総説

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

植村 健^{1,*} ¹東京大学大学院医学系研究科薬理学・分子神経生物学 / *現 信州大学医学部分子細胞生理学

Formation of synaptic connections between nerve cells is the key to understanding neuronal development. Despite the wealth of in vitro information, fundamental questions regarding how synapses are formed in the mammalian brain remain unanswered. Glutamate receptor (GluR) $\delta 2$ selectively expressed in cerebellar Purkinje cells is essential for synaptic formation in vivo. We showed that the *trans*-synaptic interaction of postsynaptic GluR $\delta 2$ and presynaptic neurexins through secreted cerebellin precursor protein 1 (Cbln1) mediates cerebellar synapse formation. We also demonstrated that GluR $\delta 2$ triggers synapse formation by tetramerization of neurexins through Cbln1. These findings provide a molecular insight into the mechanism of synapse formation in the brain.

Glutamate receptor $\delta 2$ / cerebellum / synapse formation / *trans*-synaptic tripartite complex / Cbln1 / neurexin

1. はじめに

ヒトの脳には 1,000 億もの神経細胞が存在し、神経細胞同士が「シナプス」とよばれる接合部を作り連結し無数の神経ネットワークを形成することで、複雑かつ多様な脳高次機能を可能にしている。神経細胞と神経細胞の連結部であるシナプスは、神経細胞同士が情報を伝達する場であり、シナプスの機能的、構造的可塑性が記憶・学習の基盤となっていると考えられている。また、シナプス接合の成熟異常は知的障害、自閉症などの神経発達障害との関わりが強く示唆されている。したがって、分子レベルでシナプス機能を理解することは脳科学の主要課題の 1 つであり、多くの研究が積み重ねられてきた。その結果、シナプス伝達を担うグルタミン酸受容体 (GluR)、イオンチャネルやその膜裏打ちタンパク質であるシナプス後部肥厚部 (PSD) タンパク質群、シグナル分子が同定され、神経突起の伸長を制御する因子が明らかにされてきた。さらに今世紀に入って、脳の神経細胞同志の間にシナプスを形成し、それを維持する分子 (シナプスオーガナイザー) の探索が盛んに行われてきた。しかしながら、最も解析が進んでいた neurexin (NRXN)-neuroligin (NLGN) 系ですら、NLGN1-3 のトリプルノックアウトマウスにおいて脳シナプス形成に顕著な異常が認められなかったことから、脳のシナプス形成の分子機構は未解決のまま残されていた^{1), 2)}。

2. グルタミン酸受容体 GluR $\delta 2$

高等生物の脳における早い興奮性シナプス伝達の大部分はグルタミン酸を神経伝達物質としている。GluR は、グルタミン酸の結合により自身のカチオンチャネルを開くイオンチャネル型と、細胞内情報伝達系を介して機能する代謝型に大別されており、脳における情報伝達の中心的役割を果たしている。GluR チャネルはアゴニストに対する応答性の違いから NMDA 型、AMPA 型、カイニン酸型に分類される。GluR δ /GluD ファミリーは cDNA 配列の相同性を利用したスクリーニングによりはじめて見いだされた受容体でアミノ酸配列の相同性からは NMDA 型、非 NMDA (AMPA/カイニン酸) 型サブユニットの中間に位置づけられ、GluR $\delta 1$ と GluR $\delta 2$ の 2 種類の遺伝子が存在している³⁾。

GluR $\delta 2$ は小脳プルキニエ細胞に特異的に発現し、プルキニエ細胞の平行線維シナプスに局在する分子である。GluR $\delta 2$ はその特徴的な発現分布から小脳の機能に重要な役割を果たしていると考えられる。実際、GluR $\delta 2$ ノックアウトマウスは重篤な運動失調を示し、平行線維-プルキニエ細胞間シナプスのシナプス可塑性である長期抑圧 (LTD; Long Term Depression) が障害され、小脳依存的な運動学習が障害される。また、野生型マウスのプルキニエ細胞は、出生直後は複数の登上線維による多重支配を受けているが、発達につれて過剰な登上線維が除去され、生後 3 週間で 1 本の登上線維による単一支配に変化する。ところが、GluR $\delta 2$ ノックアウトマウスでは登上線維の多重支配が成体マ

Molecular Mechanism of Synapse Formation by Synaptic Organizer

Takeshi UEMURA

¹Department of Molecular Neurobiology and Pharmacology, Graduate School of Medicine, The University of Tokyo

Present Address: *Department of Molecular and Cellular Physiology, Shinshu University School of Medicine

※図 1- 図 4 は、電子ジャーナル (<https://www.jstage.jst.go.jp/browse/biophys-char/ja/>) ではカラー版を掲載しています。

