

## 受賞対象論文

Nojima K, Miyazaki H, Hori T, Vargova L, Oohashi T : Assessment of Possible Contributions of Hyaluronan and Proteoglycan Binding Link Protein 4 to Differential Perineuronal Net Formation at the Calyx of Held. *Front Cell Dev Biol* (2021) 9, 730550.

## ハイライト

- HAPLN4とブレビカンとは台形体内側核シナプス前終末とニューロン間のシナプス周囲腔に共局在する。
- *Hapl4-KO* マウスでは、台形体内側核周囲の PNN でブレビカンの異所性発現が認められた。
- *in situ* PLA 法により、PNN における HAPLN4 とブレビカンの相互作用が明らかとなった。

野島 弘二郎

Kojiro Nojima



岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 分子医学

Department of Molecular Biology and Biochemistry, Okayama University Graduate School of Medicine, Dentistry and Pharmaceutical Sciences

## &lt;プロフィール&gt;

2018年4月 岡山大学医学部医学科入学

2020年4月 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科博士課程 科目等履修生(Pre-ART生)  
現在に至る

## 研究の背景と経緯

ペリニューロナルネット (PNN) は、パルプアルブミン陽性のGABA 作動性介在ニューロンなどに最も顕著に存在する特殊な細胞外マトリックス (ECM) 構造である。PNN は生後発達し、臨界期の終了と共に完成することから、経験依存的神経可塑性を制御すると考えられている。PNN の構造は、ニューロンが発現するヒアルロン酸にコンドロイチン硫酸プロテオグリカン (CSPG) を主体とするマトリックス分子が高密度な会合体を形成したものである<sup>1)</sup>。

リンクプロテイン (HAPLN) は、アグリカンなどのレクティンファミリー-CSPG のヒアルロン酸へのG1 ドメインによる結合を安定化させるタンパク質としてPNN 形成と制御に関わる重要分子である<sup>2)</sup>。HAPLN4 は脳幹と小脳に顕著に発現するが、台形体内側核 (MNTB) ニューロンを含む聴覚脳幹ニューロンで典型的に発現している<sup>3)</sup>。我々の行った*Hapl4-KO* マウスを用いた研究では、KO マウスでは野生型マウスよりも高周波数で高い聴覚閾値と弱い時間分解能が検出された<sup>4)</sup>。また、加齢に伴うMNTB の細胞外拡散パラメータに対するHAPLN4 欠損の影響も報告して

いる<sup>5)</sup>。これらの結果は、聴覚機能におけるHAPLN4 の重要性を示唆するものである。

Calyx of Held とは、蝸牛神経核から伸長した軸索終末端が対側台形体核の主細胞に形成する萼状のシナプスのことである。これまでの電子顕微鏡による研究により、calyx of Held におけるアグリカンとブレビカンの正確な分布パターンが明らかにされている<sup>6)</sup>。すなわち、ブレビカンは、calyx of Held とMNTB ニューロンの間の細胞周囲空間に顕著に局在し、シナプス間隙を封鎖している。一方、アグリカンは、calyx of Held シナプス前終末とMNTB ニューロンの周囲全体を取り囲んでいる。アグリカンとブレビカンのPNN 形成の違いは、細胞／シナプス表面におけるそれぞれの機能の違いを示しているのかもしれない。

これらのことから、特定のHAPLN とレクティンの分子セットは、機能の異なるPNN を形成している可能性があると考えられた。この仮説を検証するためには、*Hapl4* 遺伝子欠損がPNN の形成に及ぼす影響を、*Hapl4-KO* マウスと野生型マウスの免疫組織化学および*In situ* proximity ligation assay (PLA) を用いて評価した。

## 研究の成果の内容

### 1. マウス台形体内側核における HAPLN4 及び PNN 関連分子の発現解析

免疫組織化学解析により、ブレビカンと HAPLN4 は Calyx of Held シナプス前終末と MNTB ニューロン間のシナプス周囲腔に顕著に局在し、アグリカンと HAPLN1 は Calyx of Held シナプス前終末と MNTB ニューロンの周囲を取り囲むニューロピルに存在している。

