

令和 2 年 6 月 8 日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K07082

研究課題名(和文) BRAG2-Arf6シグナル経路による新たなシナプス可塑性制御機構の解明

研究課題名(英文) Novel regulatory mechanisms of the synaptic plasticity by BRAG2-Arf6 signaling pathway

研究代表者

深谷 昌弘 (Fukaya, Masahiro)

北里大学・医学部・准教授

研究者番号：10360900

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、新規BRAG2結合分子であるPSD-95とendophilin 3に着目し、シナプス可塑性発現時に、BRAG2-Arf6経路を介したAMPA受容体の輸送調節機構の解明を目的として研究を行った。その結果、PSD-95によるBRAG2の局在制御機構と、BRAG2とendophilin 3との相互作用が、mGluR刺激によるシナプス可塑性誘導時に、Arf6活性の増加を伴い、AMPA受容体のシナプス表面発現量変化の制御に重要であることを明らかにした。本研究によって、BRAG2-Arf6シグナル経路による興奮性シナプスの可塑性調節機構の一端を解明することができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、興奮性シナプス後部に局在するBRAG2の機能的役割を、エンドサイトーシス関連分子のendophilin 3との相互作用機能とともに、シナプス可塑性発現の実態であるAMPA受容体の細胞表面発現量を指標にして、新たなAMPA受容体輸送機構の分子機序となるシナプス可塑性の一端を解明できた点において学術的意義があると考えられる。また、記憶や学習などの高次脳機能の新たな機序の解明の一助となり、精神・神経疾患病因解明の基礎となると考えられる。

研究成果の概要(英文)：In this study, I focused on novel BRAG2-binding molecules, PSD-95 and endophilin 3, for the purpose of elucidating the regulatory mechanisms of AMPA receptor surface expression by BRAG2-Arf6 signaling pathway during synaptic plasticity. As a result, the interaction between BRAG2 and PSD-95 was involved in the postsynaptic localization mechanism of BRAG2. The interaction between BRAG2 and endophilin 3 played an indispensable role in synaptic surface expression of AMPA receptors with an increase in Arf6 activity during mGluR-stimulated synaptic plasticity. This study has elucidated novel regulatory mechanisms of the synaptic plasticity at excitatory synapses by BRAG2-Arf6 signaling pathway.

研究分野：神経解剖学

キーワード：シナプス可塑性 AMPA受容体 エンドサイトーシス BRAG2 Arf6

## 1. 研究開始当初の背景

低分子量 GTP 結合タンパク質である Arf6 は、細胞膜とエンドゾーム間の小胞輸送を制御し、細胞膜表面の細胞接着分子の発現量を調節していることが知られている (Palacios et al., Nature Cell Biol, 2002)。中枢神経系においても、この Arf6 経路が、発達期の神経細胞の移動や神経突起の伸展分岐、神経伝達物質受容体の細胞表面発現調節に重要な役割を果たしていることが明らかになってきている。中でも、Arf6 の活性制御因子である BRAG (Brefeldin A resistant Arf-GEF) ファミリー分子の重要性が指摘されている。近年、BRAG1 の IQ-like モチーフもしくは酵素活性を持つ Sec7 ドメインでのアミノ酸変異によって、非症候群性の知的障害を引き起こすことがヒトで報告されている (Shoubridge et al., Nature Genetics, 2010)。このことは、Arf6 シグナル経路が脳の発達および記憶や学習といった高次脳機能に密接に関与していることを示している。さらに、BRAG ファミリー分子である BRAG2 が興奮性シナプスにおいて AMPA 型グルタミン酸受容体 (AMPA 受容体) に直接結合して、膜上の AMPA 受容体発現量調節を介した長期抑圧 (LTD) に関与していることが、電気生理学的解析から示唆された (Scholz et al., Neuron, 2010)。また、BRAG2 はプロテオミクス解析によって、マウスの加齢に伴う認知機能低下と相関して発現量が変化する分子の一つであることが報告されている (Ottis et al., PLOS ONE, 2013)。これらの報告は、BRAG2-Arf6 シグナル経路が、記憶や学習といった高次脳機能発現の基盤となるシナプス可塑性発現調節の一端を担っていることを示している。しかしながら、実際に興奮性シナプスにおいて BRAG2 がどのような分子ネットワークを形成して、どのような分子機構で興奮性シナプスの形成や可塑性、さらには高次脳機能に関わっているのかは不明点が多く、解明が待たれる重要なシグナル伝達系路となっている。

