

令和 5 年 6 月 7 日現在

機関番号：12301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K07334

研究課題名(和文) ユビキチン化によるスパイン形成とシナプス可塑性の制御機構解明；認知症改善を目標に

研究課題名(英文) Regulatory mechanisms of spine formation and synaptic plasticity by ubiquitination; toward the treatment of dementia

研究代表者

川辺 浩志 (Kawabe, Hiroshi)

群馬大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：00582454

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)：本研究では神経細胞特異的Nedd4-2欠損マウス(Nedd4-2 cKO)を使ってNedd4-2がスパイン形態とシナプス可塑性に重要な役割を果たしていることを明らかにするために研究を開始した。その結果、Nedd4-2 cKOはシナプス可塑性について興味深い表現型を示した。同定した基質タンパク質の発現量がNedd4-2 cKOで増加していることを確認している。この基質タンパク質の発現量の上昇がシナプス可塑性の表現型の原因であることを明らかにした。また、Nedd4-2 cKOでシナプス構成タンパク質の微細局在とシナプス微細形態がどのように変化しているか検討するための超解像顕微鏡技術を立ち上げた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

神経科学研究の領域で、特異的ユビキチン化の意義は神経変性疾患を中心に研究されてきた。この研究分野において日本は世界をリードしている。一方で、神経細胞の正常な機能、特にシナプスにおける機能における特異的ユビキチン化の意義はほとんど研究されてこなかった。本研究では未知な部分が多いシナプス可塑性の制御における特異的ユビキチン化の役割を世界に先駆けて明らかにした。この成果は記憶のメカニズムが明らかになるだけでなく、Nedd4-2による基質タンパク質のユビキチン化を制御することで認知症の治療法の開発へと発展する可能性が期待できる。

研究成果の概要(英文)：We started this study to examine whether Nedd4-2 is important for spine morphology and synaptic plasticity using neuron-specific Nedd4-2 conditional KO mice (Nedd4-2 cKO). We discovered that Nedd4-2 cKO showed an interesting phenotype in synaptic plasticity. We have confirmed that the expression levels of identified substrate proteins are increased in Nedd4-2 cKO. We have shown that this elevated expression of substrate proteins is responsible for the synaptic plasticity phenotype. We have also developed a super-resolution microscopy technique to examine how the micro-localization of synaptic component proteins and synaptic micro-morphology are altered in Nedd4-2 cKO.

研究分野：生化学

キーワード：ユビキチン化 超解像顕微鏡

### 1. 研究開始当初の背景

記憶・学習などの脳機能の基盤となる神経回路では、シナプスを介して神経細胞から別の神経細胞へと情報が受け渡される。神経回路の形成に重要なタンパク質の発現制御に関して、転写レベルでの研究が進んでいるが、分解による発現制御は不明な点が多い。申請者らはタンパク質分解に関与するユビキチン化に注目して、ユビキチン化の基質特異性を決定する Nedd4 ファミリー E3 リガーゼ遺伝子である Nedd4-1 と Wwp1、そして Wwp2 が神経細胞の発達に重要であることを明らかにしてきた。本研究では Nedd4-2 のシナプスでの機能特にシナプス可塑性の制御について研究した。

### 2. 研究の目的

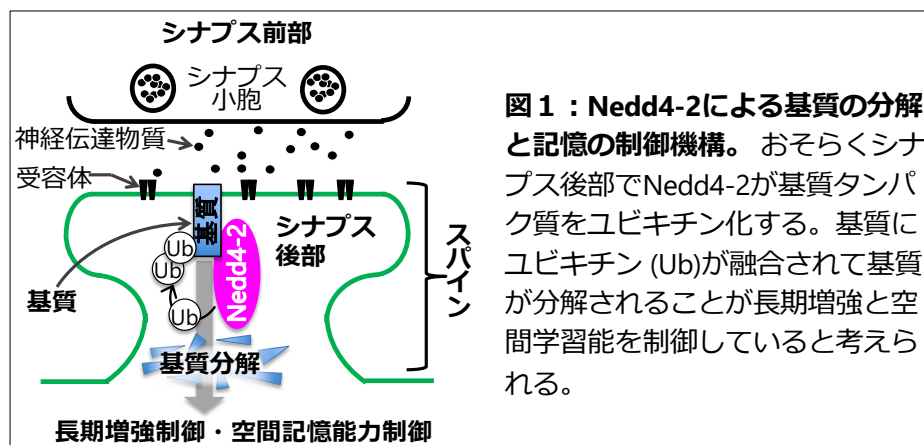
Nedd4-2 がシナプス後部に存在することを超解像 STED 顕微鏡で見出した。神経細胞特異的 Nedd4-2 欠損マウスでは、電気生理学的に海馬 CA1 領域でシナプス可塑性である長期増強と行動学的実験で空間学習能力が有為に変化していた。本研究では Nedd4-2 が触媒する基質のユビキチン化と基質の分解がどのような分子メカニズムでスパイン形成とシナプス可塑性を制御するかを明らかにする。