ウスでも残存しており、本来ならプルキニエ細胞の近位樹状突起に局限されている登上線維の投射領域が、遠位樹状突起にまで拡大している。さらに、電子顕微鏡を用いた解析は、平行線維-プルキニエ細胞間シナプスの数が約半分まで減少し、平行線維終末とのシナプス結合を持たないプルキニエ細胞のスパイン（フリースパイン）が多数出現することを示している⁴⁾。また、誘導可能な小脳プルキニエ細胞特異的遺伝子組換え法を用いて成体マウスで GluRδ2 を欠損させてもフリースパインが観察される。さらに、シナプス結合を有している平行線維-プルキニエ細胞間シナプスの中には、プルキニエ細胞スパインのシナプス後膜肥厚部が平行線維終末のアクティブゾーンよりも長くなるといったシナプスの構造異常がしばしば観察される⁵⁾。これらの結果は、GluRδ2 がシナプス形成・維持に重要な役割を果たしている分子であることを示している。しかしながら、GluRδ2 がシナプス形成を調節する分子機構はこれまでまったく不明であった。

3. タンパク質相互作用を介したシナプス可塑性、シナプス形成の制御

GluRδ2 はアミノ酸配列の相同性からはイオンチャネル型 GluR に分類されており、他のイオンチャネル型 GluR と共通する膜トポロジーを有している。すなわち、4カ所の推定膜貫通領域 (M1-M4)、大腸菌ペリプラスミック結合タンパク質 LIVBP (leucine/isoleucine/valine-binding protein) と弱いアミノ酸相同性を持つ最も N 末端の領域 N-terminal domain (NTD)、2つの領域からなる LAOBP (lysine/arginine/ornithine-binding protein)-like ドメインおよび細胞内 C 末端領域を有している (図 1)。しかしながら、これまでに GluRδ2 がイオンチャネル活性を示すとの報告は無く、グルタミン酸の結合能も報告されていない。したがって、GluRδ2 が果たす多様な生理機能がどのように調節されているかは長年不明であった。

そこで、GluRδ2 の多様な生理機能が GluRδ2 のどの領域を介して調節されているか明らかにするために、PSD-93、PTPMEG、Delphilin 等の PSD の足場タンパクが結合する最も C 末端の領域 (T site) を欠損させた遺伝子改変マウスを作製し解析した。その結果、GluRδ2 の C 末端領域は LTD 誘導と登上線維支配領域調整に必須であるが、幼弱期に見られる余剰な登上線維の除去過程には必須でないことが明らかになった。また、この遺伝子改変マウスにおいては平行線維-プルキニエ細胞間シナプス構造にはまったく異常が観察されなかったことは、GluRδ2 は C 末端細胞質内領域を介して間接的に小脳シナプス形成を調節しているのではなく、小脳シナプス形成を調節する領域が他に存

図 1

GluRδ2 の構造と機能ドメイン。C 末端細胞質内領域には膜局在に重要な役割を果たしている領域で PICK1 が結合する juxtamembrane segment (J)、後シナプス肥厚部の足場タンパク Shank が結合する領域 S segment (S)、Delphilin 等が結合する最も C 末端に位置する領域である T site (T) が存在する。(詳細は本文参照)

在することを示唆している⁶⁾。そこで次に、GluRδ2 が直接小脳シナプス形成を調節しているかどうかを検証した。通常は神経細胞とシナプスを形成しない非神経細胞であるヒト胎児腎臓由来の HEK293T 細胞に GluRδ2 を発現させ、小脳の顆粒細胞と共に培養すると、HEK293T 細胞上にシナプス前部構造が集積することことから、GluRδ2 は直接シナプス前部の分化を誘導する活性を有することが明らかとなった。さらに、GluRδ2 は NTD を介してシナプス前部の分化誘導を引き起こすことが明らかとなり⁷⁻⁹⁾、GluRδ2 がタンパク質相互作用を介してシナプス形成とシナプス可塑性を共に制御する分子であることがわかった。

4. GluRδ2-Cbln1-NRXN 三者複合体によるシナプス形成の制御

GluRδ2 は NTD を介してシナプス前部に存在する分子と結合することによりシナプス前部の分化誘導を引き起こすことが明らかとなったことから、GluRδ2 の NTD に結合するシナプス前部に存在する分子のスクリーニングを行った。その結果、GluRδ2 が分泌タンパク質 Cbln1 の存在下でシナプス前部の Neurexin (NRXN) と結合することを見いだした¹⁰⁾。Cbln1 は Clq/TNF スーパーファミリーに属するタンパク質で、小脳では顆粒細胞から分泌されること、また、Cbln1 ノックアウトマウスは、平行線維-プルキニエ細胞シナプスがほとんど形成されず、小脳 LTD が障害され重篤な運動失調を示すことが報告されている¹¹⁾。一方、NRXN はシナプス前終末に存在する細胞接着分子で NRXN1-3 の 3つの遺伝子が存在し、単一の遺伝

