

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 21 日現在

機関番号：13601

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25290021

研究課題名(和文)小脳神経回路網形成の分子基盤の解明

研究課題名(英文)Study on molecular mechanism of cerebellar circuit formation

研究代表者

植村 健(UEMURA, Takeshi)

信州大学・学術研究院医学系・准教授

研究者番号：00372368

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 11,800,000円

研究成果の概要(和文)：脳におけるシナプス形成・維持はシナプス間の細胞接着分子によって担われている。小脳平行線維-プルキンエ細胞間シナプスにおいては、ポストシナプスのGluR₂が分泌蛋白Cbln1を介してプレシナプスのNrxnと結合することでシナプス形成が調節されている。小脳神経回路網形成におけるNrxnsの役割を解明するために、小脳顆粒細胞特異的にNrxn1,2,3を欠損させた遺伝子改変マウスを作成した。小脳顆粒細胞特異的Nrxns欠損マウスは小脳顆粒細胞数と小脳シナプス数が減少し、重篤な運動失調を示すことが観察された。これらの結果は、Nrxnが小脳回路網形成に重要な役割を担うことを示唆している。

研究成果の概要(英文)：Synapses are formed and maintained by trans-synaptic interaction between pre- and postsynaptic cell adhesion molecules. In the cerebellum, the trans-synaptic interaction of postsynaptic glutamate receptor GluR₂ and presynaptic neurexins (Nrxns) through cerebellin precursor protein 1 (Cbln1) mediates parallel fiber (PF)-Purkinje cell (PC) synapse formation. In mammals, Nrxns are encoded by three genes (Nrxn1, Nrxn2, and Nrxn3). In this study, we generated cerebellar granule cell (GC)-specific Nrxn1, Nrxn2, and Nrxn3 triple KO mice. The cerebellar GCs-specific Nrxns triple KO mice showed severe ataxia and reduced cerebellar size. Histological analysis revealed that the number of cerebellar GCs was dramatically decreased in the cerebellar GCs-specific Nrxns triple KO mice. Electron microscopic analysis showed that PF-PC synapses were disappeared in the GCs-specific Nrxns triple KO mice. These results suggest that Nrxns are essential for cerebellar circuit formation.

研究分野：分子神経生物学、神経化学

キーワード：脳・神経 小脳 神経回路網構築

1. 研究開始当初の背景

(1) 高等動物の脳には 1,000 億もの神経細胞が存在し、神経細胞同志が「シナプス」とよばれる構造で連結し、複雑かつ精巧な神経回路網を形成することで脳の情報伝達や記憶・学習をはじめとする高次の脳機能を可能にしている。脳の高次機能を支える秩序だった神経回路網は、神経細胞が標的領域に軸索を伸ばし、そこで標的となる神経細胞の樹状突起とのみ特異的にシナプスを形成することで構築されていく。発達期におけるシナプス結合の形成と再編は脳の神経回路網形成の最も重要な段階の一つであり、この発達期におけるシナプス形成不全、機能低下をはじめとする神経回路網形成異常が、自閉症、精神遅滞、統合失調症等の神経発達障害と深く関係していると考えられている。したがって、脳の神経回路網形成の分子基盤の解明は神経発達障害の病態の理解のみならず、高次の精神・神経活動を司る脳の神経回路構築の原理を解明する上で極めて重要な課題である。

(2) 小脳は少数の神経細胞で構成される、均一で比較的単純な構造をしており、神経回路も比較的単純であることから、脳の神経回路網形成の分子基盤を解明する上での

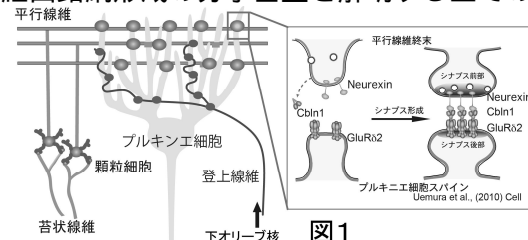


図1

モデル部位とし極めて有効な脳部位である。小脳平行線維-プルキンエ細胞間シナプスでは、シナプス後部の小脳プルキンエ細胞特異的グルタミン酸受容体 GluR δ 2 が分泌タンパク質 Cbln1 を介してシナプス前部の Neurexin (NRXN) と結合することでシナプス形成と成熟を誘導する(図1)。三者複合体によるシナプス結合の制御は従来の細胞接着分子による制御機構に対して、全く新しい概念を提唱するものである。GluR δ 2-Cbln1-NRXN 三者複合体を足がかりに、受容体の機能を担う下流シグナルを明らかにし、小脳神経回路網形成における複合体構成分子の個々の役割を明らかにすることで、秩序だった神経回路網形成を支える特異的シナプス形成機構の共通原理を導きだせるのではないかと考えるに至った。

