

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 6 月 14 日現在

機関番号：14501

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2021

課題番号：18K14830

研究課題名(和文) 発達過程におけるPSD構成因子の変化とシナプス構築の関係

研究課題名(英文) Remodeling of the postsynaptic density during postnatal development

研究代表者

貝塚 剛志 (Kaizuka, Takeshi)

神戸大学・医学研究科・特命助教

研究者番号：40782032

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：生後発達期のマウスのシナプス後肥厚(PSD)ではシナプスの可塑性に関わるパセウエイのタンパク質群が顕著に増減しており、これに伴ってシグナル伝達の変動が生じていることがわかった。また、トランスクリプトームとの相関から、2週齢以降のタンパク質量の増減は生後4日以降に生じる遺伝子発現の変化により生じることが示唆された。そして、同様のタンパク質の増減は霊長類では出生前後に生じていることが示唆された。また、自閉症患者の脳ではPSDの組成がより未成熟な状態にあることが示唆された。さらに、幼年期から大人に至るまでの霊長類の脳では、2週齢以降のマウスの脳とは異なるタンパク質の増減が生じていることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、生後発達期のシナプスのタンパク質組成の変化を網羅的に明らかにし、それがどのような意義を持っているか、またどのようなメカニズムにより生じていると考えられるかを示した。これらの結果は、シナプスの成熟を「タンパク質組成」の観点からとらえる考え方を提供したとも言える。また、自閉症などの神経発達障害にもシナプスのタンパク質組成の異常(成熟不全)が関与している可能性を示した。社会的には、自閉症の治療戦略への考え方を提供したという点でも意義があるのではないかと考えている。

研究成果の概要(英文)：I analyzed protein composition of the postsynaptic density (PSD) by proteome analysis. During postnatal development, protein involved in synaptic plasticity is found to be significantly increased or decreased in PSD in mouse brain. This is accompanied with altered signal transduction. Correlations with the transcriptome datasets suggested that the increase or decrease in protein levels after 2-week-old mouse is caused by changes in gene expression that occur after postnatal day 4. Similar protein increases and decreases were suggested to occur around birth in primates. Analysis of transcriptome dataset of the patient with autism spectrum disorders suggested that the composition of PSD is more immature in patient brain. I also found that alteration of PSD composition in common marmoset brain after 2-month-old is distinct from that found in postnatal mouse brain.

研究分野：神経科学

キーワード：PSD シナプス後肥厚 シナプス プロテオミクス 自閉症 自閉スペクトラム症

## 1. 研究開始当初の背景

脳において、興奮性シナプスの後部は主に樹状突起スパインと呼ばれるきのこ型の突起構造が担っている。スパイン先端部のシナプスを形成する部位には、シナプス後肥厚 (postsynaptic density, PSD) と呼ばれるタンパク質が集積した構造体が形成されている。PSD はグルタミン酸受容体、足場タンパク質、細胞間接着分子、シグナル伝達酵素など、シナプスの構造や機能に重要な 1000 種類以上のタンパク質群から構成されている。

生後発達期には、シナプスの密度、スパインの安定性、スパインの形態が徐々に変化していく。シナプスの密度は幼年期に至るまでは増え、その後やや減少する。スパインの安定性、すなわち単位時間あたりのスパインの形成数や除去数は、成熟とともに徐々に低下していく。また、スパインはフィロポディアと呼ばれる細長く不安定な突起状構造から形成されるが、フィロポディアの密度は脳の成熟とともに減少していく。また、自閉症などの神経発達障害では、シナプスの密度やスパインの形状等に異常が生じることが、患者の死後脳や自閉症モデルマウスの解析から示唆されていた。しかし、これらの変化の背景にどのような分子レベルでの変化があるのかは十分に理解されていなかった。

