

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 15 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2011

課題番号：22700343

研究課題名（和文） 細胞内輸送機構による神経機能の制御

研究課題名（英文） Regulation of neuronal function by intracellular protein trafficking

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）：

NMDA 受容体の活性化が AMPA 受容体のエンドサイトーシスを引き起こし、これにより長期抑圧（LTD）というシナプス可塑性が引き起こされることが知られているが、その分子機構は明らかになっていない。我々は NMDA 受容体の活性化が、PIP5K $\gamma$ 661 という酵素の活性と stargazin とアダプタータンパク質複合体との結合を制御することで、AMPA 受容体のエンドサイトーシスと LTD の誘導にかかわっていることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

NMDA receptor activation leads to endocytosis of AMPA receptors. Although this process controls long-term depression (LTD) induction, how it is regulated by neuronal activities is not completely clear. We showed that the NMDA receptor activation controls AMPA receptor endocytosis and LTD induction by regulating PIP5K $\gamma$ 661 activity and the interaction between stargazin and Adaptor Protein Complexes.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2011 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：脳神経科学・神経科学一般

キーワード：AMPA 受容体・stargazin・アダプタータンパク質・長期抑圧・リン酸化 PIP5K $\gamma$ 661・NMDA 受容体

## 1. 研究開始当初の背景

神経細胞は極性を持った細胞であり、他の細胞に情報を伝える軸索と情報を受け取る樹状突起の2つの領域からなっている。1つの神経細胞の軸索は他の細胞の樹状突起に入力し、神経細胞間の情報伝達の場となる「シナプス」を形成している。シナプスにおいて、軸索末端からは神経伝達物質が放出され、その伝達物質が樹状突起の伝達物質受容体に結合することで情報伝達が行われる。哺乳類

の中枢神経系における最も主要な神経伝達物質はグルタミン酸であり、このグルタミン酸による伝達効率は神経活動に応じて変化することが知られている。この現象はシナプス可塑性と呼ばれ、記憶・学習の基礎課程と考えられている。近年、AMPA 型グルタミン酸受容体（AMPA 受容体）の樹状突起におけるエンドサイトーシスやエクソサイトーシスといった細胞内輸送が長期増強（LTP）や長期抑圧（LTD）等のシナプス可塑性の分子

実態であることが明らかにされてきている。しかし、どのように神経活動が AMPA 受容体の輸送を制御するかは不明である。申請者は以前より、LTD の分子機構を明らかにする目的で研究を行ってきており、AMPA 受容体がリン酸化されることによりそのアンカータンパク質である GRIP から解離すること (Matsuda et al. J. Neurochem. 1999)、GRIP からの解離が AMPA 受容体のエンドサイトーシスに必要であり、このエンドサイトーシスが LTD の分子機構であることを明らかにしてきた (Matsuda et al. EMBO J. 2000)。現在では、LTD の分子実体はポストシナプスにおける AMPA 受容体のクラスリン媒介エンドサイトーシスであることが定説となっている。しかし、どのような機構で LTD 誘導刺激がエンドサイトーシスを活性化するのか、また AMPA 受容体がどのようにして LTD 誘導刺激に依存してクラスリン被覆小孔に取り込まれるのか、さらにはエンドサイトーシスで取り込まれた AMPA 受容体はその後どのように処理されるのかといったことは研究開始当初は明らかにされていなかった。申請者は、これまでに AMPA 受容体と非常に強固に結合するタンパク質である TARP が AP-Complex の 1 つである AP-4 に結合すること、そして TARP と AP-4 との結合が AMPA 受容体を樹状突起特異的に輸送することに重要な働きを持っていることを明らかにした (Matsuda et al. Neuron 2008)。申請者はこの結果をふまえ、AMPA 受容体 TARP 複合体が他の AP-Complex にも結合するかを解析する予備実験を行った。その結果、この複合体はエンドサイトーシスを制御する AP-2 や、エンドソームからリソソームへの輸送を司る AP-3 にも結合することが明らかになった。このことは AMPA 受容体が TARP を介した AP-Complex への結合によりクラスリン被覆小孔に取り込まれること、さらにはリソソームへと輸送され分解されることを示唆している。つまり、神経細胞が LTD 誘導刺激を受けると、細胞膜へとリクルートされた AP-2 と TARP が結合することにより AMPA 受容体のクラスリン媒介エンドサイトーシスが起こり、その後、TARP が AP-3 と結合することでリソソームへ送られることで AMPA 受容体はリサイクルされることなく分解され、長期にわたって細胞表面の AMPA 受容体量が減少して LTD が成立する可能性がある。本申請研究ではこの仮説を検証していくことを目的としていた。また、これまでに AP-2 が細胞膜にリクルートされてエンドサイトーシスが開始されるためには細胞膜上にホスファチジルイノシトール 2 リン酸 (PIP2) が合成されることが必須であることが知られている。このことから LTD

