

Cbln1ーデルタ2グルタミン酸受容体シグナリングは
いかにシナプス形成・維持とシナプス可塑性を
制御しているか？



幸田 和久
聖マリアンナ医科大学生理学教室

デルタ2グルタミン酸受容体とは？

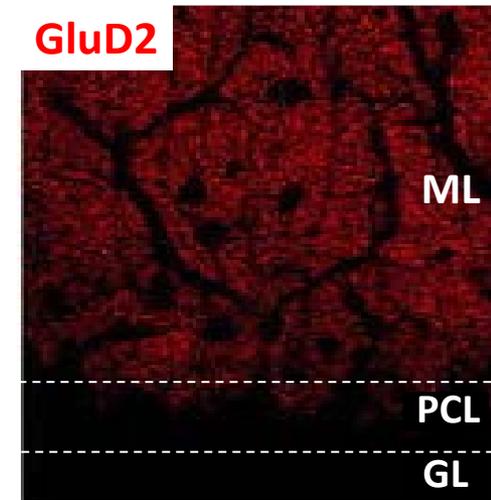
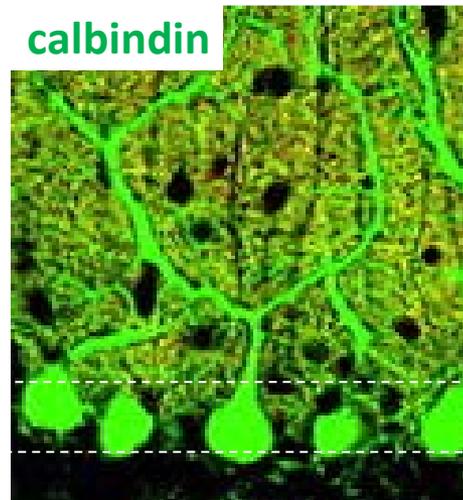
グルタミン酸受容体

イオンチャンネル型 (ionotropic)	AMPA・KA型 NMDA型 δ型 (GluD)	GluR1-4 / GluR5,6 KA1,2 NR1, NR2A-D, NR3A,B δ1, δ2
代謝型 (metabotropic)	Group I Group II Group III	mGluR1, 5 mGluR2, 3 mGluR4, 6, 7, 8

GluD2は・・・

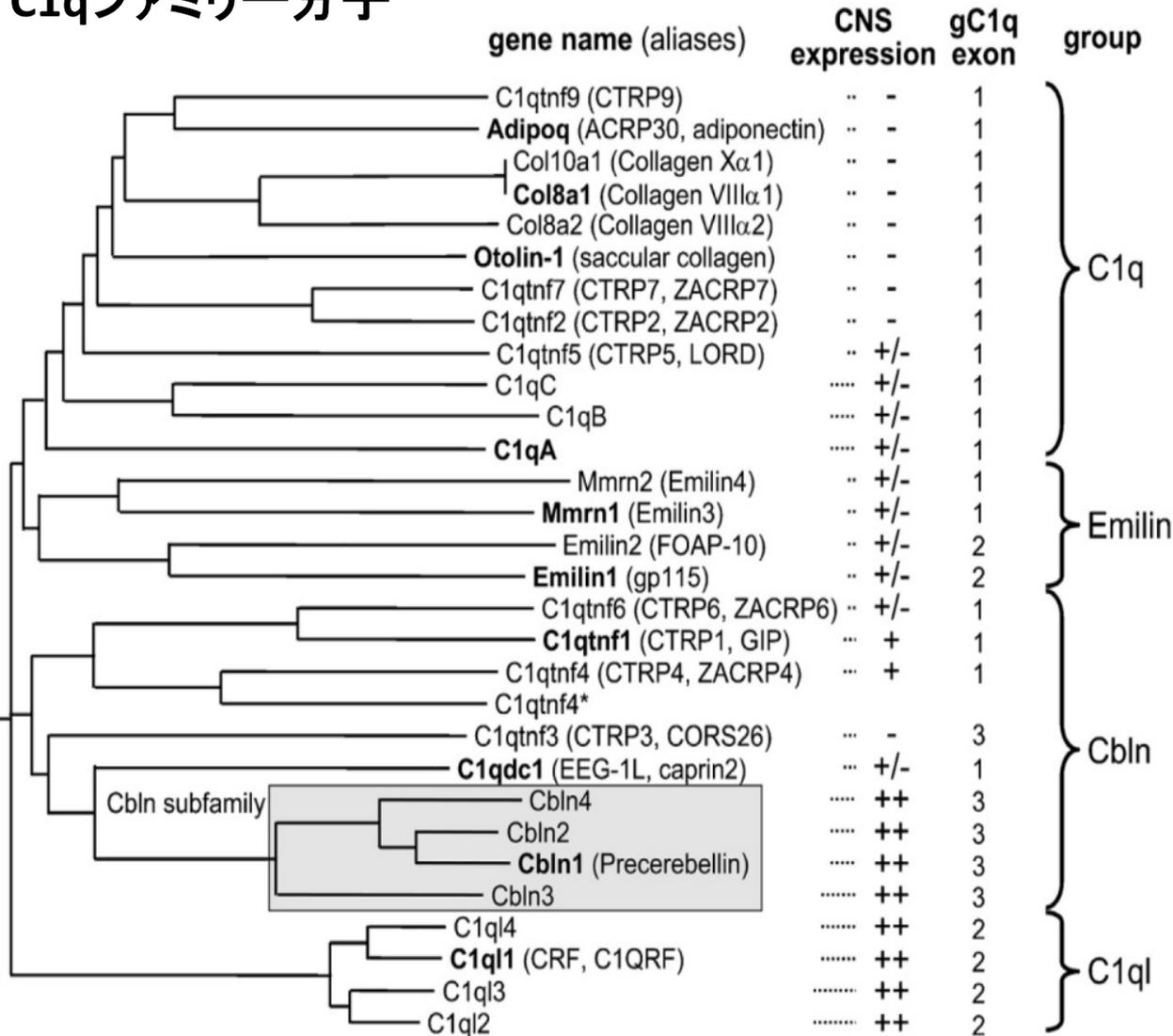
- ・ 小脳プルキンエ細胞にほぼ特異的に発現。
- ・ グルタミン酸や類似アミノ酸でイオンチャンネル活性が見られない。
- ・ グルタミン酸や類似アミノ酸が結合しない。

GluD2はorphan receptorである



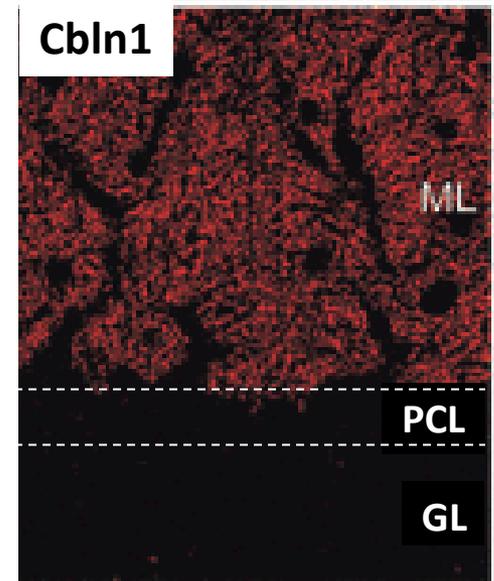
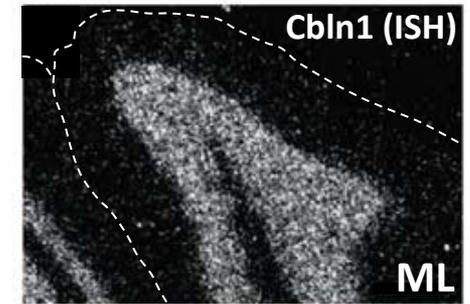
Cbln1とは？