2. 研究の目的

(1) GluR δ 2 欠損マウスにおいては小脳平行線維-プルキンエ細胞間シナプスの数が約半数に減少することから、このシナプスにおいては GluR δ 2-Cbln1-NRXN 三者複合体が主要なシナプス形成因子であると考えられる。しかしながら、依然として半数の

シナプスが残存しており、これら残存しているシナプスがどのような因子により形成されているかは、不明である。NRXN には Cbln1-GluR δ 2 以外に他のシナプス後部の細胞接着分子 NLGN、LRRTM と結合することが報告されており、残存するシナプスが NRXN を介した細胞接着により形成されているか、または全く別の受容体複合体によって担われているかを、小脳顆粒細胞特異的 NRXN1,2,3 トリプルノックアウトマウスを作成し、解析することで明らかにする。

(3) シナプス前部の NRXN がシナプス形成に果たす役割をプルキンエ細胞に投射する異なった2種類の性質の異なる興奮性入力でそれぞれ解析し比較することで、小脳神経回路網の構築に NRXN が果たす役割を明らかにする。

(2) GluR δ 2-Cbln1-NRXN 三者複合体の下流でシナプス形成を制御するシグナルは依然不明である。NRXN の細胞質内領域には酵素活性を示す領域は存在しないことから、リガンドの結合により他量体化した NRXN によってシナプス前終末の分化誘導を引き起こすタンパク質複合体が形成されることが想定される。NRXN の細胞質内領域の役割を明らかにするとともに、受容体の下流シグナルを同定し、その機能を in vitro 及び in vivo で詳細に解析することで、シナプス形成の分子メカニズムの解明を目指す。

3. 研究の方法

(1) NRXN1,2,3 を完全欠損させたマウスを作製するために *Nrxn1,2,3* の細胞膜貫通領域をコードする領域を loxP 配列で挟み、Cre 組換え酵素依存的にこれらの領域を欠損させるマウス (fNrxns) を作製する。作成した fNrxns マウスを、小脳顆粒細胞特異的 Cre リコンビナーゼ発現マウスおよび下オリーブ核神経細胞選択的 Cre リコンビナーゼ発現マウスと交配することで、小脳顆粒細胞または下オリーブ核神経細胞において NRXN1,2,3 を完全欠損させる。NRXN が小脳神経回路網形成に果たす役割を免疫染色による光顕レベルでの解析に加え、電子顕微鏡を用いて解析する。

(2) GluR δ 2-Cbln1-Neurexin 複合体の機能を支える下流の細胞内シグナル分子をプロテオミクス解析の手法を用いて同定する。磁気ビーズ上にシナプス前部の構造物を集積させた後、膜透過性蛋白質架橋剤を用いて結合分子を共有結合させる。タンパク質複合体を磁気ビーズを用いて精製し、質量分析装置を用いて網羅的に解析する。この方法により、シナプス前終末の分化誘導の機能に直結した細胞質内蛋白質複合体を同

定する。シナプス形成を支える受容体の下流シグナルを *in vitro* および *in vivo* で解析し、小脳平行線維-プルキンエ細胞間シナプスの形成機構の全貌を明らかにする。

4. 研究成果

(1) NRXN は3つの遺伝子 (*Nrxn1, 2, 3*) が存在し、単一の遺伝子から異なるプロモーターを用いて転写産物が作られることでという2つのアイソフォームが存在することから NRXN1,2,3 を完全欠損させたマウスを作製するために *Nrxn1, 2, 3* の細胞膜貫通領域をコードする領域を loxP 配列で挟み、Cre 組換え酵素依存的にこれらの領域を欠損させるマウス (*Nrxn1^{lox/lox}, Nrxn2^{lox/lox}; Nrxn3^{lox/lox}* ; *Nrxn3^{lox/lox}, Nrxn1^{lox/lox}; Nrxn2^{lox/lox}* ; *Nrxn3^{lox/lox}* マウス) を小脳顆粒細胞特異的 Cre リコンビナーゼ発現マウスおよび下オリブ核神経細胞選択的 Cre リコンビナーゼ発現マウスと交配し、これらの脳部位において NRXN1,2,3 を欠損しているマウスの系統の樹立を試みた。下オリブ核神経細胞においては遺伝子欠損の効率が著しく低くその後の解析を中止した。一方、小脳顆粒細胞においては *Nrxn1, 2, 3* 遺伝子が高効率で欠損でき、小脳顆粒細胞特異的 *Nrxn1, 2, 3* 遺伝子マウスの作成に成功した。

