

平成 22 年 6 月 16 日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2008～2010

課題番号：20700296

研究課題名（和文） 神経細胞における樹上突起特異的輸送機構

研究課題名（英文） Dendrite targeting mechanism in neurons.

研究代表者

松田 信爾（MATSUDA SHINJI）

慶應義塾大学・医学部・講師

研究者番号：60321816

研究成果の概要（和文）：AMPA 型グルタミン酸受容体（AMPA 受容体）の細胞内輸送に異常の起きる AP-4 を欠損したマウスでは、不安様行動、および運動学習に異常が見られた。また小脳におけるシナプス可塑性に異常があることが明らかとなった。また、AMPA 受容体が TARP とよばれるタンパク質を介して、他のアダプタータンパク質複合体である、AP-2 および AP-3A にも結合することを明らかにした。興味深いことにこれらのアダプタータンパク質複合体と TARP との結合は TARP のリン酸化によって制御されていることも明らかにした。

研究成果の概要（英文）：We indicated that the AP-4 deficient mice, which induces AMPA receptor mislocalization, showed abnormalities on the motor learning and anxiety behavior. Our electrophysiological analysis also indicated that the cerebellar LTP was impaired.

We also indicated that the AMPA receptors bind to AP-2 and AP-3A via TARP. These interactions are regulated by the phosphorylation of TARPs.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	2,500,000	750,000	3,250,000
2009 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：神経科学・神経科学一般

キーワード：神経細胞 極性輸送 AMPA 受容体 TARP アダプタータンパク質
エンドサイトーシス シナプス可塑性

1. 研究開始当初の背景

神経細胞は、樹状突起と軸索という、機能的・構造的に大きく異なった領域をもった極性細胞である。神経細胞の極性とその維持は、神経細胞の情報伝達・記憶維持の発現に必須である。神経細胞の極性そのも

のが決定される機構については近年、解明が進んできた。しかし形成された極性にしたがって、生涯にわたって細胞内部位特異的にタンパク質が輸送される機構については不明な点が多い。神経細胞間の興奮性のシグナル伝達の大部分は AMPA 型グルタ

ミソ酸受容体(AMPA受容体)が担っている。AMPA受容体は神経細胞の樹上突起に存在しており、軸索にはほとんど存在しない。樹上突起表面に局在するAMPA受容体数はエンドサイトーシス・エキソサイトーシスによって調節されており、この数の調節がシナプス可塑性の基盤となっていることが知られている。しかしAMPA受容体の細胞内輸送機構は明らかにされていない点も多く存在している。

申請者はこれまでの研究により、AMPA受容体はStargazinを含むTARPファミリータンパク質を介して小胞輸送を制御するアダプタータンパク質複合体の1つAP4に結合することを明らかにしていた。また、この結合がAMPA受容体を樹上突起特異的に輸送するために必須の役割を果たしていることも明らかにしていた。

2. 研究の目的

本申請研究では上述の結果をさらに発展させ、アダプタータンパク質複合体がどのようなメカニズムで、AMPA受容体、あるいは他のタンパク質の神経細胞内での輸送を制御するのか、を明らかにしていくことが本研究の目的であった。具体的には以下の点を目的に研究を行った。

1) これまで樹状突起特異的に分布することが知られているタンパク質がAP4のノックアウトマウスの神経細胞ではどのように分布しているのかを明らかにする。また、輸送するターゲットタンパク質を認識することが知られているAP4の μ サブユニットに結合するタンパク質(群)を同定し、どのようなタンパク質が樹状突起に輸送されるのかを明らかにする。

2) AP4ではサブユニットがモータータンパク質である、キネシンファミリーのタンパク質に結合することが報告されている。そこでAP4のサブユニットあるいは他のサブユニットに結合するタンパク質を同定し、AP4がどのようなメカニズムで樹状突起特異的輸送を制御するのかを解明する。

