

平成 27 年 6 月 2 日現在

機関番号：14501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25860214

研究課題名(和文) アファディンとネクチンによるシナプス形成過程の分子機構

研究課題名(英文) Molecular mechanisms in the synapse formation by afadin and nectins

研究代表者

丸尾 知彦 (Tomohiko, Maruo)

神戸大学・医学(系)研究科(研究院)・特命助教

研究者番号：10625114

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)：シナプスの正常な発達と機能的成熟は、学習や記憶に代表される高次脳機能の発現の基盤であり、その破綻は様々な精神・神経疾患を誘発することから、その分子機構を理解することは重要である。興奮性シナプスは非対称な接着構造であり、その形成過程には様々な接着分子が重要であることが明らかにされている。本研究では接着の裏打ちをなすタンパク質アファディンを欠損したマウスの神経細胞を調べることで、アファディンが接着構造のみならず、広範なシナプスの形態と機能を制御していることを明らかにした。この結果は学習や記憶の新しいしくみを理解し、種々の精神・神経疾患の治療法の開発戦略をたてるために役立つと期待される。

研究成果の概要(英文)：Synapses are specialized intercellular junctions that are indispensable for neuronal transmission. Synaptic plasticity is the critical basis for the process of learning and memory and synaptic dysfunction causes variety of psychiatric and neurological disorders, thus the molecular understanding of the microstructure is a central issue in the field of neuroscience. Synapses contain at least two types of junctional structures: synaptic junctions (SJs) and puncta adherentia junctions (PAJs). In this study, we studied the role of afadin, an important scaffold of PAJ, in the process of synapse formation and synaptic functions. We revealed that afadin regulates not only adhesion process, but also diverse process in the synaptic development and functions. These results may be helpful to understand the process of learning and memory and the process of psychiatric and neurological disorders.

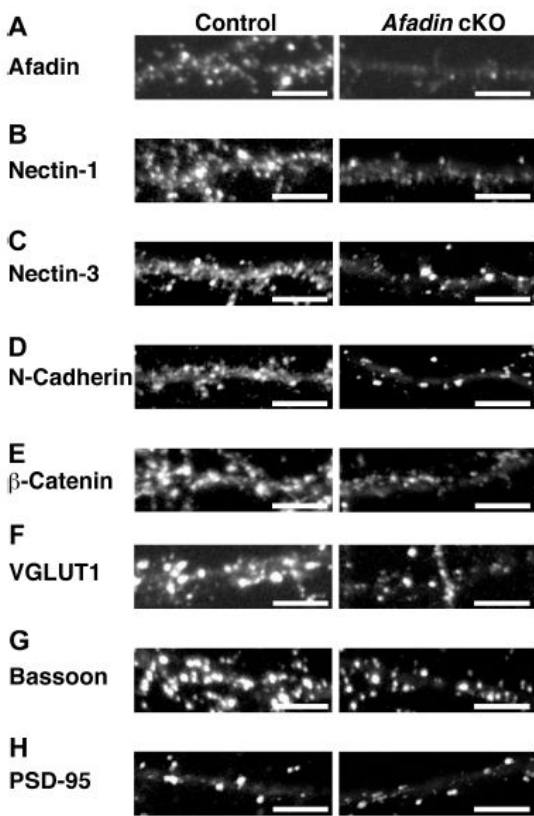
研究分野：神経細胞生物学

キーワード：シナプス 接着 アファディン

1. 研究開始当初の背景

シナプスの正常な発達と機能的成熟は、学習や記憶に代表される高次脳機能の発現の基盤であり、その破綻は様々な精神・神経疾患を誘発することから、その分子機構を理解することは重要である。興奮性シナプスは非対称な接着構造であり、その形成過程には様々な接着分子が重要であることが明らかにされている。しかし、軸索と樹状突起が出会って接着してから成熟シナプスに移行する過程の分子機構には、未だ不明な点が多い。ネクチンとその細胞膜裏打ち分子アファディンは、シナプス結合部位と分離して存在する接着帯パンクタ アドヘレンティア ジャンクション (puncta adherens junction, PAJ) に存在している。研究代表者はアファディンを欠損した培養神経細胞では、シナプスの形成と機能に異常が生じることを明らかにしていた(図1)が、その詳細な分子機構は不明であった。

