

## 脂質関連分子による LTD 制御機構の解明

研究代表者： 謝 敏カク（医学部・助教）

概 要	脳の学習・記憶はシナプスの伝達効率の動的な変化（シナプス可塑性）にある。 しかしながら、シナプス可塑性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、ホスファチジルイノシトール(3,4,5)三リン酸(PIP <sub>3</sub> )と高感度に結合・認識し、海馬に発現する Phldb2(pleckstrin homology-like domain, family B, member 2)が、シナプス後肥厚部(PSD)の構成蛋白である PSD-95 の移動やAMPA型グルタミン酸受容体(AMPA-R)分子のエンドサイトーシスに関わり長期抑圧(LTD)を制御することを明らかとした。さらに、この Phldb2 の作用には、PIP <sub>3</sub> が関わることを見い出した。
関連キーワード	Phldb2、シナプス、ノックアウトマウス、LTD

### 研究の背景および目的

シナプス可塑性の仕組みの解明は、脳の高次機能と精神・神経疾患の理解・解明に大変重要である。シナプス可塑性は、高頻度刺激などにより、シナプスでの神経伝達効率が増加する現象であり、長期増強(LTP)および長期抑制(LTD)として、知られている。LTD はシナプスにおいて AMPA 型グルタミン酸受容体(AMPA-R)が、クラスリン依存性エンドサイトーシスによって神経細胞内に取り込まれることによって引き起こされると考えられている。しかし、どのようにクラスリン依存性エンドサイトーシスが引き起こされるのかについては十分には解明されていない。最近、PIP<sub>3</sub> がスパインに局在し、シナプス後膜で AMPA-R クラスタリングの維持に働き LTP を制御することが報告された(Arendt KL et al., Nature Neurosci, 2010)。しかしながら、PIP<sub>3</sub> の LTD における役割や、PIP<sub>3</sub> と AMPA-R の間を繋ぐ分子実体は全く明らかにされていない。

我々は、ホスファチジルイノシトール(3,4,5)三リン酸(PIP<sub>3</sub>)と高感度に結合する PH (pleckstrin homology) domain を持つ Phldb2(pleckstrin

homology-like domain, family B, member 2, 別名 LL5b)の解析を進めていた(Takabayashi, T and Xie M-J et al., *J. Biol. Chem.* 2010)が、その過程で、この Phldb2 が海馬の神経細胞に発現し、Phldb2 をノックダウンおよびノックアウトした神経細胞のスパインでは、未成熟なフィロポディアや thin 型スパインが増加することから Phldb2 がスパイン成熟に重要な役割を果たしていることが見い出してきた。さらに、Phldb2 がシナプス後肥厚部(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蛋白 drebrin A に結合することを見い出している。CaMKII や PSD 95 は PSD に豊富に存在し、スパイン形成および AMPA-R の機能を調節し、シナプス可塑性に役割を果たす中心的な分子である。

本研究では、まず、Phldb2 はスパインでの PIP<sub>3</sub> への反応を検討し、さらに Phldb2 が AMPA-R に関与するエンドサイトーシスの調節機構を解析し、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。

### 研究の内容および成果

以下の成果を得た。

(1) PIP<sub>3</sub> に応じ、スパインでの Phldb2 の局在が変化することを見い出した。Phldb2 は PIP<sub>3</sub> と高感

度に結合するが、スパインにおける PIP<sub>3</sub>-Phldb2 の機能は不明である。そこで、培養海馬神経細胞に GFP-Phldb2 発現ベクターを導入し、PIP<sub>3</sub> の減

少(PI3K 阻害剤である Ly294002 の投与)によりスパイン内に局在する GFP-Phldb2 の数が減少していることを観察した。

(2) PIP<sub>3</sub> がスパインに局在する Phldb2 の移動を制御することを見い出した。GFP-Phldb2 発現 vector を導入した海馬神経細胞において、蛍光回復法 (photobleaching 法) により GFP-Phldb2 のスパインへの樹状突起シャフトからの移動の動態を検討した。Ly294002 の投与群では GFP-Phldb2 の recovery が非投与群と比較して蛍光回復が遅れることが観察された。このことから、PIP<sub>3</sub> は Phldb2 のスパインへの移動を制御していることが考えられた。