図 2
GluRδ2-Cbln1-Neurexin 三者複合体による小脳シナプス形成の分子機構モデル。文献 10, 12 より改変。

子から異なるプロモーターを用いて遺伝子産物が作られることで、 α と β という2つのアイソフォームが存在し、シナプス後部の細胞接着分子 NLGN と結合することが知られている¹⁾。その後の解析から、GluRδ2 と NRXN はそれぞれ Cbln1 の受容体であることが示され、GluRδ2 は Cbln1 を介して NRXN と結合することで三者複合体を形成し平行線維-プルキニエ細胞間のシナプス形成を担っていることが明らかになった¹⁰⁾。

次に、GluRδ2-Cbln1-NRXN によるシナプス形成の制御機構を明らかにするために三者複合体の化学量論的解析を行った。その結果、GluRδ2-NTD (dimer) と Cbln1 (hexamer) は 1:1 の化学量論比の複合体を、Cbln1 (hexamer) と NRXN1 β (monomer) は 1:2 の化学量論比の複合体を形成していることが明らかとなった。GluRδ2 は細胞膜上では 4 量体で存在していることから、GluRδ2, Cbln1, NRXN1 β は 1:2:4 の化学量論比の複合体を形成していることが示唆された。さらに、培養神経細胞を用いた実験により、GluRδ2 は Cbln1 を介して NRXN を 4 量体化することによりシナプス前部の分化誘導を引き起こすことが明らかになった。NRXN の 2 量体化だけではシナプス前部の分化誘導は引き起こされないことと、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 4 量体化した NRXN の細胞質内のみ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推察される¹²⁾ (図 2)。

5. 構造と認識機構

NRXN には 5 カ所の splice segment (S1-S5) が存在し、数多くのスプライスバリエントが作り出されることが知られており、特に S4 の有無によりシナプス後部に存在する細胞接着分子との相互作用が調節されている。

NLGN と NRXN の相互作用の強さは NRXN の S4 の有無によって調節されており、シナプス後部の細胞接着分子 leucine-rich repeat transmembrane protein (LRRTM) は S4 を欠いている NRXN とのみ結合することができる^{1), 13), 14)}。一方、Cbln1 は S4 を有する NRXN とのみ特異的に結合し、GluRδ2 と三者複合体を形成することができる^{10), 15)} (図 3)。そこで、S4 を有する NRXN と Cbln1 の相互作用に重要なアミノ酸残基を調べるために既に、報告されている NRXN 1 β の結晶構造のデータを参考に、NRXN1 β にアラニン置換変異を導入し Cbln1 との結合能を解析した。その結果、Arg218 または Trp226 に変異を導入することで Cbln1 との結合能が著しく低下することが明らかになった。これらのアミノ酸残基は共に S4 を構成している β シート構造の側面に位置しており、NRXN 1 β と NLGN の結合面からは離れたところに位置していた¹²⁾ (図 4)。

Cbln1 は Cbln ファミリーに属するタンパク質で Cbln1, 2, 3, 4 が脳に存在している。Cbln ファミリーと NRXN との相互作用を生化学的に解析した結果、Cbln1 は NRXN に対して高い親和性を示した^{10), 15)}。一方、Cbln4 は Cbln1 と 73.6% のアミノ酸配列の同一性を有しているが、NRXN とは非常に弱い相互作用し検出されなかった^{12), 15)}。同様に、Cbln4 は GluRδ2 に対しても非常に弱い相互作用しか示さなかった¹²⁾。そこで、Cbln1 と Cbln4 のアミノ酸配列と 3 次元立体構造モデルを元に Cbln1 にアミノ酸点変異を導入し、受容体との相互作用に与える影響を調べたところ、Trp136 を Lys に置換した変異体では GluRδ2 との結合能が著しく低下していた。一方、この変異体は NRXN との結合能にはほとんど影響を与えなかった。さらに、Cbln1 の C1q ドメインの N 末端近くに位置するアミノ酸残基 SGSA₅₇₋₆₀ を対応する Cbln4 のアミノ酸残

図 3
NRXN のスプライスバリエントと結合分子。

図 4 (a) Neurexin1β の結晶構造。矢印は neuroligin との結合面を示している。(b) Cbln1, Cbln4 の C1q ドメインの 1 量体および 3 量体の 3 次元立体構造モデル (c) 6 量体の Cbln1 の 3 次元立体構造モデル。文献 12 より改変。