C1qファミリー分子

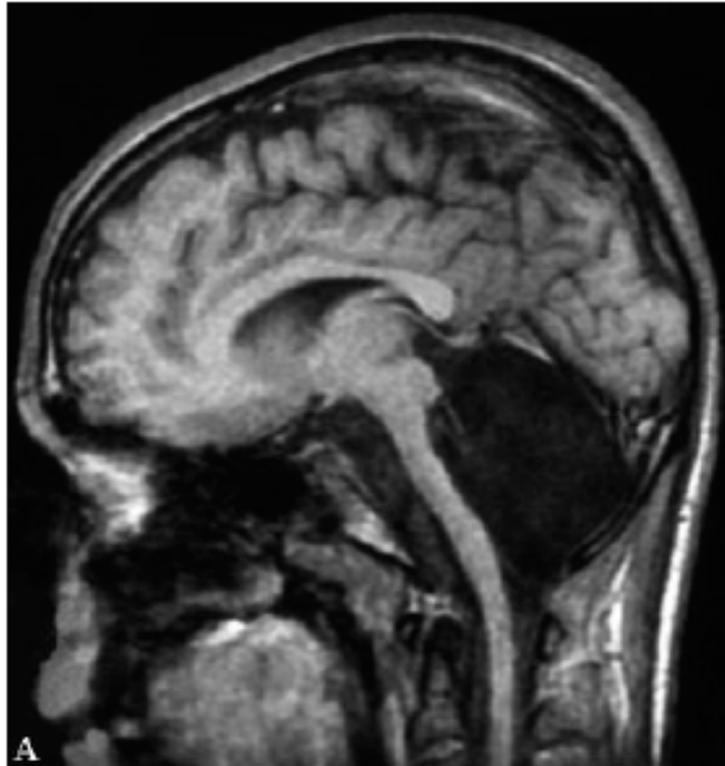


Cbln1

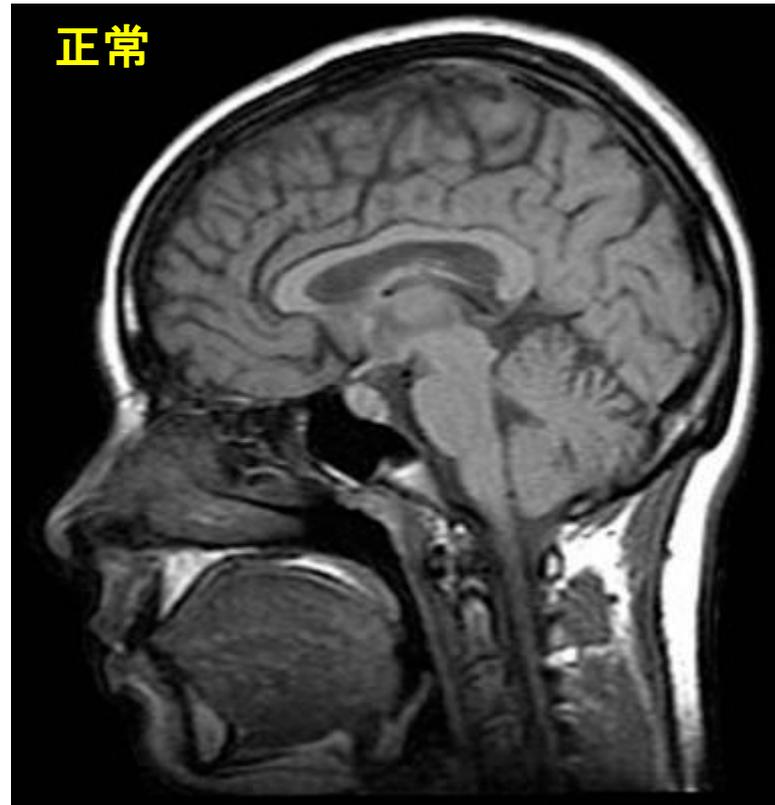
顆粒細胞に発現する
機能不明の分泌タンパク質



どこが異常でしょう？



Neurology 2005

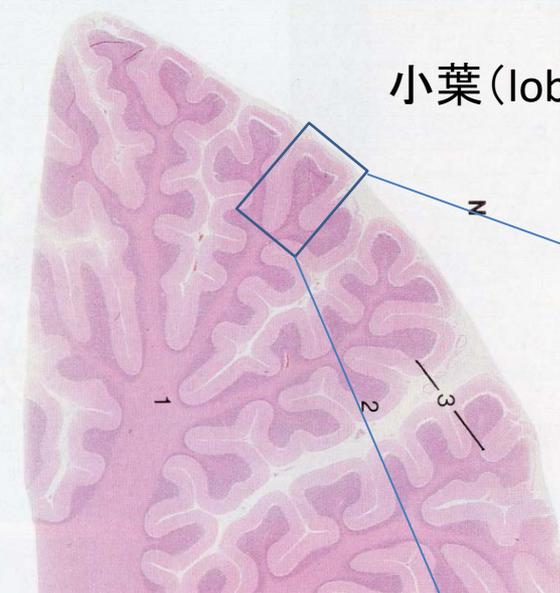
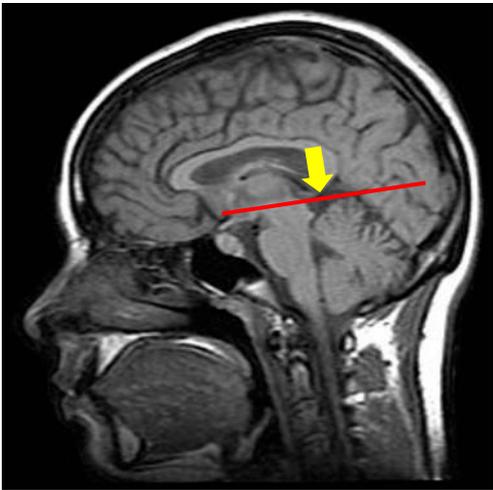


A 17-year-old boy

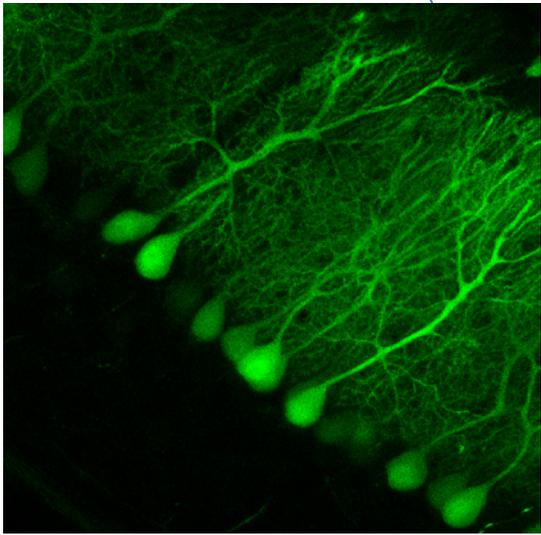
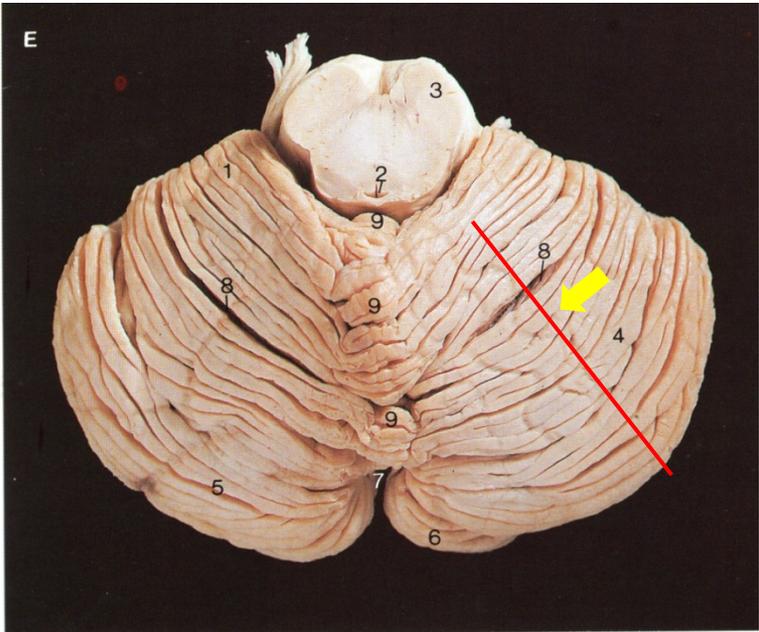
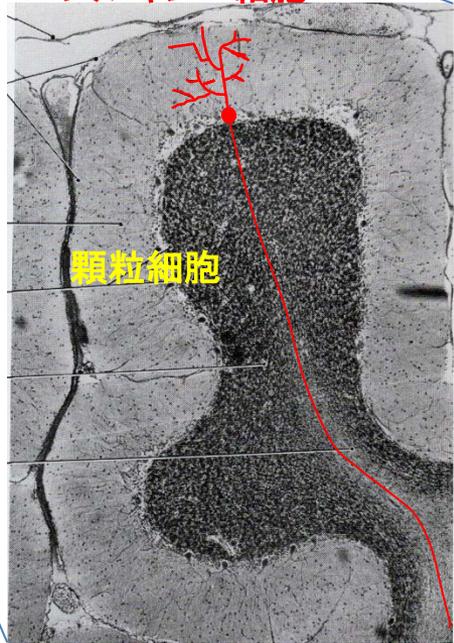
Moderate ataxia, mild dysmetria, no nystagmus, mild mental retardation

Attends a normal school, to which he gets by bicycle

小脳の解剖

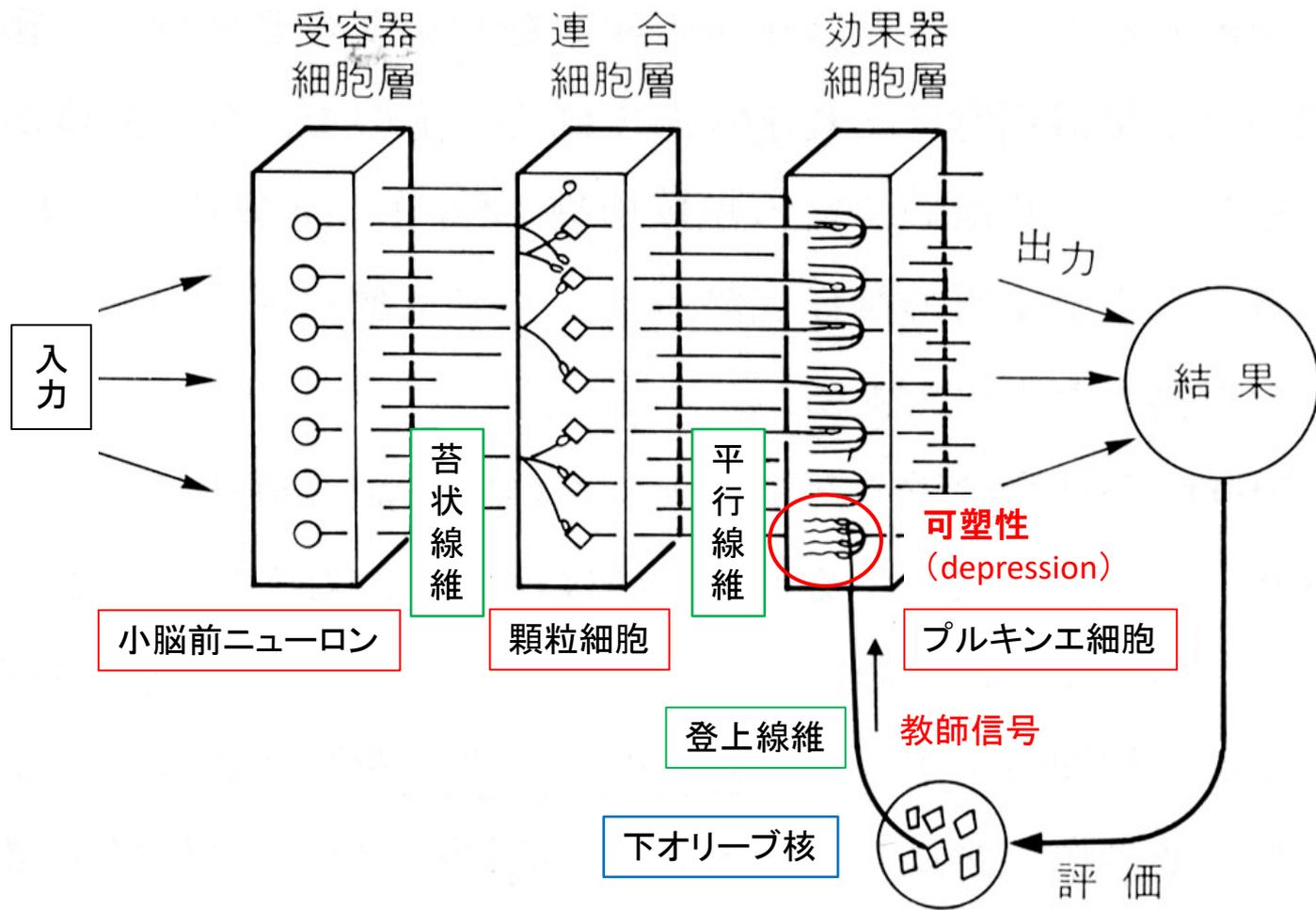
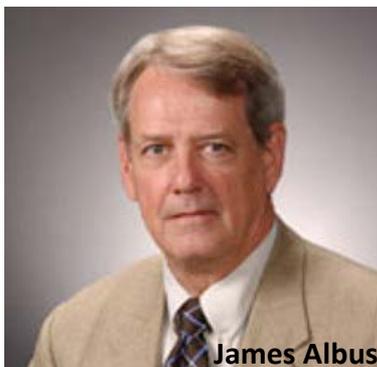


