

シナプスにおけるグリピカンとニューレキシンのヘパラン硫酸鎖の役割

神村 圭亮

1. はじめに

ヘパラン硫酸プロテオグリカン (HSPG) は、コアタンパク質に糖鎖であるヘパラン硫酸 (HS) が共有結合した糖タンパク質であり、動物細胞の細胞膜表面および細胞外マトリックスに局在している。これまで細胞膜貫通型のシンデカン、GPIアンカー型のグリピカン、分泌型のアグリンやパルカンなどが同定されている。HSPGは、HS鎖を介してWntやFGF等の分泌性タンパク質、フィブロネクチンやラミニン等の細胞外マトリックス分子、そして細胞外プロテアーゼ等を含む非常に多くの分子と相互作用することが知られている。HSPGがこのような多彩な機能を示す一つの要因は、HS鎖が多種類の修飾酵素によって形成される多様な微細構造を持つためだと推測されている。しかしながら、HS鎖とその複雑な微細構造の生理的意義と作用機序についてはいまだに多くのことがわかっていない。一方、近年シナプスの形成と機能においてグリピカンが重要な働きをすること、またシナプスオーガナイザーとして機能するニューレキシン (Neurexin: Nrnx) がHSPGであることが示された。そこで本稿では、最近明らかになったシナプスにおけるHSPGの機能を我々の成果を交えて紹介したい。

2. シナプス形成におけるグリピカンの機能

神経の発生過程においてシナプスオーガナイザーと呼ばれる分子群はシナプスの成熟を誘導する。これらの中にはシナプス前部で機能するNrnxおよび受容体型チロシンホスファターゼ (receptor protein tyrosine phosphatase: RPTP)、シナプス後部においてはNrnxと相互作用するNeurologin (Nlgn) およびロイシンリッチリピート膜貫通タンパク質 (leucine-rich repeat transmembrane proteins:

LRRTMs) 等が知られている。近年、de WitらとSiddiquiらの二つの研究グループは、ラットの全脳ホモジネートからLRRTM4と相互作用する分子としてGlypican 4 (GPC4) を同定した (図1)^{1,2)}。GPC4はグルタミン酸作動性シナプスにおいてシナプス前膜に局在し、HS鎖を介してシナプス後膜のLRRTM4と相互作用することで両分子の集積を誘導する。またGPC4のHS鎖はLRRTM4を介したシナプス形成に必要であることがわかった。一方Koらは、別のシナプスオーガナイザーであるRPTPファミリーに属するPTP σ もGPC4と相互作用することを見いだしている (図1)³⁾。PTP σ は細胞膜においてGPC4とcisに相互作用するが、この複合体の中にはLRRTM4も含まれていた。LRRTM4を介したシナプス形成にはPTP σ のHS結合部位が必要であることから、GPC4はHS鎖を介してPTP σ およびLRRTM4の両分子のシナプスオーガナイザーとしての機能を調節することが推測された。

GPC4はマウスの海馬において時期特異的な分布を示し、シナプス形成の開始する生後1~2週目まではアストロサイトで強く発現している。Allenらは、アストロサイトの培養上清液からシナプス形成を促進する分子としてGPC4とGPC6を同定した⁴⁾。作用機序を調べたところ、アストロサイトが分泌するGPC4はシナプス前膜にあるRPTPファミリーに属するPTP δ を介してNeuronal Pentraxin 1 (NP1) の分泌を誘導し、NP1がGluA1受容体と相互作用することでシナプス形成を促進することが明らかになった (図1)⁵⁾。実際に、GPC4欠損マウスではシナプス前膜からNP1が分泌されず、シナプスにおけるGluA1のレベルが減少するため、シナプス形成に異常を来することが観察されている。アストロサイトにおけるGPC4の発現レベルは生後2週目以降は減少する一方、CA3野に投射する歯状回顆粒細胞の軸索 (苔状線維) においては増加することが知られている。この領域においてLRRTM4は検出されないことから、GPC4は別の分子の機能を調節することが考えられた。Condomittiらは、GPC4と相互作用する分子としてGタンパク質共役受容体の一つであるGPR158を同定した (図1)⁶⁾。GPR158はGPC4の分布に隣接するように苔状線維の入力を受けるCA3錐体細胞の近位樹状突起に局在する。また、HEK293細胞におけるGPR158の発現は共培養した神経細胞においてシナプス前部の分化を誘導するが、この効果はGPC4のノックダウンにより抑制された。さらに、GPR158の

