

科学研究費助成事業（特別推進研究）公表用資料

〔令和4（2022）年度 中間評価用〕

令和4年3月31日現在

研究期間	2020～2024
課題番号	20H05628
研究課題名	細胞外足場タンパク質によるシナプス・非シナプス機能制御機構の解明
研究代表者氏名（ローマ字）	柚崎 通介（YUZAKI Michisuke）
所属研究機関・部局・職	慶應義塾大学・医学部（信濃町）・教授
研究者番号	40365226

研究の概要（4行以内）：

神経細胞は、「シナプス」と呼ばれる接着構造によってお互いに結合してさまざまな神経回路を構成する。神経細胞間や、神経細胞と非神経細胞の間には非典型的な接着構造も存在する。本研究ではこれらの接着構造において機能する「細胞外足場タンパク質」の解明を進め、人工コネクターを開発することによって、これらの接着構造の生理的機能を明らかにし、精神・神経疾患の病態の解明を進める。

研究分野：神経科学一般

キーワード：ニューロン、シナプス、神経回路

1. 研究開始当初の背景

神経細胞は「シナプス」と呼ばれる接着構造によってお互いに結合してさまざまな神経回路を構成する。多くの精神・神経疾患ではシナプスに異常がみられることから、シナプス形成を担う分子群の解明は基礎・臨床神経科学における最重要課題の一つである。

近年、私たちは新しいシナプス形成分子として、細胞外足場タンパク質（Extracellular Scaffolding Protein: ESP）という概念を確立した。ESPは神経細胞やグリア細胞から分泌されて、シナプスにおいてシナプス前部や後部のさまざまな膜タンパク質と結合する足場として働く。ESPは従来のシナプス形成分子とは異なり、発達時のみでなく生涯にわたって、神経活動に応じたシナプスの再編や機能を制御する。さらに、神経細胞間や、神経細胞と非神経細胞の間にはシナプスとは異なった接着構造が存在し、ESPはこのような非シナプス性接着構造にも関与することがわかってきた。

2. 研究の目的

本研究では、シナプスおよび非シナプス性接着構造において機能するさまざまなESPのシグナル伝達機構の解明を進め、さらにESPの結晶構造を元にして人工的コネクターを開発することによって、神経回路網や非シナプス性接着構造の生理的機能を明らかにし、新しい観点から脳の動作原理および精神・神経疾患の病態の解明を進める。

3. 研究の方法

目標1 ESPによるシナプス制御機構の解明

ESPに属するシナプス形成分子として、補体ファミリー分子（C1q, Cbln1-4, C1ql1-4）や神経ペントラキシン（NP: NP1, NP2, NPR）があり、さまざまな機能が報告されている。しかしそのシグナル伝達機構には不明な点が多い。そこでC1q, Cbln2, Cbln4, NPに特に焦点を当て、それぞれの受容体を同定し機能発現機構を解明する。

目標2 ESPを中心とした非シナプス性接着機構と役割の解明

- ① 扁桃体延長領域における結合腕傍核よりのコリン作動性入力
- ② 線条体における黒質よりのドーパミン作動性入力
- ③ 小脳分子層介在神経細胞における登上線維からの入力

の3つの脳部位において、非シナプス性接着構造に関与する分子を同定し、その生理的意義を解明する。

目標3 人工コネクターによる特定の神経回路の制御

Cbln1とNP1のキメラタンパク質として開発したCPTXは、脊髄損傷やアルツハイマー病モデルマウスに投与すると、シナプス形成を誘導し症状を大幅に改善する。CPTXによる形態的なシナプス形成機序の解明を進め、さらにタンパク質の構造に基づいた新しい人工シナプスコネクターを開発する。

4. これまでの成果

目標1 ESPによるシナプス制御機構の解明

正常発達時に起きる余分なシナプスの刈込み現象や、アルツハイマー病等における病的なシナプス減少において補体C1qが関与するが、C1qがいったい何に結合するのかは不明であった。私たちは、中枢神経系におけるC1q受容体の同定に初めて成功した（論文準備中）。Cbln4は大腦皮質において抑制性

シナプス形成を制御することが報告されていた。しかし、海馬歯状回では興奮性シナプス形成を制御し、海馬 CA1 領域ではシナプス形成ではなくシナプス可塑性を制御することを初めて明らかにした（論文準備中）。C1qL1 はカイン酸受容体 KAR、細胞接着型 G タンパク質共役受容体 Bai3 とともに C1qL1-KAR-Bai3 という 3 者複合体を形成して小脳登上線維—プルキンエ細胞シナプス形成を制御することが分かり、イオンチャネル活性に依存しない KAR の機能を初めて明らかにした（論文準備中）。NP ファミリー分子 NP1, NP2, NPR のシナプスレベルでの局在を明らかにするために、それぞれの分子の特異的抗体と遺伝子ノックアウトマウスの作成に成功した。また AMPA 受容体と NP1 の結晶構造から、AMPA 受容体の細胞外ドメインの中で NP との結合に必須であるアミノ酸残基の同定に成功した。