### 2. *Hapl4-KO* マウス台形体内側核におけるブレビカンの異所性発現

MNTB の PNN 成分の詳細な空間的関係を明らかにするため、calyx of Held をシナプスマーカー VGLUT1 の免疫染色により可視化した。野生型マウスの MNTB については、HAPLN4 とブレビカンの免疫染色が VGLUT1 染色に囲まれる形で確認されるが、*Hapl4-KO* マウスではブレビカンの免疫反応は、VGLUT1 染色の周囲に顕著に存在していた（図 C A, B）。このことは、HAPLN4 非存在下において、ブレビカンの局在が calyx of Held シナプス周囲の細胞外スペースに異所的にシフトしていることを明確に示している。対照的に、HAPLN1 とアグリカンは両遺伝子型において、calyx C

of Held シナプス周囲の細胞外スペースの局在は変化しなかった。レクティカンの C 末端で架橋するテネイシン R もアグリカンと同様の発現パターンを示した。

### 3. PNN 形成における HAPLN-レクティカン分子の特異的な結合の重要性

*Hapl4-KO* マウスの MNTB におけるブレビカンの異所性発現の分子機構をより深く理解するために、組織切片における内因性タンパク質-タンパク質相互作用の可視化に優れた手法である *In situ* proximity labeling assay (PLA) を導入した。Calyx のマーカー VGLUT1 の免疫染色を組み合わせることで、HAPLN とレクティカンの相互作用の差異を同定する強力なアプローチとなる。

HAPLN1 とアグリカンの一対の一次抗体は、野生型マウスと *KO* マウスともに、VGLUT1 染色の周囲にニューロピル様形態を持つ細胞外スペースに豊富なシグナルを生じた（図 C D, F）。一方、HAPLN4 とブレビカンの一次抗体のペアは、野生型マウスでは Calyx of Held と MNTB ニューロン間のシナプス周囲腔に点状のシグナルを生成することができた（図 C C）。HAPLN1 とブレビカンの一次抗体の変則的なペアは、*Hapl4-KO* マウスでのみ、周囲の細胞外空間に顕著なシグナルを示した（図 C F）。

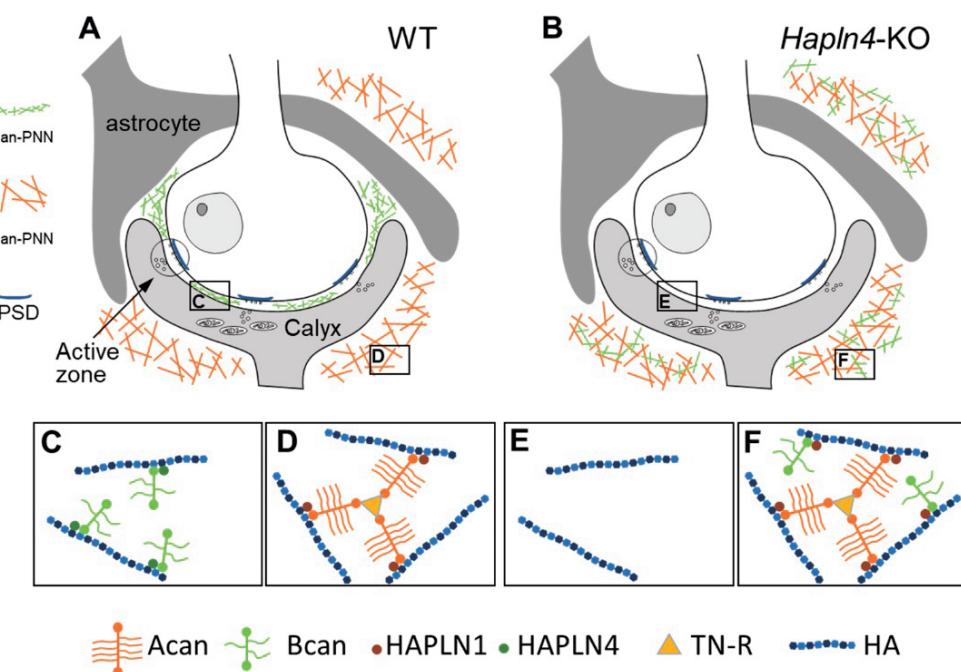


図 C 台形体内側核ペリニューロナルネット概念図

HAPLN4 は Calyx of Held シナプス前終末と MNTB ニューロン間のシナプス周囲腔にブレビカンを特異的に局在させるのに重要なことが明らかになった。受賞論文より転載許諾を得て引用。

## 研究成果の意義と今後の展望

本研究により、HAPLN4 が MNTB の Calyx of Held シナプス前終末と MNTB ニューロン間のシナプス周囲腔にブレビカンを特異的に局在させるのに重要であることが明らかになった(図1)。一方、HAPLN1 に依存してアグリカンの発現は、calyx of Held シナプス周囲のニューロピルに局在していることが示された。