### 3. 研究の方法

神経細胞特異的 Nedd4-2 欠損マウス (Nedd4-2 cKO) の神経細胞にミリストイル型 Venus タンパク質を発現させて STED 顕微鏡で観察することでスパイン形態を観察した。また、すでに同定した Nedd4-2 の基質タンパク質の神経細胞内の局在を観察する。最後に、シナプス可塑性の制御における Nedd4-2 と基質タンパク質の機能的関連を観察する。

### 4. 研究成果

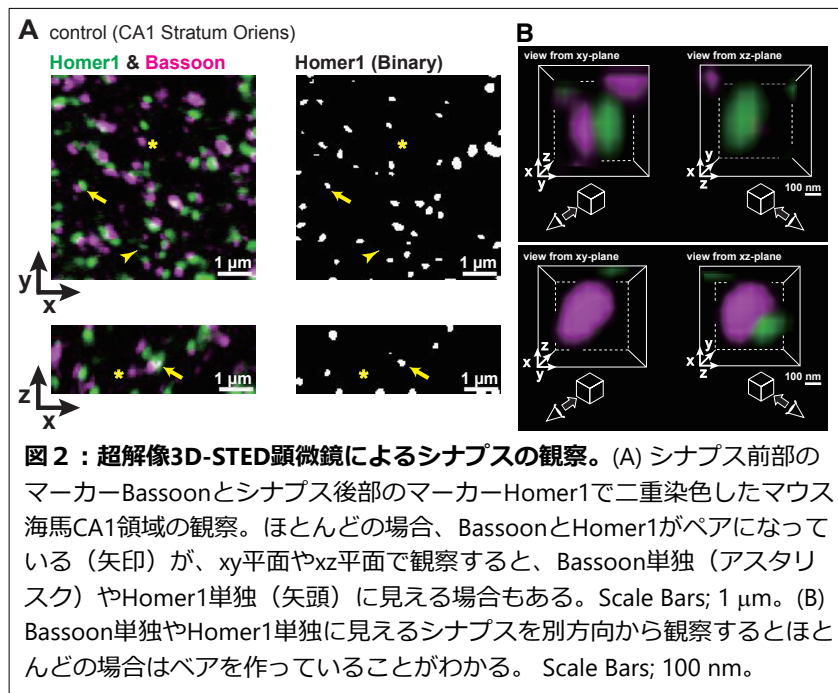
超解像 STED 顕微鏡を使うことで、Nedd4-2 の基質タンパク質が高度にスパインに濃縮していることを見出した。また、このタンパク質をコードする遺伝子を欠損させることで Nedd4-2 cKO のシナプス可塑性における表現型がコントロールマウスのレベルまで回復した。この結果から、Nedd4-2 がこの基質タンパク質をユビキチン化して発現量を抑えることでシナプス可塑性を制御していると結論した (図1)。