プルキンエ細胞



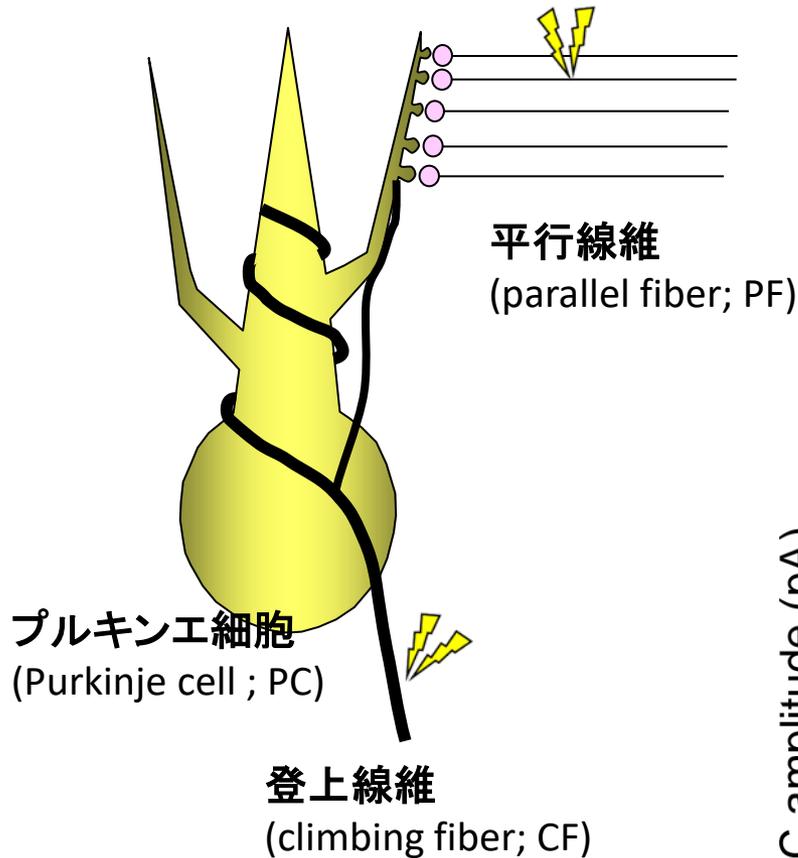
Marr-Albus-Ito (MAIT) モデル

Marr (1969), Albus (1971) がモデルを提唱



(伊藤正男 脳の設計図)

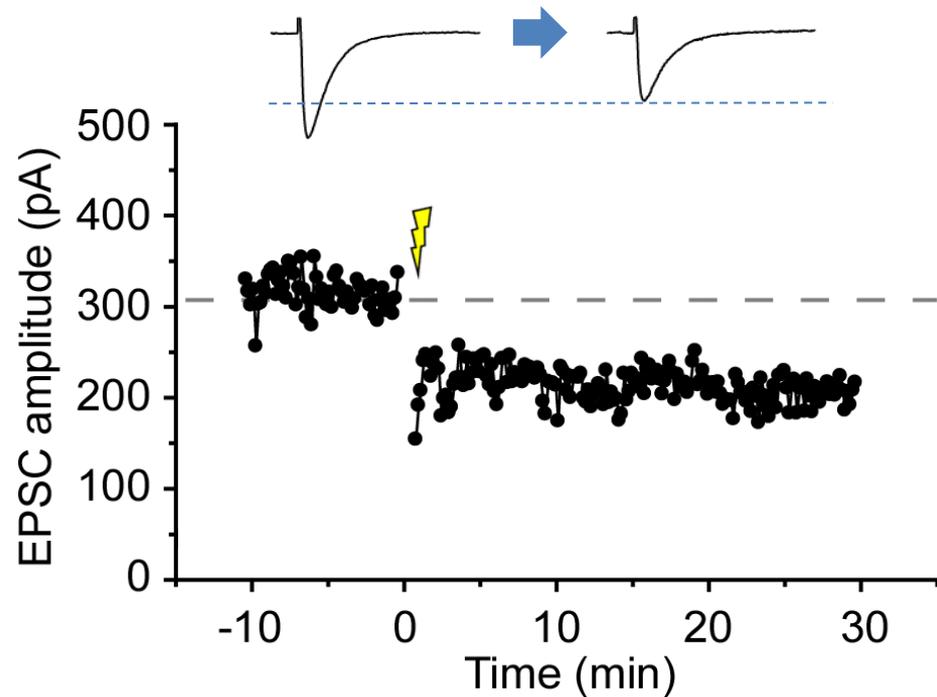
LTDの誘導



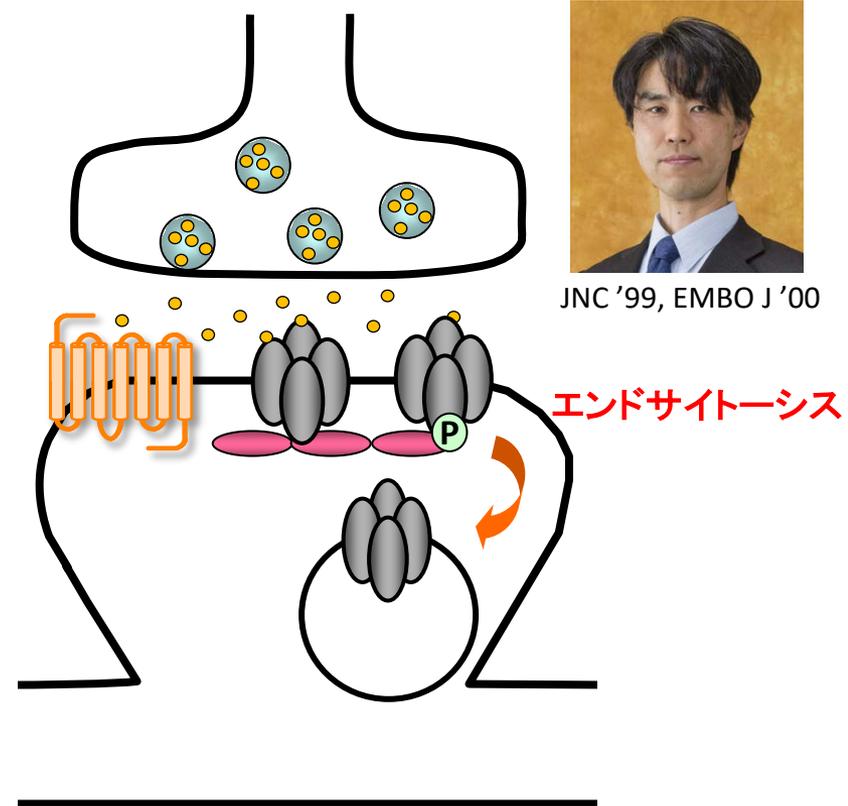
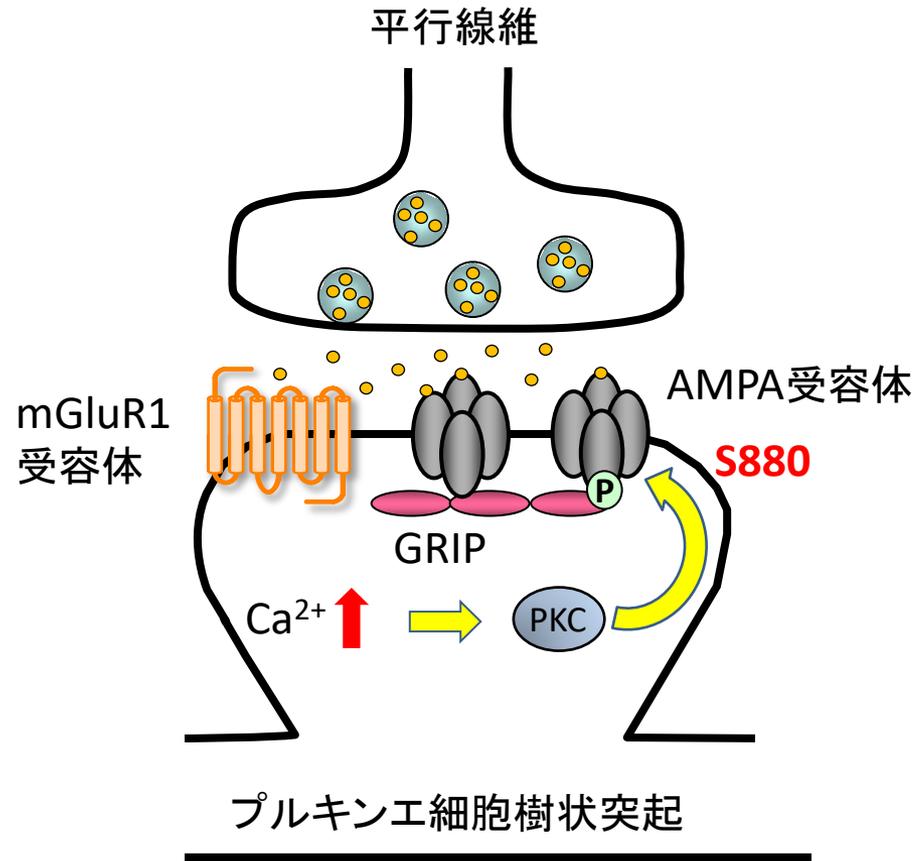
平行線維と登上線維の**同時入力**



