

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 6 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26860148

研究課題名(和文) 補体分子群によるシナプス除去の新規時空間メカニズム解明

研究課題名(英文) Elucidation of novel spatiotemporal mechanisms of synapse elimination by groups of complement proteins

研究代表者

鈴木 邦道 (Suzuki, Kunimichi)

慶應義塾大学・医学部・訪問研究員

研究者番号：10713703

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：これまで補体C1qを介する自然免疫古典経路がシナプス除去に関与することが示唆されていたが、どのシナプスを除去すべきか時空間的な認識機構は不明であった。本研究では補体C1qだけではなく、シグナルの下流の着目の幅を広げて検討を行った。C1qに加えC1r,sを含めたC1複合体を再構成したが、神経細胞への結合はC1q単独の場合と差異がなかった。興味深いことにC1qは特定の糖鎖パターンを認識する抗体によるシグナルと一致し、糖鎖を切断する酵素により消失した。一方でシナプス形成の制御分子開発として、人工的興奮性シナプス形成分子の詳細な解析を行うと同時に、シナプスを除去する分子をデザインし性状解析を行った。

研究成果の概要(英文)：It has been suggested so far that classical complement pathway initiated by complement C1q is associated to synapse elimination, but spatio-temporal mechanism how to determine whether the synapse should be pruned or not is still unclear. This research focused not only on C1q but also on the downstream of classical complement signaling. Reconstitution of C1 complex by C1q, C1r and C1s showed the binding on neurons but the binding pattern was similar to the binding of C1q on neurons, suggesting that C1q was enough to bind on neurons. Interestingly, the labeling of C1q was well colocalized with the signals detected by antibody against specific pattern of sugar chains, and was abolished by the enzyme which degraded the sugar chains. As the other topic, in order to develop novel molecules to control synapse formation, artificial excitatory synapse connector was elaborately analyzed and synapse disconnectors were also designed and analyzed about the feature such as binding specificity.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：補体 シナプス

### 1. 研究開始当初の背景

近年の遺伝子シーケンシング技術の急速な進歩により、自閉症スペクトラム障害 (ASD) などの発達障害、あるいは統合失調症、躁うつ病などの数多くの精神疾患において、新規遺伝子変異が発見されてきた。興味深いことに遺伝子変異の多くが、シナプスの形成・成熟に深く関わるタンパク質をコードしていることが明らかとなっており (Glessner et al., Nature 2009)。一連の疾患は「シナプス病 synaptopathy」と捉えられつつある (Zoghbi and Bear, CSH Perspectives 2012)。しかし、NLGをはじめ、これまでに多くのシナプス接着分子が発見されてきたが、実際に中枢神経系において、どのような機序や相互関係によってシナプス形成・維持そして除去が行われるのかについてはまだまだ不明な点が多い。シナプス除去については、発達過程において、活動度の低いシナプスにおいては補体 C1q が分泌・沈着し (Stevens et al., Cell 2007)、ミクログリアによってシナプス除去経路を活性化することも報告された (Schafer et al., Neuron 2012)。しかし、現在までに C1q や Cbln などの補体ファミリー分子が「どのタイミングで」「どのシナプス」の除去・形成を決定するのか、という「時空間制御メカニズム」についてはほとんど明らかになっていない。さらに、補体による自然免疫システムに参与する分子群がシナプス除去過程にどのように関与するかについても、不明なままである。そこで、申請者のこれまでのシナプス接着分子によるシナプス形成メカニズム研究についての知識と経験を活かし、かつ所属研究室における補体ファミリー分子についての知見を最大限に活用することにより、本研究計画では、補体分子群に焦点を当て、新しいシナプス形成・除去メカニズムの解明を目指す。

### 2. 研究の目的

免疫関連分子は感染などの病的応答における側面から研究がおこなわれてきたが、近年、正常な発達過程において、免疫応答とは異なる生理的機能の存在が示唆されている。本研究は、免疫関連分子のうち、特に古典的免疫経路に関わる補体分子群に焦点を当て、これらの分子がシナプス形成・除去を行う分子機構を明らかにし、発達期におけるシナプス形成過程を制御する方法を開発することを目的とする。さらに補体ファミリー分子についてもシナプス除去への関与も検討する。免疫系分子、特に補体自然免疫および補体ファミリー分子によるシナプス形成・除去という新たな観点から正常な発達期における機能および制御メカニズムを解明し、自閉症をはじめとする「シナプス病」の治療における新たな標的・介入法に繋げることを目指す。