の最初期段階はシナプス後膜上に PIP2 が合成されることである可能性が考えられる。実際、申請者は予備実験により、PIP2 を合成する PIP5K という酵素が LTD 誘導刺激 (NMDA 刺激) により活性化されることを示唆する結果を得ている。このことから LTD 誘導の最初期段階は PIP5K の活性化による PIP2 の合成であるという仮説を考えていた。

## 2. 研究の目的

神経細胞間におけるシナプス可塑性の分子実体は AMPA 受容体のエンドサイトーシス・エクソサイトーシスであると考えられてきている。申請者は予備実験により、長期抑圧誘導刺激がエンドサイトーシスに必須であるホスファチジルイノシトール 2 リン酸を合成する酵素である PIP5K を活性化すること、また AMPA 受容体が、エンドサイトーシスを制御するアダプタータンパク質・AP-2 やリソソームへの輸送を制御する AP-3 に TARP と呼ばれるタンパク質を介して結合することを明らかにしていた。このことは AMPA 受容体の細胞内輸送が PIP5K や TARP そしてアダプタータンパク質により巧妙に制御されていることを示唆している。これらのタンパク質が、どのように神経機能を制御しているのかを明らかにすることを目的としていた。

## 3. 研究の方法

### (1) PIP5K の機能

PIP5K の C 末領域のセリン残基の脱リン酸化とそれによる AP-2 との結合がこの酵素の活性化に必要であり、また擬似脱リン酸化 (セリンをアラニンに置換) C 末領域を過剰発現させることで、PIP5K の機能を阻害できることが報告されていた。そこで擬似脱リン酸化型の PIP5K の C 末領域を培養海馬神経細胞に発現させ、AMPA 受容体のエンドサイトーシスにどのような影響が出るかを解析した。具体的には、培養海馬神経細胞に PIP5K の C 末領域と共に N 末細胞外領域に HA タグを付加した AMPA 受容体を発現させた。LTD を誘導する刺激 (NMDA 処理) を加えた後、細胞表面に存在する AMPA 受容体の量を免疫組織化学的手法を用いて解析した。さらにこの PIP5K の C 末領域を発現させた神経細胞を電気生理学的手法を用いて解析した。

### (2) TARP と Adaptor Protein の結合

申請者は既に、TARP に様々な変異を導入することによって、AP-2 に結合できない変異 TARP、AP-3 に結合できない変異体を得ることに成功していた。そこでまず、AP-2 に結合できない変異体を神経細胞に過剰発現

させ、AP-2 と TARP との結合を特異的に阻害し、AMPA 受容体の細胞内輸送を解析した。また、実際のシナプス応答にどのような影響を与えるかを電気生理学的に明らかにした。次に、AP-3 に結合できない変異体を発現させ、AP-3 と TARP との結合を阻害した場合、AMPA 受容体のエンドサイトーシスやリサイクルにどのような影響があるかを解析した。さらに AP-Complex が LTD の誘導や維持にどのように関与しているかも明らかにするため、siRNA を用いて培養海馬神経細胞の AP-2 または AP-3 をノックダウンし、この神経細胞での AMPA 受容体の細胞内輸送を解析した。

