

令和 3 年 6 月 16 日現在

機関番号：13401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06823

研究課題名(和文) シナプス可塑性を制御するBDNF-脂質関連分子Phldb2系の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the BDNF-lipid-related Phldb2 for regulation of synaptic plasticity

研究代表者

謝 敏カク (Xie, Min Jue)

福井大学・子どものこころの発達研究センター・助教

研究者番号：40444210

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：我々は脳の高次機能には興奮性シナプスの構造的可塑性を伴う機能調節機構が深く関与し、膜脂質の一種PIP3と特異的に結合する Phldb2は、シナプスが形成されるスパインにPIP3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。Phldb2欠損マウスでは、海馬CA1シナプスの長期増強(LTP)のシナプス可塑性および記憶形成が欠如していることも報告した(Xie, 2019)。さらに、Phldb2がF-actin関連因子であるdrebrin Aの発現および局在を制御し、スパインの形態変化、成熟に関与すると見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

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。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(PIP3)と特異的に結合するPhldb2は、シナプスが形成されるスパインにPIP3依存的に局在し、シナプス可塑性、構造および学習記憶に重要な役割があることを見出した。この研究から得られる知見は記憶・学習機能を支える基本原理の理解に十分に貢献できることが期待でき、更に、神経・精神疾患の原因やその治療法の研究にも役立つ可能性がある。

研究成果の概要(英文)：The essential involvement of phosphoinositides in synaptic plasticity is well-established, but incomplete knowledge of the downstream molecular entities prevents us from understanding their signalling cascades completely. Here, we determined that Phldb2, of which pleckstrin-homology domain is highly sensitive to PIP3, functions as a phosphoinositide-signalling mediator for synaptic plasticity. BDNF application caused Phldb2 recruitment toward postsynaptic membrane in dendritic spines, whereas PI3K inhibition resulted in its reduced accumulation. Phldb2 bound to postsynaptic scaffolding molecule PSD-95 and drebrin A, and were crucial for localization of PSD-95 and drebrin A in the spine. Phldb2 was indispensable the synaptic density of AMPA receptors and spine formation. Therefore, PIP3-responsive Phldb2 is pivotal for induction and maintenance of LTP. Memory formation was impaired in our Phldb2^{-/-} mice.

研究分野：医歯薬学

キーワード：Phldb2 BDNF drebrin A

1. 研究開始当初の背景

シナプスは脳の情報伝達機構の基盤であり、樹状突起スパインの大きさやシナプス面積の活動依存的変化が、学習・記憶などの高次脳機能を支える細胞レベルの実体であると考えられている。従って、このシナプスの構造可塑性を支えるメカニズムは神経科学研究における主要な研究テーマの一つであり重点的に研究されている。たとえば、神経栄養因子である BDNF とその受容体である TrkB を介したシグナル系がシナプス構造の長期増強現象 (sLTP) を制御していること¹、TrkB が PIP₂ から PIP₃ を産生する PI3K 活性化を介して細胞内機構を制御していることが報告されている²。樹状突起スパインに PIP₃ が集積していること³を考慮すると、ホスファチジルイノシトール(3,4,5)三リン酸 (PIP₃) の下流のシグナル伝達系を明らかにすることが、シナプスの構造的可塑性制御を担う分子機構を明らかにする上で重要である。

我々は、PIP₃ と高感度に結合する PH (pleckstrin homology) domain を持つ Phldb2 (pleckstrin homology-like domain, family B, member 2) の解析を進めた過程で⁴、この Phldb2 が、海馬の神経細胞に発現しグルタミン酸受容体(R)である AMPAR および NMDAR のシナプス内局在と NMDAR-CaMKII 複合体形成に関与することをつきとめた。また、Phldb2 欠損 (Phldb2-KO) マウスの海馬 CA1 シナプスでは、Schaffer 側枝での LTP が減弱し、シナプス可塑性が欠如していることも見出した。さらに、Phldb2 KO マウスでスパインの形成障害が見られた。そこで、我々は Phldb2 がシナプス可塑性形成にも重要な役割を担う可能性があるかを検討することとした。

2. 研究の目的

脳の高次機能には興奮性シナプスの構造的可塑性を伴う機能調節機構が深く関与し、この可塑性制御に脳由来神経栄養因子 (BDNF) -TrkB シグナル伝達経路と PI3K-膜脂質特に PIP₃ が重要な役割を担うことが報告されている。しかし、PIP₃ の相互作用分子を含め下流のシグナル伝達経路は不明である。我々は、PIP₃ に高い親和性を持つ 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。そこで、BDNF-TrkB-PIP₃ と Phldb2、および下流のエフェクタである drebrin A-F-actin との関連をそれぞれの分子のスパイン内分布と共に明らかにしながら、シナプス可塑性に関与する新たな分子メカニズムを膜脂質制御の視点から解明する。

