

令和 5 年 6 月 2 日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K06861

研究課題名(和文) スパインの発達期から成熟期へのスイッチングを制御する新たな機構の解明

研究課題名(英文) Novel regulatory mechanisms switching dendritic spines of the developmental state to the mature state.

研究代表者

菅原 健之 (Sugawara, Takeyuki)

北里大学・医学部・助教

研究者番号：70584522

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)：興奮性シナプスの後部構造である樹状突起スパインの数や形態は発達や神経活動に応じて変化するが、その制御機構は十分に明らかにされていない。本研究では、細胞内小胞輸送とアクチン細胞骨格の再構成を制御する低分子量Gタンパク質Arf6の活性化因子(グアニンヌクレオチド交換因子、GEF)の一つであるEFA6Aのリン酸化状態が発達段階や神経活動に依存して変化することを明らかにした。また、そのリン酸化状態の違いによりEFA6Aの細胞内局在やGEF活性が制御されていることについても明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

スパインの形態形成を制御する機構の解明は、学習・記憶の細胞レベルでの理解に直結する重要な課題である。また近年、スパインの形態形成を正しく制御する機構の破綻と、発達障害や精神疾患の発症との密接な関連性が指摘されている。本研究では、スパインの形態形成に関わるシグナル分子であるEFA6Aのリン酸化状態と機能が発達段階や神経活動に応じて変化するを見出した。したがって本研究の成果は、学習・記憶などの高次脳機能の発現機構の理解のみならず、これまで未知であった病因の解明に繋がる可能性を持った意義あるものであったと考えている。

研究成果の概要(英文)：The number and morphology of dendritic spines, the postsynaptic sites of excitatory synapses, dynamically change during development and in response to synaptic activity, but the regulatory mechanisms are not fully understood. In this study, we found that the phosphorylation states of EFA6A, one of the guanine nucleotide exchange factor (GEF) of Arf6, changes depending on developmental stage and synaptic activity. We also revealed that the subcellular localization and GEF activity of EFA6A are regulated by the difference in its phosphorylation state.

研究分野：神経科学

キーワード：スパイン 海馬 リン酸化

1. 研究開始当初の背景

興奮性シナプスの後部構造である樹状突起スパインは、生後の発達過程で活発に形成され、その後の成熟に伴いスパインの急激な増加は停止し、環境や経験に依存した不要なスパインの除去と必要なスパインの安定化が起こる。また一方で、成熟後の脳においても学習や記憶、環境によりスパインの再編成が行われることも知られている。このような発達や環境に依存してスパインの形態形成が適切に制御されることで、機能的な神経回路網が構築・維持されていると考えられている。そして近年では、この機構に何らかの異常が起こることで発達障害や精神疾患の発症に繋がることが示唆されている。発達・環境依存的なスパイン形態形成の変化には、神経活動に応じた NMDA 型グルタミン酸受容体 (NMDA 受容体) の活性化が必要となるが、その下流でどのような分子がどのように関与しているのか、その詳細な分子機構は十分に解明されていない。

2. 研究の目的

本研究では、膜小胞輸送やアクチン細胞骨格の再構成を制御する低分子量 G タンパク質 Arf6 (ADP リボシル化因子 6) の活性化因子 (グアニンヌクレオチド交換因子、GEF) であり、スパインの形態形成に関与することが報告されている EFA6A (Exchange factor for Arf6) に着目した研究を行うことで、発達や環境に応じたスパイン形態形成の制御機構を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

発達段階に応じたスパイン形態形成の制御には、神経活動に伴う NMDA 受容体の活性化とその下流のリン酸化シグナルカスケードが重要な働きをしていることから、質量分析を用いて生体内における EFA6A のリン酸化部位の同定を行った。また、リン酸化が EFA6A の機能に及ぼす影響を明らかにするために、リン酸化部位に変異を導入した変異型 EFA6A を用いた局在解析や GEF 活性などに対する解析を行った。

4. 研究成果

発達・環境依存的なスパイン形態形成の変化には、神経活動に応じた NMDA 受容体の活性化が必要であり、その下流ではタンパク質リン酸化を介した細胞内シグナル伝達経路が重要な働きをしている。そこでまず、発達期および成熟期のマウス海馬で発現している EFA6A のリン酸化状態を明らかにするために、質量分析によるリン酸化部位の同定を行った。その結果、いずれの時期の海馬においても EFA6A は非常に高度にリン酸化されていることが明らかになった。次に、これらのリン酸化部位に変異を導入した EFA6A を培養海馬神経細胞に発現させたところ、EFA6A

の細胞内局在の制御に関するリン酸化部位 X があることが分かった。そこで次に、細胞内におけるリン酸化部位 X のリン酸化状態をモニターするためのツールとして、リン酸化 EFA6A を特異的に認識する抗体を作製した。作製したリン酸化 EFA6A 特異的抗体を用いた解析により、神経活動依存的に EFA6A のリン酸化状態が変動することが分かった。また、リン酸化部位 X のリン酸化の制御に関わるリン酸化酵素 Y および脱リン酸化酵素 Z を同定することができた。

上記で同定した部位のリン酸化状態の変化が EFA6A の機能に与える影響を明らかにするための解析を行った。EFA6A の Arf6 に対する GEF 活性への影響を調べた結果、リン酸化状態により EFA6A の GEF 活性が顕著に異なることが明らかになった。また、初代培養海馬神経細胞を用いた解析により、神経刺激に依存して EFA6A のリン酸化状態が経時的に変化し、さらにこれと同様のタイムスケールで EFA6A の細胞内局在と Arf6 活性の変化が起こることが分かった。

以上の結果から、神経活動に応じた EFA6A のリン酸化状態の変化が EFA6A の細胞内局在や GEF 活性を変化させることにより、細胞内の Arf6 活性を時空間的に制御しており、これが発達過程や環境に応じたスパイン形態形成の変化に寄与している可能性が考えられた。今後は、リン酸化による EFA6A の制御がスパインの形態形成に実際に影響するのかどうかを明らかにする必要があると考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3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 Ito A, Fukaya M, Sugawara T, Hara Y, Okamoto H, Yamauchi J, Sakagami H.	4. 巻 159
2. 論文標題 Cytohesin-2 mediates group I metabotropic glutamate receptor-dependent mechanical allodynia through the activation of ADP ribosylation factor 6 in the spinal cord	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Neurobiol. Dis.	6. 最初と最後の頁 1-19
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.nbd.2021.105466	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 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 1745
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 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 菅原 健之、阪上 洋行
2. 発表標題 EFA6A-Arf6シグナルによる細胞内小胞輸送を介した軸索初節の制御機構
3. 学会等名 第128回日本解剖大会
4. 発表年 2022年 ~ 2023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
---------	---------