.

〔学会発表〕(計 1件)

1. **Matsuda K.**, Yuzaki M.

Cross talk between C1q family molecules and glutamate receptors in synapse formation

Neuro 2013

2013年6月21日 京都

〔図書〕(計 1件)

1. **Matsuda K.**, Yuzaki M.

Cbln1.

Encyclopedia of Signaling Molecules, Edited by

Choi S., Springer, New York: 257-260, 2011.

<http://www.springer.com/biomed/human+genetics/book/978-1-4419-0460-7>

〔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〕

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

なし

(3) 連携研究者

なし