(2) 小脳顆粒細胞特異的 *Nrxn1, 2, 3* 遺伝子マウスは重篤な運動失調を示す。ローターロッドテストにおいても有意な運動協調低下が認められた。小脳顆粒細胞特異的 *Nrxn1, 2, 3* 遺伝子マウスは野生型マウスに比べて小脳のサイズが極端に小さくなっており、NeuN 抗体、DAPI 染色による解析から、8 週齢のマウスにおいては小脳顆粒細胞がほぼ消失していることが明らかとなった。電子顕微鏡を用いた解析から 8 週齢マウスの小脳においては平行線維-プルキンエ細胞間シナプスが減少していた。3 週齢のマウスにおいても小脳顆粒細胞数の減少が観察されたが、8 週齢のマウスに比べ顆粒細胞の減少数は軽微であった。TUNEL 法を用いて幼弱期のマウスを解析した結果、野生型マウスに比べ TUNEL 陽性顆粒細胞が著しく増加していることが明らかになった。これらの結果は、シナプス間細胞接着分子 NRXN の新たな機能を示唆するものであった。

(3) プロテオミクス解析により、GluRδ2-Cbln1-Neurexin 複合体を解析した。その結果、既に報告されている NRXN 結合分子 CASK に加え、複数の細胞内タンパク質を同定することに成功した。同定した候補分子は pull down 法を用いて結合を解析した。当初の予想に反して、NRXN が小脳顆粒細胞の生存に必要不可欠であることが明らかとなり、今後はシナプス形成における

NRXN の役割を細胞生存と切り離して解析していくことが必要となった。

(4) シナプス機能分子を脳神経細胞で迅速に解析する新たな方法論を開発した。CRISPR/Cas9 システムと子宮内電気穿孔法による神経前駆細胞への遺伝子導入技術を組み合わせることで、脳神経細胞での相同組換えによるゲノム編集法が可能であることを見出した。この手法を用いて脳神経細胞において内在性タンパク質を蛍光タンパク質等で標識する方法を確立させた。この技術を用いることで脳神経回路網構築と機能発現に関わる多くの遺伝子を容易かつ迅速に解析することが可能となり、今後のシナプス機能分子の解析を飛躍的に早めることが期待される。

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7件)

Uemura T, Maeda A, Yasumura M, Shimada T, Fukata Y, Fukata M, Yoshida T (In situ screening for postsynaptic cell adhesion molecules during synapse formation), Journal of Biochemistry, in press, 2017, 査読有

doi:10.1093/jb/mvx030

Uemura T, Mori T, Kurihara T, Kawase S, Koike R, Satoga M, Cao X, Li X, Yanagawa T, Sakurai T, Shinodo T, Tabuchi K (Fluorescent protein tagging of endogenous protein in brain neurons using CRISPR/Cas9-mediated knock-in and in utero electroporation technique), Scientific Reports, 6 巻, 35861, 2016, 査読有

doi:10.1038/srep35861

Yamagata A, Sato Y, Goto-Ito S, Uemura T, Maeda A, Shiroshima T, Yoshida T, Fukui S (Mechanisms of splicing-dependent trans-synaptic adhesion by PTP-IL1RAPL1/IL-1RAcP for synaptic differentiation), Nature Communications, 6 巻, 6926, 2015, 査読有

10.1038/ncomms7926

Yasumura M, Yoshida T, Yamazaki M, Abe M, Natsume R, Kanno K, Uemura T, Takao K, Sakimura K, Kikusui T, Miyakawa T, Mishina M (IL1RAPL1

knockout mice show spine density decrease, learning deficiency, hyperactivity and reduced anxiety-like behaviours), Scientific Reports, 4 巻, 3976, 2014, 査読有

10.1038/srep06613

Ikegami M, Uemura T, Kishioka A, Sakimura K, Mishina M (Striatal dopamine D1 receptor is essential for contextual fear conditioning), Scientific Reports, 4 巻, 3976, 2014, 査読有

doi: 10.1038/srep03976

Kishioka A, Uemura T, Fukushima F, Mishina M (Consolidation of auditory fear memories formed by weak unconditioned stimuli requires NMDA receptor activation and de novo protein synthesis in the striatum), Mol. Brain, 6 巻, 17, 2014, 査読有

doi: 10.1186/1756-6606-6-17

植村健(シナプスオーガナイザーによるシナプス形成の制御機構), 生物物理, 53 巻, 90-93, 2013, 査読有

<http://dx.doi.org/10.2142/biophys.53.090>

[学会発表](計 14 件)

植村健, 森琢磨, 栗原大河, 里賀みちる, 田淵克彦 (CRISPR/Cas9-mediated gene knock-in in single neurons in vivo), 第 39 回日本神経科学大会, 2016.7.21, パシフィコ横浜, 横浜市

