

成熟脳におけるシナプス改変・維持過程を担う新しい分子機構

A Novel Mechanism Reconstructing and Maintaining Mature Neural Networks.

(日本生理学会推薦)

代表研究者	慶應義塾大学	掛川 渉	Keio University School of Medicine	Wataru KAKEGAWA
協同研究者	慶應義塾大学	柚崎 通介	Keio University School of Medicine	Michisuke YUZAKI
	慶應義塾大学	三浦 会里子	Keio University School of Medicine	Eriko MIURA

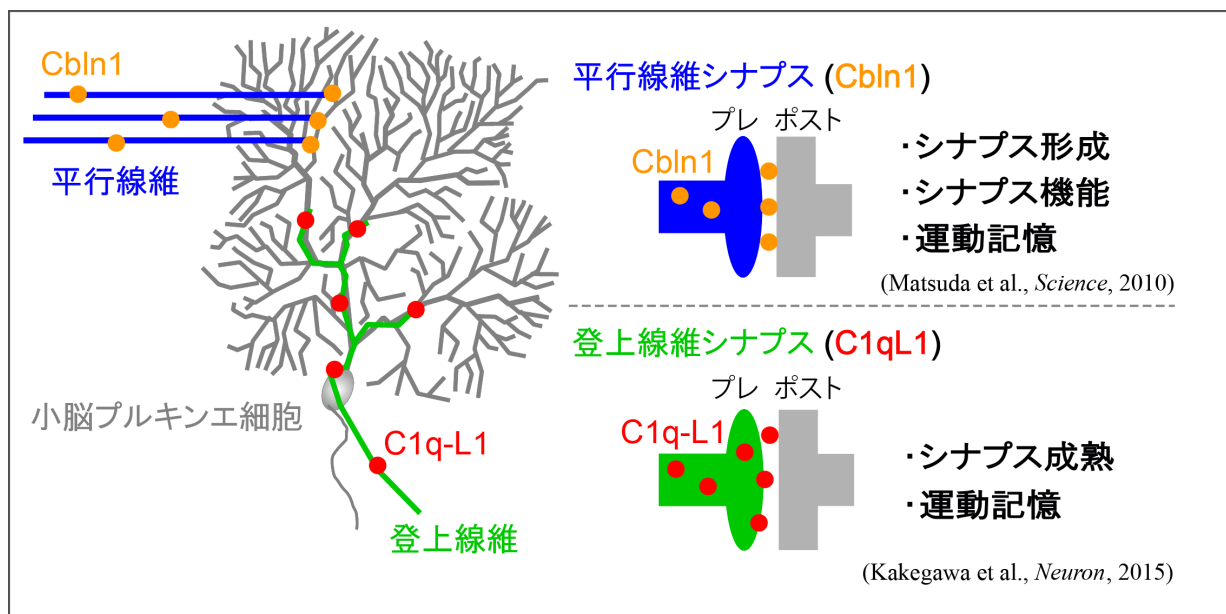
Neuronal circuits are continually refined throughout life by repeating synapse formation and elimination. The C1q family proteins, which are characterized by a conserved global C1q domain, are reportedly expressed in various brain regions and they regulate synapse formation, elimination and maintenance (Yuzaki, *Curr Opin Neurobiol*, '17; Stephan et al., *Annu Rev Neurosci*, '12). Among them, C1q-like protein 1 (C1qL1), a novel C1q-family protein, is selectively expressed at cerebellar climbing fiber (CF)-Purkinje cell synapses (CF synapses) and it's essential for CF synapse formation and strengthening during development (Kakegawa et al., *Neuron*, '15). Although C1qL1 is still abundantly expressed at CF synapses in adulthood, it remains unclear whether and how C1qL1 works in mature cerebellum. To address this issue, we first introduced recombinant C1qL1 into CF synapses in adult C1qL1-KO mice. Interestingly, exogenous C1qL1 completely rescued synaptic abnormalities observed in C1qL1-KO mice; retracted CF territories, impaired CF synaptic transmission, abrogated synaptic plasticity and impaired motor learning. Furthermore, microRNA-mediated C1qL1 deletion in adult WT mice induced C1qL1-KO mouse-like abnormalities, which were restored by microRNA-resistance form of C1qL1. These results demonstrated that C1qL1 is essential for the CF synapse maturation and maintenance throughout life. Because C1qL subfamily (C1qL1-4) is widely expressed at excitatory synapses in various brain regions, it may contribute to general mechanisms for synaptic integrity in the CNS.

