

シナプス可塑性における脂質関連分子の新たな役割の解明

研究代表者： 謝 敏カク (医学部・助教)

研究分担者： 深澤 有吾 (医学部・教授)

概 要	シナプス伝達効率を動的に制御 (シナプス可塑性) する仕組みは、学習記憶のモデルとして盛んに研究され、関連遺伝子やタンパク質の同定とその役割の理解が深まりつつある。一方、シナプス膜上に存在する脂質 (膜脂質) と各可塑性関連タンパク質との相互作用やそのシナプス可塑性における機能的役割については殆ど不明である。本研究では、膜脂質の一種ホスファチジルイノシトール (3, 4, 5) 三リン酸 (PIP ₃) と特異的に結合する Phldb2 (pleckstrin homology-like domain, family B, member 2) が、シナプスが形成されるスパインに PIP ₃ 依存的に局在し、グルタミン酸受容体のシナプス内係留とシナプス後肥厚タンパク質 (PSD)-95 の細胞内動態に関与することを突き止めた。また、Phldb2 欠損マウスの海馬 CA1 シナプスでは、長期抑制 (LTD) と長期増強 (LTP) の両方のシナプス可塑性が欠如していることも見出した。これらの知見は、シナプス可塑性における膜脂質 - タンパク質相互作用の重要性を提起し、その分子実体を明らかにした点で重要な発見である。
関連キーワード	Phldb2、シナプス、ノックアウトマウス、CaMKII

研究の背景および目的

シナプス伝達効率を動的 (シナプス可塑性) に制御する仕組みは、学習記憶をはじめとする脳の高次機能に深く関与している。シナプス伝達の大きさはシナプス後電流を通す AMPA 型グルタミン酸受容体 (AMPA-R) のシナプス内発現数に比例することが示され、AMPA-R のシナプスへの運搬と除去に関わる分子機構の解析がタンパク質を中心に進められてきた。しかし、膜脂質の役割については、まだ十分に解析が進んでいない。ホスファチジルイノシトールは、リン酸基の数と位置により、細胞膜上で起こる種々の機能発現を制御している。神経細胞においては、ホスファチジルイノシトール (3, 4, 5) 三リン酸 (PIP₃) が AMPA-R のシナプス後肥厚部上での発現調節に関与することが近年報告された (Arendt KL et al., Nature Neurosci, 2010)。しかし、PIP₃ と相互作用する分子の実体は明らかにされておらず、その詳細は不明である。

我々は、pleckstrin homology like domain (PH domain) を持ち PIP₃ に特異的に結合する Phldb2 (pleckstrin homology-like domain, family B, member 2、別名 LL5β, Takabayashi, T and Xie M-J

et al., J. Biol. Chem. 2010) の細胞移動における役割を研究する中で、Phldb2 が成熟した脳にも発現し、神経細胞の興奮性シナプスが形成される樹状突起スパインに PIP₃ 依存的に局在していることを見出した。Phldb2 ノックアウト (KO) マウスを作製して、シナプスと Phldb2 との関係を検討すると、未成熟なスパイン形態である、フィロポディアと thin 型スパインが増加し、AMPA-R を構成するサブユニットの 1 種、GluA2 の発現が細胞全体としても、膜上発現としても減少していることを突き止めた。また、NMDA 処理による化学的な長期抑制 (LTD) に伴って起こる細胞膜上 GluA2/総 GluA2 の低下が、Phldb2 KO マウスでは有意に低いことも見出した。これらの結果は、Phldb2 がシナプス内 AMPA-R 発現の調節に深く関与し、シナプス可塑性に重要な分子で有ることを強く示唆している。

そこで本申請課題では、Phldb2 のシナプス機能関連分子との相互作用を AMPA-R を中心に明らかにし、脂質-タンパク質相互作用によるシナプス可塑性調節機構の実体を明らかにすることを目的とした。

研究の内容および成果

(1) Phldb2 はシナプス可塑性の発現に重要

生後 3 週齢マウスの脳スライスを作製し、高頻度電気刺激による LTP 誘導と低頻度電気刺激によ

る LTD 誘導を海馬 CA1 シナプスを対象に行った。Ph1db2 KO マウスでは LTP また LTD の誘導が完全に阻害されていたことから、Ph1db2 はシナプス機能の増強と減弱の両方向、即ちシナプス可塑性発現そのものに必須であることが示唆された。

(2) Ph1db2 は AMPA-R 複合体を形成する

Cos 7 細胞に ph1db2 と GluA1、または GluA2 を発現導入し、Ph1db2 に対して免疫沈降すると、GluA1 と GluA2 の両方とも共沈されることから、Ph1db2 がこれら AMPA-R サブユニットに直接結合することが示唆された。

