

樹状突起スパインの安定性と可塑性を担う新たな細胞骨格制御機構の解明

研究代表者：謝 敏かく（医学部 組織細胞形態学・神経科学領域、助教）

概 要	シナプス形成に関与する蛋白質の異常により学習障害、痴呆や自閉症の精神症状発現が引き起こされることが近年知られるようになってきた。しかしながら、シナプス形成の分子機構の解明自体はいまだ十分ではない。我々は、最近新たにホスファチジルイノシトール (3, 4, 5) トリリン酸 (PIP3) および細胞骨格関連因子である LL5 β がスパイン形成に重要な役割を果たしているアクチン結合タンパクの一つと結合し、スパイン形成に関わることを見出した。さらには LL5 β が LTP および LTD に関連する中心的分子と結合すること、それ故 LL5 β が LTP および LTD などの学習機構に関わることを可能性を見出した。
関連キーワード	LL5 β 、シナプス、アクチン結合タンパク、LTD、LTP

研究の背景

グルタミン酸作動性シナプス後部の膜直下はシナプス後肥厚部 (PSD) と呼ばれ、多種類のタンパク質が存在し、状況に応じて異なる複合体を形成し機能している。中でも足場蛋白質 PSD-95、カルシウム/カルモジュリン依存性リン酸化酵素 II (CaMKII) は、グルタミン酸受容体 AMPA-R や NMDA-R とともに、記憶・学習の基礎過程である長期増強 LTP (long-term potentiation) に中心的分子として関わっている。近年、シナプス後部の膜上での AMPA-R の局在量が増加や減少することが、スパインの形態のダイナミックな変化とともに LTP や LTD (long-term depression) を担う直接の仕組みであると考えられている。しかしながら、スパインのダイナミックな形態変化、AMPA-R の局在量変化制御の分子的な仕組み、さらには両者の相互関係はその有無も含め十分には解明されていない。一方、昨年、スパインでの PIP3 が AMPA-R および

PSD-95 の樹状突起シャフトからスパイン内部への局在変化に対し重要な役割を果たしていると報告された (Sasaki J et al., *Nat. Neurosci.* 13:36;2010)。このことより、まだ未知ではあるが、何らかの分子を介して、PIP3 が AMPA-R と PSD-95 の時空間的調節を行っていると考えられた。

我々は、リン脂質の一種である PIP3 と特異的に結合する PH (pleckstrin homology) domain を持つ LL5 β (PHLDB2; pleckstrin homology-like domain, family B, member 2) の解析を進めた。そして、この LL5 β 分子が細胞膜の PIP3 に応じて、細胞内局在を変化させること、さらにアクチンを架橋する因子であるフィラミン A が LL β に結合し、LL5 β はフィラミン A を介し、PIP3 の脱リン酸化酵素 SHIP2 を膜直下に運び、膜上の PI (3, 4) P2 量を調節することを最近報告した (Takabayashi, T and Xie M-J et al., *J. Biol. Chem.* 13:36;2010)。

研究の目的

シナプスは脳の情報伝達機構の基盤であり、学習・記憶など高次機能の実態として、刺激により動的にその形態・構造が大きく変化する。グルタミン酸作動性シナプス後部の膜直下は多種類のタンパク質が存在し、状況に応じて異なる複合体を形成し、機能している。しかし、動的な形態さらには機能変化を担う分子メカニズムの解明は十分ではない。

我々は、いままで研究を進めてきた LL5 β がシナプス後肥厚部 (PSD) の分子複合体の形成に関わると想定し、この分子を通じて、シナプス形成から成熟に至る分子過程を解き明かし、海馬における学習・記憶などの脳高次機能に関与する新たな分子メカニズムを解明する目的で本研究を実施した。