目標 2 ESP を中心とした非シナプス性接着機構と役割の解明

① 結合腕傍核よりの入力線維と扁桃体延長領域の神経細胞との間にみられる接着構造にはグルタミン酸受容体 GluD1 以外には既存のシナプス分子が存在しないことが分かった。GluD1 は Cbln1 の受容体であることから、GluD1 および Cbln1 遺伝子欠損マウスを用いて解析したところ、2 つの遺伝子欠損マウスでは、ともにこの接着構造が激減した。すなわち、Cbln1-GluD1 シグナリングは扁桃体延長領域間における非シナプス性接着構造を制御することが分かった。

② 線条体における黒質よりのドーパミン (DA) 作動性入力、線条体 GABA 作動性シナプス後部の Neuroligin2 を介して非シナプス性接着を形成することを見出した。さらに同部位に局在する分子群を明らかにするために、細胞間接着部位のみに GFP や TurboID を発現させる技術開発に成功した。

③ 小脳分子層において登上線維が介在神経細胞と形成する接着構造について、電子顕微鏡解析と、抗体染色による局在分子の同定を行った。同部位はシナプス後膜肥厚を欠き、登上線維終末にはシナプス小胞の集積がみられなかった。一方、NMDA 受容体サブユニット GluN1、GluN3A、カリウムチャネル Kv4.3 が局在していた。これらの結果から、この非シナプス性接着部位は通常の興奮性シナプス伝達とは異なる機能を担っている可能性が示唆された。

目標 3 人工コネクターによる特定の神経回路の制御

脊髄における CPTX の作用を解明し、新しい人工シナプスコネクターを開発するために、脊髄における C1q ファミリー分子の局在解析を進めた。より高い S/N 比で局在解析を行うために、それぞれの分子について、抗原性の高いエピトープタグをノックインしたマウスを作成した。また C1qL の構造に基づいた新規シナプスコネクターを開発した。

5. 今後の計画

目標 1 新しい C1q 受容体について生理的意義を明らかにする。海馬での Cbln4 のシナプス制御機構について、それぞれ論文として発表する。NP の詳細なシナプス局在を明らかにするとともに、NP 非結合型 AMPA 受容体を用いることによって、NP による AMPA 受容体機能制御機構を明らかにする。

目標 2 扁桃体延長領域における結合腕傍核入力との間の非シナプス性接着構造の形態の詳細を明らかにする。また機能的意義を明らかにするために、非シナプス性接着構造を欠損する Cbln1 や GluD1 遺伝子欠損マウスを用いて電気生理学的解析および行動学的解析を進める。線条体における黒質よりの DA 作動性入力との間に形成される非シナプス性接着構造について、光電子相関顕微鏡法を用いて三次元構築を行い、分子局在様式および周辺の古典的興奮性シナプスとの位置関係を明らかにする。

目標 3 開発したエピトープタグノックインマウスを活用して脊髄における C1q ファミリー分子の局在を明らかにする。また非ヒト霊長類を用いて脊髄損傷後の巧緻運動の回復を指標として CPTX の効果について検討する。さらに ESP の構造を元にして設計した新規シナプスコネクターについて、培養神経細胞での検証を進めるとともに、脊髄損傷や慢性疼痛モデルを用いた性能の検証を進める。

6. これまでの発表論文等 (受賞等も含む)

Takeo YH, Yuzaki M. Purkinje Cell Dendrites: The Time-Tested Icon in Histology. In Contemporary Clinical Neuroscience. Springer Nature. 2021. p.145-167.

Matsuda S, Yuzaki M. Subunit-dependent and independent rules of AMPA receptor trafficking during chemical long-term depression in hippocampal neurons. J Biol Chem 297:100949, 2021.

Kawamura A, Katayama Y, Kakegawa W, Ino D, Nishiyama M, Yuzaki M, Nakayama KI. The autism-associated protein CHD8 is required for cerebellar development and motor function. Cell Rep. 35(1):108932, 2021.

Miyazaki T, Yamasaki M, Tanaka K, Watanabe M: Compartmentalized input-output organization of Lugaro cells in the cerebellar cortex. Neuroscience, 462:89-105, 2021.

Nakamoto C, Konno K, Taisuke Miyazaki, Nakatsukasa E, Natsume R, Abe M, Kawamura M, Fukazawa Y, Shigemoto R, Yamasaki M, Sakimura K, Watanabe M: Expression mapping, quantification, and complex formation of GluD1 and GluD2 glutamate receptors in adult mouse brain. J Comp Neurol 528:1003-27, 2020.

7. ホームページ等

<http://www.yuzaki-lab.org>

<https://aande.hokkaido.university/>