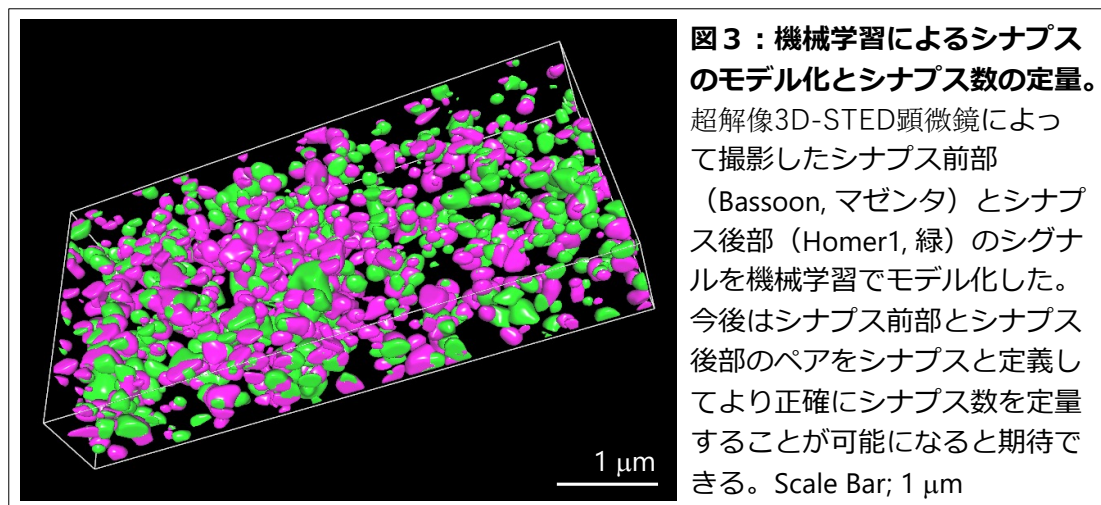
これまでに、多くの構造タンパク質とシグナル伝達関連タンパク質をコードする遺伝子欠損マウスで、シナプス機能の異常が引き起こされることが報告されてきた。その結果、ほとんどの場合、学習能力が低下する。本研究では、特異的なユビキチン化を触媒する E3 リガーゼである Nedd4-2 によるシナプス可塑性の表現型と、その表現型を説明する分子機構の一部を明らかにした。この研究成果から、Nedd4-2 を介した特異的なユビキチン化を制御することで将来的には認知症の症状改善につながる医薬品の開発に発展すると期待できる。

Nedd4-2 と相溶性が高い Ube3b という E3 リガーゼについてもその機能を研究した。ヒト UBE3B 遺伝子の欠損により発達障害の一つであるカウフマン症候群を発症する。研究代表者はすでにマウス Ube3b の神経細胞発達における機能を報告した (Ambrozkiwicz, 川辺ら, Mol Psychiatry, 2021)。本研究期間中に若年成人期から成人期における Ube3b の機能を研究した。Ube3b cKO はコントロールマウスに比べて興奮性シナプスの数が減少していることを見出した (Katsube, 川辺ら, Neurosci Letters, 2023)。この研究では3次元で高分解能で観察することが可能な超解像 3D-STED 顕微鏡を駆使してシナプスの観察を行った。コンフォーカル顕微鏡の分解能が xy 方向で 250 nm 程度、z 軸方向で 600 nm 程度と考えられている。シナプスの大きさ

が 100 nm から 500 nm 程度であるために個々のシナプスを完全に分離することは困難であった。超解像 3D-STED 顕微鏡の分解能は xyz 全方向に 85 nm であるために、これまでのコンフォーカル顕微鏡を使ったシナプス数の定量に比べて格段に正確に定量することが可能になった(図 2)。



この成果は論文として報告した(Katsube, 川辺ら, Neurosci Letters, 2023)が、この論文ではImageJを使ってある明るさ(閾値)以上のシグナルをシナプスからのシグナルと定義した。さらに、超解像 3D-STED 顕微鏡で撮影した Bassoon と Homer1 のシグナルをもとに人工知能を使ってシナプス数を定量する解析系を確立しつつある(図 3)。



さらに、本研究期間中に超解像 STED 顕微鏡を応用した技術開発も進めた。超解像 3D-STED 顕微鏡を応用して開発した顕微鏡技術によって分解能が向上した結果、xyz の全方向で 20 nm 程度の分解能が得られた。タンパク質分子の大きさが数 nm から 20 nm 程度であることから、20 nm 程度の分解能の蛍光顕微鏡によってほぼ 1 タンパク質分子レベルの分解能が達成できていると考えられる。この分解能は世界でもトップレベルの分解能であると言える。

将来的には、これらの顕微鏡技術で Nedd4-2 cK0 のシナプス形態を観察することで、シナプス可塑性の新しい制御機構を分子レベルで理解することが可能になると考えられる。さらに、この顕微鏡技術をシナプ스에異常がある疾患の病態解明や創薬研究に応用できる可能性が高い。