平行線維－プルキンエ細胞シナプスの伝達効率が低下



LTDの実体はシナプス表面のAMPA受容体の数の減少



JNC '99, EMBO J '00

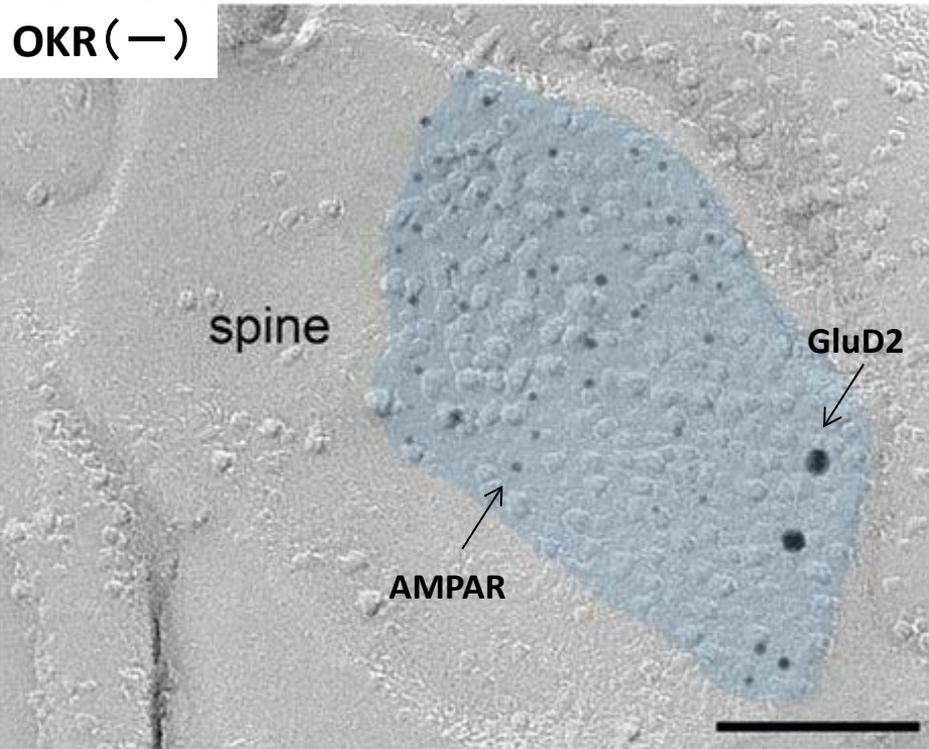
プルキンエ細胞の
応答



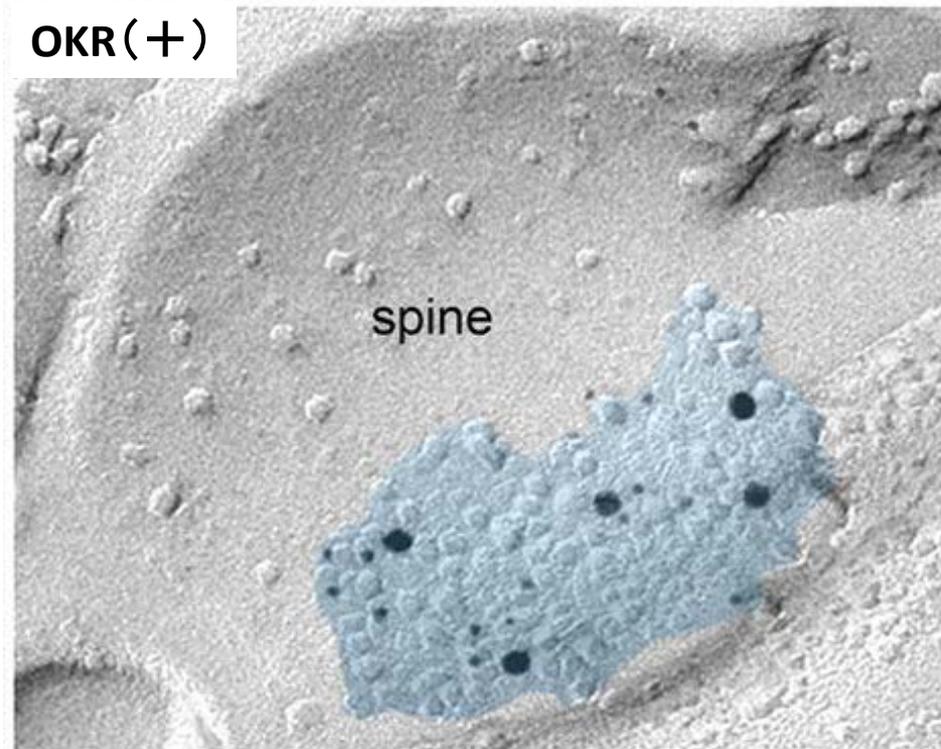
LTDの実体はAMPA受容体の数の減少(2)

視運動反応 (optokinetic response) のadaptationによって、
平行線維－プルキンエ細胞シナプスのAMPAの数が減少する

OKR(-)



OKR(+)



GluD2はシナプス形成とシナプス可塑性に関与

GluD2をノックアウトすると・・・

(Kashiwabuchi et al. Cell '95)

機能的異常

F1. 平行線維(PF)-プルキンエ細胞(PC)間シナプスのLTDの障害

形態的異常

M1. シナプス前成分を伴わないPCの神経棘(spine) → **naked spines (free spines)**

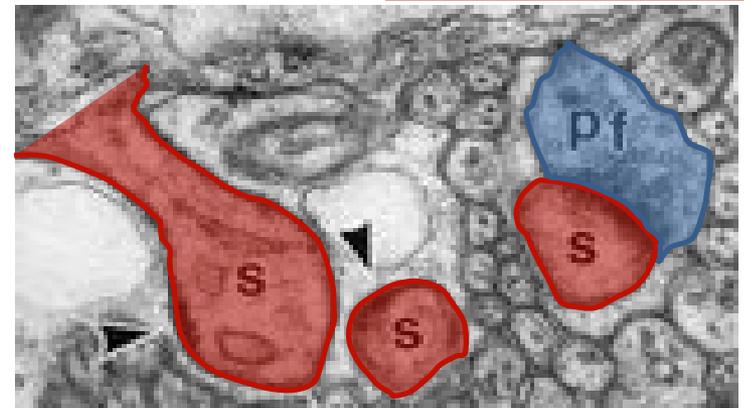
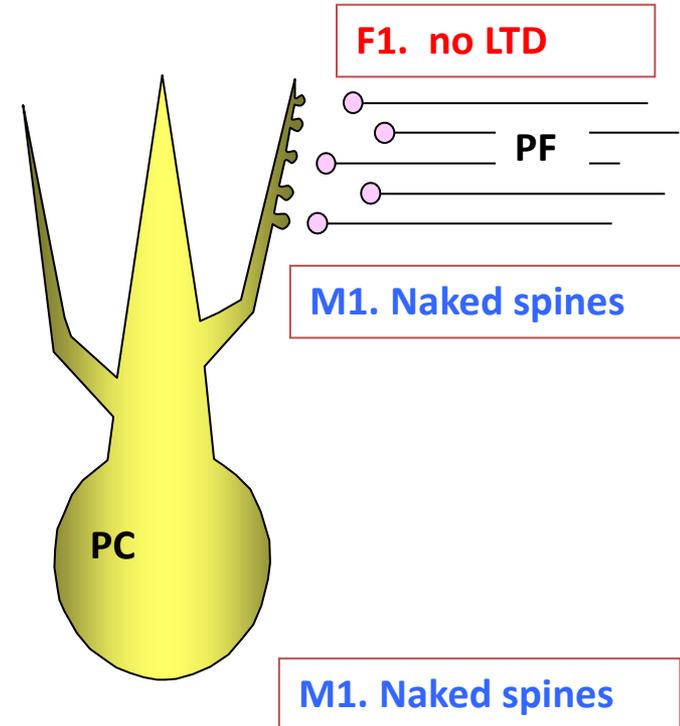
行動学的異常

B1. 運動失調

B2. 小脳依存性学習の障害
(瞬目条件付け、前庭動眼反射など)

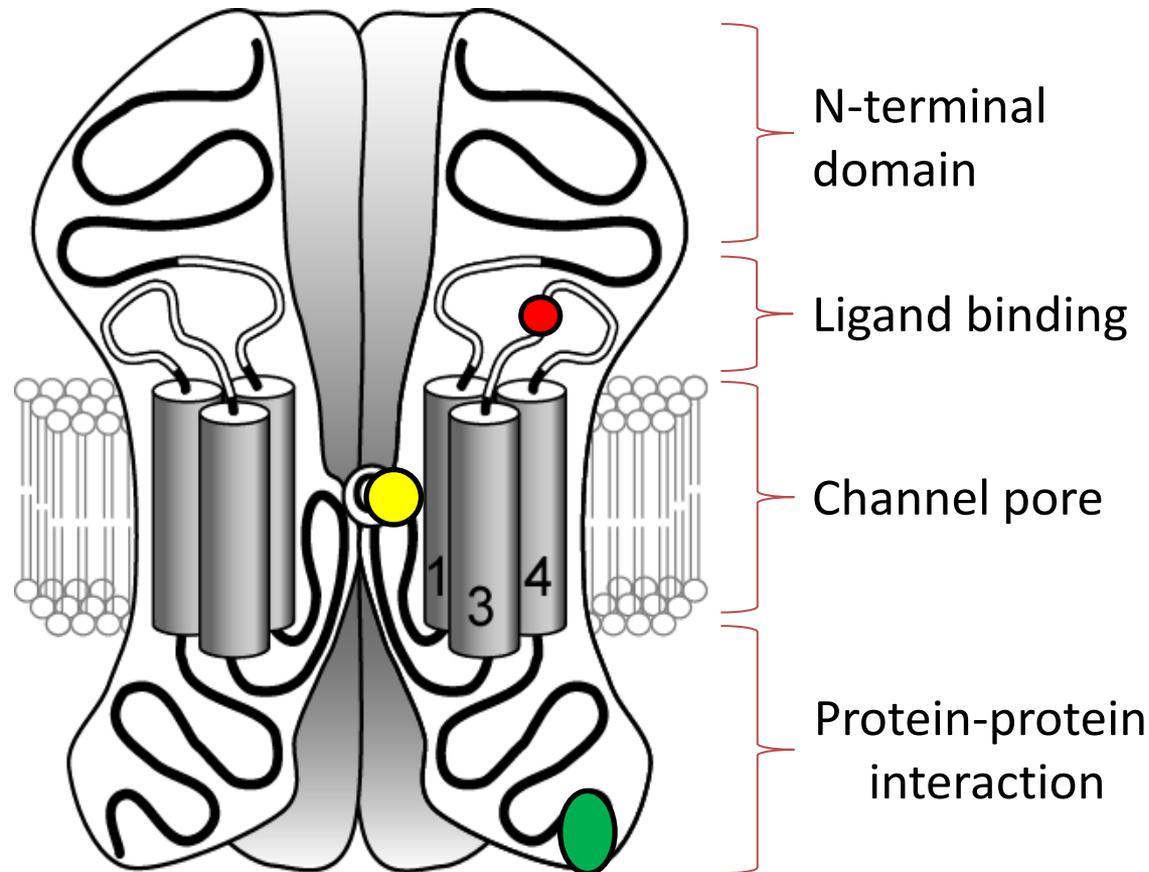
Cbln1KOの表現型もほぼ同じ

GluD2, Cbln1はどのように機能するか？



表現型回復実験

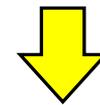
グルタミン酸受容体の 機能的モジュール



GluD2KOマウスのPC
X

GluD2^{mutant} の
トランスジーン

(トランスジェニックマウス、ウイルスベクター)



GluD2KOマウスの異常表現型

- (1) LTDの障害
- (2) シナプス形成の障害
- (3) 運動失調、運動学習の障害

回復するか？

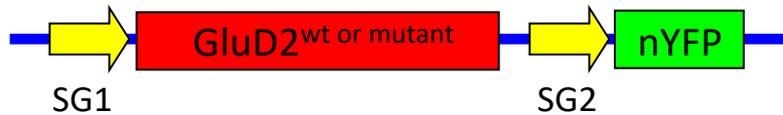
表現型回復実験(2)