## 2. 研究の目的

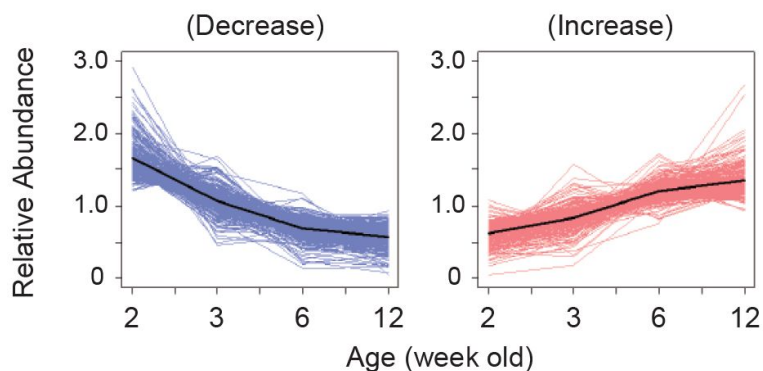
本研究では、発達期のげっ歯類および霊長類の脳におけるシナプスのタンパク質組成の変化、その変化が及ぼす影響、そして変化のメカニズムを調べることにした。さらに、自閉症におけるシナプスのタンパク質組成の異常を探ることとした。

## 3. 研究の方法

シナプスの密度が顕著に変動する時期のモデル動物の脳から PSD を採取し、定量的プロテオーム解析を行った。モデル動物としては、げっ歯類として 2 週齢から 12 週齢までのマウス、および霊長類として 2 か月齢から 24 か月齢のコモンマーモセット (*Callithrix jacchus*) を用いた。PSD の単離・精製には、分画遠心による古典的精製法を用いた。得られたサンプルを質量分析で解析し、ラベルフリー定量を行った。定量データについて、クラスター解析、顕著な増減を示したタンパク質群のパスウェイ解析、トランスクリプトームとの相関解析などを実施した。

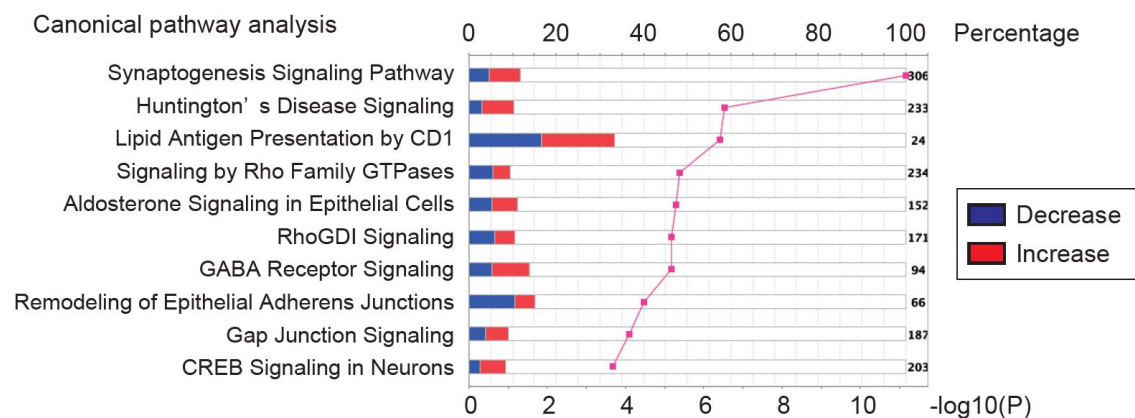
## 4. 研究成果

生後発達期のマウスの PSD では約 2000 のタンパク質が検出・定量された。これらのタンパク質のうち、約 300 のタンパク質がそれぞれ顕著に増加または減少していることが分かった (図 1)。



**図 1 生後発達期のマウスの PSD におけるタンパク質の増減**  
個体の成熟とともに顕著な減少 (Decrease) を示した 288 のタンパク質、および顕著に増加 (Increase) を示した 267 のタンパク質の相対量のプロット。太い黒線は平均値。

これら増減するタンパク質の中には、Rho GTPase シグナルや CREB シグナルなど、シナプスの可塑性に関わるパスウェイのタンパク質群が集中していた（図 2）。Rho GTPase シグナルの変動は Cofilin のリン酸化の減少として、実験的に確認された。よって、PSD のタンパク質組成の変化は、後シナプスのシグナル伝達の変化に寄与していると考えられる。そして、このシグナル伝達の変化は、発達期におけるシナプスの密度、スパインの安定性、スパインの形態の変化に寄与している可能性があると考えられる。