図1 アファディン欠損海馬培養神経細胞におけるPAJおよびシナプス分子の集積阻害



2. 研究の目的

本研究では、シナプス形成におけるアファディンの作用機構を分子レベルで解明するために(図2)、ノックアウトマウスから単離した初代培養神経細胞を用いてその形成と機能を解析し、生化学的手法によりアファディンの新規結合分子を同定する。

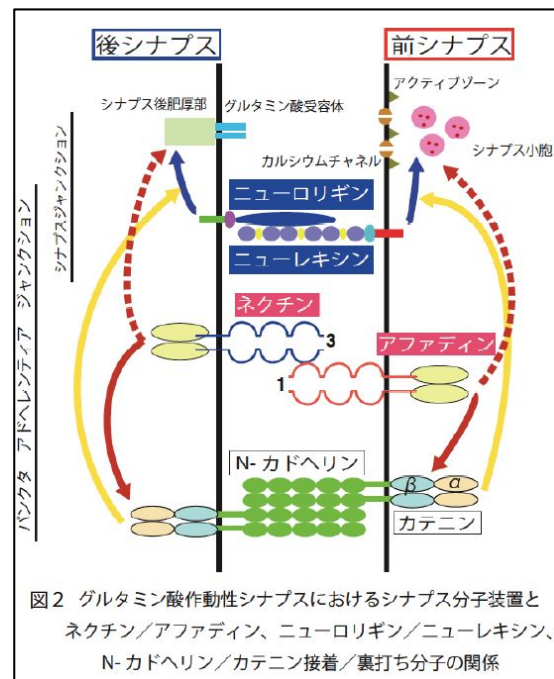


図2 グルタミン酸作動性シナプスにおけるシナプス分子装置とネクチン/アファディン、ニューロリギン/ニューレキシン、N-カドヘリン/カテニン接着/裏打ち分子の関係

3. 研究の方法

(1) アファディン欠損海馬培養神経細胞を用いたシナプス分子の変化の解析

胎生18日目の神経細胞特異的アファディンノックアウトマウスから分散神経細胞を調整し、シナプス形成時におけるアファディンの機能を細胞生物学的にさらに詳細に解析する。具体的には、これまでにアファディンやネクチンに結合することが所属研究室で見いだされている分子に対する抗体を用いた免疫染色により、アファディン欠損神経細胞間のシナプスの分子構成や形態的特徴、AMPA型や他のグルタミン酸受容体の集積や細胞膜表出に関して詳しく解析する。

(2) アファディン欠損海馬培養神経細胞を用いたシナプス分子の集積不全の分子機構の解析

アファディンノックアウトマウスから調整した神経細胞に、電気穿孔法を用いてアファディンの発現ベクターを導入し、シナプス分子の異常が真にアファディンを欠損させた結果であったかどうかについて確認する。同時にアファディンの変異遺伝子を遺伝子導入し、シナプス分子の集積に必要なアファディンのドメインを明らかにし、そのドメインに結合する分子を過去の文献から、もしくは生化学的に同定して確認する。

(3) 生化学的手法を用いたシナプス形成に關与する新規のネクチン-アファディン複合体構成分子の同定

アファディン-ネクチンに依存的なシナプス形成の分子機構を解明するため、特異的抗体カラムを用いて、脳から生化学的にアファディンとネクチン-1,-3の複合体を精

製する。コントロール IgG カラムより調整した免疫沈降産物との比較質量分析法を行うことにより、特異的結合分子を同定する。すでに手元にあるアフアディンの特異的抗体を用いて免疫沈降された複合体を SDS-PAGE 法でサイズ分画したのち、銀染色で可視化したバンドの比較を行い、切り出して質量分析法により当該タンパク質を同定する。