基 AANS に置換した変異体では, NRXN との結合が著しく低下したが, GluRδ2 との結合能にはほとんど影響を与えなかった¹²⁾ (図 4)。これらの結果は, GluRδ2 と NRXN は Cbln1 の異なった部位に結合し三者複合体を形成しているモデル (図 2) を支持している。

Cbln1 は通常 6 量体を形成して分泌されている。この 6 量体構造は N 末端側に存在する 2 つのシステイン残基に依存しており, このシステイン残基変異体は 3 量体であって 6 量体を形成せず, NRXN および GluRδ2 への結合能を欠如している^{10), 16)}。これらの結果から, 6 量体が形成されてはじめて構築される構造物が NRXN および GluRδ2 との結合に関与していることが想定されるが, その詳細については今のところ不明である。

6. 今後の展望

近年の研究の進展により, 小脳シナプス形成を担う GluRδ2-Cbln1-NRXN 複合体に加え, IL1RAPL1-PTPδ¹⁷⁾, TrkC-PTPσ¹⁸⁾, Slitrk3-PTPδ¹⁹⁾ 複合体など, 脳のシナプス形成を担うシナプスオーガナイザーの存在が徐々に明らかになってきた。興味深いことに, この膜タンパ

ク質受容体型チロシン脱リン酸化酵素 PTP には NRXN と同じく多様なスプライシングバリエーションが存在することが知られており, NRXN における S4 と同様にスプライスバリエーションにより結合分子との相互作用の特異性が調節されている¹⁷⁾。これら最新の知見を考え合わせると, 分子の多様性に加えスプライスバリエーションの多様性が特定の神経細胞間のシナプス結合の特異性を決定し, 複雑かつ秩序だった神経ネットワークの形成に寄与していることが推察される。今後, これらの個々の神経細胞の種類における発現パターンを解析し, シナプスオーガナイザーの構造基盤を明らかにしていくことで, シナプス結合の特異性決定のメカニズムが明らかになっていくものと期待される。

今回, GluRδ2 が Cbln1 を介して NRXN を 4 量体化することによりシナプス前部の分化誘導を引き起こすことを明らかにしたが, どのようなシグナルを細胞内へ伝えることでシナプスが形成されるかは依然として不明である。シナプス形成を担うシナプスオーガナイザーの下流シグナルについては依然として謎が多いが, 本研究を通じてシナプス形成を担う受容体の細胞内シグナル伝達機構を明らかにしていくことで, 脳シナプス形成の普遍的な分子基盤を導き出せるのではないかと考えている。

文 献

- 1) Südhof, T. C. (2008) *Nature* **455**, 903-911.
- 2) Varoqueaux, T. *et al.* (2006) *Neuron* **51**, 741-754.
- 3) Araki, K. *et al.* (1993) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **197**, 1267-1276.
- 4) Mori, H., Mishina, M. (2003) *Life Sciences* **74**, 329-336.
- 5) Takeuchi, T. *et al.* (2005) *J. Neurosci.* **25**, 2146-2156.
- 6) Uemura, T. *et al.* (2007) *J. Neurosci.* **27**, 12096-12108.
- 7) Uemura, T., Mishina, M. (2008) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **377**, 1315-1319.
- 8) Kakegawa, W. *et al.* (2009) *J. Neurosci.* **29**, 5738-5748.
- 9) Kuroyanagi, T. *et al.* (2009) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **106**, 4912-4916.
- 10) Uemura, T. *et al.* (2010) *Cell* **141**, 1068-1079.
- 11) Hirai, H. *et al.* (2005) *Nat. Neurosci.* **8**, 1534-1541.
- 12) Lee, S. J. *et al.* (2012) *J. Neurosci.* **32**, 4688-4701.
- 13) Ko, J. *et al.* (2009) *Neuron* **64**, 791-798.
- 14) de Wit, J. *et al.* (2009) *Neuron* **64**, 799-806.
- 15) Joo, J. Y. *et al.* (2011) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **406**, 627-632.
- 16) Matsuda, K. *et al.* (2010) *Science* **328**, 363-368.
- 17) Yoshida, T. *et al.* (2011) *J. Neurosci.* **31**, 13485-13499.
- 18) Takahashi, H. *et al.* (2011) *Neuron* **69**, 287-303.
- 19) Takahashi, H. *et al.* (2012) *Nat. Neurosci.* **15**, 389-398.

植村 健

植村 健 (うえむら たけし)

東京大学大学院医学系研究科・助教 (現・信州大学医学部分子細胞生理学・講師)

2003 年東京大学大学院医学系研究科修了, 博士 (医学), 03-04 年同 COE 特任研究員, 05-06 年同助手, 07 年助教, 13 年より現職。

研究内容: 脳シナプス形成の分子基盤

連絡先: 〒390-8621 長野県松本市旭 3-1-1

E-mail: tuemura@shinshu-u.ac.jp