(3) Phldb2 は AMPA-R の一種である GluR2 の局在および化学的 LTD 誘導後の GluR2 のエンドサイトーシスを制御することを見い出した。培養海馬神経細胞に HA-GluR2 を発現するベクターを導入し、樹状突起およびスパイン膜表面上における GluR2 の発現量の変化を検討した。GluR2 の発現量は HA を免染し、定量化した。野生型神経細胞と比較し、Phldb2 ノックアウト(Phldb2-KO)マウスの神経細胞では、膜表在 GluR2/総 GluR2 の発現が減少することを観察した。さらに、NMDA 処理により化学的 LTD をおこすと、膜表在 GluR2/総 GluR2 の発現の減少が野生型マウスに比較しにくいことを観察した。このことより、Phldb2-KO マウスにおいては、AMPA-R のエンドサイトーシスが阻害がされていると考えられた。すなわち、

Phldb2 は化学的 LTD の制御に関わるものと考えられた。

(4) Phldb2 が LTD の制御に関わることを見い出した。脳スライスを用いて電気生理学的に LTD を誘導して解析したところ、Phldb2-KO マウスでは LTD が起きにくいことを確認したことから Phldb2 がシナプス可塑性に重要な役割を果たしているものと考えられた。

(5) Phldb2 の GluR2 の局在変化および LTD への作用には PIP<sub>3</sub> が関わることを見い出した。培養海馬神経細胞に HA-GluR2 を発現するベクターを導入し、Ly294002 の投与により樹状突起およびスパイン膜表面上における GluR2 の発現量の変化を検討した。野生型神経細胞では Ly294002 処理により膜表在 GluR2/総 GluR2 の発現が減少したが、Phldb2-KO 神経細胞では有意な変化はみられなかった。さらに、脳スライスを用いて電気生理学的に LTD を誘導して解析したところ、Phldb2-KO マウスでは Ly294002 処理により LTD の変化が観察されなかった。よって、Phldb2 が PIP<sub>3</sub> に応じ、LTD への役割を果たしているものと考えられた。

以上のことより Phldb2 はスパインの AMPA 受容体のエンドサイトーシスおよび LTD の可塑性に関わり、なかでもシナプス後肥厚部の分子複合体を制御することで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。

## 本助成による主な発表論文等、特記事項および競争的資金・研究助成への申請・獲得状況

### 「発表論文」

Xie, M.-J., Yagi, H., Kuroda, K., Wang C.-C., Komada, M., Zhao, H., Sakakibara, A., Miyata, T., Nagata, K., Oka, Y., Iguchi, T. and Sato, M. WAVE2-Abi2 complex controls growth cone activity and regulates the multipolar-bipolar transition as well as the initiation of glia-guided migration. *Cereb. Cortex* 23:1410-23:2013.

本助成による成果発表は投稿する予定。

### 「学会発表」

謝 敏カク, 八木秀司, 猪口徳一, 岡 雄一郎, 黒田一樹, 柚崎通介, 松田信爾, 白尾智明, 石川保幸, 佐藤 真. Phldb2 は樹状突起スパインの成熟および化学的 LTD 誘導後のシナプスでの AMPA

受容体のエンドサイトーシスを制御する。Neuro2013, 2013, 6.

謝 敏カク。Phldb2 は AMPA 受容体のエンドサイトーシスおよび LTD を制御する。第 14 回 ORIGIN 神経科学研究会夏のワークショップ、2013, 8.

Xie, M.-J., Yagi, H., Iguchi, T., Oka, Y., Kuroda, K., Yuzaki, M., Matsuda, S., Shirao, T., Ishikawa, Y. and Sato, M. Phld2 regulates the maturation of dendritic spines and AMPA receptor endocytosis during long-term depression. Society For Neuroscience 2013, 2013, 11.