トランスジェニックマウスの作成

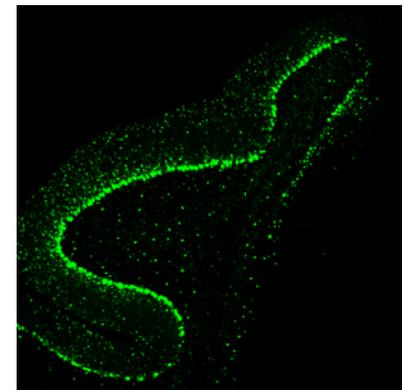


KOバックグラウンド
WT vs mutant

シンドビスウイルスベクターを用いた遺伝子の導入

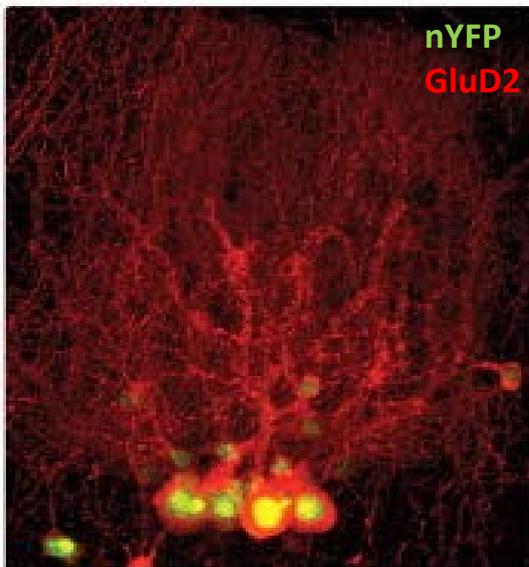
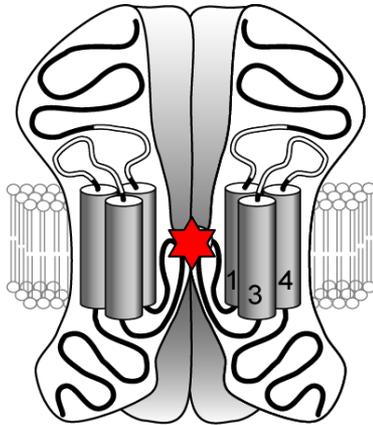


GluD2欠損マウスのプルキンエ細胞へ
GluD2の**変異体**を導入

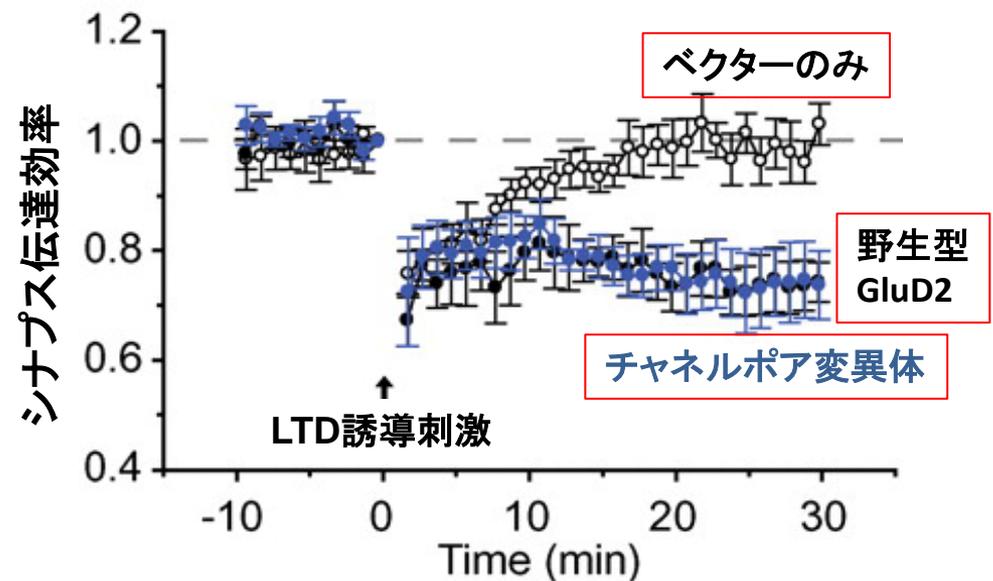


チャンネルポア変異体はLTDを回復させた

GluD2
チャンネルポア変異体



GluD2欠損マウスのプルキンエ細胞へ
GluD2のチャンネルポア変異体を導入

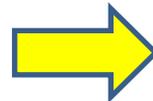


チャンネルポア変異体は失調歩行を回復させた



- ・チャンネルポア変異体
- ・nYFPのみ

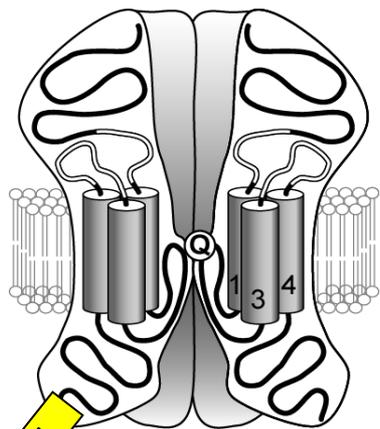
GluD2のチャンネルポア変異体は、
LTDを回復
運動障害を回復



GluD2はチャンネルとして機能していない

GluD2 Δ CT7 の導入によって、LTDは回復しなかった

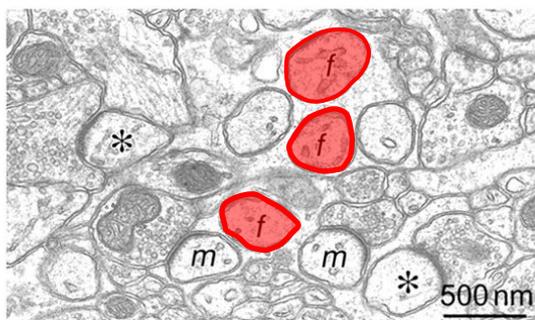
GluD2 Δ CT7



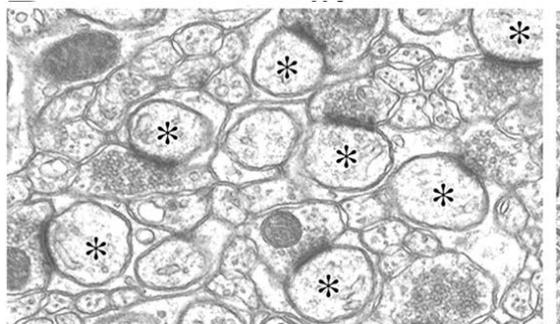
PDZタンパク質

delphinin
PTPMEG
PSD93
S-SCAM
nPIST
...

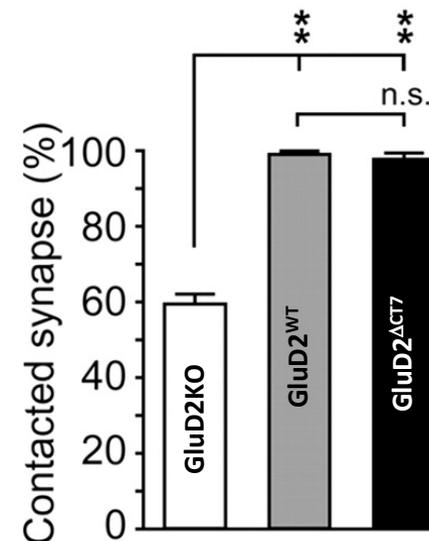
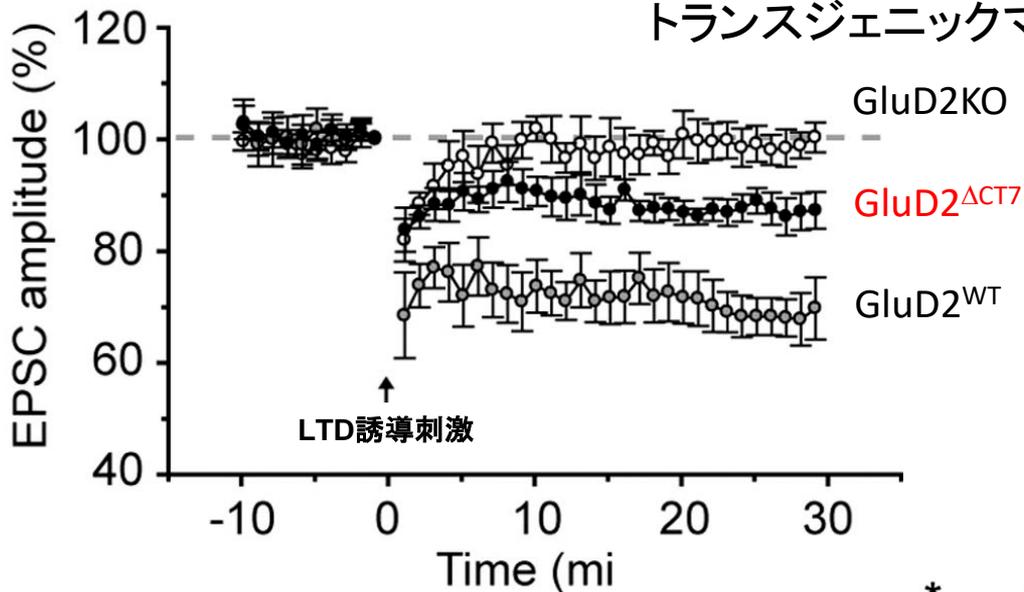
GluD2KO



