

令和 2 年 5 月 27 日現在

機関番号：12612

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K07048

研究課題名(和文) TARPのリン酸化によるAMPA受容体輸送の制御機構

研究課題名(英文) Regulation of AMPA receptor trafficking by the phosphorylation of TARP

研究代表者

松田 信爾 (Matsuda, Shinji)

電気通信大学・大学院情報理工学研究科・准教授

研究者番号：60321816

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：AMPA型グルタミン酸受容体(AMPA受容体)の副サブユニットであるTransmembrane AMPA receptor Regulatory Protein (TARP)には9つのリン酸化されるセリン残基が存在し、これらのリン酸化パターンによってAP-1, AP-2, AP-3, SNX-17といった細胞内輸送にかかわるタンパク質との相互作用が制御されていることが明らかになった。

さらにAMPA受容体のエンドサイトーシスを光により制御する技術の開発にも成功し、小脳における代表的なシナプス可塑性である長期抑圧と運動学習との因果関係を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

AMPA受容体の細胞内輸送はシナプス可塑性の分子実体であり、そのメカニズムの解明は神経科学分野の重要課題の一つである。今回、AMPA受容体の副サブユニットであるTARPのリン酸化のパターンによって結合するタンパク質が変化することが明らかになった。このことは神経細胞内でのAMPA受容体の輸送制御機構の一端を解明するものであり、シナプス可塑性の分子機構の解明に大きく寄与すると考えられる。

また、光によってAMPA受容体のエンドサイトーシスを制御する技術を用いて運動学習と小脳長期抑圧との因果関係を明らかにした。この技術は他の脳領域での長期抑圧の意義を解明するためにも有用である。

研究成果の概要(英文)：The Auxiliary subunit of AMPA type glutamate receptor (AMPA receptor), Transmembrane AMPA receptor regulatory Protein (TARP), contains 9 serine residues which can be phosphorylated. We clarified that the affinity of TARP to AP-1, AP-2, AP-3 and SNX17 can be regulated by the phosphorylation pattern of these serine residues.

We also generated the optogenetic tool, PhotonSABER, which can regulate the endocytosis of AMPA receptor in a light dependent manner. By using knock in mice which express the PhotonSABER specifically in cerebellar Purkinje cell, we clarified the inhibition of AMPA receptor endocytosis by light stimulation blocked one kind of motor learning. These results indicated that the endocytosis of AMPA receptor directly contribute to the learning and memory.

研究分野：神経科学

キーワード：AMPA受容体 TARP リン酸化 細胞内輸送 長期抑圧 オプトジェネティクス 運動学習

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

シナプス可塑性は、記憶・学習の細胞レベルでの基盤である可能性が考えられており、その分子機構が盛んに研究されてきている。その結果、シナプス可塑性の分子実体はエンドサイトーシスやエキソサイトーシス等の細胞内輸送による細胞表面の AMPA 型グルタミン酸受容体 (AMPA 受容体) の数の変化であることが明らかになった。一方この細胞内輸送の制御機構については不明な点が多い。AMPA 受容体 - TARP (Transmembrane AMPA receptor Regulatory Protein) 複合体のような膜タンパク質は細胞内輸送のためにアダプタータンパク質等、様々な輸送関連タンパク質と結合することが必要である。しかし、シナプス可塑性の誘導時にどのような輸送タンパク質と結合するのかは申請者自身が報告した研究を除いてほとんど解明されていない。申請者は長期抑圧誘導時の AMPA 受容体エンドサイトーシスの分子機構を明らかにしてきた。基底状態ではリン酸化されている TARP が長期抑圧誘導刺激により脱リン酸化されるとアダプタータンパク質の 1 つである AP-2 に結合できるようになる。これにより AMPA 受容体 - TARP 複合体が効率的にクラスリン被覆ピットに取り込まれ、エンドサイトーシスにより初期エンドソームへと輸送される。その後、別のアダプタータンパク質である AP-3 に結合して後期エンドソーム・リソソームに運ばれることにより、長期にわたって細胞表面の AMPA 受容体の数が減少し、長期抑圧が引き起こされることを明らかにした。一方、長期抑圧はシナプス可塑性の一形態に過ぎない。もう一つの代表的なシナプス可塑性である長期増強、長期抑圧状態が解除される de-depression あるいは長期増強状態が解除される de-potentialization といった現象も知られている。これらのシナプス可塑性が正常に引き起こされるためには AMPA 受容体輸送の精密な制御が必要となると考えられるが、その詳しいメカニズムは明らかにされていない。申請者は予備実験により TARP が AP-2, 3 のみならず、いくつかの輸送関連タンパク質とリン酸化依存的に結合することを見出した。さらに TARP には 9 つのリン酸化されるセリン残基があり、様々なタンパク質との相互作用を精緻に制御しうると考えられる。これらの事実から、AMPA 受容体 - TARP 複合体と様々な輸送制御タンパク質との結合がリン酸化により精密に制御され、シナプス可塑性の分子実体となっている可能性があると考え本申請研究を立案した。