(4) シナプスオーガナイザーによるシナプス誘導過程でのアフアディンの役割の解析

近年の研究により、シナプスオーガナイザーと呼ばれる一連の接着分子がシナプス形成を誘発することが明らかになっている。ネクチン、アフアディンとシナプスオーガナイザーのシナプス形成機構におけるクロストークの詳細を明らかにするために、ニューロリギン、TrkC-PTP など複数のシナプスオーガナイザーについて、それらの活性におけるアフアディン依存性を確かめる実験を行う。具体的には、それらを非神経細胞に発現させてアフアディンを欠損した神経細胞と共培養し、人工シナプスが誘導できるか確認する実験を行う。

4. 研究成果

下記の通り、研究方法の項目で挙げた各々の課題について、発展的な成果をおさめることが出来た。予想外に派生した結果を含め、複数の論文を発表することができた。

(1) アフアディン欠損海馬培養神経細胞を用いたシナプス分子の変化の解析

以前見だしていたアフアディン欠損海馬培養神経細胞における PAJ 分子およびシナプス分子の集積不全を、さらに詳細に解析した。具体的には、培養 14 日目のアフアディン欠損および野生型相当の胎児より確立した海馬培養神経細胞を用い、ネクチン-1、ネクチン-3、N-カドヘリン、カテニンの4つの PAJ 分子と、VGLUT1、バスの2つのシナプス分子の、樹状突起上のクラスター輝度を定量化した。その結果、PAJ 分子については顕著かつ統計上有為な減少が、またシナプス分子においても軽度ながら統計上有為な減少が認められた。アフアディン欠損マウスの海馬苔状線維-CA3 錐体細胞間の巨大シナプスにおいても、同様の所見が確認された。シナプトタグミンのルメラドメインに対する抗体の取り込み実験では、アフアディン欠損神経細胞のシナプスではシナプス小胞のリサイクリングが阻害されていることが統計的有意差を持って確認された。また、電気生理学的にも細胞間のシナプス伝達が低下しており、少なくともシナプス前部の機能が低下していることが示された。以上の内容は論文として発表した(発表論文)。

一方、シナプス後部の代表的な分子である PSD-95 についても同様の傾向が認められた。これについては、アフアディンのドメイン欠損変異体の入れ直し実験により、さらに詳細に解析した((3) で後述)。

他方、EGFP を発現させたアフアディン欠損海馬培養神経細胞の形態解析では、後シナプス構造であるスパインが、頭部と首部を持ったキノコ型の形態から、その首部を無くした切り株状の形態に変化していることが認められた。このようなスパインの構造変化は、以前に研究代表者の所属する研究室で多数見いだされた種々の低分子量 G タンパク質の活性変化により誘導されることや、アフアディンがいくつかの低分子量 G タンパク質の基質かつ調節因子であることがすでに判明していることから、アフアディンはこれらの低分子量 G タンパク質と共同してこのようなスパイン形態の変化を制御している可能性があり、その詳細な解析を現在も継続中である。

さらに、電気生理学的解析により、シナプス前部と後部の機能の両方にアフアディンの寄与があることが示唆されたため、AMPA 型受容体のシナプス後膜表面での集積を検討したところ、その低下が認められた。このメカニズムについては複数考えられるが、後述する独自に見いだしたアフアディン結合分子を中心に、またレーザー光刺激装置により、シナプス後部に直接グルタミン酸を解放することで、より直接的にシナプス後部に存在するグルタミン酸受容体の数を推定する方法を構築したのでそれらを用い、現在解析中である。