(公財) 東京都医学総合研究所、脳・神経科学研究分野、脳神経回路形成プロジェクト (〒156-8506 東京都世田谷区上北沢 2-1-6)

Heparan sulfate chains of glypican and neurexin at the synapse
Keisuke Kamimura (Department of Brain and Neurosciences, Tokyo Metropolitan Institute of Medical Science, 2-1-6 Kamikitazawa, Setagaya-ku, Tokyo 156-8506, Japan)

DOI: 10.14952/SEIKAGAKU.2020.920740

© 2020 公益社団法人日本生化学会

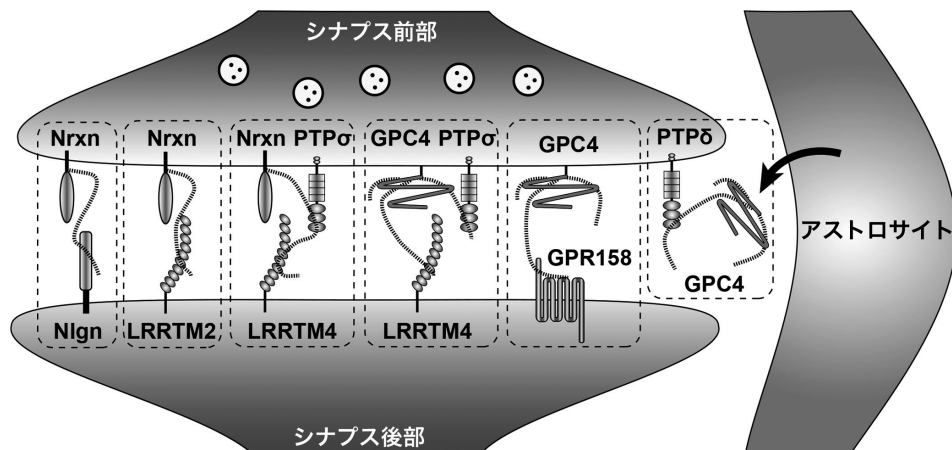


図1 哺乳動物の中枢神経シナプスにおけるHSの機能
NrxnとGPC4はHS鎖を介して複数のシナプスオーガナイザーと相互作用することでシナプス形成を調節している。

ノックアウトマウスにおいては苔状繊維-CA3錐体細胞シナプスの形態およびシナプス伝達に異常を来すことから、GPR158はGPC4と相互作用することでシナプス形成を調節することが推測された。このようにGPC4は脳の発生段階によって異なる分布を示し、さまざまな分子と相互作用することでシナプス形成に深く関与している。

3. NrxnはHSPGとして機能する

これまでNrxnは、タンパク質領域のみを介してNlgnやLRRTMと結合すると考えられてきた。しかしZhangらのグループは、NrxnはHS鎖を持ったプロテオグリカンであり、HS鎖を介してこれらのリガンドと相互作用することを示した(図1)⁷⁾。培養海馬神経細胞において、HS鎖を欠失した変異型NrxnはNlgnおよびLRRTM2を凝集することができず、シナプス形成に異常を来す。また、NlgnおよびLRRTM2のHS結合部位に変異を挿入してもシナプス形成能が低下することが判明した。さらに同グループは、Nrxn1のHS付加部位に変異を挿入した*Nrxn1ΔHS*マウスを作製した。*Nrxn1ΔHS*マウスは苔状繊維-CA3錐体細胞シナプスにおける電気生理学的特性と形態の異常を示すことから生体内においてもNrxnはHS鎖を介してシナプスの形成と機能を調節することが明らかとなっている。一方Roppongiらは、NrxnがLRRTMに加え、HS鎖を介してシナプス前部のPTPσと相互作用することを報告している(図1)⁸⁾。GPC4もHS鎖を介してPTPσとLRRTM4と相互作用するが、GPC4を含む複合体にNrxnは含まれないことからNrxn-PTPσ-LRRTM4複合体とGPC4-PTPσ-LRRTM4複合体は別々に存在することが推測された。また、LRRTM4のHS結合部位に変異を挿入した*Lrrtm4^{RR-K1}*マウスのシナプスでは①NrxnとPTPσの減少、②興奮性シナプスの減少、および③電気生理学的特性の異常が観察されており、ここでも生