## 2. 研究の目的

近年、興奮性シナプス後部の PSD-95 複合体のプロテオミクス解析から、シナプス可塑性に関与する分子とともに BRAG2 が高い割合で検出されている (Dosemeci et al., Molecular & Cellular Proteomics, 2007)。また、我々の研究グループでは、特異抗体を用いた包埋後免疫電子顕微鏡解析から、BRAG2 が興奮性シナプス後肥厚部 (PSD) 内部に選択的に局在することを明らかにしている (図 1)。さらに、酵母ツーハイブリッド解析から、BRAG2 が PSD の主要な足場タンパク質である PSD-95 およびクラスリン依存的なエンドサイトーシスに重要な役割を果たす分子である endophilin 3 と直接結合することを発見した。これらの自己所見と既知の報告されている知見から、次のような作業仮説を導いた (図 2 参照)。

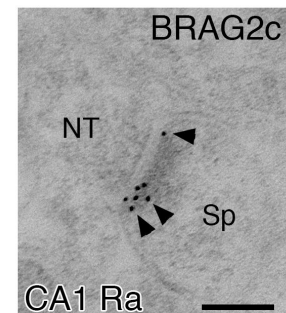


図1. 興奮性シナプス後部に集積するBRAG2 (矢頭)。

(1) BRAG2 は、PSD-95 と相互作用することによって選択的に興奮性シナプスの PSD に局在している。

(2) BRAG2 は、エンドサイトーシスに重要な endophilin 3 と神経活動依存的に相互作用し、AMPA 受容体のエンドサイトーシスの調節を行い、シナプス可塑性 (LTD) の制御に関与している。

(3) BRAG2 は、PSD-95 とも相互作用する synGAP と同様にシナプス可塑性発現時に刺激依存的にスパイン内部でダイナミックに集積や離散をしてエンドサイトーシスを制御し、スパインや PSD の大きさの変化にも影響を与えている。

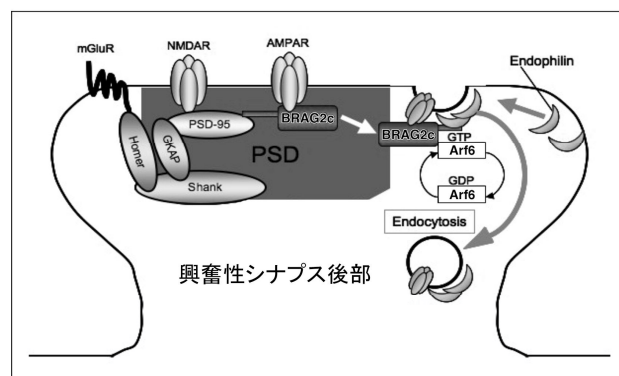


図2. 興奮性シナプス後部でのBRAG2とendophilinとの相互作用を介したAMPA型グルタミン酸受容体のエンドサイトーシス制御モデル。

本研究課題では、これらの仮説を検証することを目的として、分子解剖学および生化学的解析手法、さらにライブセルイメージング手法を駆使して研究を行った。

## 3. 研究の方法

### (1) BRAG2 の PSD-95 との相互作用による局在制御機構

これまで BRAG2 の C 末領域をベイトとして酵母ツーハイブリッド法によって単離した BRAG2 結合分子のうち、PSD-95 に着目し、それぞれの結合責任領域を酵母ツーハイブリッド法によ

て確定する。その結合領域を欠損した BRAG2 変異分子を海馬培養神経細胞に発現させ、BRAG2 変異分子の局在を解析し、PSD-95 と BRAG2 の相互作用の重要性を明らかにする。また、免疫沈降法によって、BRAG2 と PSD-95 の相互作用を確認する。

#### (2) BRAG2 と endophilin 3 の相互作用領域の決定

BRAG2 の C 末端領域と相互作用する分子として単離された endophilin 3 は細胞膜を湾曲させるための BAR ドメイン、さらにプロリンリッチ領域との結合が知られる SH3 ドメインを有している。一方、BRAG2 の C 末領域にはプロリンリッチ領域が多く存在するため、各プロリンリッチ領域をアラニンに置換した変異体で相互作用責任配列を同定する。また、HeLa 細胞の強制発現系を用いた免疫沈降法でも、BRAG2 と endophilin 3 との相互作用を確認するとともに、脳の抽出液を用いた免疫沈降法も行い、生体内における相互作用を確認する。