3. 研究の方法

(1) PIP₃ 刺激による Phldb2 のスパイン局在変化

PIP₃ と高感度に結合する PH domain を持つ Phldb2 はスパインに PIP₃ 依存的に局在するかどうかを検討した。具体的には、Phldb2-GFP を過剰発現させた海馬初代培養神経細胞を用いて、BDNF の刺激 (PIP₃ の増加) および PI3 kinase 阻害剤である LY294003 投与 (PIP₃ の減少) により Phldb2 局在変化を検討した。

(2) Phldb2 がシナプス内微細構造に及ぼす変化

我々はすでにシナプス後膜上に集積した AMPA-R の発現密度の減少を見出したが、シナ

ブス内微細構造を確認するため集束イオンビーム (FIB-SEM)/三次元構造の再構築法を用い、海馬 CA1 領域のシナプス結合丸ごとの微細構造を観察・定量化を行った。

(3) Phldb2 を介し、スパインに存在する drebrin A および F-actin の局在の変化を検討した

Phldb2 が drebrin A に結合することを見出したが、drebrin A 局在への影響を検討した。具体的には、培養海馬神経細胞に tdTomato を発現導入し、drebrin A および F-actin の免疫染色標識を行った。蛍光強度の強さによりスパイン内 drebrin A および F-actin の局在のピークについてスパイン head の辺縁からの距離を測定した。さらに、生後 4 週齢マウスの脳スライスで drebrin A に対する免疫染色標識を行った。

(4) Phldb2 を介しレスキュー実験

Phldb2 KO マウスで培養海馬神経細胞に Phldb2 を導入し、細胞膜上 GluR2/総 GluR2 の発現が減少および PSD-95 の局在変化をレスキューできるかを検討した。

(5) 行動実験

Phldb2-KO マウスの海馬 CA1 シナプスでは、LTP が減弱し、シナプス可塑性が欠如していることも見出した。さらに、この Phldb2 KO マウスで学習と記憶への影響を検討するために T-maze left-right discrimination test を行った。

4. 研究成果

(1) Phldb2 はスパインに PIP₃ 依存的に局在することを見出した

Phldb2-GFP を過剰発現させた海馬初代培養神経細胞を用いて、BDNF の刺激により Phldb2 がスパインへ集積し、スパインの形態が大きくなることを見出した。一方、PI3 kinase 阻害剤である LY294003 の投与により Phldb2 がスパインでの局在数は有意に減少した。

(2) Phldb2 がシナプス後肥厚部 (PSD 領域) に及ぼす変化

シナプス後肥厚部(PSD)は、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。そこで、FIB-SEM/三次元構造の再構築法を用い、生後 4 週齢 WT マウスおよび Phldb2 KO マウスの海馬 CA1 領域の PSD 面積、スパイン体積を測定した。すると両方のマウスで、PSD 面積とスパイン体積の有意な正の相関が見られた。また、PSD 面積、スパイン体積に、有意な変化がみられなかった。そのことからシナプス後膜上に集積した AMPA-R 密度の減少により AMPA-R の発現量が減少することを確認した。

(3) Phldb2 は drebrin A のスパイン内局在を制御する

Drebrin A はスパインに局在し、スパインの裏打ち構造である F-actin と結合することで、スパインの構造変化に重要な役割を果たしていることが知られている⁵。既に、Phldb2 が drebrin A と結合し、海馬培養神経細胞を用い、Phldb2 が過剰な drebrin A の発現によりスパインを抑制することを見出したが、今回は drebrin A がスパイン内の局在変化が Phldb2 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 drebrin A および

F-actin 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 drebrin A 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。これらのことは、Phldb2 が drebrin A のスパイン内局在を制御していることを示唆する。。

(4) Phldb2 を発現させ、Phldb2 KO マウスでの表現型をレスキューする

Phldb2 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することを見出した。この表現型の Phldb2 KO マウス培養海馬神細胞に Phldb2 発現ベクターを導入し、スパインでの PSD-95 の局在変化をレスキューしたことを確認した。また Phldb2 KO マウスで AMPA-R のスパイン異常局在表現型をレスキューする為に PIP₃ に高感度結合する PH 領域を含む Phldb2 の導入が必須であることを確認した。以上のことから、Phldb2 がスパインでの PSD-95 局在および PIP₃ が依存的にグルタミン酸受容体のスパイン係留に関与することを突き止めた。

(5) Phldb2 は学習・作業記憶を制御する

T-maze left-right discrimination test は海馬のシナプスの可塑性異常など学習・記憶を評価する行動テストの一つである⁶。Phldb2 KO マウスでは海馬 CA1 領域の LTP の障害や AMPA-R の発現量の低下が見られる。今回は Phldb2 KO マウスで T-maze left-right discrimination test を行った。その結果、生後 4 週齢雄 WT マウスではトレーニング期間中に徐々にパフォーマンスを向上し、五日間で餌を取る正解率が 80% になった。一方、Phldb2 KO マウスではパフォーマンスは向上したが、WT より有意に正解率は低かった。このことから Phldb2 は学習・作業記憶を制御することがわかった。

