

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 22 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24390095

研究課題名(和文)新規Akt基質Girdinのシナプス可塑性における機能と精神・神経疾患での病態解析

研究課題名(英文)Roles of Girdin in synaptic plasticity and memory

研究代表者

浅井 直也 (Asai, Naoya)

名古屋大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：80273233

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,400,000円

研究成果の概要(和文)：アクチン結合タンパクGirdinはAktによってセリン1416残基がリン酸化され、細胞骨格の制御を介して細胞運動に関わる。本研究計画では、海馬のシナプス可塑性の制御におけるGirdin S1416リン酸化の役割を調べた。Girdinは生体脳の花柳神経細胞において刺激依存性にS1416リン酸化を受けた。リン酸化部位変異ノックインマウスではスパインの萎縮、電気生理学的なLTPの減弱、海馬依存性の長期記憶の障害が生じた。さらにGirdinがSrcおよびNR2Bと複合体を形成すること、Girdinリン酸化がNR2Bリン酸化を介してNMDA受容体の活性をコントロールしていることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Girdin, an actin-binding protein involved both in the remodeling of the actin cytoskeleton and in cell migration, has been identified as a substrate of Akt at Girdin S1416. We focused on the role of Girdin S1416 phosphorylation in BDNF/TrkB/Akt signaling associated with synaptic plasticity. We found that Girdin in the hippocampus was phosphorylated at S1416 in an activity-dependent manner. Phosphorylation-deficient knock-in mice exhibited shrinkage of spines, deficit of hippocampal long-term potentiation, and memory impairment. Furthermore, Girdin interacted with Src kinase and NR2B subunit of NMDA receptor, leading to phosphorylation of the NR2B subunit and NMDA receptor activation. Our findings suggest that Girdin controls Akt-dependent NR2B phosphorylation through the interaction with Src, which is associated with synaptic plasticity in the hippocampus underlying memory formation.

研究分野：実験病理学

キーワード：記憶障害 シナプス可塑性 蛋白リン酸化 疾患モデルマウス BDNF/TrkB/Aktシグナル 海馬神経

1. 研究開始当初の背景

海馬における記憶現象は、電気生理学的には長期増強 (long-term potentiation: LTP) に示され、形態的には、刺激を受けたシナプスが選択的に結合性を变化させるシナプス可塑性に示されるが、そのメカニズムの詳細は明らかとなっていない。

我々は、Aktによるリン酸化で細胞膜への結合が制御されて細胞運動に作用する新規のアクチン結合蛋白として Girdin を同定し、がん細胞の浸潤・転移への関与、生後の血管新生と神経発生・新生における役割を報告してきた。Girdin 欠損マウスのはもは海馬歯状回の新生ニューロンは顆粒層内での過剰移動による位置異常を示し、軸索である苔状線維の進展が不十分となる。一方、変異マウスのはもは海馬神経の構造には異常を示さないが、恐怖条件付け試験と Morris 水迷路による行動解析にて海馬依存的な長期記憶に障害があることが判明した。従って、Girdin がシナプス可塑性を制御する記憶関連機能分子として重要な役割を果たしているものと考えられた。

2. 研究の目的

海馬神経のシナプス可塑性における Girdin の機能の解析を行い、分子メカニズムを明らかにすることを目的として研究を行った。実験には各種の Girdin 変異マウスを用い、行動解析や神経組織の解析などの個体レベルでの研究を行った。

3. 研究の方法

(1) Girdin 変異マウスを用いて海馬神経細胞の異常の有無を詳細に調べ直した。とくに Girdin の細胞内局在とスパインの発達について焦点を当てた。また、Girdin 変異マウスから用意した脳スライス組織を用いて電気生理学な解析を行った。更に、Girdin 変異マウスに対して行動解析を行い、記憶機能などに異常があるかを調べた。

(2) 培養細胞、マウス脳組織を材料として Girdin 結合蛋白を同定し解析を行った。また、海馬のシナプス可塑性に関与するシグナル伝達として BDNF/TrkB/Akt 経路の重要性が報告されているので、培養細胞、脳組織をサンプルとしてシグナルの活性化と Girdin リン酸化との関わりについて調べた。

4. 研究成果

(1) 7-20週齢の雄性 Girdin 欠損マウスヘテロおよび Akt リン酸化部位 (Girdin S1416) の変異マウスにて行動解析を行ったところ、恐怖条件付け試験において一時間後の短期記憶には差がなかったが、24時間後の長期記憶では記憶

能の障害が両者に共通して認められた(図1)。また、Morris 水迷路および新規物体認識試験においても記憶能の障害が共通して認められた。一方で、情動行動については両マウス共に障害は認められなかった。これらの結果は Girdin が海馬の記憶機能に重要であり、Girdin リン酸化による機能制御が行われていることを示す結果と考えられた。

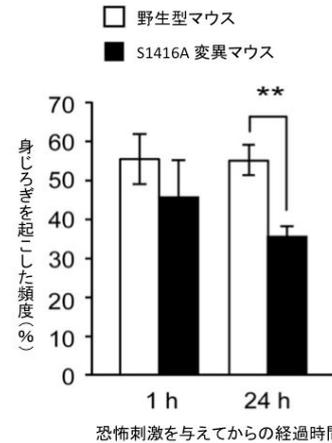


図1: S1416A 変異マウスにおける長期記憶の障害 (2) Akt リン酸化部位の変異マウスのはもは海馬歯状回顆粒神経細胞を蛍光色素トレースにて標識して樹状突起とスパインを観察したところ、スパインの体積および頭部直径が優位に減少していることが判明した(図2)。

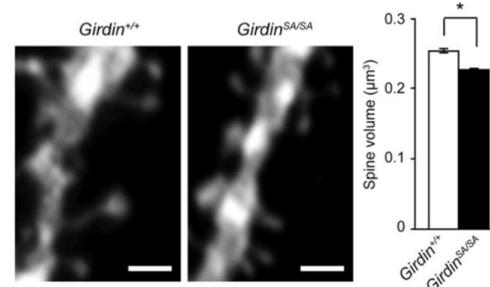


図2: S1416A 変異マウスにおけるスパイン体積の減少

(3) Girdin 欠損マウスヘテロおよび Akt リン酸化部位の変異マウスにて海馬急性スライスを作成して電気生理学な解析を行ったところ、海馬歯状回顆粒神経細胞において long-term potentiation (LTP) の障害が認められた。更に、記憶に重要な役割を果たすことが知られている NMDA 受容体と AMPA 受容体の電気刺激応答について調べたところ、両変異マウスでは NMDA 受容体の反応が特異的に障害されていた。従って、Girdin は NMDA 受容体の反応をコントロールしていると考えられた。

(4) マウスのはもはから初代培養海馬神経細胞を調整して BDNF 刺激を行ったところ、Akt リン酸化部位である Girdin S1416 のリン酸化の上昇が見られた(図3)。リン酸化の上昇は Trk inhibitor K252a、PI3-K inhibitor LY294002、Akt inhibitor IV によって阻害された。従って、

海馬神経細胞において BDNF/TrkB/Akt のシグナルによって Girdin S1416 のリン酸化がコントロールされていると考えられた。

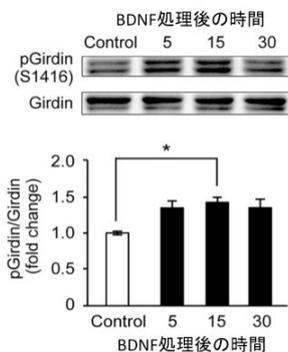


図3: 培養海馬神経における BDNF依存性のGirdinリン酸化

(5)恐怖条件付け刺激後に海馬組織を採取して調べたところ、Girdin S1416 のリン酸化の上昇が認められた。従って、BDNF/TrkB/Akt 経路による Girdin S1416 のリン酸化は生体内で海馬記憶に機能していると考えられた(図 4)。

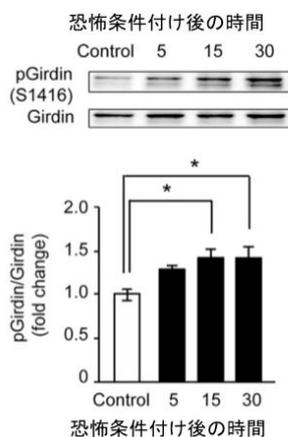


図4: 恐怖条件付け刺激後のマウス脳組織でのGirdinリン酸化

(6)電気生理学的解析により、Girdin が NMDA 受容体をコントロールしていると考えられたため、NMDA 受容体サブユニットの NR2A および NR2B のリン酸化を検索したところ、培養海馬神経細胞において BDNF 刺激により NR2B のチロシンリン酸化の特異的な上昇が認められた(図 5)。Akt リン酸化部位の変異マウスから調整した海馬神経細胞では上昇が認められなかったことから(図 5)、GirdinS1416 リン酸化が NR2B リン酸化の上流に位置すると考えられた。また、恐怖条件付け刺激後に海馬組織で NR2B リン酸化が更新することも明らかとなった(図 6)。

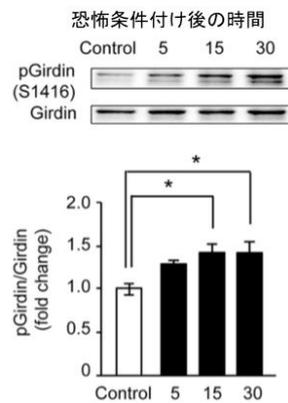


図5: 恐怖条件付け刺激後のマウス脳組織でのGirdinリン酸化

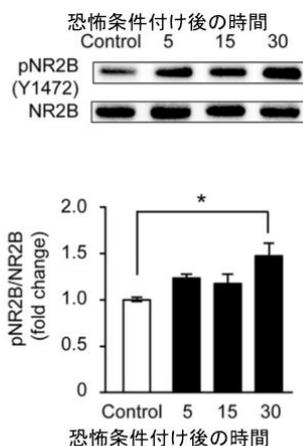


図6: 恐怖条件付け刺激後のマウス脳組織でのNR2Bリン酸化

(7)Girdin は Src チロシンキナーゼと相互作用することが報告されていたので、Src キナーゼが NR2B リン酸化に関わっている可能性を考えて培養細胞をサンプルとした免疫沈降法で調べたところ、Girdin/Src/NR2B の複合体形成が確認された。