#### (3) mGluR 刺激によるシナプス可塑性(LTD)誘導時の BRAG2 ノックダウン法による AMPA 受容体のシナプス表面発現量変化の解析

BRAG2 を特異的にノックダウンする shBRAG2 ベクターを海馬培養神経細胞に導入し、LTD 様のシナプス可塑性を誘導する代謝型グルタミン酸受容体(mGluR)のアゴニストである DHPG を添加して、BRAG2 がノックダウンされた神経細胞での AMPA 受容体の細胞表面発現量を AMPA 受容体細胞外領域特異的に認識する抗体を用いて定量化し、LTD 発現時と同様な AMPA 受容体の表面発現量低下が BRAG2 ノックダウンで消失するかを検証する。これらの解析から LTD 発現時の BRAG2 の重要性を検証できる。また、DHPG 処理に伴って発現量が増加することが知られている Arc とともに BRAG2 や Arf6, endophilin 3 の発現量変化の有無を確認する。

#### (4) LTD 誘導時の BRAG2 と endophilin 3 の相互作用の役割および活性化型 Arf6 の変化量の生化学的解析

海馬培養神経細胞の DHPG 処理による LTD 発現時に、BRAG2 の野生型、endophilin 3 との結合部位変異型、PSD-95 との結合部位欠損変異型をそれぞれ shBRAG2 ベクターと同時に導入して、BRAG2 の機能回復実験を行う。これらの実験から BRAG2 と endophilin 3 および PSD-95 との相互作用がシナプス可塑性発現時に重要な役割を果たしているかを検証できる。また、これと同時に DHPG 処理に伴う活性化型 Arf6 の増減を GGA3-GST によるプルダウンアッセイで定量化し、シナプス可塑性誘導時の Arf6 シグナル経路の活性化状態を明らかにする。さらに、BRAG2 と endophilin 3 の相互作用自体が BRAG2 による Arf6 の活性化を促進しているかどうかを HeLa 細胞に同時に BRAG2 と endophilin 3, Arf6 を発現させて、Arf6 の活性化を定量することによって明らかにする。

#### (5) LTD 誘導時の BRAG2 およびスパインのライブセルイメージングによる動態の解析

海馬培養神経細胞の DHPG 処理による LTD 誘導時に、BRAG2 がスパイン内部もしくは樹状突起内部においてダイナミックに移動しているかどうかを検証するために、EGFP 標識した BRAG2 もしくは PSD-95 を発現させた海馬培養神経細胞のライブセルイメージングを行う。ライブセルイメージングでは倒立型共焦点レーザー顕微鏡のステージに、温度、酸素および二酸化炭素濃度を一定に保つ培養装置を装着させてイメージングを行い、DHPG 添加によって LTD を誘導した後に経時的にイメージングを行う。LTD の誘導に伴って BRAG2 および PSD-95 のスパインおよび樹状突起内部での蛍光強度の変化を定量するとともに mCherry で細胞全体を可視化し、スパインの大きさや形の動態も観察する。

### 4. 研究成果

#### (1) BRAG2 の PSD-95 との相互作用による局在制御機構

酵母ツーハイブリット法によって、BRAG2 の C 末端の PDZ 結合領域が PSD-95 の PDZ2 領域が強く結合することが明らかとなった。PSD-95 結合領域欠損変異体の BRAG2 と PSD-95 の培養海馬神経細胞での強制発現解析を行ったところ、野生型の BRAG2 はスパイン内部に局限した局在パターンを示した。一方で、PSD-95 結合領域欠損変異体の BRAG2 では、スパインでの限局的な局在は観察されず、樹状突起にも均一に分布していた。また、免疫沈降法でも BRAG2 と PSD-95 の相互作用を確認した。これらの結果から、シナプス後部における BRAG2 の局在は、PSD-95 との相互作用によって制御されていることが明らかとなった。この解析は、AMPA 受容体表面発現量解析に用いた、BRAG2 の endophilin 3 との結合部位を欠損した変異体や、酵素活性部欠損変異体など様々な変異体の局在の正常性を示す手法としてとても有効であった。