以上のように、アフアディン欠損海馬培養神経細胞において、PAJ 分子とシナプス分子の集積不全、シナプスの形態形成不全、シナプスの伝達不全という広範囲に渡る過程の障害が認められた。

派生した研究成果として、アフアディンを脳の時空間的に特異的に欠失させるマウスから培養神経細胞を調整していたが、これらのマウスの解析により、アフアディンは中脳水道の形成および大脳層構造の構築に必須であることが明らかになり、論文発表した(発表論文)。

(2) アフアディン欠損海馬培養神経細胞を用いたシナプス分子の集積不全の分子機構の解析

遺伝子導入細胞の同定はシナプス後部分子では容易であるため、特に PSD-95 をモデルとして、アフアディンによるシナプス分子の集積の詳細な解析を行った。その結果、アフアディン欠損マウス由来の海馬培養神経細胞にアフアディン発現ベクターを導入することで、PSD-95 のクラスター輝度が回復した。一方、アフアディン欠損マウス由来の海馬培養神経細胞に、PDZ ドメインを欠失したアフアディン変異体発現ベクターを導入することで、PSD-95 のクラス

ター輝度は回復しなかった。アフアディンの PDZ ドメインの主要なシナプス後部での結合分子としてネクチン-3 や Eph といった接着分子が知られており、接着分子がシナプス形成においても重要な役割を果たすことが示唆された。現在これらをさらに詳細に解析中である。

派生した研究成果として、所属研究室で用いている、2つのアフアディンの主要なスプライスバリエーションである l-アフアディンと s-アフアディンでは、ネクチンへの結合能力が異なることが分かり、その両者とも今回用いた分散培養系で発現していることが明らかになった。この成果は論文として発表した(発表論文)。

(3) 生化学的手法を用いたシナプス形成に關与する新規のネクチン-アフアディン複合体構成分子の同定

マウス脳を試料として、アフアディン結合分子複合体の単離・精製を試みた。手法として、研究代表者が米国留学中に開発した方法を応用した(発表論文)。すなわち、所属研究室で作製された l-アフアディン特異的抗体および l/s-アフアディン特異的抗体、さらにコントロール IgG を共有結合したビーズを用い、マウス脳膜分画の可溶化液中のアフアディンおよびそれを中核とする分子複合体の精製を行い、質量分析法を用いて網羅的にその構成要素の同定を試みた。その結果、少なくとも数十の分子群が同定された。その中で、カテニン類など既知の直接および間接のアフアディン結合分子群が改めて同定されたが、s-アフアディンないし l-アフアディンに比較的特異性を持って結合する分子が複数含まれていることが判明した。前述の in vitro の解析結果と同様に、脳における内在性のネクチン-1 も、l/s-アフアディン特異的抗体の免疫沈降物に多く含まれていた。すでにいくつかの分子については、その結合特異性を in vitro 再構成系で確認することができたため、重要な機能が予想される複数の分子について解析を継続している。特にそのうちの分子 X については、ノックアウトマウス作製が完了しており、その解析を開始している。

(4) シナプスオーガナイザーによるシナプス誘導過程でのアフアディンの役割の解析

複数のシナプスオーガナイザーを COS7 細胞に発現させ、野生型相当のコントロールおよびアフアディン欠損海馬培養神経細胞と共培養して人工シナプスを誘導した。詳細に検討したところ、あるシナプスオーガナイザー Y による人工シナプス形成能が、アフアディン欠損神経細胞との共培養で特異的に低下していた。このことから、アフアディンは特異的な分子種によるシナプス形成過程に選択的に關与していることが示唆された。現在、培養神経細胞同士のシナプス形成過程におけるアフアディンとシナプスオーガナイザ

-Y の分子シグナルにおける関係について解析を進めている。

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)

Yamamoto H, Mandai K, Konno D, Maruo T, Matsuzaki F, Takai Y. (2015) Impairment of radial glial scaffold-dependent neuronal migration and formation of double cortex by genetic ablation of afadin. *Brain Res.* 査読有、doi: 10.1016/j.brainres.2015.05.012.