GluD2^{WT}

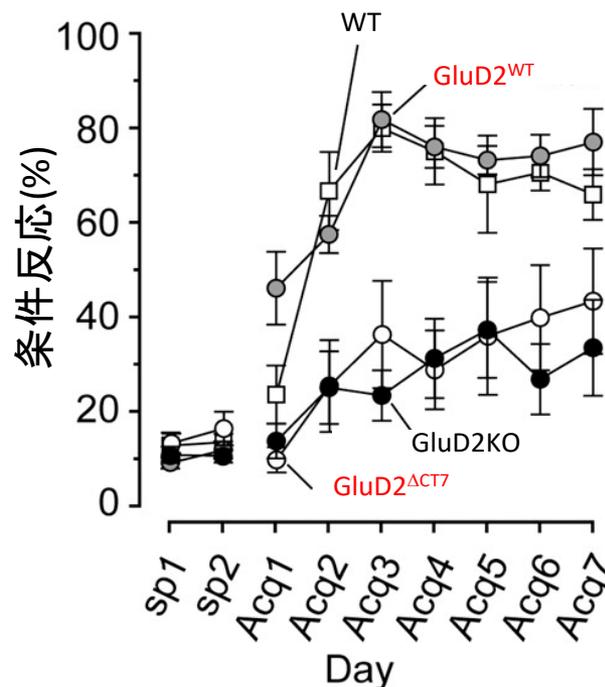


トランスジェニックマウス



GluD2^{ΔCT7} の導入によって、LTDは回復しなかった

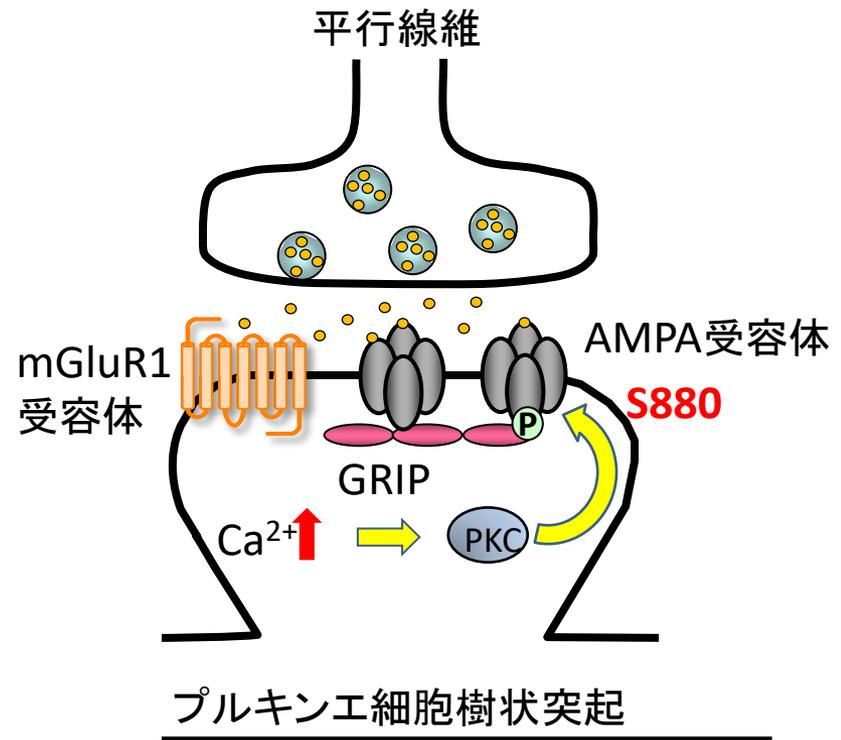
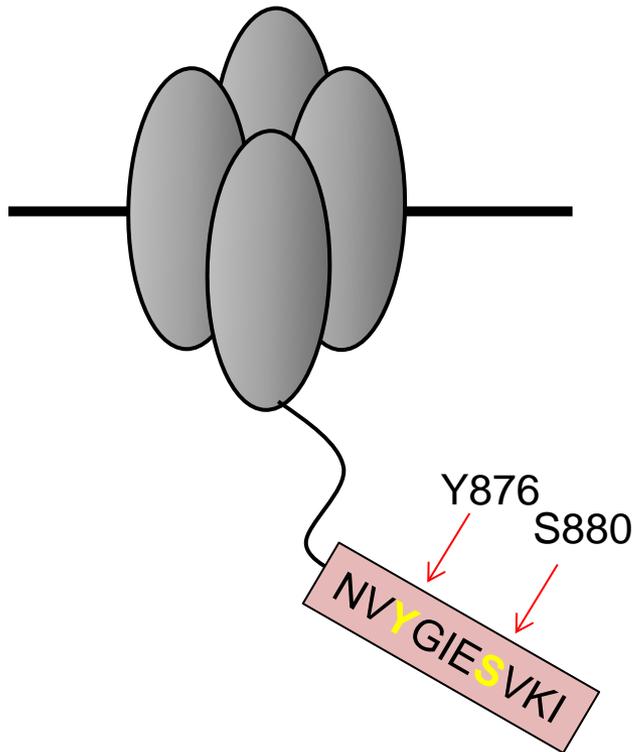
瞬目条件付け: 小脳依存性の学習



GluA2の2つのリン酸化部位

GluA2

1. S880のPKCによるリン酸化
平行線維－プルキンエ細胞シナプスのLTDに必須

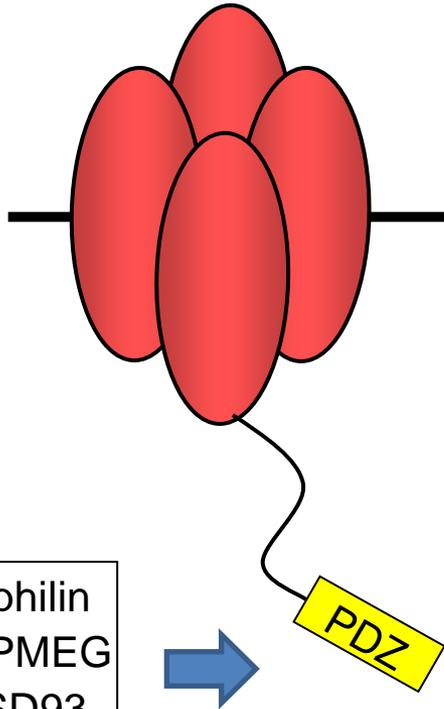


2. Y876 phosphorylation

海馬におけるLTDではY876のリン酸化？ 脱リン酸化？

チロシンリン酸化とGluD2

GluD2



delphinin
PTPMEG
PSD93
S-SCAM
nPIST

- ・ DelphininはSrcに結合する
(Miyagi et al. *JNS* '02)
- ・ Delphinin-KOマウスは LTDが増強
(Takeuchi et al. *PloS One* '08)
- ・ PTPMEG-KO マウスはLTDが減弱
(Kina et al. *EJN* '07)

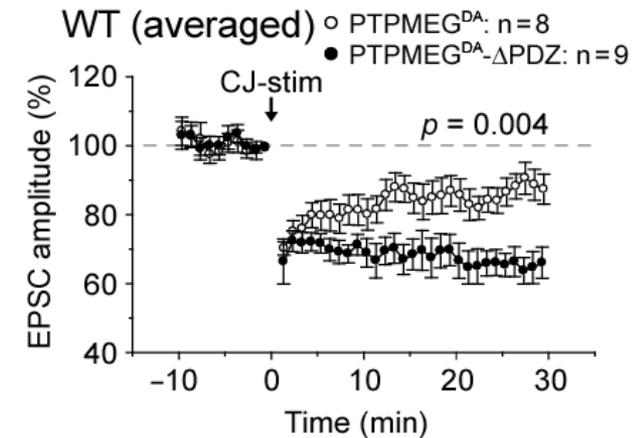
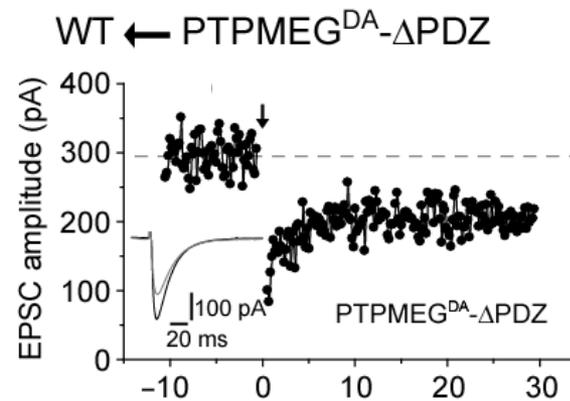
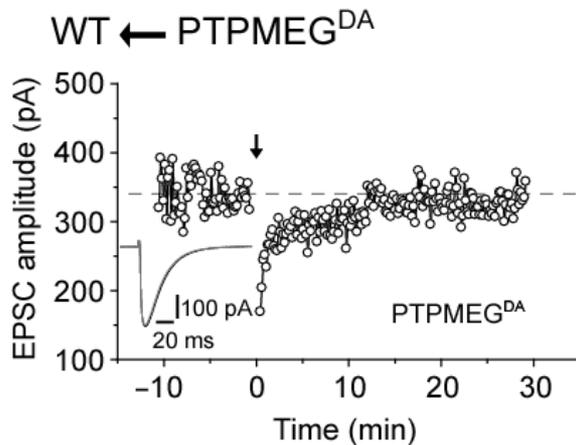
PTPMEGによるGluA2-Y876の脱リン酸化が
LTD誘導に必要なではないか？

PTPMEGの活性とそのGluD2への結合がLTD誘導に必要



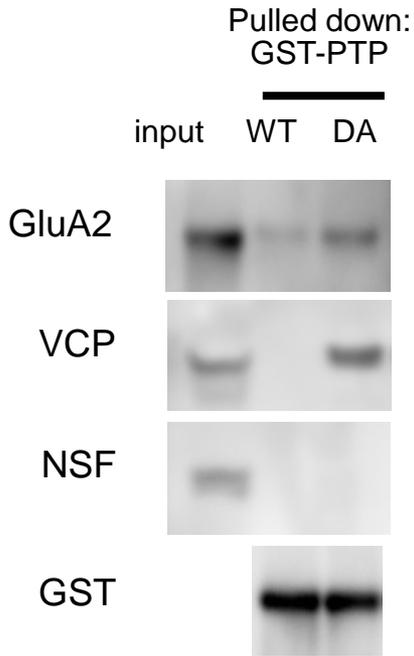
(脱リン酸化活性を失った変異体)

Sindbisvirus vector



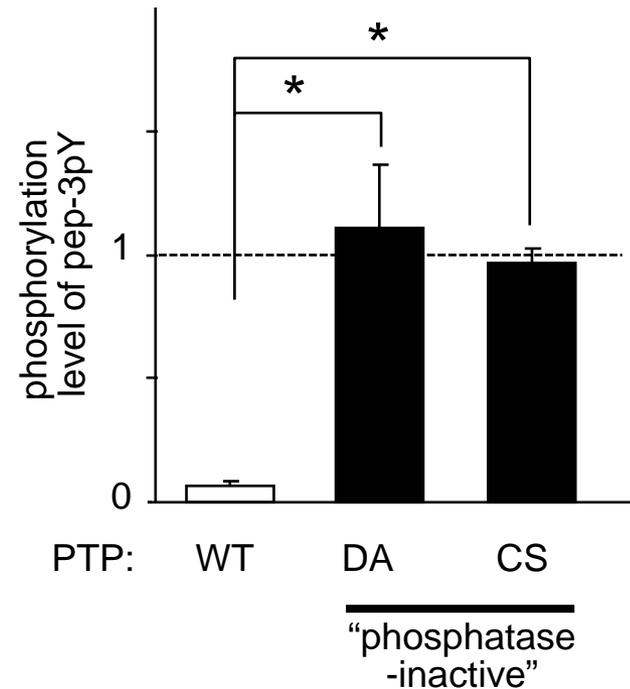
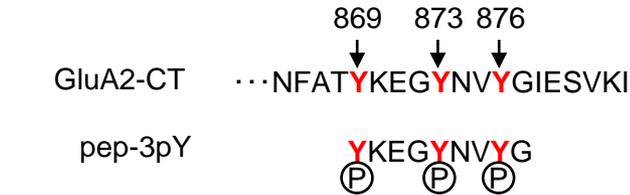
GluA2はPTPMEGの基質である