研究目的

超高齢社会を迎えた我が国において、認知症や加齢に伴う記憶障害への対応は、喫緊の課題の1つである。記憶は脳内の神経細胞どうしをつなぐ「シナプス」に蓄積されると考えられているが、幼少期にいったん構築されたシナプス回路は、成熟期になっても尚、環境に応じてダイナミックに改変されることが最近になって分かってきた。そのため、成熟脳におけるシナプスが、どのような分子メカニズムを介して改変され、そして、維持されるのかを明らかにすることは、学術面ばかりでなく臨床面においてもきわめて重要な課題であり、社会的な要請に応えるものである。

近年、シナプスを制御する分子として、免疫系をささえる補体C1qやその機能ドメインを持つC1qフ

ァミリー分子が注目されている。例えば、補体C1qは正常発達や加齢、そして病的過程でのシナプス除去(刈り込み)にかかわることが報告されている(Stephan et al., *Annu Rev Neurosci*, '12)。また、私たちは、遺伝子欠損マウスの解析により、C1qファミリーに属するCbln1が、運動記憶を担う小脳の平行線維-プルキンエ細胞間シナプス(平行線維シナプス; Fig. 1)の形成と機能に関わることを報告した(Matsuda et al., *Science*, '10; Hirai et al., *Nat Neurosci*, '05)。Cbln1は、シナプス後部に発現するデルタ2型グルタミン酸受容体(GluD2)およびシナプス前部に発現する接着分子Neurexinと3者複合体を構築することでシナプス形成を誘導する免疫関連分子であることから、これまでに報告のないまったく新しいタイプの分泌性シナプス形成因子(シナプスオーガ



(本課題)

成熟期のシナプス改変・維持過程におけるC1qファミリー分子の役割？

(Fig. 1) Two major excitatory synaptic inputs to cerebellar Purkinje cells: parallel fiber synapse (PF synapse; blue) and climbing fiber synapse (CF synapse; green) and C1q-family molecules regulating cerebellar synapse integrity and motor learning (Cb1n1 and C1qL1). Cb1n1 is released from PF terminals to make these synapses. C1qL1, which is released from CF terminals, is essential for CF synaptic competition and strengthening during development. In this study, we examined the functional roles of C1qL1 in mature cerebellum.

ナイザー)として、現在精力的に研究されている (Yuzaki, *Curr Opin Neurobiol*, '17, '11; Yuzaki and Aricescu, *Trends Neurosci*, '17; Martinelli and Südhof, *Eur J Neurosci*, '11; Fig. 1)。

プルキンエ細胞は、平行線維に加えて、延髄下オリブ核から投射する登上線維により強い興奮性入力を受ける (登上線維シナプス; Figure 1)。登上線維は、運動学習時のエラー信号を、教師信号としてプルキンエ細胞に送ることで、小脳依存性運動記憶・学習の獲得に必須な役割を果たすと考えられている (Ito, *Physical Rev*, '01)。興味深いことに、私たちは最近、Cb1n1と同じC1qファミリーに属するC1q様分子1 (C1q-Like protein 1; 以下、C1qL1と略す)が、登上線維の起始核である延髄下オリブ核に選択的に発現し、登上線維終末から分泌されることで、同シナプスを成熟化させ、運動記憶を制御することを明らかにした (Kakegawa et al., *Neuron*, '15; Fig. 1)。さらに私たちは、登上線維終末から放出されるC1qL1がプルキンエ細胞に発現する脳特異的血管新生抑制

因子3 (brain-specific angiogenesis inhibitor 3; 以下、BAI3と略す)と選択的に結合することも明らかにした。これらの結果は、C1qL1-BAI3結合を介するシグナリングが、登上線維シナプスの成熟化および機能に重要な役割を果たしていることを示唆している (Kakegawa et al., *Neuron*, '15)。

