

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31日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2011

課題番号：22700354

研究課題名（和文） テレンセファリンのリガンド・ビトロネクチンによるシナプス形成制御機構の解析

研究課題名（英文） Telencephalin binds to vitronectin and regulates synapse formation

研究代表者

古谷 裕 (FURUTANI YUTAKA)

独立行政法人理化学研究所・シナプス分子機構研究チーム・研究員

研究者番号：80392108

研究成果の概要（和文）：細胞接着分子テレンセファリンが細胞外マトリックス蛋白質ビトロネクチンに強く結合することを見出した。ビトロネクチンコートしたビーズを培養海馬神経細胞に撒くと樹状突起に結合し、ビーズ周囲にテレンセファリンの集積を伴う突起構造を形成する。ビトロネクチン欠損マウスの海馬 CA1 錐体細胞においてスパインヘッドの肥大が観られた。これらのことからテレンセファリンとビトロネクチンとの結合がスパインヘッドの形態を調節していると考えられた。

研究成果の概要（英文）：I report the identification of telencephalin as a novel vitronectin receptor on neuronal dendrites. Vitronectin-coated microbeads induce the accumulation of telencephalin and the formation of phagocytic cup-like plasma membrane protrusions on dendrites of cultured hippocampal neurons. Vitronectin-deficient mice displays marked enlargement of spine heads in hippocampal CA1 pyramidal neurons. These results suggest that the vitronectin and its neuronal receptor telencephalin play a pivotal role in spine morphogenesis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

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：テレンセファリン、ビトロネクチン、スパイン、シナプス形成、細胞接着分子、細胞外マトリックス

1. 研究開始当初の背景

テレンセファリンは1987年、森憲作によってモノクローナル抗体271A6が抗原として認識する分子として発見され(PNAS 84: 3921,

1987)、1994年に吉原良浩がその構造について発表した(Neuron 12: 541, 1994)。この発表以来、終脳神経細胞の樹状突起特異的に局在する細胞接着分子であることが解り、近年

国内外の研究グループがテレンセファリンに注目し研究を進めている。2006年に松野仁美によってテレンセファリンがスパイン形成を調節し、さらにスパインの前駆体である樹状突起フィロポディア形成を促進することが示された(J. Neurosci. 26: 1776, 2006)。私はテレンセファリン細胞内領域がEzrin/Radixin/Moesin(ERMタンパク質)と結合し、スパイン形成と樹状突起フィロポディアの伸長を制御していることを明らかにした(J. Neurosci. 27: 8866, 2007)。これまでの研究でスパイン形成に関わる接着分子は数多く報告されてきたが(Curr. Opin. Neurobiol. 16: 95, 2006)、樹状突起フィロポディア形成を制御する接着分子はテレンセファリンが初めてであり、これに結合して活性を制御する分子もERMタンパク質が初めての報告である。また、テレンセファリン細胞外領域がプロテアーゼに切断されることによりスパイン形成を促進すると報告された(J. Cell Biol. 178: 687, 2007)。このようにテレンセファリンは樹状突起フィロポディア形成とスパイン成熟を調節する細胞接着分子であることが明らかになった。

2. 研究の目的

私たちの研究により、樹状突起フィロポディア形成とスパイン成熟においてテレンセファリンの細胞内領域のみだけでなく細胞外領域も重要であることが明らかになっている。これまでの研究で細胞内領域にはERMタンパク質が結合すると解っていたが、細胞外領域に結合しフィロポディア形成やスパイン成熟を調節するタンパク質は解っていなかった。そこで私はテレンセファリンの細胞外領域に結合するリガンドを探索したところ、細胞外マトリックス蛋白質ビトロネクチンが結合することを明らかにした。また、ビ

トロネクチンコートしたマイクロビーズを培養海馬神経細胞に撒くと、テレンセファリンの激しい集積が起こり、ビーズをファゴサイトーシスするかのようにテレンセファリンがビーズ全体を取り囲んでいた(図1)。そ