3) AP4のノックアウトマウスの海馬や小脳の神経細胞の電気生理学的性質を解析しさらに、個体レベルの行動や学習にどのような異常があるのかを明らかにする。このことにより樹状突起特異的輸送に生理学的意義を明らかにする。

4) アダプタータンパク質複合体には、大きく分けてAP-1,2,3,4の4種類あり、AP4以外のアダプタータンパク質がAMPA受容体の細胞内輸送を制御しているか否かを明らかにする。

3. 研究の方法

AP4はどのようなタンパク質(群)を樹状突起特異的に輸送するかを解析するため、これまでに樹状突起特異的に輸送されることが報告されているタンパク質がAP4のノックアウトマウスの神経細胞ではどのように分布するのかを免疫組織化学的手法を用いて明らかにする。さらに輸送するターゲットタンパク質を認識することが知られている μ サブユニットに結合するタンパク質(群)をYeast Two Hybrid法あるいは免疫沈降と質量分析を組み合わせた方法により同定する。

AP4がどのようなメカニズムで樹状突起特異的輸送を制御するかを明らかにするため、AP4の他のサブユニットに結合するタンパク質も上述の方法を用いて同定する。実際AP-1ではサブユニットにモータータンパク質であるキネシンファミリーのタンパク質が結合することが報告されている。

AP4のノックアウトマウスの海馬や小脳の神経細胞の電気生理学的性質を解析しさらに、個体レベルの行動や学習にどのような異常があるのかを明らかにする。

AP4以外のアダプタータンパク質がAMPA受容体の細胞内輸送を制御するかについての研究については、AMPA受容体がAP-1,2,3に結合するか否かを、免疫沈降法を用いて解析する。また、様々なアダプタータンパク質をsiRNAを用いて、ノックダウンした神経細胞において、AMPA受容体の細胞内輸送がどのような影響を受けるかを免疫組織化学的手法や電気生理学的手法を用いて解析する。

4. 研究成果

本研究では以下のような成果が得られた。AP4を欠損したマウスでは、不安様行動、および運動学習に異常が見られた。また小脳におけるシナプス可塑性の1つである、PKA依存的なLTPが引き起こされないことが明らかとなった。これらのことから、AP4に依存したタンパク質の樹上突起特異的輸送は、シナプス可塑性、および個体レベルの行動に重要な役割を持っていることが示唆された。

また、予備的な結果であるが、AP4のサブユニットがmLin-7に結合することを示唆する結果も得ている。mLin-7は間接的にキネシンスーパーファミリーのタンパク質と結合してNMDA受容体を樹上突起特異的に輸送することが示唆されている。このことからAP4はAMPA受容体をキネシンファミリーのモータータンパク質に結合させ樹上突起特異的輸送を制御している可能性が考えられる。さらに、AP4欠損マウスの小脳においては本来樹上突起のみ

に存在しているはずの LDL 受容体が軸索にも存在していることを明らかにしている。このことから、AP 4 は AMPA 受容体以外のタンパク質についても、樹上突起への極性輸送を行っていることが示されている。一方、同じく樹上突起特異的に存在する NMDA 受容体や、mGluR1 は AP 4 のノックアウトマウスにおいても、軸索への輸送は見られなかった。これらのタンパク質の極性輸送は AP 4 に依存していないものであると考えられる。これらの点に関しては現在も、研究を続行中である。

