

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 1 日現在

機関番号：63905

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K18361

研究課題名(和文) シナプス形成に於けるN-カドヘリン内在化機構の解明

研究課題名(英文) Study for the mechanism of N-cadherin endocytosis in synapse

研究代表者

永岡 唯宏 (NAGAOKA, Tadahiro)

生理学研究所・生体機能調節研究領域・特別協力研究員

研究者番号：70634864

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、平面内細胞極性因子Vangl2によるシナプス接着分子Nカドヘリンの制御の分子機構を解明することを目的とした。正常な神経細胞ではNカドヘリンと後シナプスの主要な足場蛋白質であるPSD-95は相補的な局在を示すが、Vangl2の発現をshRNAで抑制させた神経細胞では、NカドヘリンとPSD-95の共局在が増加する異常が見られた。このことからVangl2が樹状突起においてPSD-95、Nカドヘリンの分布を制御している可能性が示唆された。また、シナプス形成に於いて、Vangl2によるNカドヘリンの制御の役割を遺伝学的に調べる過程で、その異常が二分脊椎を引き起こすことが判明した。

研究成果の概要(英文)：Planar cell polarity protein Vangl2 regulates cell surface expression level of N-cadherin at synapse. To resolve this mechanism is major object of this project. PSD-95 is scaffold protein of post synapse and is shown that complementary localization with N-cadherin in normal neuron. PSD-95 is known as the binding partner of Vangl2 and Vangl2 may responsible for stabilization of PSD-95 localization at the synapse. Because PSD-95 puncta density was decreased and its signal was diffused in dendrite in Vangl2 knockdown neuron. Furthermore, merged localization of PSD-95 and N-cadherin was increased abnormally in Vangl2 knockdown neuron. Therefore we suggested that Vangl2 may regulate proper compartmentalization of PSD-95 and N-cadherin. We also investigate genetic interaction between Vangl2 and N-cadherin and that caused neural tube closure defect.

研究分野：分子生物学

キーワード：カドヘリン 平面内細胞極性因子

1. 研究開始当初の背景

シナプス間細胞接着の調節は、シナプスの形成や神経伝達を司る最も重要な細胞生物学的要素の一つであり、結果的に我々の神経機能を規定する。従って、シナプス接着分子の制御機構を解析することは、脳機能や神経・精神疾患の分子基盤を理解する上で中心的な研究課題であると考えられる。申請者らは、平面内細胞極性を制御する因子 Vangl2 の神経細胞に於ける機能を解析する過程で、それがシナプス後肥厚部に存在し、シナプス接着分子 Nカドヘリンの直接的な結合因子として、そのエンドサイトーシスを制御することを明らかにした。具体的には Vangl2 と Nカドヘリンとの間の物理的、機能的な相互作用は β -カテニンや Vangl2 の結合分子である Prickle2 によって競合的に阻害され、逆に、N-カドヘリン/ β -カテニンの結合は、Vangl2 の過剰発現によって抑制される。細胞生物学的には、 β -カテニンが Nカドヘリンを細胞表面上に保持し、それに拮抗する形で Vangl2 が Nカドヘリンの内在化を促しているということが明らかになった。しかし、そのエンドサイトーシスの分子機構の詳細に関しては不明であり、この複合体のエンドサイトーシスを制御する新規の結合分子が存在する可能性がある。

2. 研究の目的

Nカドヘリンのエンドサイトーシスが Vangl2 によって促進されるという知見(図1)を基に、Nカドヘリン/Vangl2 複合体を

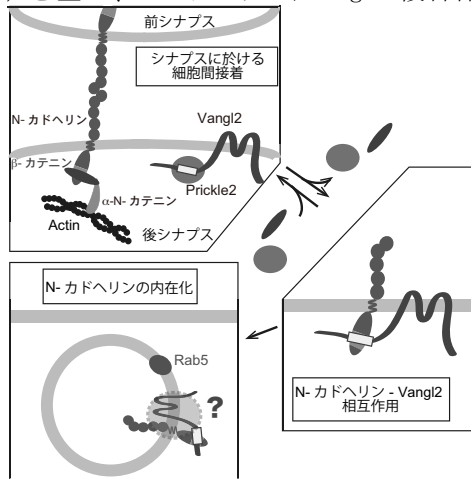


図1 N-カドヘリンと Vangl2 の相互作用は N-カドヘリンのエンドサイトーシスを促進する
構成する新規因子の同定やそれらの機能解析によって、Nカドヘリンの細胞内輸送、及びそれに依存するシナプス結合の調節機構を明らかにすることを目的とする。そこで、Nカドヘリン/Vangl2 複合体に含まれる分子群を同定し、その機能を解析する。また、その解析を通して、シナプス結合の強さやシナプスの可塑性が如何に制御されているのか、また、スパイン形成を含むシナプス形成の過程に Nカドヘリンの輸送がど