上記の通り、Cb1n1やC1qL1といったC1qファミリー分子が脳内シナプスの形成や機能制御に重要であることは、私たちの研究を含め多くのグループによって支持されつつあるが、いったん神経回路が形成された成熟脳でのシナプス改変・維持過程において、C1qファミリー分子がどのように関与しているかについては、これまで行ってきた生まれつき遺伝子を欠く遺伝子欠損動物の解析では不明である。そこで本計画では、C1qL1分子が成熟期における登上線維シナプス機能および運動記憶学習をどのように制御しているかを解析し、その結果をもとに、C1qファミリー分子の普遍的かつ新しい動作原理の理解を深めることにした。

研究経過

まず、成熟期小脳の CF シナプスにおける C1qL1 の重要性を調べるため、成熟 C1qL1 欠損マウスの登上線維シナプスに外来性 C1qL1 を導入した。その結果、生後発達期に刈り込まれなかった過剰な登上線維が、成熟期においても刈り込まれ、最終的に1つのプルキンエ細胞に1本の登上線維線維が投射する、成熟した野生型マウスに特徴的な、いわゆる“1本支配”の投射様式を示した。また、C1qL1 の発現に伴い、1本の強い登上線維はより強化され、シナプス応答も増大した。すると、C1qL1 欠損マウスで観察されたシナプス可塑性障害や運動記憶・学習異常もほぼ完全に回復することが分かった。

次に、成熟期野生型マウスに発現する内在性 C1qL1 を、RNA 干渉法を用いて急性除去した。レンチウイルスベクターを駆使し C1qL1 除去用 microRNA を登上線維起始核ニューロンである下オリーブ核細胞に発現させると、感染細胞において、きわめて効率よく C1qL1 発現を抑えることができた。次に、C1qL1 を急性除去した細胞からの登上線維投射様式を形態学および電気生理学的に観察したところ、C1qL1 が除去された登上線維では、発達期にいったん形成されたシナプスがはずれ、同時に同線維の退縮も認められた。また、C1qL1 が急性除去されたマウスでは、シナプス可塑性に加え、運動記憶・学習が著しく障害された。さらに、C1qL1 除去された細胞に microRNA 耐性を有する C1qL1 を発現させると、その表現型が改善されたのに対し、BAI3 との結合能を欠いた変異型 C1qL1 を発現させた場合、表現型の回復は認められなかった。

考察

以上の所見から、登上線維シナプスは成熟期においてもダイナミックに改変され、その過程において C1qL1-BAI3 相互作用が重要な役割を担っていることが示唆された (論文投稿準備中)。興味深いことに、C1qL1 の類似分子 (C1qL2, C1qL3) は、小脳以外の脳領域に広く発現している。興味深いことに、私たちは近年、海馬顆粒細胞—CA3 シナプスに限局して発現する C1qL2 および C1qL3 が同シナプスに発現するカ

イニン酸型グルタミン酸受容体の局在様式を調節し、シナプス機能を制御していることを明らかにした (Matsuda et al., *Neuron*, '16)。また、C1qL サブファミリーは、Cbln1 と同様に、シナプス前部において Neurexin と結合しうることも *in vitro* 実験により示されている (Matsuda et al., *Neuron*, '16)。したがって、平行線維シナプスにおける Neurexin-Cbln1-GluD2 複合体と同様、登上線維シナプスにおいても C1qL1 が BAI3 および Neurexin と3者複合体を構築し、機能を制御している可能性が推察される。今後、これらの分子群が各脳領域における機能的神経回路の形成にどのように関与しているかについてより詳細に明らかにしていきたい。

参考文献

1. Hirai et al., *Nat Neurosci*, '05
2. Ito, *Physical Rev*, '01
3. Kakegawa et al., *Neuron*, '15
4. Martinelli and Südhof, *Eur J Neurosci*, '11
5. Matsuda et al., *Neuron*, '16
6. Matsuda et al., *Science*, '10
7. Stephan et al., *Annu Rev Neurosci*, '12
8. Yuzaki, *Curr Opin Neurobiol*, '17
9. Yuzaki, *Curr Opin Neurobiol*, '11
10. Yuzaki and Aricescu, *Trends Neurosci*, '17