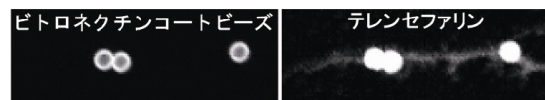


図1: ビトロネクチンコートしたマイクロビーズを培養海馬神経細胞に撒くと、樹状突起に結合しテレンセファリンの激しい集積を起こす。

こには、樹状突起フィロポディアのマーカとなるリン酸化ERMタンパク質やF-アクチンが集積していた。このようにテレンセファリンをレセプターとしてリガンドであるビトロネクチンが神経細胞で働き、テレンセファリン結合分子であるリン酸化ERMタンパク質の集積を起こすことが明らかとなった。そこで、この相互作用がフィロポディア形成やスパイン成熟に関わるか明らかにすることを第1の目的とした。また、ビトロネクチンコートしたマイクロビーズによりテレンセファリンの激しい集積が起こる。この集積に伴い集まってくるテレンセファリン結合タンパク質を網羅的に解析し、フィロポディア形成からスパイン成熟への細胞内シグナルを明らかにすることを第2の目的とした。テレンセファリン遺伝子欠損マウスは野生型マウスと比較してスパイン形成が早まり、聴覚野における臨界期の終了が早くなることが解っている。そこで、ビトロネクチン欠損マウスにおいても樹状突起フィロポディアやスパイン形成に変化があるのか明らかにすることを第3の目的とした。

3. 研究の方法

テレンセファリンとビトロネクチンとの相互作用がフィロポディア形成とスパイン成熟において果たす役割、さらにマウスでの神

経回路形成に伴う高次脳機能への効果を調べるために以下の実験を行った。

(1) テレンセファリンとビトロネクチンとの結合実験

N2a 細胞にテレンセファリンを過剰発現させるとフィロポディア様の突起を形成し、細胞がスプレディングを起こす (図 2)。一般的にス

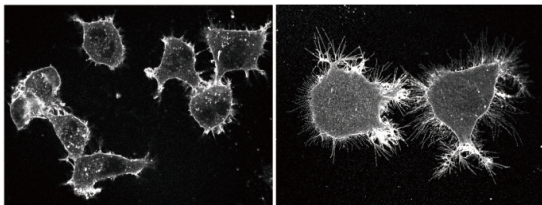


図 2 : N2a 細胞 (左) にテレンセファリンを過剰発現させるとフィロポディア様の突起が形成され、スプレディングを起こす (右)。

プレディングを起こす際に細胞接着分子と細胞外マトリックス蛋白質の間で相互作用が起こっている。そこで、テレンセファリンを過剰発現させた N2a 細胞と細胞外マトリックス蛋白質との結合実験を行った。さらに、この結合が直接的な結合か間接的な結合か明らかとするために表面プラズモン (Biacore) を用いた結合実験を行った。

(2) ビトロネクチンコートビーズによる phagocytic cup-like structures の形成

神経細胞におけるテレンセファリンとビトロネクチンとの相互作用の役割を明らかにするために、ビトロネクチンコートしたビーズを培養海馬神経細胞に撒くとテレンセファリンの激しい集積を伴いビーズの周囲を取り囲む突起構造である phagocytic cup-like structure が形成される。ここには樹状突起フィロポディアに局在するテレンセファリン、F-アクチン、PI(4,5)P₂ などが集積していた。この phagocytic cup-like structure の形成はテレンセファリンの発現に依存していた。これらのことから、ビトロネクチンは神経細胞での受容体であるテレンセファリンと結合し、細胞内でテレンセフ

ァリンと結合するリン酸化 ERM 蛋白質や F-アクチンの集積を引き起こし、細胞内シグナルを活性化していると考えられた。

(3) ビトロネクチンの脳における局在

テレンセファリンは終脳特異的な細胞接着分子で、スパインを持つ神経細胞に発現している。一方で、ビトロネクチンの脳内での局在は明らかとなっていなかった。そこで、マウス・ビトロネクチンに特異的な抗体を作製し、抗体染色を行った。その結果、血管周囲にある周皮細胞と軟膜より発現していることが解った。よってこれらの細胞から分泌されたビトロネクチンは脳全体に広がって行くと考えられた。