体内のシナプス形成・機能におけるHS鎖の重要性が明らかとなっている。

4. シナプス可塑性におけるグリピカンの作用機構

HSPGのシナプス形成における作用機構については研究が進んでいる一方、シナプス可塑性における重要性についてはよくわかっていない。そこで筆者らは、ショウジョウバエを用い、シナプス可塑性におけるHSPGの役割に着目し、解析を行った⁹⁾。ショウジョウバエ幼虫の体壁筋の神経筋接合部(NMJ)はグルタミン酸作動性であり、脊椎動物中枢神経系の興奮性シナプスに類似した構造を示す(I型シナプス終末)ことが知られている。ほとんどの体壁筋は、I型線維に加えてオクトパミン作動性線維の入力も受けている(II型シナプス終末)。オクトパミンは脊椎動物のノルアドレナリンに機能的に相当するモノアミンであり、種々のストレスに応答して放出され、NMJの活動を修飾する。たとえば、ショウジョウバエの幼虫は飢餓状態にさらされると餌を求めて活発な移動を開始するが、それに伴ってI型シナプス終末の新生をはじめとするNMJの再編成が起こる。このような神経可塑性は、飢餓により放出されるオクトパミンによって調節されている。すなわち、オクトパミンはI型およびII型シナプス終末に存在する受容体Octβ2Rを活性化し、各シナプス終末の新生、および幼虫の移動速度の増大を誘導することが明らかにされている¹⁰⁾。しかしながら、その詳細な分子機構は明らかになっていなかった。

筆者らは、GPC4ホモログであるDally-like(Dlp)が、このような経験依存的神経可塑性に関与する可能性を検討した。これまでの報告から、DlpはGPC4とは異なり、シナプス後部に局在することがわかっている。まず、飢餓およびオクトパミンの欠失がDlpの局在にどのような影響を及ぼすのか解析した。その結果、飢餓によりシナプス後部に

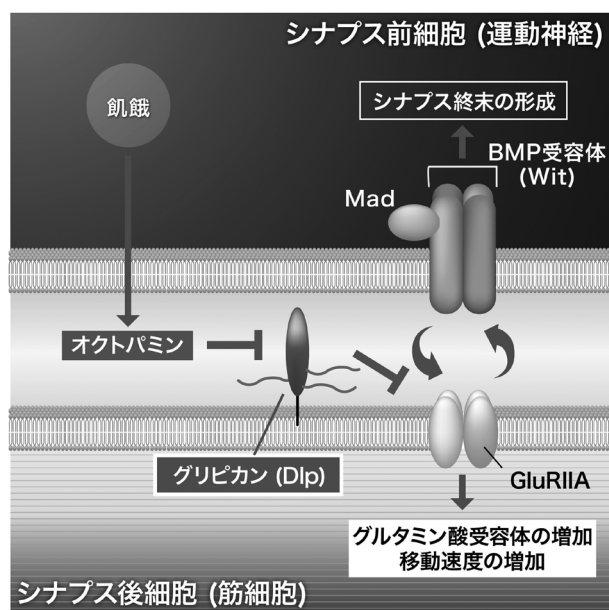


図2 ショウジョウバエの神経筋接合部におけるDlpの機能
飢餓時においてDlpはシナプス後部のグルタミン酸受容体 (GluRIIA) の局在調節を介してシナプス前部のBMPシグナルの活性を制御することで、神経筋接合部の形成と移動速度の増加を引き起こす。

におけるDlpのレベルが減少する一方、オクトパミンを欠失した個体では飢餓状態においてもDlpのレベルが変化しないことが明らかになった。次にDlpが飢餓依存的なシナプス終末の形成および運動速度の増加に必要などうかを調べた。その結果、*dlp*をノックダウンした個体では、飢餓依存的なシナプス終末の形成および運動速度の増加が抑制された。以上のことから、Dlpはオクトパミンシグナルによって発現レベルが低下することでシナプスの可塑的な形態変化および運動能を調節することがわかった。さらにDlpの詳細な作用機構を調べるため、Dlpがグルタミン酸受容体の局在を調節する可能性について調べた。ショウジョウバエのグルタミン酸受容体は四つのサブユニットからなるが、その一つであるGluRIIAは神経活動依存的なシナプス形成において重要であることが知られている。解析の結果、野生型においては飢餓に伴いシナプス後部におけるGluRIIAのレベルが増加する一方、*dlp*ノックダウン個体では飢餓状態においても変化しないことがわかった。このようなDlpを介したGluRIIAの制御はNMJの電気生理学的特性に影響を与える可能性が考えられる。実際に野生型において、運動神経を電気刺激したときに観察される誘発性の興奮性接合部電位は飢餓により増加するが、*dlp*ノックダウン個体においては変化しなかった。以上の結果からDlpは飢餓時のシナプス機能の変化に深く関与することがわかった。

