

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 15 日現在

機関番号：13601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2014

課題番号：24650183

研究課題名(和文) DREADDシステムを用いたシナプス成熟技術の開発

研究課題名(英文) Development of the technique to promote synapse maturation using DREADD system.

研究代表者

田淵 克彦 (TABUCHI, Katsuhiko)

信州大学・学術研究院医学系・教授

研究者番号：20546767

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：自閉症など、シナプス成熟異常による疾患を克服する技術を開発する目的で、DREADDシステムを用いてシナプス成熟が促進できるかを試みた。DREADDの一つであるhM3Dqをマウスの大脳皮質II/III層の錐体ニューロンに導入し、CNO投与によりhM3Dqのシグナルを誘導したところ、遺伝子導入ニューロンの棘突起の形態変化から、シナプスの成熟が促進されたことが確認できた。さらに、hM3Dqのシグナルを誘導することにより、シナプス成熟に関与していることが知られているNeurexin-1の細胞内領域のセリンのリン酸化が誘導され、これはPKCの活性化によって引き起こされることを見出した。

研究成果の概要(英文)：To overcome disorders caused by deficit of synapse maturation, such as autism, we attempted to promote synapse maturation using DREADD system. For this, we introduced one type of DREADD, hM3Dq, into layer II/III pyramidal neurons in cerebral cortex in mouse brains, followed by administration of CNO to induce hM3Dq signal. We found that the synapse maturation was promoted in the hM3Dq expressing neurons judged from the morphology of dendritic spines. Furthermore, we found that this signal induced serine phosphorylation in the cytoplasmic region of Neurexin-1 that was known to be involved in synapse maturation, due to the activation of PKC.

研究分野：神経生理学

キーワード：シナプス 神経実験形態学

1. 研究開始当初の背景

我々は、疾患モデルマウスを用いた研究により、自閉症の原因としてシナプスの成熟異常が関与している可能性を見出してきた。自閉症の根本的治療法は今のところ存在しないが、人為的にシナプスを成熟させる方法を確立できれば、自閉症の治療法に繋がる可能性がある。DREADD (Designer Receptors Exclusively Activated by Designer Drugs) は、米国ノースカロライナ大学の Bryan L. Roth たちが開発したシステムで、彼らはムスカリン様アセチルコリン受容体に変異を導入し、アセチルコリンには反応しないが clozapine-N-oxide (CNO) に反応して下流シグナルを惹起する人工受容体を作りだした。本研究は、DREADD システムを用いて神経活動を誘発し、結果としてシナプス成熟を誘導するシステムを確立することを試みる。

2. 研究の目的

本研究では、M3 アセチルコリン受容体を改変した DREADD コンストラクトである hm3Dq を利用して、CNO によって下流シグナル (ホスホリパーゼ C - PKC パスウェイ) を誘導し、シナプス成熟を試みる。このため、このコンストラクトを、子宮内エレクトロポレーション法によりマウスの大脳皮質 II/III 層の錐体ニューロンに導入し、CNO を腹腔内投与後、脳切片について c-fos の発現により hm3Dq のシグナルが誘導されたことをモニターし、hm3Dq 導入ニューロンの棘突起の形状を解析することにより、シナプス成熟をモニターする。また、シナプス誘導因子として知られるシナプス接着因子 Neuroligin-1 について、このノックアウトのシナプス膜表面の NMDA 受容体の密度をモニターすることにより、シナプス成熟と Neuroligin-1 の因果関係について解析する。また、Neuroligin-1 と結合してシナプス前終末の成熟を誘導することが知られる Neurexin について、細胞内領域の構造及び hm3Dq のシグナル誘導によって引き