**図 2 顕著な変動を示した PSD タンパク質が関与するパスウェイ**  
 生後発達期のマウスにおいて顕著な変動を示したタンパク質群（図 1）にエンリッチしていたパスウェイの一覧（上位 10 項目）。棒グラフは各群に含まれる該当するタンパク質の割合、折れ線は P 値（ $-\log_{10}$  表記）。

トランスクリプトームとの相関を解析したところ、2 週齢以降のマウスにおける PSD タンパク質量の増減は生後 4 日以降に生じる遺伝子発現の変化に伴って生じていることが示唆された。また、霊長類（ヒトおよびマカク）の脳のトランスクリプトームとの比較も行ったところ、霊長類の脳ではマウスの脳で生後 4 日以降に生じる遺伝子発現の変化が出生前後に生じていることがわかった。よって、霊長類の脳では、2 週齢以降のマウスで生じるのと同様の PSD タンパク質組成の変化が出生前後から新生児期に生じているのではないかと推測される。

また、自閉症患者の脳のトランスクリプトームデータを参照したところ、患者の脳では出生前後に生じる PSD タンパク質をコードする遺伝子の発現の増減が健常者と比べて不十分であることが示唆された。よって、自閉症患者では健常者と比べ、PSD のタンパク質組成がより「未成熟」な状態にあるのではないかと推測される。これは、自閉症患者で見られるとされる。「未成熟なシナプス」の形成に寄与している可能性があると考えられる。

新生児期より後の霊長類における PSD のタンパク質組成の変化を調べるため、2 か月齢以降のコモンマーモセットの PSD タンパク質組成の変化を解析したところ、コモンマーモセットの脳では 2 週齢以降のマウスの脳とは異なるタンパク質の増減が生じていることがわかった。よって、霊長類の脳では、出生前後から成体に至るまでに、げっ歯類よりも複雑な PSD タンパク質組成の軌跡をたどるのではないかと考えられる。発達期に一旦増えたシナプス密度の減少（シナプスの剪定）は、げっ歯類よりも霊長類の脳で顕著に生じていることが示唆されている。げっ歯類と霊長類における PSD タンパク質組成の変化の違いは、シナプスの剪定などの違いに関与している可能性があると考えられる。

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 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Morishita Hideaki, Kanda Yuki, Kaizuka Takeshi, Chino Haruka, Nakao Kazuki, Miki Yoshimi, Taketomi Yoshitaka, Guan Jun-Lin, Murakami Makoto, Aiba Atsu, Mizushima Noboru	4. 巻 33
2. 論文標題 Autophagy Is Required for Maturation of Surfactant-Containing Lamellar Bodies in the Lung and Swim Bladder	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 108477 ~ 108477
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.celrep.2020.108477	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 Takeshi Kaizuka, Takehiro Suzuki, Noriyuki Kishi, Manfred W. Kilimann, Takehiko Ueyama, Masahiko Watanabe, Hideyuki Okano, Naoshi Dohmae, Toru Takumi	4. 巻 -
2. 論文標題 Developmental dynamics of the postsynaptic proteome to understand synaptic maturation and dysmaturation	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 bioRxiv	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） 10.1101/2022.05.05.490828	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 該当する

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 貝塚 剛志、鈴木 健裕、岸 憲幸、堂前 直、岡野 栄之、内匠 透
2. 発表標題 発達期のげっ歯類および霊長類の脳におけるシナプス後肥厚のリモデリング
3. 学会等名 第93回日本生化学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 貝塚 剛志、鈴木 健裕、堂前 直、内匠 透
2. 発表標題 発達期におけるシナプス後肥厚のリモデリング
3. 学会等名 日本プロテオーム学会2019年大会・第70回日本電気泳動学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 貝塚 剛志
2. 発表標題 発達期の脳におけるシナプス後肥厚のリモデリング
3. 学会等名 次世代脳プロジェクト 冬のシンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takeshi Kaizuka, Toru Takumi
2. 発表標題 Remodeling of PSD composition during postnatal development
3. 学会等名 Cold Spring Harbor Asia, Autism & Neurodevelopment Disorders (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Takeshi Kaizuka, Toru Takumi
2. 発表標題 Remodeling of postsynaptic density during development
3. 学会等名 文部科学省新学術領域研究「スクラップ&ビルドによる脳機能の動的制御」第2回領域会議
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
---------	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------