#### (2) BRAG2 と endophilin 3 の相互作用領域の決定

酵母ツーハイブリッド法による BRAG2 と endophilin 3 の相互作用責任領域の解析を行ったところ、BRAG2 のプロリンリッチ領域と endophilin 3 の SH3 領域が相互作用に重要であることを明らかにした。また、免疫沈降法でも、BRAG2 と endophilin 3 との相互作用を確認した。さ

らに, endophilin 3 との相互作用に重要な BRAG2 のプロリンリッチ領域の欠損変異体も作成し、後の AMPA 受容体表面発現量解析にも応用した。

### **(3) mGluR 刺激によるシナプス可塑性(LTD)誘導時の BRAG2 ノックダウン法による AMPA 受容体のシナプス表面発現量変化**

培養海馬神経細胞を用いて mGluR 刺激によるシナプス可塑性(LTD)誘導時の BRAG2 ノックダウン法による AMPA 受容体のシナプス表面発現量変化の解析を行ったところ、BRAG2 がノックダウンされていると mGluR 刺激によって誘導される AMPA 受容体のシナプス表面発現量の減少が、抑制されることが明らかとなった。さらに、shRNA 耐性変異体の野生型 BRAG2 を共発現させることによって、機能回復実験も成功した。また、DHPG 処理に伴って Arc の発現量増加が観察されたが、BRAG2 や Arf6, endophilin 3 の発現量の変化は認められなかった。これらの結果は、海馬シナプス可塑性の LTD 時に、BRAG2 が短期的な発現量の変化を伴わずに重要な役割を果たしていることを示唆している。

### **(4) LTD 誘導時の BRAG2 と endophilin 3 の相互作用の役割および活性化 Arf6 の変化**

培養海馬神経細胞を用いて、LTD 誘導時の BRAG2 ノックダウンとともに様々な BRAG2 変異体を用いた機能回復実験を行った結果、野生型 BRAG2 では機能回復できた一方で、endophilin 3 との相互作用を欠損した変異体と PSD-95 との相互作用を欠損した変異体では、BRAG2 の機能回復はできなかった。また、mGluR 刺激による LTD 誘導時に、BRAG2 と endophilin 3 との結合量が増加すること、それに伴って Arf6 の活性化が上昇することを明らかにした。これらの結果から、興奮性シナプス後部において BRAG2 が endophilin 3 および PSD-95 との相互作用を介してシナプス可塑性を調節することが示唆された。これらのことは、海馬神経細胞のシナプス可塑性の BRAG2-Arf6 経路による endophilin 3 を介した新たな制御機構の存在を示している。

### **(5) LTD 誘導時の BRAG2 およびスパインのライブセルイメージングによる動態**

海馬培養神経細胞のライブセルイメージングによって、LTD 誘導時の蛍光標識 BRAG2 の動態を観察した結果、LTD 誘導に伴ってスパインの大きさは縮小するものが多い一方で、BRAG2 の蛍光強度は一部減少するものもあったが、一定の強度を保つスパインが多く観察された。この BRAG2 のイメージング手法は、今後の BRAG2 以外の Arf6 の GEF によるシグナル経路のシナプス可塑性解析に応用できる。

以上の結果から、海馬神経細胞の BRAG2 が endophilin 3 と PSD-95 との相互作用を介して、mGluR 刺激依存的に AMPA 受容体の輸送を調節するとともに、記憶や学習などの高次脳機能の基盤となっているシナプス可塑性の制御に寄与していることが示唆された。本研究によって、BRAG2-Arf6 シグナル経路による興奮性シナプスの可塑性制御機構の一端を解明することができた。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Fukaya Masahiro, Sugawara Takeyuki, Hara Yoshinobu, Itakura Makoto, Watanabe Masahiko, Sakagami Hiroyuki	4. 巻 40
2. 論文標題 BRAG2a Mediates mGluR-Dependent AMPA Receptor Internalization at Excitatory Postsynapses through the Interaction with PSD-95 and Endophilin 3	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The Journal of Neuroscience	6. 最初と最後の頁 4277 ~ 4296
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1523/JNEUROSCI.1645-19.2020	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 Ibuchi Kanta, Fukaya Masahiro, Shinohara Tetsuro, Hara Yoshinobu, Shiroshima Tomoko, Sugawara Takeyuki, Sakagami Hiroyuki	4. 巻 -
2. 論文標題 The Vps52 subunit of the GARP and EARP complexes is a novel Arf6-interacting protein that negatively regulates neurite outgrowth of hippocampal neurons	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Brain Research	6. 最初と最後の頁 146905 ~ 146905
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.brainres.2020.146905	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 Saegusa Shintaro, Fukaya Masahiro, Kakegawa Wataru, Tanaka Manabu, Katsumata Osamu, Sugawara Takeyuki, Hara Yoshinobu, Itakura Makoto, Okubo Tadashi, Sato Toshiya, Yuzaki Michisuke, Sakagami Hiroyuki	4. 巻 14
2. 論文標題 Mice lacking EFA6C/Psd2, a guanine nucleotide exchange factor for Arf6, exhibit lower Purkinje cell synaptic density but normal cerebellar motor functions	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0216960	査読の有無 有
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 -