Inoue T, Fujiwara T, Rikitake Y, Maruo T, Mandai K, Kimura K, Kayahara T, Wang S, Itoh Y, Sai K, Mori M, Mori K, Mizoguchi A, Takai Y. (2015) Nectin-1 spots as a novel adhesion apparatus that tethers mitral cell lateral dendrites in a dendritic meshwork structure of the developing mouse olfactory bulb. *J Comp Neurol.* 査読有、doi: 10.1002/cne.23762.

Kobayashi R, Kurita S, Miyata M, Maruo T, Mandai K, Rikitake Y, Takai Y. (2014) s-Afadin binds more preferentially to the cell adhesion molecules nectins than l-afadin. *Genes Cells.* 査読有、19(12):853-63.

Shanks NF, Cais O, Maruo T, Savas JN, Zaika EI, Azumaya CM, Yates JR 3rd, Greger I, Nakagawa T. (2014) Molecular dissection of the interaction between the AMPA receptor and cornichon homolog-3. *J Neurosci.* 査読有、34(36):12104-20.

Toyoshima D, Mandai K, Maruo T, Supriyanto I, Togashi H, Inoue T, Mori M, Takai Y. (2014) Afadin regulates puncta adherentia junction formation and presynaptic differentiation in hippocampal neurons. *PLoS One.* 査読有、9(2):e89763.

Yamamoto H, Maruo T, Majima T, Ishizaki H, Tanaka-Okamoto M, Miyoshi J, Mandai K, Takai Y. (2013) Genetic deletion of afadin causes hydrocephalus by destruction of adherens junctions in radial glial and ependymal cells in the midbrain. *PLoS One.* 査読有、8(11):e80356.

丸尾知彦、萬代研二、高井義美、(2013) ネクチンによる細胞間接着の制御機構、*生体の科学*、査読無、64、206-215、2013.

[学会発表](計4件)

Takeshi Fujiwara, Shujie Wang, Yu Itoh, Kousyoku Sai, Aika Kaito, Naoyuki

Miyazaki, Kazuyoshi Murata, Tomohiko Maruo, Hideaki Yamamoto, Kenji Mandai, Yoshimi Takai, Akira Mizoguchi. SBF-SEM3 次元立体再構築法を用いたアフアディン欠損マウス海馬苔状繊維 - CA3 野錐体細胞樹状突起間シナプスの構造解析、第 120 回日本解剖学会総会・全国学術集会・第 92 回日本生理学会大会合同大会、2015 年 3 月 21 日、神戸国際会議場・展示場(兵庫県)

Daisaku Toyoshima, Kenji Mandai, Tomohiko Maruo, Irwan Supriyanto, Hideru Togashi, Takahito Inoue, Masahiro Mori, Yoshimi Takai Afadin plays an important role in formation of puncta adherentia junction and differentiation of presynapses in hippocampal neurons. Neuroscience 2014, 2014.11.19. Washington, USA. Hideaki Yamamoto, Kenji Mandai, Daijiro Konno, Tomohiko Maruo, Fumio Matsuzaki, Yoshimi Takai. Afadin-deficiency leads to the formation of double cortex by abnormal radial glial scaffold and cell-autonomous impairment of neuronal migration during development. 2014 CSHL Conference on Glia in Health & Disease, 2014.7.17-21. New York, USA.

丸尾知彦、豊嶋大作、萬代研二、富樫英、井上貴仁、山本昆明、三好淳、イルワンスプリヤント、森正弘、高井義美、アフアディンの海馬神経細胞におけるシナプス形成への関与、Neuro2013、2013 年 6 月 21 日、京都国際会議場(京都府)

〔図書〕(計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

丸尾 知彦 (MARUO Tomohiko)

神戸大学・大学院医学研究科・特命助教

研究者番号：10625114