のように関わっているのか、その分子機構を解明していくことを目的としている。更に、シナプスに於ける Nカドヘリンの細胞内輸送に関わる分子群とその機能を明らかにすることによって、シナプス結合の強さやシナプスの可塑性が如何に制御されているのか、また、スパイン形成を含むシナプス形成の過程に Nカドヘリンの輸送がどのように関わっているのか、その分子機構を解明していくことが可能になるものと考えられる。

3. 研究の方法

(1) Nカドヘリン/Vangl2 複合体に含まれる分子群の同定

Nカドヘリン/Vangl2 複合体に含まれる Nカドヘリンのエンドサイトーシスを制御する因子を同定するために、この複合体を精製した。293T 細胞に FLAG-Vangl2 と HA-Nカドヘリンを遺伝子導入し、その細胞抽出物から抗 FLAG 抗体と抗 HA 抗体を用いて 2 段階の異なるアフィニティー精製を行い、溶出された蛋白質を電気泳動で分離後、銀染色を行って得られたバンドを切り出し、nano LC-MS/MS によって質量分析を行い、分子を同定した。さらに、FLAG-Vangl2 および HA-Nカドヘリンとの共免疫沈降により、同定された蛋白質に対する特異抗体で共沈が確認されるかどうかを調べた。

(2) シナプスに於いて Vangl2 が Nカドヘリン在化に果たす役割

Vangl2 は興奮性シナプスに於いて、その主要な足場蛋白質である PSD-95 や Prickle2 と相互作用することが知られる。Prickle2 は Nカドヘリンと Vangl2 との結合で競合することがわかっているので、これらの相互作用が変化することによってシナプス形成の機能が制御されていることが考えられる。そこで、より詳細にシナプスに於ける Vangl2 の役割を調べるために、これらシナプス構成分子の局在を、ラット海馬由来初代培養ニューロンで観察することにした。まず、ニューロンに GFP-Vangl2、GFP-Vangl2 変異体または Vangl2 shRNA を導入しシナプス成熟の見られる DIV23 まで培養し、Nカドヘリン、あるいは後シナプスマーカー PSD-95 で免疫蛍光染色を行った。また、Vangl2 と PSD-95、PSD-95 と Prickle2 が二者間で相互作用することは分かっていたが、3 分子で相互作用するかどうかは分からなかった。そこで、共免疫沈降法により 3 者が複合体を形成するかどうかを検討した。

4. 研究成果

(1) Nカドヘリン/Vangl2 複合体に含まれる分子群の同定

免疫沈降後の銀染色で得られたバンド(図2)から質量分析を行ったところ、3種類の蛋白質が同定された。293T細胞にFLAG-Vangl2、HA-Nカドヘリンを発現させてこれらの分子を免疫沈降した。そこに、この3種類の蛋白質が含まれるかどうかを、それらに対する特異抗体を用いたウェスタンブロットで調べたが、どの抗体でもシグナルを検出することができなかった。そこで、現在は、既知の結合分子の中に、Nカドヘリンのエンドサイトーシスを制御する分子があるかどうか検討するため、それらの発現プラスミドあるいはshRNAを作製し、Vangl2によるNカドヘリンのエンドサイトーシス促進に影響のある分子があるかどうかを検討している。

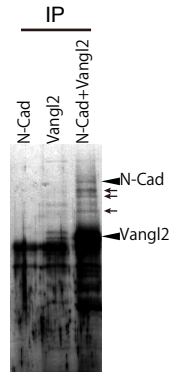


図2 銀染色

(2) シナプスに於いて Vangl2 が Nカドヘリン局在化に果たす役割

ラット海馬ニューロンに Vangl2 shRNAを導入して Vangl2 の発現を抑制させると、樹状突起スパインの密度が減少することは以前に発表した(Nagaoka et al., Cell Rep. 2014)。更に、研究を進めると、PSD-95 斑点の密度も減少することが分かった(図3)。更に、その