さらに、TARP が AP 4 だけでなく、他のアダプタータンパク質複合体である、AP 2 および AP 3A にも結合することを明らかにした。さらに興味深いことにこれらのアダプタータンパク質複合体と TARP との結合は TARP のリン酸化によって制御されていることも明らかにした。つまり、TARP の九つあるセリン残基がすべて脱リン酸化状態であると、AP 2、AP 3A の両方に結合すること、セリン残基すべてがリン酸化状態であると、AP 2 にも AP 3A にも結合できないことが明らかとなった。我々はこのセリン残基に様々な変異を導入することで、AP 2 にも AP 3A にも結合する変異 TARP、AP 3A にも AP 2 にも結合する変異 TARP を作成することに成功した。これらの変異 TARP を発現させた神経細胞では AMPA 受容体の細胞内輸送に異常が見られた。AP 2 に結合できない変異 TARP を発現させた神経細胞では、NMDA 刺激を与えた場合、AMPA 受容体のエンドサイトーシスは見られなかった。AP 3 に結合できない変異 TARP を発現させた神経細胞では、AMPA 受容体は NMDA 刺激によりエンドサイトーシスされるが、リソソームに輸送されることなく、速やかに細胞表面にリサイクルされた。これに対して、野生型の TARP を発現させた神経細胞では、AMPA 受容体はエンドサイトーシスされた後、リソソームに輸送されて、細胞表面の AMPA 受容体が NMDA 刺激により、長時間にわたって減少した。また siRNA を用いて AP 2 をノックダウンした神経細胞では AP 2 に結合できない変異 TARP を発現させた神経細胞と同様に、NMDA 依存的な AMPA 受容体のエンドサイトーシスが見られないことが明らかとなった。また、AP 3A をノックダウンした神経細胞では AP 3A に結合できない変異 TARP を発現させた神経細胞と同様に、AMPA 受容体はリソソームに輸送されることなく、速やかに細胞表面にリサイクルされることが示された。これらの結果から TARP とアダプタータンパク質との間のリン酸化による結合制御が AMPA 受容体の細胞内輸送を巧妙に制御していることが示唆された。今後、このアダプタータンパク

質に依存した、AMPA 受容体の細胞内輸送が、神経細胞の機能、特にシナプス可塑性に果たす役割について、電気生理学的手法、行動学的手法を用いて解析していく予定である。

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)

[雑誌論文] (計 5 件)

Matsuda K, Kondo T, Iijima T, Matsuda S, Watanabe M and Yuzaki M (2009) Cbln1 binds to specific postsynaptic sites at parallel fiber-Purkinje cell synapses in the cerebellum
EUROPEAN JOURNAL OF NEUROSCIENCE 29: 707-717
査読有

Matsuda S, Yuzaki M (2009) Polarized sorting of AMPA receptors to the somatodendritic domain is regulated by adaptor protein AP 4
NEUROSCIENCE RESEARCH 65: 1-5
査読有

Matsuda S, Miura, E., Matsuda, K., Kakegawa, W., Kohda, K., Watanabe, M., and Yuzaki, M. (2008). Accumulation of AMPA receptor in autophagosomes in neuronal axons lacking adaptor protein AP 4. *Neuron* 57, 730-745.
査読有

Matsuda S, Yuzaki M: AP 4: autophagy-four mislocalized proteins in axons. *Autophagy* 2008, 4:815-816.
査読無

松田信爾、柚崎通介 (2008) 神経における極性輸送 蛋白質核酸酵素, 53: 2214-2219
査読無

[学会発表] (計 3 件)

Michisuke Yuzaki, Shinji Matsuda
New mechanisms regulating the number of AMPA receptors at synapses
柚崎 通介、松田 信爾
第 3 2 回日本神経科学大会 (Neuro2009)
2009 年 9 月 1 8 日 名古屋国際会議場

Mechanisms for polarized sorting of glutamate receptors to the somatodendritic domain

of neurons

松田 信爾、三浦会里、掛川 涉、松田 恵子、幸田 和久、渡辺 雅彦、柚崎 通介
第31回日本神経科学大会 (Neuro2008)
2008年7月11日 東京国際フォーラム

Regulation of autophagy in neuronal axons

柚崎 通介、西山 潤、松田 信爾、三浦 絵里子、水島 昇、渡辺 雅彦
第31回日本神経科学大会 (Neuro2008)
2008年7月11日 東京国際フォーラム

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松田 信爾 (MATSUDA SHINJI)
慶應義塾大学・医学部・講師
研究者番号：60321816

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし