

平成 21 年 5 月 20 日現在

研究種目：若手研究 B
 研究期間：2006～2008
 課題番号：18790731
 研究課題名（和文）N-カドヘリン・エンドサイトーシスによる神経シナプス可塑性の制御機構
 研究課題名（英文） Regulation of synaptic plasticity by endocytosis through N-cadherin
 研究代表者
 泉 鉉吉（IZUMI GENKICHI）
 和歌山県立医科大学・医学部・博士研究員
 研究者番号：70423952

研究成果の概要：ラット脳組織から、遠心分離操作により N-カドヘリンを豊富に含む後シナプス細胞膜分画を精製した。その分画に ATP、GTP、ラット脳細胞質分画を加えて加温することにより N-カドヘリンのエンドサイトーシスを起こさせることに成功した。その N-カドヘリン小胞を遠心操作で分離し、抗 N-カドヘリン抗体でウェスタンブロットすることで、N-カドヘリン・エンドサイトーシスを迅速かつ定量的に解析できる無細胞再構成系を確立した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	1,800,000		1,800,000
2007 年度	800,000		800,000
2008 年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	240,000	3,640,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・小児科学

キーワード：小児神経学

1. 研究開始当初の背景

(1) 知的障害・精神発達遅滞等の病因および病態に関しては、現在でもまだその詳細な機序は明らかではない。

近年、学習・記憶のメカニズムに神経シナプスの可塑性の関与を示唆する報告も多く、これらの機序の解明が、知的障害・精神発達遅滞の解明につながる事が推測される。

(2) シナプス伝達長期現象時に、シナプス領域の細胞膜上において N-カドヘリンの発現量が増加することが報告されている。また、N-カドヘリンの発現量の変化がシナプスの可塑性に関与する可能性があると報告され

ている。N-カドヘリンの発現量は、新たに合成・供給される分子数、及び細胞質内へ取り込まれる分子数の総計で決定される。細胞質内へ取り込まれる一つの機序として N-カドヘリンのエンドサイトーシスが考えられているが、その機序の詳細は不明である。

2. 研究の目的

N-カドヘリンのエンドサイトーシスの制御機構を明らかにし、その制御機構に関わる分子が、神経伝達物質の放出効率、受容体の発現量、さらにはシナプス構成分子の発現量、局在にどのように影響するのかを解明することにより、シナプスの可塑性の制御機構の

一因の解明を目的とする。

3. 研究の方法

(1) N-カドヘリンのエンドサイトーシスを、生化学的手法を用いて迅速且つ定量的に解析できる無細胞再構成系 (N-カドヘリン・エンドサイトーシスアッセイ) を開発する。

(2) (1) のアッセイを用いて、N-カドヘリンのエンドサイトーシス制御機構に関わる分子を同定し、それらの分子により、神経伝達物質の受容体を含めた他のシナプス構成分子の発現量、局在にどのように影響するのかを解明する。

4. 研究成果

ラット肝臓から E-カドヘリンを豊富に含む、Adherens junctions(Ajs)を分離する方法 (Tsukita and Tsukira, 1989)と同様の方法で、ラット脳組織より、N-カドヘリンを豊富に含む後シナプス膜分画 (PSD fraction) を分離、この PSD fraction を用いて以下に示す方法で、N-カドヘリン・エンドサイトーシスアッセイを開発した。

N-cadherin Endocytosis Assay

PSD fraction 20 μ g (*1)

↓
↓
↓

Incubation at 30 °C for 30 min (#1)

↓
↓
↓

↓ Reaction buffer (*2)

- ↓ • Rat brain cytosol 2.5 mg
- ↓ • ATP-regenerating system(*3)
- ↓ • GTP 100 μ M

↓
↓
↓

Chilling tube on ice(*4)

↓
↓
↓

Centrifugation at 20,000 g for 10 min

↓ (*5)

↓
↓
↓

Ppt
(Budding N-cadherin vesicle on the

PSD membrane)

↓
↓
↓

↓ pipetting 20 times (#2)

↓ (N-cadherin endocytosis) (*6)

↓
↓
↓

Centrifugation at 16,000 g for 2 min

↓ (*7)

↓
↓
↓

Sup

↓
↓
↓

Centrifugation at 100,000 g for 20 min

↓ (*8)

↓
↓
↓

Ppt (Endocytosed N-cadherin vesicle)

↓
↓
↓

Solubilized in a SDS sample buffer

at RT for 30 min(*9)

↓
↓
↓

Separated by 10% SDS-PAGE(*10)

↓
↓
↓

Transferred to nitrocellulose membrane

sheet(*11)

↓
↓
↓

Immunoblotted with N-cadherin mAb,

followed by the HRP-conjugated secondary

antibody(*12)

↓
↓
↓

Quantitaed using a molecular imaging

system(*13)

↓
↓
↓

#1: 36 mM Hepes, pH 7.4, 0.25 mM sorbitol,
70 mM KOAc, 5 mM EGTA, 1.8 mM CaCl₂, 2.5 mM

Mg(OAc)₂

#2: 20 mM Hepes, pH 7.2, 0.25 mM sorbitol,
150 mM KOAc, 2.5 mM Mg(OAc)₂

*1: PSD fraction を 0.5M Tris/HCl, pH7.5 buffer にてシナプスを構成する細胞膜をルーズな結合状態に変化させる。その後 20 mM Hepes pH7.4, 125mM KOAc 緩衝液に溶解する、そのうち 20 μ g を使用する。

*2: PSD fraction を Reaction buffer (#1+rat brain cytosol, ATP, GTP)を加えて 30°Cで 30 分間加温する。この操作で、エンドサイトーシスの初期段階である細胞膜の陥凹を起こさせる。

Reaction buffer 成分

- Rat brain cytosol; N-cadherin が細胞膜から陥凹する際、エンドサイトーシスによって形成される N-カドヘリン小胞の cytoplasmic coat protein subunits の供給源として必要。
- ATP; N-カドヘリンが細胞膜から陥凹する際に必要なエネルギー源として必要
- GTP; N-カドヘリン小胞を形成する際に必要な dynamin や small G protein の制御因子として必要

尚、これらの 3 成分のいずれがかけても、N-カドヘリンのエンドサイトーシス効率が顕著に低下する。Rat brain cytosol については、濃度依存的に、エンドサイトーシス効率が上昇する

*3: 1mM ATP, 5mM Creatine phosphate, 0.2 IU Creatine phosphokinase

*4: tube を 4°C 環境におくことで、エンドサイトーシス反応を止める

*5: 20,000g、10 分間の遠心操作にて、陥凹した N-カドヘリン小胞を含む、PSD 細胞膜成分を沈殿として得る（上清を取り除く）

*6: #2 緩衝液を加え、計 60.6 μ l とする。20 回のピペッティング操作で、陥凹した N-カドヘリン小胞を機械的に小胞に形成し、細胞膜から分離する。

*7: 16,000g、2 分間の遠心操作にて、細胞膜から分離し、上清中に存在する N-カドヘリン・エンドサイトーシス小胞を収穫する。42 μ l を新しいチューブに移す。

*8: 収穫した N-カドヘリン・エンドサイトーシス小胞を含む上清を、100,000g、20 分間の超遠心操作にて、tube 内に沈殿として得る。

*9: 沈殿として得られた N-カドヘリン・エン

ドサイトーシス小胞に SDS sample buffer を加え、室温で 30 分間激しく振動させることで、小胞に存在する分子を SDS 化させる。

*10: SDS 化させた N-カドヘリン・エンドサイトーシス小胞上の分子を 10% SDS-PAGE により電気泳動させ、分子量サイズに従って、分子を分離する。

*11: ゲル上の上記分子を、ニトロセルロース膜にトランスファー装置も用いて、移動させる。

*12: ニトロセルロース膜上に移動させた、N-カドヘリン・エンドサイトーシス小胞分子を 1 次抗体として抗 N-カドヘリン・モノクローナル抗体、2 次抗体として HRP を使用し、ウェスタンブロットを行う。

*13: ウェスタンブロットを行った上記ニトロセルロース膜に ECL-kit を使用し、molecular imaging system により評価を行うことで、エンドサイトーシスした N-カドヘリン小胞を定量化する。

上記アッセイは、ラット脳・後シナプス膜分画 (PSD fraction) からエンドサイトーシスさせた N-カドヘリン小胞を直接解析できる無細胞再構成系であり、これまでの研究と比較して、細胞再構成系でなく、無細胞再構成系を用いていること、シナプスを直接構成する分子以外の影響を排除できること、より迅速かつ定量的に解析することが可能である。今後、このアッセイ系を用いることにより、N-カドヘリンのエンドサイトーシスのメカニズムの解明、それらに関わる分子間相互の関係、さらにはシナプス可塑性の制御機構の解明に寄与することが期待される。そのような機序の解明が、知的障害・精神発達遅滞等の病態の解明につながることを期待される。

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)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

泉 鉉吉 (IZUMI GENKICHI)

和歌山県立医科大学・医学部・博士研究員

研究者番号：70423952

(2)研究分担者 なし

(3)連携研究者 なし