起こされる効果について検討する。これらに加えて、シナプス成熟との関連が示唆されるその他の細胞接着因子とシナプス成熟との因果関係についても、研究を行う。

3. 研究の方法

(1) 子宮内エレクトロポレーション法による DREADD コンストラクトのマウスニューロンへの導入：ヒト M3 ムスカリン様アセチルコリン受容体のアセチルコリンに対する親和性を除去し、外来薬剤 clozapine-N-oxidase (CNO) に対してのみ反応する様な変異を加えたタンパク質 (hm3Dq) の N 末に HA エピトープタグを付加した遺伝子 (ノースカロライナ大学 Bryan L. Roth 博士より提供) を、CAG プロモーター発現ベクター (pCAGGS) に挿入したコンストラクト (pCAGGS-HA-hm3Dq) を作成し、これを妊娠 14 日目の母親マウスを開腹して胎児の側脳室に EGFP 発現マーカー遺伝子と共に子宮の上から注入し、ネッパジーン社のエレクトロポレーターにより電気パルスをかけた後、腹を縫合して正常に出産するまで妊娠を継続させた。出産後、遺伝子導入マウスを頭蓋の外から青色 LED を当てることにより、EGFP シグナルを検出し、遺伝子導入マウスを選別した。この方法により、遺伝子は脳皮質 II/III 層の錐体ニューロンに特異的に導入されることになる。

(2) CNO による DREADD 導入ニューロンの活動の誘導及びその検出：hm3Dq 遺伝子導入成熟マウスに 5mg/kg の CNO を腹腔内投与し、DREADD システムによる遺伝子導入ニューロンの活動を誘導した。90-120 分後に灌流固定を行い、脳切片に対して c-fos 抗体による免疫染色を行い、遺伝子導入ニューロンが活動したことをモニターした。また、EGFP のシグナルの集積をマーカーとして、遺伝子導入ニューロンの棘突起の密度、大きさ、形状を解析し、シナプスの成熟を評価した。

(3) 凍結割断レプリカ免疫電顕法：2% PFA により固定した Neuroligin-1 のノックアウト及び野生型コントロールマウスの脳の小領域のブロックを高圧下で急速凍結し、割断装置（JFD11）で細胞膜脂質二重層に沿って割断し、割断面に白金・炭素を蒸着させた。これを SDS 溶液中で 80℃ でインキュベートし、細胞質成分を除去した。この標本を NMDA 受容体の 1 次抗体、金標識 2 次抗体で染色し、透過型電子顕微鏡下でシナプス膜表面の NMDA 受容体の密度を解析した。

(4) Neurexin-1 の細胞内領域の構造の解析：His(x6) タグを融合した Neurexin-1 の細胞内領域のタンパク質を大腸菌により発現し、ニッケルカラムにより精製し、このタンパク質の折りたたみ構造を NMR 及び円偏光二色性（CD スペクトラ）により解析した。

(5) DREADD による Neurexin-1 のリン酸化の誘導およびその検出：N 末に Flag タグを付加した Neurexin-1b のコンストラクトと、pCAGGS-HA-hm3Dq のコンストラクトを HEK293T 細胞に共導入し、培養液に CNO を添加することにより Gq/11 型の GPCR 下流シグナル（ホスホリパーゼ C - PKC 系）を活性化した。この細胞抽出液を Phos-Tag ポリアクリルアミドゲルに泳動し、抗 Flag タグ抗体により Neurexin-1 の泳動度の変化を検出することにより、Neurexin のリン酸化をモニターした。

(6) 電気生理学的手法によるシナプス接着因子のシナプス成熟能の解析：シナプス接着因子（Neurexin ファミリー、Neuroligin ファミリー、Calsyntenin ファミリー、LAR-PTP ファミリーなど）の shRNA 及びレスキューコンストラクトを発現するレンチウィルスを作成し、海馬の初代培養ニューロンに感染さ

せ、電圧固定パッチクランプ法によりシナプスの活動を記録した。テトロドトキシン存在下で、興奮性及び抑制性の自発的シナプス小胞の放出をモニターし、電気刺激によりシナプス強度、短期可塑性をモニターした。また、これらのプラスミドコンストラクトを子宮内エレクトロポレーション法により大脳皮質 II/III 層の錐体ニューロンに導入し、これら脳の急性切片から電圧固定パッチクランプ法により、同様のパラメータを解析した。