(4) ビトロネクチンによるスパイン形態制御

テレンセファリン欠損マウスにおいて、スパイン形成が促進されると共にスパインヘッドの肥大が観られていた。そして、免疫電顕によりテレンセファリンは Post-synaptic density (PSD) の近傍に局在していた。ビトロネクチンがテレンセファリンの足場となりスパインヘッドの形態を制御していると考えた。そこで、ビトロネクチン欠損マウスにおける海馬 CA1 錐体細胞のスパイン形態を DiI により可視化し野性型マウスと比較した。

4. 研究成果

(1) テレンセファリンのリガンド・ビトロネクチンの同定

これまでテレンセファリンに結合する分子としてリン酸化 ERM 蛋白質、 α -アクチニン、プレセニン、LFA-1 インテグリンが国内外の研究室により同定されているが、ビトロネクチンは細胞外マトリックス蛋白質としてテレンセファリンに結合する初めての蛋白質である。テレンセファリンの発現に依存して N2a 細胞がビトロネクチンに結合するが、他のフィブロネクチン、コラーゲン I、ラミニンにはテレンセファリンの発現に依存して結合しなかった (図 3)。そして、テレンセファリン細胞外領域とビトロネクチンが直

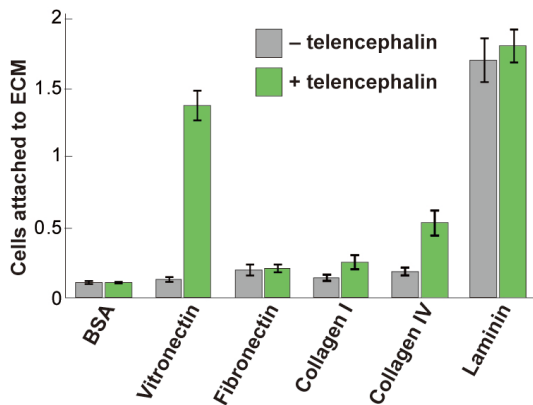


図3 : N2a 細胞はテレンセファリンの発現に依存してビトロネクチンと結合する。

接結合することを表面プラズモンを用いた結合実験により示した (図4)。さらに、テレンセファリンはビトロネクチン・ヘモペキシンドメインに結合し、この結合にはテレンセファリンの第2 Ig-like ドメインが関与していることが明らかとなった。

(2) Phagocytic cup-like structures と樹状突起フィロポディアの相同性

ビトロネクチンコートしたビーズを培養海馬神経細胞に撒くとテレンセファリンの集積を伴う phagocytic cup-like structure の形成が起こる。この phagocytic cup-like structure を抗体染色により解析すると樹状突起フィロポディアに局在するリン酸化 ERM 蛋白質や F-アクチンや PI(4,5)P₂ などが集積していた。このことから phagocytic cup-like structure と樹状突起フィロポディアの間には構成分子の相同性があることが確かめられた。この相同性を利用して樹状突起フィロポディアに局在する分子を網羅的に同定することが可能となった。

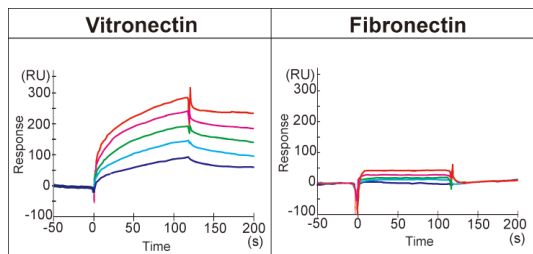


図4 : テレンセファリン細胞外領域はビトロネクチンに結合するがフィブロネクチンには結合しない。

(3) ビトロネクチンの脳内局在

ビトロネクチンは国内外の様々な研究室により局在や機能を調べられてきたが、これまで脳における詳細な局在を明らかにされていなかった。この研究で特異性の高い抗体を作製し、ビトロネクチン欠損マウスと野生型マウスを用い抗体染色結果を比べることにより、ビトロネクチンが血管の周りに位置する pericyte や脳を取り巻く leptomeninges より発現していることが明らかとなった。これまで、アストロサイトより分泌されシナプス形成を制御する細胞外マトリックス蛋白質は知られていたが、pericyte より分泌されシナプス形成を制御する分子は国内外問わず初めての報告である。