Substrate trapping

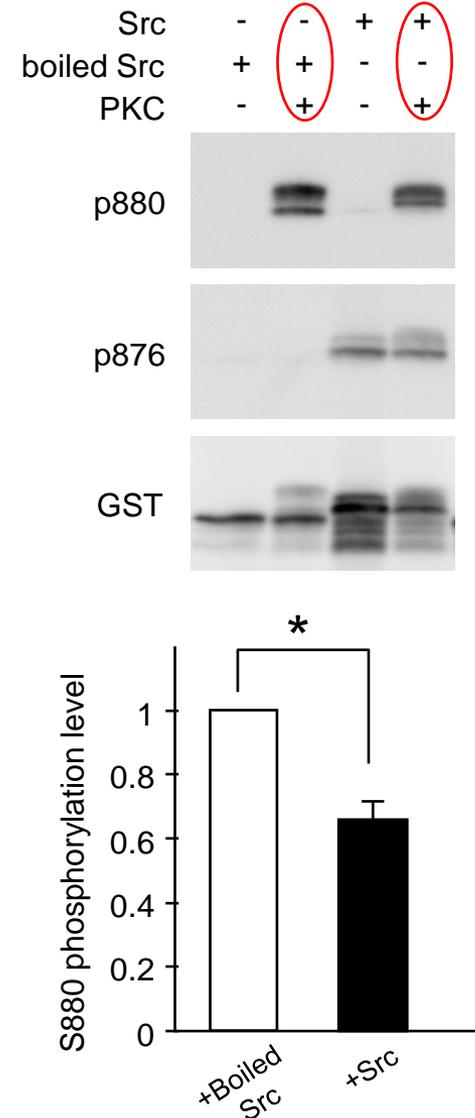


The lysates of HEK293 cells expressing GluA2

in vitro dephosphorylation assay



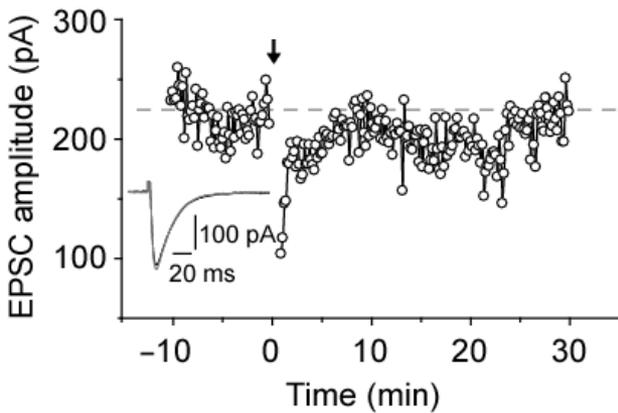
GST-GluA2-CT



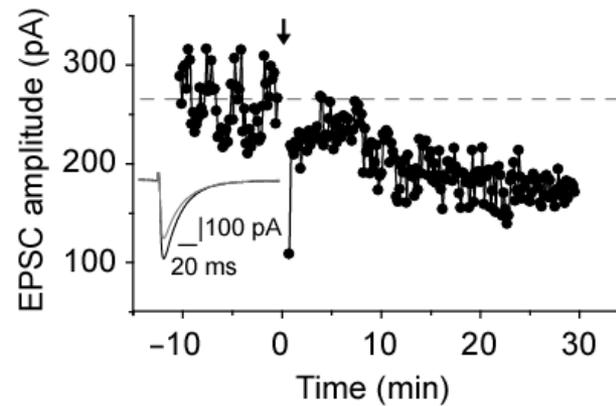
GluA2-Y876の脱リン酸化がLTD誘導の十分条件

Sindbisvirus vector

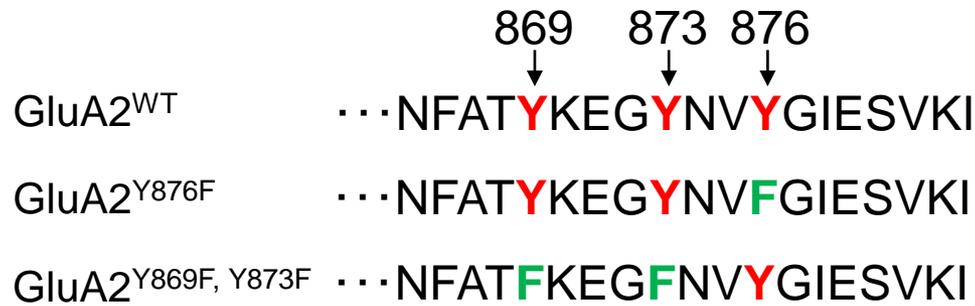
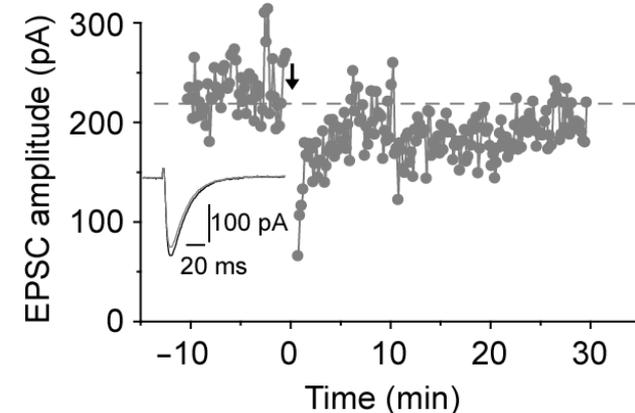
GluD2-null ← GluA2^{WT}



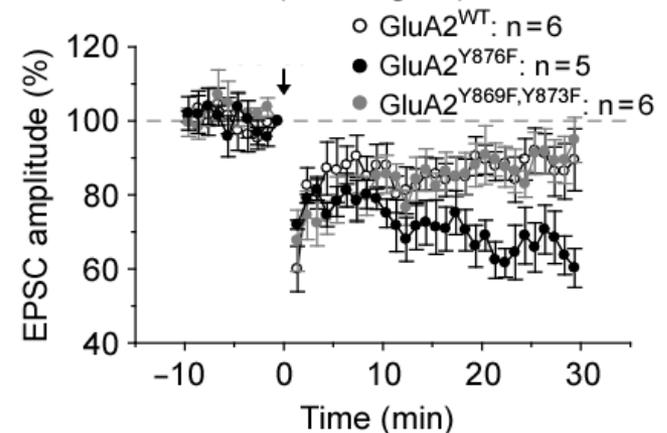
GluD2-null ← GluA2^{Y876F}



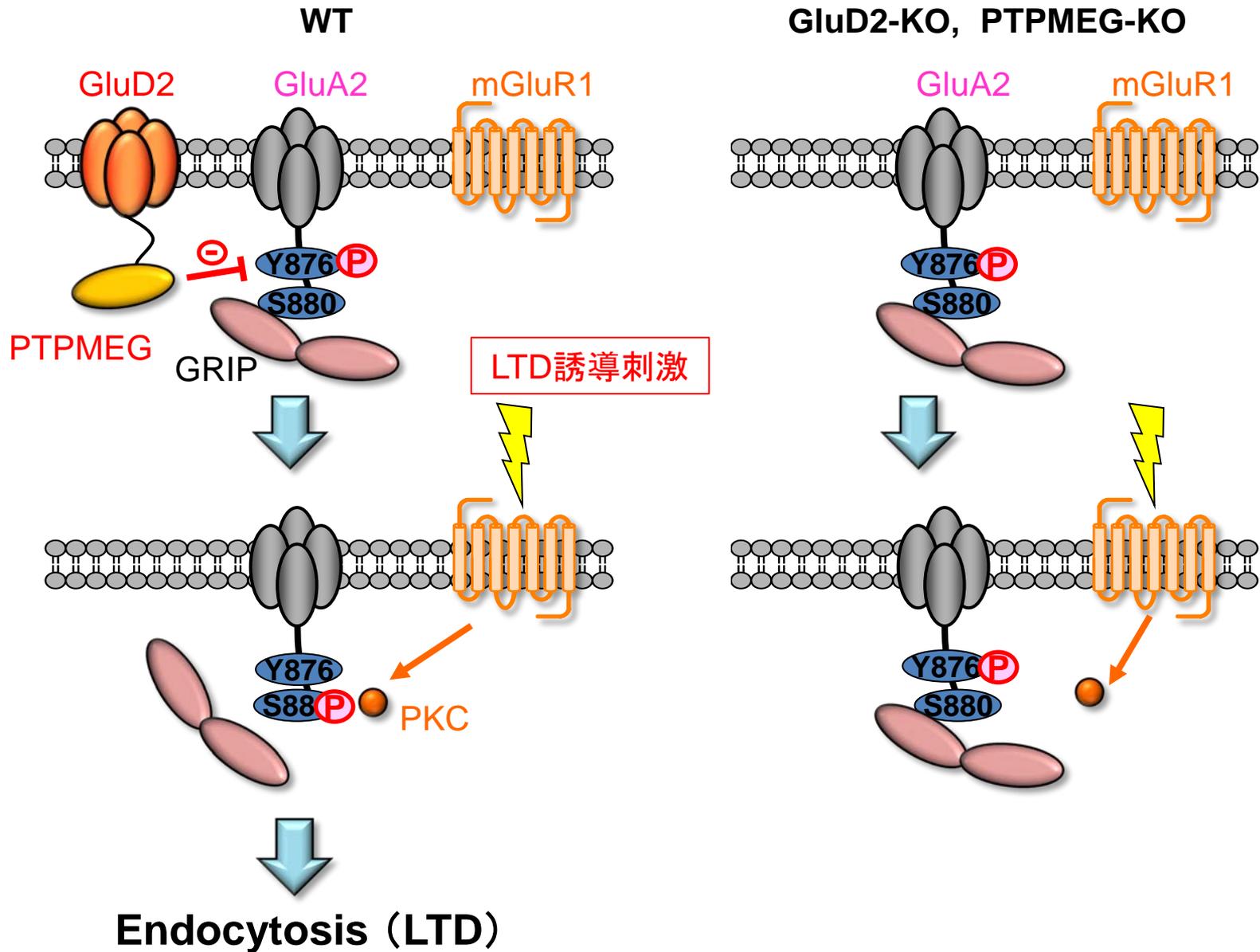
GluD2-null ← GluA2^{Y869F, Y873F}



GluD2-null (averaged)

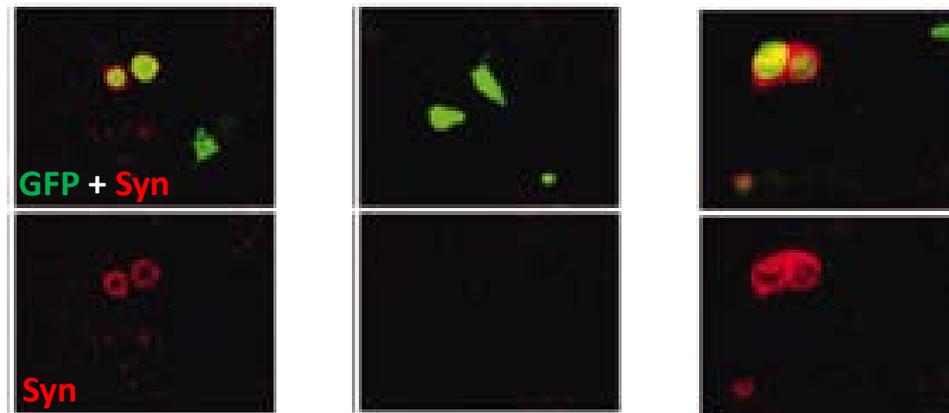
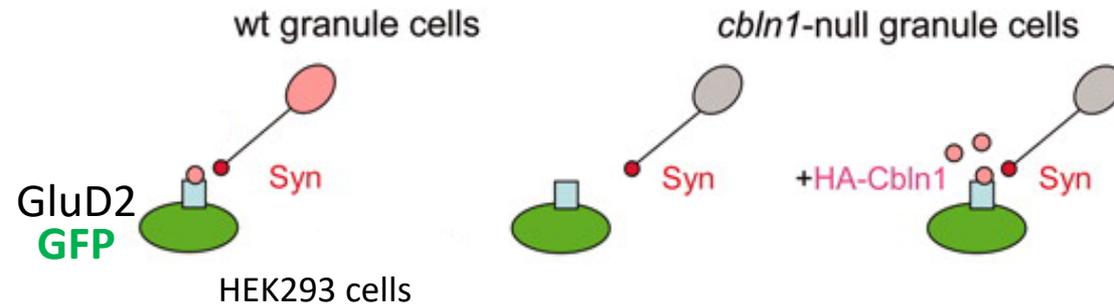