4. 研究成果

(1) 子宮内エレクトロポレーションを行ったマウスの脳切片について、大脳皮質体性感覚野 II/III 層の錐体ニューロンに高効率で EGFP シグナルが検出され、また HA 抗体による免疫染色により EGFP シグナル陽性ニューロンのほぼ 100% で HA シグナルが検出された。

(2) CNO 投与後の脳切片に置いて、EGFP 陽性の HA-hm3Dq 導入ニューロンで c-fos の発現が検出された。また、CNO 非投与の個体と比較して、CNO 投与後の HA-hm3Dq 導入ニューロンの棘突起の密度の上昇がみられた。また、棘突起の頭部のサイズが上昇し、高さおよび頸部の幅が減少したことから、形態学的にシナプスの成熟が促進したことが示唆された。

(3) 凍結割断レプリカ免疫電顕により Neuroligin-1 のノックアウトマウスのシナプス後部表面の NMDA 受容体の分布を解析したところ、野生型に比べて密度が低下していることが認められた。

(4) NMR および CD スペクトラム解析により、Neurexin-1 の細胞内領域は天然変性タンパク質の特徴を有していることを見出した。

(5) Flag-Neurexin-1b と HA-hm3Dq 発現ベクターを HEK293T 細胞に共導入して、CNO による hm3Dq シグナル誘導後、細胞抽出液を

Phos-Tag ゲルで泳動し、抗 Flag 抗体で Neurexin の泳動度を解析したところ、Neurexin のバンドが上へシフト(泳動距離の低下)がみられ、Neurexin がリン酸化されていることが判明した。hM3Dq のシグナルは PKC を活性化するため、Flag-Neurexin-1b を単独で導入した HEK293T 細胞に TPA を添加し、PKC を活性化すると、やはり Neurexin のバンドシフトがみられた。Neurexin-1b の最後から 3 つのセリンをアラニンに置換したコンストラクトではこのバンドシフトが見られないことから、これらのセリンが PKC のリン酸化標的であることが判明した。また、野生型 Neurexin-1 は、PI(4,5)P2 と結合することを見出し、最後から 3 つのセリンのリン酸化がこの結合を阻害することも見出した。

(6) シナプス後部局在性シナプス接着因子 Calsynenin-3 が、Neurexin と複合体を形成し、シナプス成熟を誘導することを、shRNA およびレスキューコンストラクトを海馬初代培養系および子宮内エレクトロポレーション法による大脳皮質 II/III 層の錐体ニューロンに導入した系における電気生理学実験で見出した。また、Neurexin の結合相手である LRRTM がプロテオグリカン的一种である Glypican-4 と結合すると、シナプス前終末で Neurexin ではなく PTPs と結合し、別の分子経路でシナプス成熟を誘導することも同様の系を用いた実験により突き止めた。

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 9 件)

Ko, J. S., Pramanik, G., Um, J. W., Shim, J. S., Lee, D., Kim, K. H., Chung, G. Y., Condomitti, G., Kim, H. M., Kim, H., de Wit, J., Park, K. S., Tabuchi, K. and Ko, J. PTPsigma functions as a presynaptic receptor for the glypican-4/LRRTM4

complex and is essential for excitatory synaptic transmission. Proc Natl Acad Sci U S A. (査読有) 112(6):1874-1879. 2015. DOI:10.1073/pnas.1410138112

Isshiki, M., Tanaka, S., Kuriu, T., Tabuchi, K., Takumi, T. and Okabe, S. Enhanced synapse remodelling as a common phenotype in mouse models of autism. Nat Commun. (査読有) 5(4742). 2014. DOI:10.1038/ncomms5742

Um, J. W., Pramanik, G., Ko, J. S., Song, M. Y., Lee, D., Kim, H., Park, K. S., Sudhof, T. C., Tabuchi, K. and Ko, J. Calsynenin function as synaptogenic adhesion molecules in concert with neurexins. Cell Rep. (査読有) 6(6): 1096-109. 2014. DOI:10.1016/j.celrep.2014.02.010

田淵克彦, 張文欣, Nur Farehan Mohamed Asgar, Gopal Pramanik: Neuroigin モデルマウスに見るシナプス成熟障害と自閉症との関係(総説): 日本神経精神薬理学雑誌(査読無し) Vol.34.No.1:1-4. 2014

田淵克彦: シナプスと自閉症(総説): 生体の科学(査読無し) Vol.65.No.1: 3-6. 2014

Aoto, J., Martinelli, D. C., Malenka, R. C., Tabuchi, K. and Sudhof, T. C. Presynaptic neurexin-3 alternative splicing trans-synaptically controls postsynaptic AMPA receptor trafficking. Cell. (査読有) 154(1): 75-88. 2013. DOI:10.1016/j.cell.2013.05.060

田淵克彦: ニューレグリン受容体(ERBB4)の異常と精神疾患(総説): 生体の科学(査読無し) Vol.64.No5: 470-471. 2013

Budreck, E. C., Kwon, O. B., Jung, J. H., Baudouin, S., Thommen, A., Kim, H. S., Fukazawa, Y., Harada, H., Tabuchi, K., Shigemoto, R., Scheiffele, P. and Kim, J. H. Neuroligin-1 controls synaptic abundance of NMDA-type glutamate receptors through extracellular coupling. Proc Natl Acad Sci U S A. (査読有) 110(2): 725-30. 2013.
DOI:10.1073/pnas.1214718110

Baig, DN., Yanagawa, T., Tabuchi, K. Analysis of Neuroligin-3 R451C knock-in mice as models for autistic savant. Japanese Journal of Biological Psychiatry. (査読無し) 23(4): 281-286. 2012

〔学会発表〕(計7件)

田淵克彦 : Neuroligin-3 変異マウスを用いた非症候群性自閉症におけるシナプス異常の研究. 第92回日本生理学会, 2015年3月23日, 神戸国際会議場(兵庫県神戸市)

Tabuchi, K. : Impairment in Synapse Maturation as a Cause of Autism. International Conference on Emerging Trends in Life Sciences for Sustainable Development., 2014年10月9日, Forman Christian College (Lahore, Pakistan)

田淵克彦 : Neuroligin モデルマウスに見るシナプス成熟障害と自閉症との関係. 第55回脳の医学生物学研究会, 2013年8月10日, 名古屋市立大学医学部(愛知県名古屋市)

田淵克彦, 張文欣, Nur Farehan Mohamed Asgar, T. C. S., 重本隆一 : Synapse maturation and autism: The role of synapse adhesion molecules. 第90回日本生理学会

大会, 2013年3月27日, タワーホール船堀(東京都江戸川区)

田淵克彦 : Neuroligin 変異モデルマウスの解析による自閉症の病態の解明. 第34回日本生物学的精神医学会, 2012年10月1日, 神戸国際会議場(兵庫県神戸市)

Tabuchi, K. : Synapse maturation and autism: The role of Neuroligins and Neurexins. The 11th Biennial Meeting of the Asia Pacific Society for Neurochemistry, 2012年9月30日, 神戸国際会議場(Kobe, Japan)

Tabuchi, K. : Synapse function and autism: The role of Neuroligins and Neurexins. 15th Annual Neuroscience Symposium The Korean Society for Brain and Neural Science, 2012年9月26日, ソウル国立大学(Seoul, Korea)

〔その他〕
ホームページ等
<http://www.shinshu-u.ac.jp/faculty/medicine/chair/i-2seiri/ja/research.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田淵 克彦 (TABUCHI, Katsuhiko)
信州大学・学術研究院医学系・教授
研究者番号: 20546767