山形敦史, 吉田知之, 佐藤裕介, 伊藤(後藤)桜子, 植村健, 森寿, 三品昌美, 深井周也 (IIa 型受容体チロシンホスファターゼ とインターロイキン 1 受容体タイプのシナプスオーガナイザー間の選択的スプライシング依存的相互作用制御の構造基盤), 第 88 回日本生化学大会, 2015.12.3, 神戸ポートアイランド, 神戸市

山形敦史, 佐藤裕介, 伊藤(後藤)桜子, 植村健, 吉田知之, 深井周也 (Slitrk ファミリータンパク質と IIa 型受容体タンパク質チロシン脱リン酸化酵素がスプライスインサートに依存して相互作用するメカニズム), 第 88 回日本生化学大会, 2015.12.3, 神戸ポートアイランド, 神戸市

植村健, 佐藤裕介, 山形敦史, 吉田知之, 後藤桜子, 前田亜沙美, 城島知子, 田淵克彦, 三品昌美, 深井周也 (Insights into structure and assembly of GluD2-Cbln1-neurexin adhesion complex for cerebellar synapse formation), 第 88 回日本

生化学大会, 2015.12.1, 神戸ポートアイランド, 神戸市

植村健 (小脳シナプス形成を担う GluR 2-Cbln1-neurexin 接着分子複合体の構造基盤), 第 53 回日本生物物理学会年会, 2015.9.14, 金沢大学, 金沢市

山形敦史, 佐藤裕介, 伊藤(後藤)桜子, 植村健, 前田亜沙美, 城島知子, 吉田知之, 深井周也 (Slitrk2 と PTP のスプライシング依存的認識機構の構造基盤), 第 38 回日本神経科学大会, 2015.7.30, 神戸国際会議場, 神戸市

吉田知之, 山形敦史, 佐藤裕介, 後藤桜子, 植村健, 前田亜沙美, 城島知子, 岡本志穂, 森寿, 三品昌美, 深井周也 (シナプス形成を司る IL1RAPL1-PTP 複合体の構造基盤), 第 38 回日本神経科学大会, 2015.7.30, 神戸国際会議場, 神戸市

植村健, 佐藤裕介, 山形敦史, 吉田知之, 後藤桜子, 田淵克彦, 三品昌美, 深井周也 (小脳シナプス形成のための GluR 2-Cbln1-Neurexin 三者複合体の構造的解析), 第 38 回日本神経科学大会, 2015.7.30, 神戸国際会議場, 神戸市

植村健 (C1q ファミリー分子 Cbln1 とその受容体であるグルタミン酸受容体 GluR 2 と neurexin による小脳シナプス形成の調節機構), 第 37 回日本分子生物学会年, 2104.11.26, パシフィコ横浜, 横浜市

三品昌美, 池上賢, 植村健, 岸岡歩, 崎村建司 (線条体ドパミン D1 受容体は文脈依存恐怖条件付け学習に必須である), 第 37 回日本神経科学大会, 2014.9.13, パシフィコ横浜, 横浜市

佐藤主税, 木下貴明, 植村健, 平野和己, 川田正晃, 西山英利, 佐藤真理, 海老原達彦, 須賀三雄, 西原祥 (The Atmospheric Scanning Electron Microscope (ASEM) Observes Axonal Segmentation and Synaptic Induction in Solution), Microscopy & Microanalysis 2014 Meeting, 2014.8.5, ハーフォード, アメリカ合衆国

植村健 (シナプス形成を司る GluR 2-Cbln1-Neurexin 三者複合体の X 線結晶構造解析), 第 14 回日本蛋白質学会年会, 2014.6.27, ワークピア横

浜/横浜産貿ホールマリネリア，横浜市

植村健，佐藤真理，西山英利，須賀三雄，佐藤主税（受容体でコートした磁気ビーズによる初代培養シナプス形成誘導の ASEM 水中免疫電顕），日本顕微鏡学会 第 70 回記念学術講演，2014.5.11，幕張メッセ国際会議場，千葉市

安村美里，吉田知之，高雄啓三，山崎真弥，阿部学，植村健，宮川剛，崎村建司，三品昌美（IL1RAPL1 欠損マウスの行動学的解析），第 36 回日本神経科学大会．2013.6.21，国立京都国際会館，京都

〔図書〕(計 1 件)

Mishina M, Yoshida T, Yasumura M, Uemura T, Springer Japan, (Synapse formation in the brain in Cortical development, Kageyama, R., and Yamamori, T., eds., 2013, pp. 229–247

6．研究組織

(1)研究代表者

植村 健 (UEMURA, Takeshi)
信州大学・学術研究院医学系・准教授
研究者番号：0 0 3 7 2 3 6 8

(3)連携研究者

吉田 知之 (YOSHIDA, Tomoyuki)
富山大学・医学薬学研究院・准教授
研究者番号：9 0 3 7 2 3 6 7