(4) ビトロネクチンとテレンセファリンによるスパイン形態制御

これまでにテレンセファリン欠損マウス CA1 錐体細胞においてスパインヘッドの肥大が観られていた。私は以前の研究においてリン酸化 ERM 蛋白質とテレンセファリンの結合によるアクチン骨格の形成制御が細胞内からスパインの形態を制御していることを明らかにした。ビトロネクチン欠損マウスにおいてもスパインヘッドの肥大化が観られ (図5)、テレンセファリンとビトロネクチンに

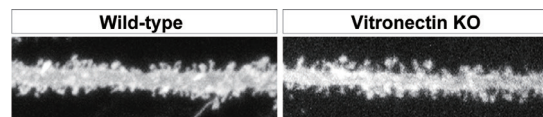


図5 : ビトロネクチン欠損マウスにおいてスパインヘッドが肥大した。一方、スパインの密度は低下した。

よるスパイン形態の制御機構が存在すると考えられた (図6)。そして、ビトロネクチンコートしたビーズにリン酸化 ERM 蛋白質が集積してくることからテレンセファリンはビトロネクチンをリガンドとしてスパインの形態を調節していると考えられた。このことはビトロネクチンを細胞外から投与することによりスパインの形態を調節でき、臨界期や神経可塑性の制御につながる重要な研究である。

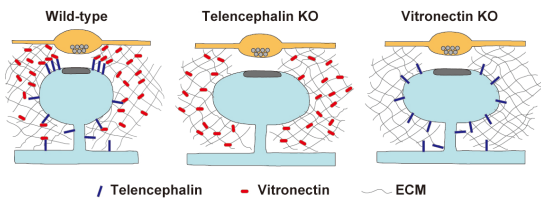


図6：ビトロネクチン欠損マウスにおいてもテレンセファリン欠損マウスと同様にスパインヘッドの肥大が観られた。野生型においてテレンセファリンはビトロネクチンを足場としてスパインの形態をコンパクトに保っていると考えられる。

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 2 件)

- ① Y. Mori, T. Matsui, Y. Furutani, Y. Yoshihara, M. Fukuda “Small GTPase Rab17 Regulates the Dendritic Morphogenesis and Postsynaptic Development of Hippocampal Neurons” **J. Biol. Chem.** 287:8963-8973 (2012) 査読有
- ② A. Di Sandro, S. Del Duca, EA. Verderio, AJ. Hargreaves, A. Scarpellini, G. Cai, M. Cresti, C. Faleri, RA. Iorio, S. Hirose, Y. Furutani, IG. Coutts, M. Griffin, PL. Bonner, D. Serafini. “An Extracellular Transglutaminase is Required for Apple Pollen Tube Growth” **Biochem J.** 429:261-271 (2010) 査読有

[学会発表] (計 3 件)

- ① 吉原良浩、古谷 裕 「樹状突起フィロポディアの形成・維持・機能を制御する分子機構」第84回日本生化学会大会 2011年9月21日 京都
- ② Y. Furutani, M. Kawasaki, H. Matsuno, S. Mitusi, K. Mori, Y. Yoshihara “Vitronectin Binds to Telencephalin and Regulates Dendritic Spine Morphogenesis” The 34th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society, 2011年9月15日 横浜
- ③ Y. Furutani, Y. Yoshihara “Proteomic Analysis of Dendritic Filopodia” The 33rd Annual Meeting of the Japan Neuroscience

Society, 2010年9月3日 神戸

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

- 出願状況 (計 0 件)
- 取得状況 (計 0 件)

[その他]

6. 研究組織

(1) 研究代表者

古谷 裕 (FURUTANI YUTAKA)

独立行政法人理化学研究所・シナプス分子機構研究チーム・研究員

研究者番号：80392108