1. 著者名 Hara Yoshinobu, Fukaya Masahiro, Sugawara Takeyuki, Sakagami Hiroyuki	4. 巻 48
2. 論文標題 FIP 4/Arfophilin 2 plays overlapping but distinct roles from FIP 3/Arfophilin 1 in neuronal migration during cortical layer formation	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 European Journal of Neuroscience	6. 最初と最後の頁 3082 ~ 3096
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/ejn.14199	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 Ito Akiko, Fukaya Masahiro, Saegusa Shintaro, Kobayashi Emi, Sugawara Takeyuki, Hara Yoshinobu, Yamauchi Junji, Okamoto Hirotsugu, Sakagami Hiroyuki	4. 巻 147
2. 論文標題 Pallidin is a novel interacting protein for cytohesin-2 and regulates the early endosomal pathway and dendritic formation in neurons	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Neurochemistry	6. 最初と最後の頁 153 ~ 177
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jnc.14579	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 Gonzalez-Fernandez Estibaliz, Jeong Hey-Kyeong, Fukaya Masahiro, Kim Hyukmin, Khawaja Rabia R, Srivastava Isha N, Waisman Ari, Son Young-Jin, Kang Shin H	4. 巻 7
2. 論文標題 PTEN negatively regulates the cell lineage progression from NG2+ glial progenitor to oligodendrocyte via mTOR-independent signaling	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 eLife	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.7554/eLife.32021	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 該当する

1. 著者名 Sakagami Hiroyuki, Katsumata Osamu, Hara Yoshinobu, Sasaoka Toshikuni, Fukaya Masahiro	4. 巻 58
2. 論文標題 BRAG2a, a Guanine Nucleotide Exchange Factor for Arf6, Is a Component of the Dystrophin-Associated Glycoprotein Complex at the Photoreceptor Terminal	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Investigative Ophthalmology & Visual Science	6. 最初と最後の頁 3795 ~ 3795
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1167/iovs.17-21746	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 Sakai Yusuke, Kassai Hidetoshi, Nakayama Hisako, Fukaya Masahiro, Maeda Tatsuya, Nakao Kazuki, Hashimoto Kouichi, Sakagami Hiroyuki, Kano Masanobu, Aiba Atsu	4. 巻 9
2. 論文標題 Hyperactivation of mTORC1 disrupts cellular homeostasis in cerebellar Purkinje cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-38730-4	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 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 深谷昌弘, 伊藤諭子, 岡本浩嗣, 阪上洋行
2. 発表標題 Subcellular localization and functional roles of pallidin as a novel cytohesin-2 interacting protein in the mouse brain
3. 学会等名 第40回 日本神経科学大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 深谷昌弘, 伊藤諭子, 三枝信太郎, 原芳信, 岡本浩嗣, 阪上洋行
2. 発表標題 新規cytohesin-2 結合分子pallidinの神経細胞における初期エンドソーム輸送調節と樹状突起形成制御機構
3. 学会等名 第123回 日本解剖学会全国学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 深谷昌弘, 阪上洋行
2. 発表標題 海馬神経細胞におけるBRAG2-Arf6シグナル経路を介したAMPA受容体のシナプス発現調節機構
3. 学会等名 第125回 日本解剖学会全国学術集会
4. 発表年 2020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
---------	---------------------------	-----------------------	----