以上の研究結果から、Phldb2 は、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することができた。

<引用文献>

1. Harward, S.C. et al. Autocrine BDNF-TrkB signalling within a single dendritic spine. *Nature* **538**, 99-+ (2016).
2. Briz, V. et al. Calpain-2-Mediated PTEN Degradation Contributes to BDNF-Induced Stimulation of Dendritic Protein Synthesis. *Journal of Neuroscience* **33**, 4317-4328 (2013).
3. Ueda, Y. & Hayashi, Y. PIP(3) regulates spinule formation in dendritic spines during structural long-term potentiation. *J Neurosci* **33**, 11040-11047 (2013).
4. Takabayashi, T. et al. LL5 beta Directs the Translocation of Filamin A and SHIP2 to Sites of Phosphatidylinositol 3,4,5-Triphosphate (PtdIns(3,4,5)P-3) Accumulation, and PtdIns(3,4,5)P-3 Localization Is Mutually Modified by Co-recruited SHIP2. *J Biol Chem* **285**, 16155-16165 (2010).
5. Mizui, T., Takahashi, H., Sekino, Y. & Shirao, T. Overexpression of drebrin A in immature neurons induces the accumulation of F-actin and PSD-95 into dendritic filopodia, and the formation of large abnormal protrusions (vol 30, pg 149, 2005). *Mol*

Cell Neurosci **30**, 559-559 (2005).

6. McHugh, S.B., Niewoehner, B., Rawlins, J.N.P. & Bannerman, D.M. Dorsal hippocampal N-methyl-D-aspartate receptors underlie spatial working memory performance during non-matching to place testing on the T-maze. *Behav Brain Res* **186**, 41-47 (2008).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1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 Xie MJ, Ishikawa Y, Yagi H, Iguchi T, Oka Y, Kuroda K, Iwata K, Kiyonari H, Matsuda S, Matsuzaki H, Yuzaki M, Fukazawa Y, and Sato M.	4. 巻 9
2. 論文標題 PIP3-Phldb2 is crucial for LTP regulating synaptic NMDA and AMPA receptor density and PSD95 turnover	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Sci Rep	6. 最初と最後の頁 4305
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/978-3-030-05542-4_3	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 -

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 5件）

1. 発表者名 Xie MJ, Iwata K, Ishikawa Y, Fukazawa Y, Matsuzaki H
2. 発表標題 Autistic Phenotype in the N-Ethylmaleimide Sensitive Factor Gene Lacking Mice
3. 学会等名 INSAR2019（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Xie MJ, Iwata K, Ishikawa Y, Fukazawa Y, Matsuzaki H
2. 発表標題 Autism-related deficits via dysregulated NSF-dependent membrane protein trafficking
3. 学会等名 ISN-ASN 2019（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Xie MJ, Ishikawa Y, Yagi H, Fukazawa Y, Sato M
2. 発表標題 Phosphoinositide responsive Phldb2 is crucial for LTP regulating synaptic NMDA and AMPA receptor density and PSD95 turnover
3. 学会等名 Society For Neuroscience 2019（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 謝 敏カク、岩田圭子、石川保幸、深澤有吾、松崎秀夫
2. 発表標題 Abnormal synaptic plasticity in the autistic like the N-ethylmaleimide sensitive factor knockout mice
3. 学会等名 NEURO2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 謝 敏カク
2. 発表標題 NSF ノックアウトマウスを用いた新たな精神疾患モデルの探索
3. 学会等名 第20回ORIGIN神経科学研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Min-Jue Xie, Keiko Iwata, Yugo Fukazawa, Hideo Matsuzaki
2. 発表標題 Reduced social interaction and communication in N-ethylmaleimide sensitive factor knockout mice.
3. 学会等名 第41回日本神経神経科学大会（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 謝敏かく、松崎秀夫
2. 発表標題 自閉症様のNSFヘテロノックアウトマウスの解析
3. 学会等名 第19回ORIGIN神経科学研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Min-Jue Xie, Keiko Iwata, Yugo Fukazawa, Hideo Matsuzaki
2. 発表標題 Abnormal membrane protein trafficking in the autistic like the N-ethylmaleimide sensitive factor knockout mice
3. 学会等名 Society For Neuroscience 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018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
研究分担者	佐藤 真 (Sato Makoto) (10222019)	大阪大学・連合小児発達学研究所・教授 (14401)	
研究分担者	深澤 有吾 (Fukazawa Yugo) (60343745)	福井大学・学術研究院医学系部門・教授 (13401)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------