それぞれの HAPLN に依存した微小 PNN 構造がどのようにして明瞭に形成されるのか、という疑問に関して、今回の研究より HAPLN とレクティカンの C1 ドメインとの結合親和性の違いが寄与することが示唆された。しかしながら、この仮説の検証には、さらに HAPLN とレクティカンの結合親和性を測定する生化学的な実験、その他の必要なメカニズムを検討する必要がある。

MNTB ニューロンは、巨大な軸索末端である Calyx of Held の单一入力を受ける。成熟した Calyx of Held シナプスでは、入力信号に応じて多量の興奮性神経伝達物質グルタミン酸を放出し、高速かつ高信頼性の伝達を行う。Calyx of Held シナプスは、高密度に組織化された PNN に包まれているが、PNN の機能的重要性は最近まで明らかにされていなかった。しかし、近年の PNN 形成の理解の進展に基づき、PNN 成分を欠損した遺伝的モデルの脳スライスでパッチクランプ記録を行うことができるようになっている。HAPLN4 欠損マウスでのパッチクランプ記録実験により、calyx of Held シナプスの伝達における機能的解析が期待される。

PNN は多くの精神疾患に関与していることが近年報告されてきており<sup>1)</sup>。PsychENCODE コンソーシアム(EBI 脳サンプル)の遺伝子発現データを用いた 13435 遺伝子のトランスクリプトームワイド関連研究(TWAS) FUSION 解析によると、HAPLN4 遺伝子が有意な遺伝子として含まれている<sup>7)</sup>。Ji らは、196 の統合失調症リスク遺伝子に転写－神経画像解析を適用し、統合失調症患者における灰白質体積(GMV) の変化と関連する 98 の遺伝子を同定した<sup>8)</sup>。注目すべきは、同定された 98 の遺伝子は、分子機能的に 8 つの Gene ontology term に有意に濃縮され、その 2 つが CSPG 結合やヒアルロン酸結合を含むものであったことである。

中でも HAPLN4 は最も大きな負の相関を示し、同遺伝子の発現は統合失調症患者の GMV 減少の大きい脳領域で低かった。以上のように、PNN 関連遺伝子と精神疾患との関連がますます注目されており、HAPLN4 のシナプス形成・機能維持機構の解明は重要であると考えられる。

## 文 献

- 1) Eawcett CJW, Oohashi CT, Pizzorusso CT, et al. The roles of C-type lectin domain-containing proteins in the formation and maintenance of perineuronal nets and the perinodal extracellular matrix in neuronal function. *Nat Rev Neurosci* (2019) 20, 451–465.
- 2) Oohashi T, Edamatsu M, Bekku Y, Carulli D, et al. The hyaluronan and proteoglycan link proteins are organizers of the brain extracellular matrix and key molecules for neuronal function and plasticity. *Exp Neurol* (2015) 274, 134–144.
- 3) Bekku Y, Su WD, Hirakawa S, Fässler R, Ohtsuka A, et al. Molecular cloning of Bral2, a novel brain-specific link protein, and immunohistochemical colocalization with brevican in perineuronal nets. *Mol Cell Neurosci* (2003) 24, 148–159.
- 4) Popelář J, Díaz Gómez M, Lindovský J, Rybalko N, Burianová J, et al. The absence of brain-specific link protein Bral2 in perineuronal nets hampers auditory temporal resolution and neural adaptation in mice. *Physiol Res* (2017) 66, 867–880.
- 5) Sucha P, Chmelova M, Kamenicka M, Bochin M, Oohashi T, et al. The Effect of Hapln4 Link Protein Deficiency on Extracellular Space Diffusion Parameters and Perineuronal Nets in the Auditory System During Aging. *Neurochem Res* (2020) 45, 68–82.
- 6) Blosa M, Sonntag M, Brückner G, Jäger C, Seeger C, et al. Unique features of extracellular matrix in the mouse medial nucleus of trapezoid body—implications for physiological functions. *Neuroscience* (2013) 228, 215–234.
- 7) Gandal MJ, Zhang P, Hadjimichael E, Walker RL, Chen C, et al. Transcriptome-wide isoform-level dysregulation in ASD, schizophrenia, and bipolar disorder. *Science* (2018) 362, eaat8127.
- 8) Gu Y, Zhang X, Wang Z, Qin W, Liu H, et al. Genes associated with gray matter volume alterations in schizophrenia. *Neuroimage* (2021) 225, 117526.

2022年8月22日受稿

〒700-8558 岡山市北区鹿田町 5 号

岡山電話：086-235-7128 FAX：086-222-7768

E-mail : knojima@s.okayama-u.ac.jp