研究の成果

(1) 海馬は脳の記憶や空間学習能力に関わる脳の器官であるが、LL5βが海馬のスパインに強く発現することを認めた。

(2) LL5βがスパイン成熟に重要な役割を果たしていることを見出した。シナプス成熟過程では、未成熟なフィロポディアやthin型スパインが形成され、その後、成熟に伴い形態がstubby型やmushroom型のスパインとなることが知られている。LL5βをノックダウンした海馬神経細胞のスパインでは、フィロポディアもしくはthin型の未成熟型スパインを多数認めたが、反対に、LL5βを強制発現した場合には、stubbyもしくはmushroom型の成熟型スパインが多数となった。このことからLL5βはスパイン成熟に重要な役割を果たすと考えられた。

(3) アクチン結合タンパクの一つは、スパインの形成や形態の制御に関わるが、我々は、このアクチン結合タンパクの局在がLL5βにより制御されることを見出した。このアクチン結合タンパクには胎児型と成体型の2種類が存在し、LL5βは胎児型とは結合せず、成体型と結合することを認めた。成体型を強制発現すると強大なフィロポディアが形成されるが、LL5βとの共発現によりそのフェノタイプはキャンセルされ、スパインは正常型に戻った。このことよりLL5βは成体型に拮抗すると考えられた。

(4) LL5βは後肥厚部のタンパクの樹状突起シャフトからスパインへの移動を制御した。我々は、LL5βが後肥厚部のタンパクと結合することを見出した。後肥厚部のタンパクの局在制御にLL5βが関わる可能性を想定し、光により活性化するphotoactivatable GFP (PAGFP)と後肥厚部のタンパクの融合タンパクを作成し、PAGFP融合後肥

厚部のタンパクに光をあて、光活性化した後肥厚部のタンパクの動態を検討した。PAGFPは、紫外光照射により蛍光波長が紫外線領域から可視領域へとシフトする特長を有しており、光活性化された分子の蛍光情報だけを抽出することができる。光を照射し、後肥厚部のタンパク-PAGFPを発光させたところ、LL5βと共発現したスパインでは後肥厚部のタンパクの移動が、LL5βがない場合に比較し速いことを観察した。このことから、LL5βは後肥厚部のタンパクの移動を制御していることと想定された。

(5) シナプス関連タンパクはLL5βと結合し、LL5βの発現を制御した。海馬においてLL5βがシナプス関連タンパクと結合することを認めた。さらに、Cos7細胞では、活性型シナプス関連タンパクを過剰発現させると、LL5βの存在量が低下することが観察された。以上より、LL5βはシナプス関連タンパクをシナプス後肥厚部に運び、そこで一旦LTPが始まると、LL5βはその役割を終え、分解されると推測された。すなわち、LL5βはスパインのダイナミックな形態変化に重要な役割を果たしていると考えられた。

(6) LL5βがシナプス可塑性に重要な役割を果たしている。海馬培養細胞を用いて、LTDをおこすと、LL5βがスパイン内部から樹状突起シャフトへの局在変化することを見出した。

以上のことよりLL5βはスパインの成熟に関わり、なかでもアクチン結合タンパク、シナプス関連タンパクといった因子とスパイン内で相互作用し、海馬学習の分子メカニズムの重要な一翼を担うと想定された。

特記事項・発表論文など

「本研究に関わる発表論文」

Takabayashi, T*, Xie, M-J*, Takeuchi, S., Kawasaki, M., Yagi, H., Okamoto, M., Tariqur, R.M., Malik, F., Kuroda, K., Kubota, C., Fujieda, S., Nagano, T. and Sato, M. LL5β directs the translocation of Filamin A and SHIP2 to sites of PtdIns(3,4,5)P3 accumulation and PtdIns(3,4,5)P3 localization is mutually modified by co-recruited SHIP2, *J.Biol.Chem*13:36;2010.

*謝(Xie, M-J.)を含む2名は筆頭著者扱い。

「本研究に関わる学会発表」

Xie M-J., Iguchi T., Yagi H., Shirao T., and Sato M.. LL5β regulates morphology and maturation dendritic spines. 包括脳ネットワーク夏のワークショップ, 2010, 7, 札幌

Xie M-J., Iguchi T., Kuroda K., Shirao T., Yagi H., and Sato M.. LL5β regulates for maturation of dendritic spines. Neuro 2010, 9, 神戸