

PSD 95 関連分子による AMPA 受容体制御について

研究代表者： 謝 敏珏（医学部・助教）

研究分担者： 佐藤 真（医学部・教授）

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、興奮性シナプス伝達とその可塑性変化を担うグルタミン酸受容体である AMPA 受容体(AMPA-R)を制御する分子機構の解明自体はまだまだ十分ではない。我々は、細胞骨格関連因子である分子がスパイン形成および成熟に関わることを <i>in vitro</i> 系にて見出ししているが、最近同分子のノックアウトマウスにおいて、 <i>in vivo</i> 系でもスパイン成熟に関わることを見出した。さらに、長期抑圧(LTD)をおこすと AMPA-R のエンドサイトーシスが阻害されたことから、この分子が LTD のシナプス可塑性に関連し、AMPA-R の輸送を制御することが明らかとなった。
関連キーワード	LL5β、シナプス、ノックアウトマウス、LTD、LTP

研究の背景および目的

中枢神経系における最も主要な神経伝達物質はグルタミン酸であり、このグルタミン酸による伝達効率は神経活動に応じて変化することが知られている。この現象はシナプス可塑性と呼ばれ、記憶・学習の基礎過程と考えられている。最近興奮性シナプス伝達とその可塑性変化を担うグルタミン酸受容体である AMPA 型グルタミン酸受容体(AMPA-R)のエンドサイトーシスやエクソサイトーシスといった細胞内輸送が長期増強(LTP)や長期抑圧(LTD)等のシナプス可塑性の分子実態であることが明らかにされてきている。しかし、AMPA-R の輸送を制御する分子機構、さらには AMPA-R とシナプス後部の膜直下に存在する多種類のタンパク質複合体であるシナプス後肥厚部(PSD)との相互関連は十分には解明されていない。

近年、スパインでフォスファチジルイノシトール3リン酸(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ことが報告された(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、PIP3 と特異的に結合する PH (pleckstrin homology)domain を持つ LL5β (PHLDB2;pleckstrin homology-like domain, family B, member 2) (Takabayashi, T and Xie M-J et al., *J. Biol. Chem.* 13:36;2010)の解析を進めていたが、その過程で、この分子が神経細胞に発現し、PSD に存在する足場蛋白質である PSD-95 やカルシウム/カルモジュリン依存性リン酸化酵素 II(CaMKII)、AMPA-R およびアクチン結合たんぱく質 drebrin A に結合することを見出した。

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、刺激により変化しうる可塑性と呼ばれる柔軟性を持つ。シナプス可塑性に中心的な役割を担うグルタミン酸受容体の細胞表面量がどのような分子により調節されているのか、またその調節機構はどのようなものであるのかについて十分ではない。

本研究では、現在まで進めてきた LL5β の解析をさらに展開し、LL5β のシナプス後肥厚部(PSD)分子複合体への働きを解析し、シナプス形成から成熟に至る分子過程を解き明かし、さらには学習・記憶などの脳高次機能と密接に関わる LTP および LTD に対する LL5β の役割を解明する。

研究の内容および成果

以下の成果を得た。

(1)スパイン形成時期の海馬において LL5β の海馬

での発現を確認した。

(2) LL5 β ノックアウトマウスを作製した。LL5 β exon 2 を Cre リコンビナーゼ標的配列 loxP で挟むターゲティングベクターを構築し、このような遺伝子座を持つ flox マウスを作製した。その後、この flox マウスを tnapCre 発現マウスとかけ合わせることで、LL5 β の exon 2 の欠損マウスを得た。LL5 β ノックアウトマウスでは LL5 β の発現が大脳皮質および海馬にて欠損していることを Western blot 法により確認した。その他、腎臓、肺、肝臓などの臓器に対しても LL5 β ノックアウトマウスでは LL5 β の発現の欠損を確認した。

(3) LL5 β ノックアウトマウスにて、LL5 β がスパイン成熟に重要な役割を果たしていることを明らかにした。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。Golgi 染色法により、生後 3 週齢マウスの脳切片を用いて、CA1 錐体細胞のスパイン形態変化を検討した。LL5 β ノックアウトマウスではフィロポディア型の未成熟型スパインを多数認めた。この結果は *in vitro* 系にて報告されている LL5 β 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増加した結果と一致したことから、LL5 β はスパイン成熟に重要な役割を果たすと証明された。

(4) LL5 β がシナプス可塑性に重要な役割を果たしていることを明らかにした。海馬培養細胞に LL5 β 発現ベクターを導入し、その後 NMDA 処理により LTD をおこすと、LL5 β 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を見出したが、LTP をおこすと LL5 β の局在変化がみられなかった。このことから LL5 β がシナプス可塑性 (特に LTD) に重要な役割を果たしていると考えられた。

(5) LL5 β が AMPA-R の輸送を制御することを見出した。培養海馬神経細胞に HA tag をつけた AMPA-R を発現するベクターを導入し、LTD 誘導後、樹状突起およびスパイン膜表面上における AMPA-R の発現量の変化を検討した。AMPA-R 発現量は HA を免染し、定量化した。野生型神経細胞では LTD 誘導後、樹状突起およびスパイン膜表面に局在する AMPA-R 量が減少し、細胞内に移動したことを観察した。一方、LL5 β ノックアウトマウスでは LTD 誘導後、樹状突起およびスパイン膜表面に局在する AMPA-R 量の変化が観察されなかった。このことより、AMPA-R のエンドサイトーシス阻害がされたと考えられた。以上のことから、LL5 β は AMPA-R の輸送を制御すると想定された。

これらの結果より、LL5 β はスパインの成熟に関わり、学習・記憶に関わるスパインでの分子メカニズムの重要な一翼を担うと想定された。

本助成による主な発表論文

「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. LL5 β 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。

「学会発表」

謝敏カク, 黒田一樹, 八木秀司, 駒田致和, 猪口徳一, 佐藤真. 大脳皮質形成期の法線方向移動における神経細胞の多極性から双極性への形態変化に

成長円錐が重要である. 第 116 回日本解剖学会全国学術集会・第 88 回日本生理学会大会, 2011, 3, 誌上開催, *J. Physiol.Sci* 61:1, S287.

謝敏カク, 八木秀司, 黒田一樹, 駒田致和, 猪口徳一, 佐藤真. 大脳皮質での glia-guided locomotion の開始には、樹状突起の成長円錐が重要である. 第 34 回日本神経科学大会 2011, 9, 横浜.

Xie, M-J., Yagi, H., Kuroda K., Wang C-C, Komada M., Iguchi, T.Sato, M. Dendritic growth cone activities are essential for completing multipolar-bipolar transition and starting glia-guided locomotion. *Neuroscience* 2011, 11, Washington.