研究の発表

口頭発表

1. 掛川 渉, 柚崎 通介: D-セリン—デルタ受容体シグナリングを介する新規グリア—ニューロン相互作用の解明. 文科省科学研究費補助金新学術領域 (グリアアセンブリ) 班会議 (東京) 2016年1月.
2. Kakegawa W: A novel D-serine signaling for synaptic plasticity and motor learning. 文科省科学研究費補助金新学術領域 (記憶ダイナミズム) 班会議 (静岡) 2016年6月.
3. 掛川 渉: シナプス分子群がもたらす運動記憶ダイナミズムの解明. 次世代脳プロジェクト・若手シンポジウム (東京) 2016年12月.
4. 鈴木 邦道, 掛川 渉, 三浦 会里子, エレグハート ジョナサン, クレイトン アンバー, アリセク エイ ラドゥー, 柚崎 通介: 新しいデザイナ

ーシナプスコネクターを用いたシナプス形成・可塑性の制御. 第94回日本生理学会大会 (静岡) 2017年3月.

誌上発表

1. 掛川 渉, 柚崎 通介: 「強きをたすけ弱きをくじく」ーシナプス刈り込みを担う新規 C1qI1 シグナリング. *実験医学* (羊土社) (2015) 33:1777-1780.
2. 掛川 渉, 柚崎 通介: GRAPHIC HOT PRESSーC1qI1: 脳内シナプスの形態と機能を制御する新しい分子. *細胞工学* (学研メディカル秀潤社) (2015) 34:692-693.
3. Matsuda K, Budisantoso T, Mitakidis N, Sugaya Y, Miura E, Kakegawa W, Yamasaki M, Konno K, Uchigashima M, Abe M, Watanabe I, Kano M, Watanabe M, Sakimura K, Aricescu AR, Yuzaki M: Trans-synaptic modulation of kainate receptor functions by C1q-like proteins. *Neuron* (2016) 90:752-767.
4. Elegheert J, Kakegawa W, Clay JE, Shanks N, Behiels E, Matsuda K, Kohda K, Miura E, Rossmann M, Mitakidis N, Motohashi J, Chang VT, Siebold C, Greger IH, Nakagawa T, Yuzaki M, Aricescu AR: Structural basis for integration of GluD receptors within synaptic organizer complexes. *Science* (2016) 353:295-299.
5. 掛川 渉, 柚崎 通介: Current Topicsーシナプスに架かる記憶への架け橋: NeurexinーCbln1ーGluD2 三者複合体構造. *実験医学* (羊土社) (2016) 34:3181-3184.
6. 掛川 渉, 松田 恵子, 柚崎 通介: 「補体ファミリー分子」とシナプス形成・維持. *Annual Review 神経 2016* (中外医学社) (2016) 35-43.
7. Kakegawa W, Yuzaki M: Physiological functions of D-serine mediated through $\delta 2$ glutamate receptors in the cerebellum. From *D-Amino Acids: Physiology, Metabolism, and Application*. Springer Books (2016).
8. Kohda K, Kakegawa W, Yuzaki M: Long-term depression (LTD). From *Essentials of Cerebellum and Cerebellar Disorders*. Springer Books (2016).
9. Wakayama S, Kiyonaka S, Arai I, Kakegawa W, Matsuda S, Ibata K, Nemoto YL, Kusumi A, Yuzaki M, Hamachi I: Chemical labelling for visualizing native AMPA receptors in live neurons. *Nature Communications* (2017) 8:14850 (open access).
10. 河野 まや, 掛川 渉, 柚崎 通介: 中枢神経の可塑性とは. 特集ーニューロリハビリテーションの進歩より *Clinical Neuroscience* (中外医学社) 35: 523-527.
11. 松田 恵子, 掛川 渉, 柚崎 通介: 脳神経機能における素過程・構造をコントロールする分子群ー17章 中枢神経系における分泌型シナプス形成因子. *脳の分子論* (東京化学同人社) 印刷中.