一方、近年NMJの形成においてGluRIIAが既知のBMPリガンド非依存的にシナプス前終末に局在するBMP受容

体Witを介してMadをリン酸化し（非古典的BMP経路）、また、シナプス前終末における非古典的BMP経路がシナプス後部におけるGluRIIAの局在を促進することが報告されている。このようなフィードバック制御と一致して、筆者らは野生型においてリン酸化Mad (pMad) のレベルは飢餓により増加することを見いだした。また、*dlp*ノックダウン個体においては、GluRIIAと同様にpMadレベルは飢餓状態においても変化しないことがわかった。以上の結果は、DlpがGluRIIAもしくはWitを介して両分子の機能を調節することを示唆する。そこでDlpがGluRIIAもしくはWitのどちらを介して機能するのかを明らかにするために、*dlp*, *wit*, および*GluRIIA*間における遺伝的上位性を調べたところ、DlpはBMP経路非依存的にGluRIIAの局在を調節することを見いだした。以上の結果から、Dlpはシナプス後部におけるGluRIIAの局在調節を介して、シナプス前部における非古典的BMPシグナルの活性を調節し、シナプス可塑性に深く関与することがわかった (図2)。

5. HSPG欠損マウスが示す行動異常と自閉症・統合失調症への関与

近年、マウスにおいてHSや*GPC4*の欠損が行動異常を引き起こすことが報告されている。IrieらはHS合成酵素をコードする*Ext1*をグルタミン酸作動性神経細胞特異的に欠損したマウスの行動を調べた¹¹⁾。その結果、このマウスは、社会的相互作用（他の個体との接触頻度）、コミュニケーション（超音波発生）、および反復・ステレオタイプ行動等において、自閉症に特徴的な行動を示すことがわかった。一方Dowlingらは、*Gpc4*欠損マウスに着目し、このマウスが生後2週目までは過剰に活動するがその後正常に戻るという一過性の行動異常を報告している¹²⁾。興味深いことに、この過剰な活動が改善する時期はGPC4のアストロサイトから神経細胞への発現変化のタイミングと一致する。一方、3か月齢の*Gpc4*マウスは作業記憶や活動性に明らかな変化は観察されなかったが、他の新規のマウスに対して興味を示さないという自閉症関連遺伝子欠損マウスに特徴的な異常を示すことがわかっていく。

HSPG欠損マウスが示す行動異常と一致して、ヒトにおいてHSおよび*GPC4*が自閉症に関与することが報告されている。Doanらは、human accelerated region (HAR, 他の哺乳類の間では保存されているがヒトにおいて多様性がみられるDNA領域)と自閉症との関連性を解析し、*GPC4*のイントロンにあるHAR領域の異常がこの疾患に関与することを示している¹³⁾。また*Ext1*やHSの脱アセチル化/脱硫酸転移酵素の一つである*NDST3*の変異が自閉症や統合失調症を引き起こす例も報告されており^{14, 15)}、HS鎖の欠損やHS微細構造の変化が*Nrxn*や*GPC4*の機能に影響する

ことでこれらの疾患発症に深く関与することが推測される。

6. おわりに

Nrxn および GPC4 は HS 鎖を介して複数のシナプスオーガナイザーの機能を調節することでシナプスの形成と機能において中心的な働きをすることが明らかになった。しかしながら、どうしてこのような相互作用にタンパク質領域ではなく HS 鎖が使われているのか、また HS 鎖の微細構造はどのような役割を果たすのか、といった解決すべき問題が多く残っている。今後、ショウジョウバエやマウスなどのモデル生物を用いた解析をさらに進めることで、シナプスにおける HSPG の新たな機能が明らかになることが期待される。