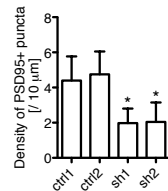


図3 Vangl2 knockdownにより PSD-95 密度は減少する

PSD-95 斑点のシグナルは正常細胞に比べて凝集度が分散していることが分かった(図4)。また、この PSD-95 密度の減少が PSD-95 と Vangl2 の相互作用が減少することに起因するものであるかどうかを調べるために、PSD-95 との相互作用が不全となる Vangl2 Δ ETSV 変異体をラット海馬由来初代培養ニューロンに強制発現させたところ、

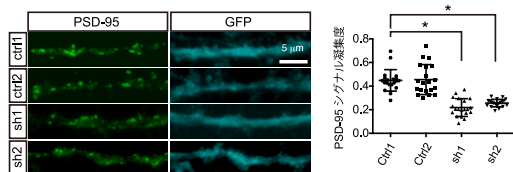


図4 Vangl2 の発現抑制は PSD-95 斑点のシグナルを分散させる

PSD-95 と共局在する Vangl2 変異体は、天然型と比べて減少することが分かったが、PSD-95 と Vangl2 変異体が共局在しているパンクタも多く観察された。また変異体の

導入による PSD-95 の密度やスパイン密度の減少といったドミナントネガティブな作用は見られなかった。これらのことからシナプス形成の制御に Vangl2 と PSD-95 の物理的相互作用はそれほど重要ではないように考察される。一方で、この実験では培養ニューロンに内在性の Vangl2 が発現することから、この内在性 Vangl2 によって正常な PSD-95 と Vangl2 の相互作用が維持されていることも考えられる。あるいは、後述するように、Vangl2 は PSD-95、Prickle2 と三者による複合体を形成する。Vangl2 Δ ETSV は Prickle2 とは結合できるため、この三者の複合体は維持されている可能性もある。このことから、今後はゲノム編集等により Vangl2 や Prickle2 をノックアウトしたニューロンを用いて、これらに野生型 Vangl2 や Vangl2 変異体を導入し PSD-95 の密度が回復するかどうかを検討することによって、PSD-95 と Vangl2 の相互作用がシナプス形成に重要であるかどうかを明らかにしていきたいと考えている。

一方、PSD-95 と Nカドヘリンを共染色したところ、正常ニューロンではこれらが相補的な局在を示すのに対し、Vangl2 shRNAを導入したニューロンでは、正常細胞ではほとんど見られない PSD-95 と Nカドヘリンの共局在の有意味な増加が観察された(図5)。

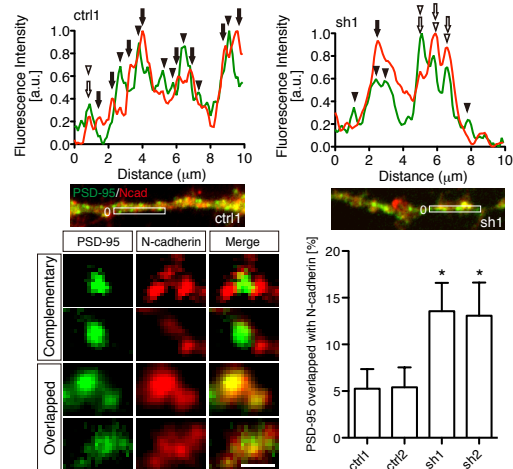


図5 Vangl2 knockdown は PSD-95 と Nカドヘリンの局在を変化させる

電子顕微鏡による観察によると、興奮性シナプスの後部ではシナプス伝達を司る PSD 領域は Nカドヘリンによる細胞接着領域に囲まれていて、それぞれは分画されている(Uchida et al., J Cell Biol, 1996)。我々の観察は Vangl2 のノックダウンによって PSD-95 と Nカドヘリンの局在異常が生じることを明らかにしたが、このことは Vangl2 が PSD-95 (PSD 領域) と細胞接着領域の正常な分画化、すなわち正常なシナプス構造の形成に重要な役割を果たしていることを示唆している。