(3) Ph1db2 はシナプス膜表面における AMPA-R の発現密度の制御に関する

シナプス膜上の AMPA-R 発現に対する Ph1db2 の役割を検討するために、凍結切断レプリカ標識 (SDS-FRL) 法を用いた AMPA-R 発現の高解像度解析を行った。10 週齢マウスの海馬固定組織を急速高圧凍結し、凍結切断レプリカを作製した後、SDS 処理により膜タンパク質以外の分子を洗い流してから、AMPA-R に対する免疫金標識を行った。電子顕微鏡下で海馬 CA1 錐体細胞のシナプスを膜内粒子 (IMP) の集積を頼りに同定し、興奮性シナプス後膜の面積と AMPA-R 標識数を測定した。総 AMPA-R 標識と GluA1 標識のラベルの両方で、シナプス面積と標識数の有意な正の相関が見られ、これは ph1db2 KO マウスでも確認された。しかし、KO マウスでは、総 AMPA-R 標識、及び GluA1 標識の両方の標識密度が野生型マウスの標識密度に比べ有意に低いことが分かり、ph1db2 の欠損が、単一シナプスレベルにおける AMPA-R 発現密度の制御に関与することが明らかとなった。また、KO マウスに見られた標識密度の減少は、LTP の初期相に深く関与する GluA1 の標識密度で顕著であったことから、ph1db2 が AMPA-R 輸送機構の中でもシナプス可塑性に関わる機構に関与していることが強く示唆された。

(4) Ph1db2 は PSD-95 のスパイン内動態を制御する

脂質関連分子を介する新たな AMPA 型グルタミン酸受容体のシナプス集積機構の解明後肥厚部 (PSD) と呼ばれ、神経伝達物質受容体をはじめとす

る種々のシナプス機能分子が集積することで、機能的な分子複合体を形成している。興奮性シナプスでこの分子複合体形成に中心的な役割を担う分子 (足場タンパク質) PSD-95 のシナプス発現が Ph1db2 の制御下にあるかどうかを検討する目的で、培養海馬神経細胞の PSD-95 局在を、免疫染色法より比較検討した。その結果、KO マウスでは PSD-95 局在のピークがスパイン head の辺縁から樹状突起シャフトに移動していた。さらに、paGFP-PSD-95 の培養海馬神経細胞への発現誘導後の PSD-95 拡散動態解析で、PSD-95 の拡散が KO マウスで遅いことが判明した。これらのことから、Ph1db2 は PSD-95 のスパイン内局在および移動も制御していることが示唆された。

(5) Ph1db2 は NMDAR-CaMKII-AMPA 局在調節機構の形成維持に重要

興奮性シナプス伝達の可塑性は、NMDA 型グルタミン酸受容体 (NMDA-R) から流入する Ca^{2+} がカルモジュリンキナーゼ II (CaMKII) の活性化を誘導し、種々の AMPA-R シナプス局在制御関連タンパク質のリン酸化を制御することで誘導される。従って、NMDA-R-CaMKII 複合体の形成は、シナプス機能変化の方向性を問わず、シナプス可塑性の発現そのものに重要である。そこで、Ph1db2 の CaMKII との結合能を検討した結果、CaMKII に直接結合することを見出した。さらに、CaMKII と NMDA-R (NR2A, 2B, NR1) の複合体が、KO マウスで WT マウスに比べて顕著に減少していることを、培養神経細胞を用いた免疫沈降実験により明らかにした。これらの結果から、シナプス可塑性の発現そのものが KO マウスで障害された原因として、Ph1db2 の欠損により CaMKII がシナプスに運ばれず、NMDAR からの Ca^{2+} シグナルが AMPA-R に伝えられなくなったことが原因であると示唆された。

以上の研究結果から、Ph1db2 が膜脂質との相互作用を介してシナプス伝達関連タンパク質のシナプス集積を担う分子であり、シナプス可塑性の発現に必須な重要な分子であることを突き止めると同時に、シナプス可塑性のメカニズムの一端を明らかにした。

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」

Okamoto M, Iguchi T, Hattori T, Matsuzaki S, Koyama Y, Taniguchi M, Komada M, Xie MJ, Yagi H, Shimizu S, Konishi Y, Omi M, Yoshimi T, Tachibana T, Fujieda S, Katayama T, Ito A, Hirotsune S, Tohyama M, Sato M. DBZ regulates cortical cell positioning and neurite development by sustaining the anterograde transport of Lis1 and DISC1 through control of Ndel1 dual-phosphorylation. *J. Neurosci.* 18 · 35 · 2942-58 · 2015.

Yagi H, Oka Y, Komada M, Xie MJ, Noguchi K, Sato M. Filamin A interacting protein plays a role in proper positioning of callosal projection neurons in the cortex. *Neurosci. Lett.* 26 · 612:18-24, 2016

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、深澤有吾、松崎秀夫、岩田圭子、柚崎 通介、松田 信爾、石川 保幸、佐藤 真。Ph1db2 はシナプスの可塑性を制御する。第 38 回日本神経科学大会、2015, 7.

謝 敏カク、八木 秀司、猪口 徳一、岡 雄一郎、黒田 一樹、深澤有吾、松崎秀夫、岩田圭子、柚崎 通介、松田 信爾、石川 保幸、佐藤 真。膜脂質結合タンパク質 Ph1db2 を介した AMPA 受容体局在制御機構。第 121 回日本解剖学会総会・全国学術集会、2016, 3.