2. 研究の目的

シナプス可塑性は記憶や学習といった高次脳機能の細胞レベルの基盤の可能性が指摘されており、その分子機構の解明は神経科学分野の最重要課題の 1 つである。シナプス可塑性の分子実体は AMPA 受容体の細胞内輸送制御であることが明らかになっている。本申請研究ではこの AMPA 受容体の細胞内輸送の制御機構を、AMPA 受容体の副サブユニットである TARP と様々な輸送制御タンパク質群との間のリン酸化によって制御されるダイナミックな相互作用という視点から解明し、シナプス可塑性の全体像を明らかにする。さらにシナプス可塑性が阻害された遺伝子改変マウスを用いて、個体レベルの記憶・学習の分子メカニズムを明らかにしていくことを目的としていた。

3. 研究の方法。

TARP と SNX17、AP-1、synt7 との結合が TARP のリン酸化状態によってどのように制御されるかを GST-TARP 融合タンパク質を用いた pull-down 法、免疫沈降法を用いた解析を行った。さらに TARP と輸送タンパク質との結合の生理学的意義については、海馬神経細胞に変異 TARP や siRNA を導入し、AMPA 受容体の細胞内輸送にどのような影響が出るのかも解析した。またシナプス可塑性の一つである長期抑圧を光により阻害する技術を開発し、これを用いて

長期抑圧と小脳学習との関係性を直接的に解析した。もう一つの代表的なシナプス可塑性である長期増強の光制御技術の開発にも着手した。

4．研究成果

研究期間中に TARP の 9 つのリン酸化部位を様々な組み合わせでアスパラギン酸、あるいはアラニンに置換した変異 TARP を GST 融合タンパク質として精製し、これが SNX17 に結合するか否かを解析した。同様に TARP と AP-1 そして AP-2, AP-3 との結合がリン酸化によってどのような影響を受けるかを解析した。その結果、AP-1 と TARP の結合に必要なセリン残基の脱リン酸化のパターンが AP-2、AP-3、そして SNX17 との間で異なることが明らかになった。

また、光によって AMPA 受容体の輸送を制御する新しい光制御ツール PhotonSABER を開発し、小脳プルキンエ細胞における AMPA 受容体のエンドサイトーシスがと運動学習との関連性を直接的に解析した。PhotonSABER を小脳プルキンエ細胞に特異的に発現するノックインマウスを作製し、このマウスから小脳切片を作製した。光刺激を与えていない状態で特定の電気刺激をプルキンエ細胞に与えると正常に長期抑圧が誘導されたが、同様の刺激を光照射と共にあたえると長期抑圧は誘導されなかった。さらにこれらのマウスの運動学習も光照射によって阻害された。この研究はシナプス可塑性と学習との関係性を直接的に解明したものであり、高い評価を得ている。小脳長期抑圧と運動学習の因果関係については、実験系によって異なる結果が報告されており、長い間結論のでない問題でもあった。この原因は一般的な遺伝子改変動物などを用いると代償作用の影響が出てしまうことにもあったと考えられる。今回開発した方法は光により学習タスクを与えているときにのみ長期抑圧が阻害できるため、代償作用の影響を大きく抑えられ上記の議論の最終的な回答であると考えている。現在、もう一つの代表的なシナプス可塑性である長期増強についても細胞レベルで制御することにまでは成功しており、遺伝子改変マウスの作成を行っているところである。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kakegawa Wataru, Katoh Akira, Narumi Sakae, Miura Eriko, Motohashi Junko, Takahashi Akiyo, Kohda Kazuhisa, Fukazawa Yugo, Yuzaki Michisuke, Matsuda Shinji	4. 巻 99
2. 論文標題 Optogenetic Control of Synaptic AMPA Receptor Endocytosis Reveals Roles of LTD in Motor Learning	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Neuron	6. 最初と最後の頁 985 ~ 998.e6
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) http://doi.org/10.1016/j.neuron.2018.07.034	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Matsuda Shinji, Kakegawa Wataru, Yuzaki Michisuke	4. 巻 12
2. 論文標題 PhotonSABER: new tool shedding light on endocytosis and learning mechanisms in vivo	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Communicative & Integrative Biology	6. 最初と最後の頁 34 ~ 37
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.1080/19420889.2019.1586048	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Shinji Matsuda
2. 発表標題 New optogenetic tool clarified that the cerebella LTD was essential for motor learning
3. 学会等名 FAOPS2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Shinnosuke Kohara, Shinji Matsuda
2. 発表標題 MMP-9 activity is required for the NMDA induced endocytosis of AMPA receptor
3. 学会等名 FAOPS2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----