文 献

- de Wit, J., O'Sullivan, M.L., Savas, J.N., Condomitti, G., Caccese, M.C., Vennekens, K.M., Yates, J.R. 3rd, & Ghosh, A. (2013) Unbiased Discovery of Glypican as a Receptor for LRRTM4 in Regulating Excitatory Synapse Development. *Neuron*, **79**, 696–711.
- Siddiqui, T.J., Tari, P.K., Connor, S.A., Zhang, P., Dobie, F.A., She, K., Kawabe, H., Wang, Y.T., Brose, N., & Craig, A.M. (2013) An LRRTM4-HSPG Complex Mediates Excitatory Synapse Development on Dentate Gyrus Granule Cells. *Neuron*, **79**, 680–695.
- 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., et al. (2015) PTP σ Functions as a Presynaptic Receptor for the glypican-4/LRRTM4 Complex and Is Essential for Excitatory Synaptic Transmission. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **112**, 1874–1879.
- Allen, N.J., Bennett, M.L., Foo, L.C., Wang, G.X., Chakraborty, C., Smith, S.J., & Barres, B.A. (2012) Astrocyte Glypicans 4 and 6 Promote Formation of Excitatory Synapses via GluA1 AMPA Receptors. *Nature*, **486**, 410–414.
- Farhy-Tselnick, I., van Casteren, A.C.M., Lee, A., Chang, V.T., Aricescu, A.R., & Allen, N.J. (2017) Astrocyte-Secreted Glypican 4 Regulates Release of Neuronal Pentraxin 1 From Axons to Induce Functional Synapse Formation. *Neuron*, **96**, 428–445.
- Condomitti, G., Wierda, K.D., Schroeder, A., Rubio, S.E., Vennekens, K.M., Orlandi, C., Martemyanov, K.A., Gounko, N.V., Savas, J.N., & de Wit, J. (2018) An Input-Specific Orphan Receptor GPR158-HSPG Interaction Organizes Hippocampal Mossy Fiber-CA3 Synapses. *Neuron*, **100**, 201–215.
- Zhang, P., Lu, H., Peixoto, R.T., Pines, M.K., Ge, Y., Oku, S., Siddiqui, T.J., Xie, Y., Wu, W., Archer-Hartmann, S., et al. (2018) Heparan Sulfate Organizes Neuronal Synapses Through Neurexin Partnerships. *Cell*, **174**, 1450–1464.
- Roppongi, R.T., Dhume, S.H., Padmanabhan, N., Silwal, P., Zahra, N., Karimi, B., Bomkamp, C., Patil, C.S., Champagne-Jorgensen, K., Twilley, R.E., et al. (2020) LRRTMs Organize Synapses Through Differential Engagement of Neurexin and PTP σ . *Neuron*, **106**, 108–125.
- Kamimura, K., Odajima, A., Ikegawa, Y., Maru, C., & Maeda, N. (2019) The HSPG Glypican Regulates Experience-Dependent Synaptic and Behavioral Plasticity by Modulating the Non-Canonical BMP Pathway. *Cell Rep.*, **28**, 3144–3156.
- Koon, A.C., Ashley, J., Barria, R., DasGupta, S., Brain, R., Waddell, S., Alkema, M.J., & Budnik, V. (2011) Autoregulatory and Paracrine Control of Synaptic and Behavioral Plasticity by Octopaminergic Signaling. *Nat. Neurosci.*, **14**, 190–199.
- Irie, F., Badie-Mahdavi, H., & Yamaguchi, Y. (2012) Autism-like Socio-Communicative Deficits and Stereotypies in Mice Lacking Heparan Sulfate. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **109**, 5052–5056.
- Dowling, C. & Allen, N.J. (2018) Mice Lacking Glypican 4 Display Juvenile Hyperactivity and Adult Social Interaction Deficits. *Brain Plast.*, **26**, 197–209.
- Doan, R.N., Bae, B.I., Cubelos, B., Chang, C., Hossain, A.A., Al-Saad, S., Mukaddes, N.M., Oner, O., Al-Saffar, M., Balkhy, S., et al.; Homozygosity Mapping Consortium for Autism. (2016) Mutations in Human Accelerated Regions Disrupt Cognition and Social Behavior. *Cell*, **167**, 341–354.
- Autism Spectrum Disorders Working Group of The Psychiatric Genomics Consortium. (2017) Meta-analysis of GWAS of over 16,000 individuals with autism spectrum disorder highlights a novel locus at 10q24.32 and a significant overlap with schizophrenia. *Mol. Autism*, **8**, 21.
- Lencz, T., Guha, S., Liu, C., Rosenfeld, J., Mukherjee, S., DeRosier, P., John, M., Cheng, L., Zhang, C., Badner, J.A., et al. (2013) Genome-wide Association Study Implicates NDST3 in Schizophrenia and Bipolar Disorder. *Nat. Commun.*, **4**, 2739.

著者寸描

●神村 圭亮 (かみむら けいすけ)

(公財) 東京都医学総合研究所 主席研究員。理学博士。

■略歴 兵庫県小野市出身。2003年東京都立大学大学院博士課程を修了後、愛知医科大学分子医科学研究所研究員、ミネソタ大学遺伝細胞発生生物学部研究員、(財)東京都神経科学総合研究所研究員を経て、11年より現職。

■研究テーマと抱負 ショウジョウバエを用いたプロテオグリカンの機能解析。

■ウェブサイト <http://www.igakuken.or.jp/project/detail/regeneration.html>

■趣味 釣り。