また、Vangl2 は Prickle2 (Jenny et al., EMBO J, 2003)、PSD-95 (Yoshioka et al.,

FEBS Lett, 2013; Nagaoka et al., Cell Rep, 2014)とそれぞれ相互作用し、PSD-95はPrickle2 (Hida et al., J Biochem, 2011)と結合することが報告されているが、これらの3者が複合体を作りうるか否かについては不明であった。そこで、これらの発現遺伝子を293T細胞に導入して共免疫沈降実験を行ったところ、Prickle2とPSD-95の二者間の相互作用は比較的弱いことが示唆されたが、ここにVangl2が加わると3者で強固な複合体を形成することが分かった(図6)。このことから、Vangl2は

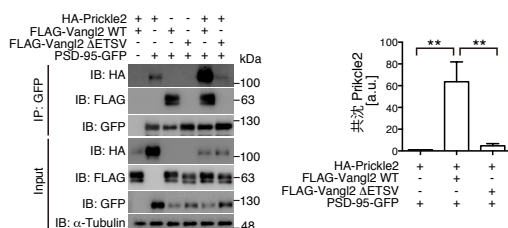


図6 Vangl2はPSD-95/Prickle2複合体を安定化させる

PSD-95/Prickle2複合体を安定化させると考えられる。

これらの結果から、Vangl2はシナプスに於いて、Nカドヘリンのエンドサイトーシスに関与し、シナプス接着を制御し、更にPSD-95とPrickle2と安定な複合体を形成してPSD領域の安定化にも関与することが予想されるが(図7)、この証明には更に研究が必要である。また、Nカドヘリン/Vangl2のエンドサイトーシスについては、今後も研究を進め、その制御分子を特定したいと考えている。更に、我々はVangl2; Nカドヘリン変異マウスが神経管閉鎖不全を起こすことを見出し、この相互作用がシナプス以外に於いても生理的な意味をもつことが示唆された。

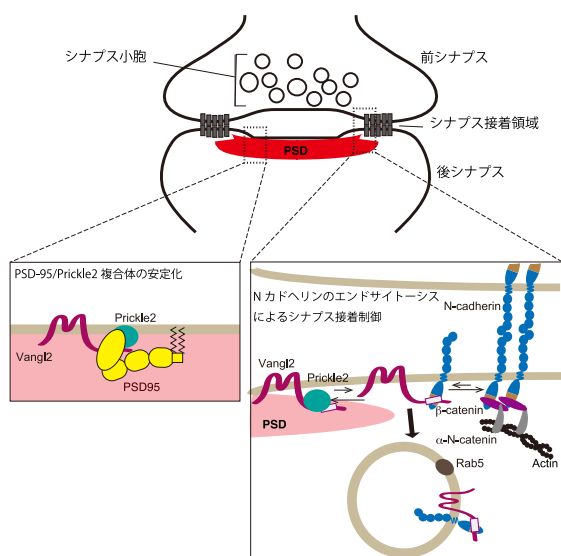


図7 シナプスに於いて予想されるVangl2の役割

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 2 件)

1. Tadahiro Nagaoka, Masashi Kishi; The planar cell polarity protein Vangl2 is involved in postsynaptic compartmentalization. *Neuroscience Letters*, 612: 251-255 (2016) doi. 10.1016/j.neulet.2015.12.009 査読有り
2. Tadahiro Nagaoka, Katsuhiko Tabuchi, Masashi Kishi; PDZ interaction of Vangl2 links PSD-95 and Prickle2 but plays only a limited role in the synaptic localization of Vangl2; *Scientific Reports*, 5, 12916 (2015) doi. 10.1038/srep12916 査読有り

[学会発表] (計 3 件)

1. Tadahiro Nagaoka, Masashi Kishi; Role of Planar Cell Polarity Protein Vangl2 in Synapse Formation. The 47th NIPS International Symposium "Decoding Synapses", 2016年10月27日, 岡崎コンファレンスセンター, 愛知県岡崎市
2. Tadahiro Nagaoka, Masashi Kishi; Role of planar cell polarity protein Vangl2 in synapse formation. 2015 cell biology ASCB annual meeting, 2015年12月15日, San Diego, CA, USA
3. Masashi Kishi, Tadahiro Nagaoka; Planar Cell Polarity in the Neural Circuit, 第38回日本分子生物学会年会, 第88回日本生化学会大会合同大会, 2015年12月3日, 神戸ポートアイランド, 兵庫県神戸市

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

○取得状況 (計 0 件)

名称:
発明者:

権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

永岡 唯宏 (NAGAOKA, Tadahiro)
生理学研究所・生体機能調節研究領域・特別協力研究員
研究者番号：70634864

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：

(4)研究協力者

()