#### 4. 研究成果

##### (1) PIP5K の機能

培養海馬神経細胞に PIP5K の C 末領域と共に N 末細胞外領域に HA タグを付加した AMPA 受容体を発現させた。NMDA 処理を加えた後、細胞表面に存在する AMPA 受容体の量を免疫組織化学的手法を用いて解析した。その結果擬似脱リン酸化(セリンをアラニンに置換) C 末領域を過剰発現させた神経細胞では AMPA 受容体のエンドサイトーシスが阻害されていたのに対し、擬似リン酸化(セリンをアスパラギン酸に置換) C 末領域を過剰発現させた神経細胞では、正常に AMPA 受容体のエンドサイトーシスが見られた。さらにこの PIP5K の C 末領域を発現させた神経細胞を電気生理学的手法を用いて解析した。その結果擬似脱リン酸化 C 末領域を過剰発現させた神経細胞では LTD が誘導されなかったのに対し、擬似リン酸化 C 末領域を過剰発現させた神経細胞では、正常に LTD が見られた。以上の結果から、PIP5K の C 末領域の脱リン酸化による活性化が AMPA 受容体のエンドサイトーシスおよび LTD の誘導に必須の働きをしていることが示された (Neuron 2011)。

##### (2) TARP と Adaptor Protein の結合

AP-2 に結合できない変異 TARP を過剰発現させ、AP-2 と TARP との結合を特異的に阻害した培養神経細胞では、NMDA 処理による AMPA 受容体のエンドサイトーシスは観察されなかった。一方 AP-3 に結合できない変異 TARP を発現させ、AP-3 と TARP との結合を阻害した神経細胞では、AMPA 受容体は一旦エンドサイトーシスにより細胞内へ取り込まれるものの、直ぐに細胞表面へリサイクルされることを明らかにした。さらに、siRNA を用いて培養海馬神経細胞の AP-2 および AP-3 をノックダウンし、この神経細胞での AMPA 受容体の細胞内輸送を解析した結果、同様に AMPA 受容体の細胞内輸送が障害を受けていることが明らかになった。ま

た、AP-2 に結合できない変異 TARP、あるいは AP-3 に結合できない変異 TARP を過剰発現させた海馬の急性スライスでは、LTD は引き起こされなかった。一方野生型の TARP を過剰発現させた海馬の急性スライスでは正常に LTD が誘導された。以上の結果から、TARP の脱リン酸化とそれによって制御されるアダプタータンパク質との結合が海馬の LTD に重要な役割を果たしていることが明らかになった (Neuron in revision)。

#### 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2件)

**NMDA receptor-mediated PIP5K activation to produce PI(4,5)P is essential for AMPA receptor endocytosis during LTD.**

Unoki T\*, Matsuda S\*, Kakegawa W\*, Van N. T, Kohda K, Suzuki A, Funakoshi Y, Hasegawa H, Yuzaki M, Kanaho Y

\*These authors contributed equally  
Neuron, 査読有, 2011 73 35-148

**Cerebellar long-term depression requires dephosphorylation of TARP in Purkinje cells**

Nomura T, Kakegawa W, Matsuda S, Kohda K, Nishiyama J, Takahashi T, Yuzaki M

European Journal of Neuroscience, 査読有, 2011 35 402-410

(学会発表)(計1件)

野村寿博 掛川渉 松田信爾 幸田和久 柚崎通介 小脳長期抑制の TARP による制御第 33 回日本神経科学会 2010 年 9 月 4 日 神戸

(図書)(計0件)

(産業財産権)

出願状況(計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況（計0件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等  
なし

## 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