GluD2-PTPMEGはLTDの扉を開く



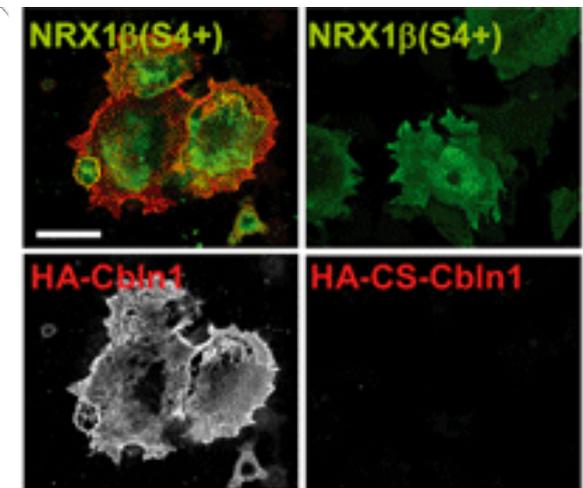
Nrx-Cbln1-GluD2の複合体がシナプス形成を促す

Cbln1とGluD2



Matsuda et al. *Science* '10

Cbln1とneurexin



HA-Cbln1: + CS

293 cells: NRX1β(S4+)

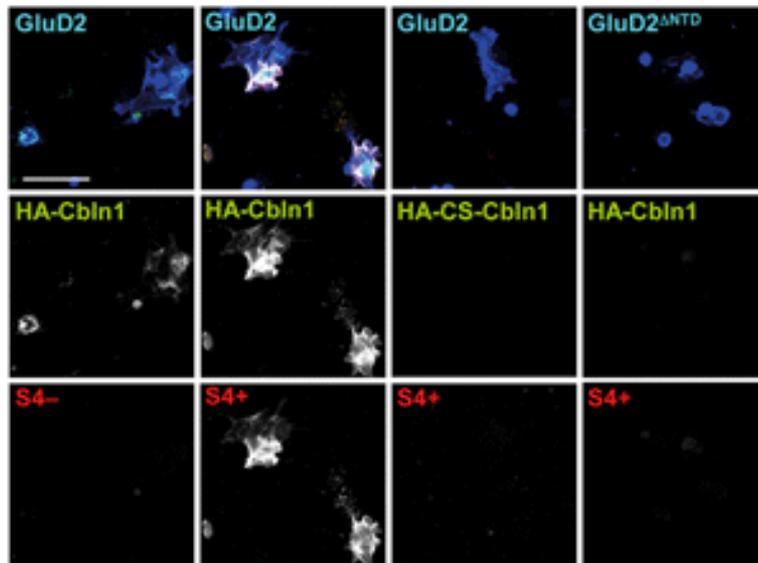
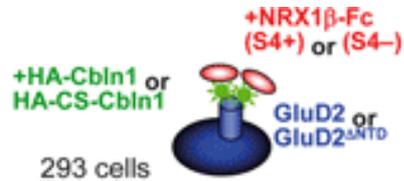
Matsuda et al. *EJN* '11

Nrx-Cbln1-GluD2の複合体がシナプス形成を促す(2)

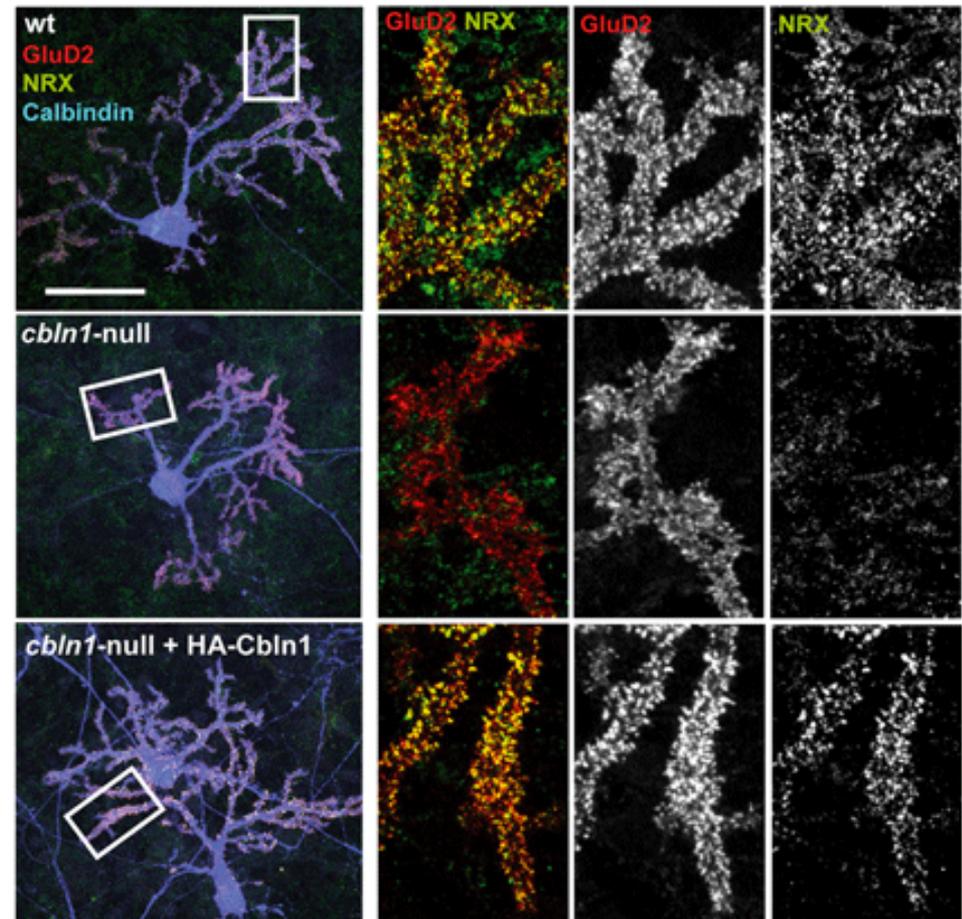
Neurexin, Cbln1, GluD2の3者
コンプレックス

初代培養プルキンエ細胞

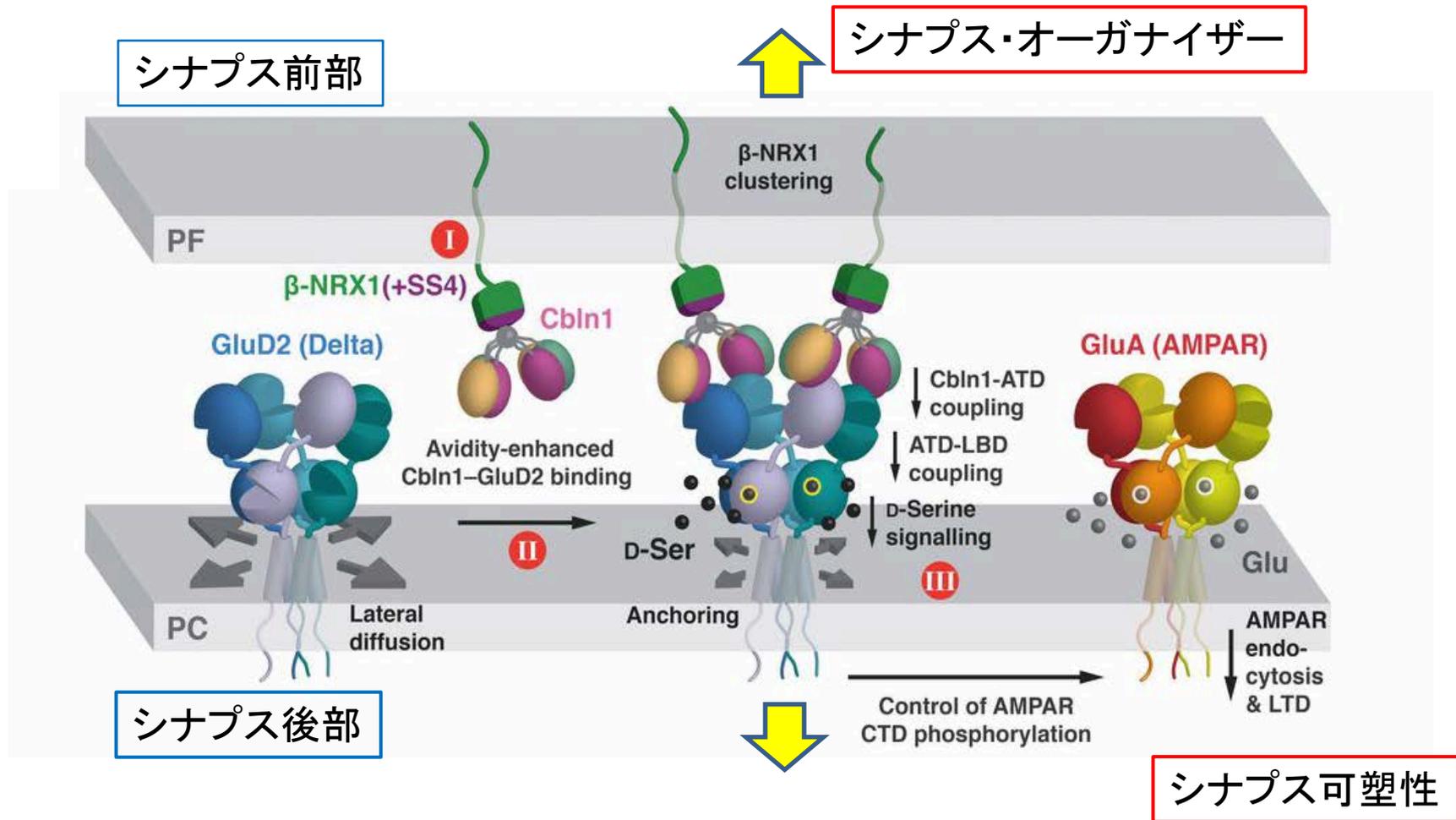
A



HA-Cbln1:	+	+	CS	+
NRX1β-Fc:	S4-	S4+	S4+	S4+
293 cells:	GluD2		GluD2 ^{ΔNTD}	



Nrx-Cbln1-GluD2系によるシナプス形成



Cbln1-KOマウスでは、なぜLTDが起きないのか？