### 3. 研究の方法

本研究では補体が発達期の中枢神経系においてシナプス除去を行う現象に着目し、(1) 分子メカニズム解明および(2) 制御方法の確立をめざす。

(1)では、まず補体がシナプスを除去する実験系を *in vitro* および *in vivo* で確立する。その後、補体の受容体およびシナプス除去シグナリングに関わる候補分子を遺伝学的に探索する。さらに補体関連分子の局在が神経活動によりどのような時空間的分布するか、生化学およびイメージング技術を駆使して詳細な検討を行う。

(2)では、補体がシナプスに呈示される領域とプレシナプス接着分子またはミクログリア上の受容体との相互作用領域を繋いだキメラ分子を作製する。これを用いて *in vitro* および *in vivo* でシナプス除去に介入し、シナプス可塑性の検討や行動解析を行う。

#### (1)分子メカニズム解明

*in vitro* および *in vivo* 実験系の確立  
リコンビナント C1 複合体や C3、iC3b を作製し、海馬または小脳由来の初代培養神経細胞、さらにマウス海馬、小脳または外側膝状体に投与し、結合する条件や機能変化が生じるか否かを検討する。また補体 KO マウスを用いて発達期及び成獣期でのシナプス形成・除去に変化があるか検討する。

メカニズム探索 (受容体探索)  
C1q および C1 複合体の結合相手を生化学的手法、免疫細胞化学的手法、過剰発現系、RNA 干渉法を用いて補体受容体を探索する。また、神経活動への介入を行い、結合性が変化するか否かについても検討する。

補体シグナルの動態と相互作用の解明  
受容体候補が絞られた場合、その受容体の状態を変化させる薬理的処理を行うことで補体シグナルの動態を検討する。また補体側を蛍光標識し輸送・局在などがどのように変化するか検討する。

#### (2) 制御方法の確立

シナプス形成/除去の制御分子の作製  
C1q、C3、NRX、NLG、Cbln1 の部分ドメインに着目し、シナプス形成を阻害するもしくは積極的に除去するキメラ分子を設計する。また人工シナプス形成因子については作成がなされており、その性状解析を進めつつ、それを基盤として人工的シナプス除去因子についても結合特異性などを検討する。

シナプス形成/除去の制御分子の機能評価  
作製したキメラ分子の機能について、培養細胞および培養神経細胞を用いて、リガンドに対して競合能力があるか、シナプスを形成・阻害・除去するか否かを検討する。また神経細胞に過剰発現させる、または動物個体

にリコンビナントタンパクを打ち込むことで神経回路や行動に効果があるか否かを、小脳失調モデル動物などを使用して検討する。

#### 4. 研究成果

これまで補体 C1q を介する自然免疫古典経路がシナプス除去に關与することが示唆されていたが、どのシナプスを除去すべきか時空間的な認識機構は不明であった。本研究では補体 C1q だけではなく、シグナルの下流の着目の幅を広げて検討を行った。C1qABC および C3 の全長 cDNA のクローニングに加えて C1r, C1s, C1 inhibitor のクローニングを行い、各リコンビナントタンパク質の濃縮を行い神経細胞への結合を検討した。その成果として C1q が神経細胞の一部のコンパートメントへ結合することを観察できる最適な実験系を確立した。また同様に神経細胞への結合は C1 複合体でも見られたが、C1q 単体での結合との差異が認められなかったことから C1 複合体の再構成は必ずしも必要ではないことが判明した。興味深いことに C1q は特定の糖鎖パターンを認識する抗体によるシグナルとは一致し、またその糖鎖を切断する酵素処理により C1q のシグナルが消失したことから、C1q は特定の糖鎖に対して単独で結合しうるものと思われた。C1q の神経細胞への結合は内因性 C1q においても観察され、今後の C1q の結合分子や機能の詳細を検討する in vitro 実験系が確立できたものと考えられる。