このように本研究の成果は非常に大きく、神経科学研究だけでなく、細胞生物学研究や病理学研究などにも幅広く応用できる可能性が高いため大きく発展すると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 7件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Koganezawa Noriko, Hanamura Kenji, Schwark Manuela, Krueger-Burg Dilja, Kawabe Hiroshi	4. 巻 582
2. 論文標題 Super-resolved 3D-STED microscopy identifies a layer-specific increase in excitatory synapses in the hippocampal CA1 region of Neuroligin-3 KO mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 144 ~ 149
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2021.10.003	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 該当する
1. 著者名 Leitz Dominik H. W., Duerr Julia, Mulugeta Surafel, Seyhan Agircan Ay?a, Zimmermann Stefan, Kawabe Hiroshi, Dalpke Alexander H., Beers Michael F., Mall Marcus A.	4. 巻 22
2. 論文標題 Congenital Deletion of Nedd4-2 in Lung Epithelial Cells Causes Progressive Alveolitis and Pulmonary Fibrosis in Neonatal Mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 6146 ~ 6146
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms22116146	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 該当する
1. 著者名 Yan Shen, Ripamonti Raphael, Kawabe Hiroshi, Ben-Yehuda Greenwald Maya, Werner Sabine	4. 巻 22
2. 論文標題 NEDD4-1 Is a Key Regulator of Epidermal Homeostasis and Wound Repair	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Investigative Dermatology	6. 最初と最後の頁 6146
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jid.2021.09.033	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 該当する
1. 著者名 Kawabe Hiroshi, Stegmüller Judith	4. 巻 112
2. 論文標題 The role of E3 ubiquitin ligases in synapse function in the healthy and diseased brain	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Molecular and Cellular Neuroscience	6. 最初と最後の頁 103602 ~ 103602
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.mcn.2021.103602	査読の有無 無
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 該当する

1. 著者名 Ambrozkiewicz Mateusz C., Cuthill Katherine J., Harnett Dermot, Kawabe Hiroshi, Tarabykin Victor	4. 巻 9
2. 論文標題 Molecular Evolution, Neurodevelopmental Roles and Clinical Significance of HECT-Type UBE3 E3 Ubiquitin Ligases	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cells	6. 最初と最後の頁 2455 ~ 2455
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cells9112455	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

1. 著者名 Akter Nargis, Fukaya Ryota, Adachi Ryota, Kawabe Hiroshi, Kuba Hiroshi	4. 巻 40
2. 論文標題 Structural and Functional Refinement of the Axon Initial Segment in Avian Cochlear Nucleus during Development	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The Journal of Neuroscience	6. 最初と最後の頁 6709 ~ 6721
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1523/JNEUROSCI.3068-19.2020	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 該当する

1. 著者名 Katsube Saki, Koganezawa Noriko, Hanamura Kenji, Cuthill Katherine J., Tarabykin Victor, Ambrozkiewicz Mateusz C., Kawabe Hiroshi	4. 巻 797
2. 論文標題 The murine ortholog of Kaufman oculocerebrofacial syndrome gene Ube3b is crucial for the maintenance of the excitatory synapses in the young adult stage	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Neuroscience Letters	6. 最初と最後の頁 137059 ~ 137059
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.neulet.2023.137059	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 該当する

〔学会発表〕 計4件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 4件)

1. 発表者名 Koganezawa Noriko, Hanamura Kenji, Schwark Manuela, Krueger-Burg Dilja, Kawabe Hiroshi
2. 発表標題 Super-resolved 3D-STED microscopy identifies a layer-specific increase in excitatory synapses in the hippocampal CA1 region of Neuroigin-3 KO mice
3. 学会等名 第95回日本薬理学会年会 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 川辺 浩志
2. 発表標題 The principle and applications of STED microscopy
3. 学会等名 日本薬物動態学会第 37 回年会（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Saki Katsube, Noriko Koganezawa, Kenji Hanamura, Katherine J. Cuthill, Mateusz C. Ambrozkiwicz, Hiroshi Kawabe
2. 発表標題 Kaufman oculocerebrofacial syndrome gene, Ube3b, is crucial for the maintenance of synapse numbers in the young adult brain
3. 学会等名 第96回日本薬理学会年会（国際学会）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Tomoya Nakamura, Kenji Hanamura, Kei Hori, Mikio Hoshino, Hiroshi Kawabe
2. 発表標題 The analysis of synapse numbers in an autism spectrum disorder (ASD) model mouse with 3D-STED microscopy
3. 学会等名 第96回日本薬理学会年会（国際学会）
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 記憶力向上のための認知症治療薬のスクリーニング方法	発明者 川辺 浩志	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、P 2 1 1 9 0 2 J P	出願年 2021年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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
---------	---------