機能的側面での検討については、海馬、小脳、バレル皮質、外側膝状体に着目して幅広く検討したが、C1q および C3KO マウスについて網膜神経節細胞 外側膝状体シナプスにおいてシナプス除去に影響が見られたほかはシナプス数やシナプス除去に大きな変化を見出せなかった。一方で in vitro 実験系におけるグリア細胞による貪食能を評価する実験系を確立し、ミクログリアおよびアストロサイトの貪食能をアッセイすることが可能となった。その結果、補体 KO マウス由来のミクログリアではビーズおよびシナプトソームの貪食能が低下していることが示唆された。更にビーズによる貪食アッセイ系を用いて、自然免疫系とは別の補体 C1q ファミリー分子をビーズにコートし野生型初代グリア細胞による貪食能を評価したところ、顕著な被貪食性を示す補体ファミリー分子が発見され、今後の研究において機能的意義を探索する手がかりとなることが期待される。

シナプス形成および除去を制御する分子の開発が行われ、詳細な機能解析が行われた。Cerebellin1 (Cbln1) と Neuronal pentraxin1 (NPTX1) の部分配列を結合させたキメラタンパク質 CPTX を、小脳失調を呈する Cbln1KO および GluD2 マウスに投与したところ歩行における運動失調が顕著に改善された。さらにこの運動失調の改善は電子顕微鏡による解析からシナプス形成を生じていることが観

察された。一方で、シナプスを積極的に貪食させる制御分子としてシナプス接着分子の細胞外ドメインと自然免疫古典経路の下流で産生される切断産物である補体 C3dg をつなげたキメラタンパク質のデザインを行った。また、シナプス形成を解除する制御分子として Cbln1 の部分ドメイン発現系を構築した。Cbln1 の部分ドメイン発現系については濃縮、結合特異性および内因性リガンドに対する結合アッセイを行い、競合能を有することを確認した。シナプス形成を両方向性に制御する方法を確立する上で、今後も段階的な検討ができていくものと考えられる。

#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 7 件)

1 .  
Kunimichi Suzuki, Wataru kakegawa, Eriko Miura, Michisuke Yuzaki, Does complement C1q regulate synapse pruning via binding to chondroitin sulfate proteoglycan, The 3<sup>rd</sup> international symposium on Glyco-Neuroscience, 2016 年 1 月 14-16 日 (淡路夢部第国際会議場 (兵庫県淡路市))

2 .  
岩本創哉、鈴木邦道、柚崎通介、cerebellin 1 における neurexin 結合ドメインの解析～人為的なシナプス解除法の開発を目指して、第 38 回日本神経科学会、2015 年 7 月 28-31 日、神戸国際会議場 (兵庫県神戸市)

3 .  
鈴木邦道、Jonathan Elegheert, Amber Clayton, A. Radu Aricescu, 柚崎通介、新規の人工的シナプス接続分子 Cerebellin-Pentraxin (CPTX) を用いたシナプス形成及び可塑性の制御、第 38 回日本神経科学会、2015 年 7 月 28-31 日、神戸国際会議場 (兵庫県神戸市)

4 .  
Kunimichi Suzuki, Michisuke Yuzaki、Investigation into molecular mechanism of synapse elimination mediated by complement C1q and C3, 2014 Joint Meeting of the Society for Glycobiology and the Japanese Society of Carbohydrate Research, 2014 年 11 月 18 日、ホノルル (アメリカ)

5 .  
Kunimichi Suzuki, Michisuke Yuzaki、Investigation into molecular mechanism of synapse elimination mediated by complement C1q and C3, 第 8 回神経糖鎖生

物 学 領 域 班 会 議 ” Glycans in Neuroscience ” (Satellite Symposium II)、  
2014 年 11 月 16 日、ホノルル(アメリカ)

6 .

Kunimichi Suzuki, Jonathan Elegheert, Amber Clayton, A. Radu Aricescu, Michisuke Yuzaki、Modulation of synapse formation and plasticity by a novel artificial synapse connector, Cerebellin-Pentraxin (CPTX)、Fourth Annual Conference of COST Action ECMNET, 2014 年 10 月 1 日、アンタルヤ(トルコ)

7 .

鈴木邦道・柚崎通介、補体 C1q,C3 は正常シナプスを除去するのか？ - 分子機構の探索に向けて、第 7 回神経糖鎖生物学領域班会議、2014 年 5 月 25 日、ヤマハリゾートつま恋(静岡県掛川市)

〔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〕

なし

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

鈴木 邦道 (SUZUKI, Kunimichi)

慶應義塾大学・医学部・訪問研究員

研究者番号：10713703

### (2)研究分担者

なし

### (3)連携研究者

なし

### 国際共同研究協力者

A. Radu Aricescu, University of Oxford,  
Wellcome Trust Centre for Human Genetics  
Division of Structural Biology, Professor