(8)以上の結果から、BDNF 刺激による Akt のリン酸化はGirdin S1416のリン酸化を誘発し、Src キナーゼを介して NR2B のリン酸化 (NMDA 受容体の活性化)をもたらすものと考えられる。さらに、そのリン酸化は海馬でのスパインの微細構造変化(シナプス後肥厚部の増加)と NMDA/AMPA ratio の増大と共に LTP の増強に関与していることが示唆される。Girdin S1416 のリン酸化は、シナプスの構造的および機能的な修飾と長期記憶の形成に関与しているものと考えられた (図 7)。

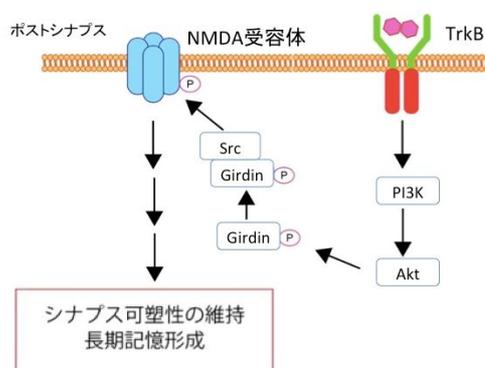


図7: 海馬での長期記憶形成におけるGirdinリン酸化の役割

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10件)

Akt-Girdin signaling in cancer-associated fibroblasts contributes to tumor progression. Yamamura Y, Asai N, Enomoto A, Kato T, Mii S, Kondo Y, Ushida K, Niimi K, Tsunoda N, Nagino M, Ichihara S, Furukawa K, Maeda K, Murohara T, Takahashi M. *Cancer Res.* 2015 Mar 1;75(5):813-23. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-14-1317. (査読有)

Girdin is phosphorylated on tyrosine 1798 when associated with structures required for migration. Omori K, Asai M, Kuga D, Ushida K, Izuchi T, Mii S, Enomoto A, Asai N, Nagino M, Takahashi M. *Biochem Biophys Res Commun.* 2015 Mar 20;458(4):934-40. doi: 10.1016/j.bbrc.2015.02.065. (査読有)

Girdin phosphorylation is crucial for synaptic plasticity and memory: a potential role in the interaction of BDNF/TrkB/Akt signaling with NMDA receptor. Nakai T, Nagai T, Tanaka M, Itoh N, Asai N, Enomoto A, Asai M, Yamada S, Saifullah AB, Sokabe M, Takahashi M, Yamada K. *J Neurosci.* 2014 Nov 5;34(45):14995-5008. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2228-14.2014. (査読有)

Speed control for neuronal migration in the postnatal brain by Gmp13-mediated local inactivation of RhoA. Ota H, Hikita T, Sawada M, Nishioka T, Matsumoto M, Komura M, Ohno A, Kamiya Y, Miyamoto T, Asai N, Enomoto A, Takahashi M, Kaibuchi K, Sobue K, Sawamoto K. *Nat Commun.* 2014 Jul 30;5:4532. doi: 10.1038/ncomms5532. (査読有)

Regulation of cargo-selective endocytosis by dynamin 2 GTPase-activating protein girdin. Weng L, Enomoto A, Miyoshi H, Takahashi K, Asai N, Morone N, Jiang P, An J, Kato T, Kuroda K, Watanabe T, Asai M, Ishida-Takagishi M,

Murakumo Y, Nakashima H, Kaibuchi K, Takahashi M. *EMBO J.* 2014 Sep 17;33(18):2098-112. doi: 10.15252/emboj.201488289. (査読有)

Proteomic analysis of Girdin-interacting proteins in migrating new neurons in the postnatal mouse brain. Ota H, Hikita T, Nishioka T, Matsumoto M, Ito J, Asai N, Enomoto A, Takahashi M, Kaibuchi K, Sobue K, Sawamoto K. *Biochem Biophys Res Commun.* 2013 Dec 6;442(1-2):16-21. doi: 10.1016/j.bbrc.2013.10.126. (査読有)

Role of Girdin in intimal hyperplasia in vein grafts and efficacy of atelocollagen-mediated application of small interfering RNA for vein graft failure. Miyachi H, Mii S, Enomoto A, Murakumo Y, Kato T, Asai N, Komori K, Takahashi M. *J Vasc Surg.* 2014 Aug;60(2):479-489.e5. doi: 10.1016/j.jvs.2013.06.080. (査読有)

Girdin and its phosphorylation dynamically regulate neonatal vascular development and pathological neovascularization in the retina. Ito T, Komeima K, Yasuma T, Enomoto A, Asai N, Asai M, Iwase S, Takahashi M, Terasaki H. *Am J Pathol.* 2013 Feb;182(2):586-96. doi: 10.1016/j.ajpath.2012.10.012. (査読有)

Similar phenotypes of Girdin germ-line and conditional knockout mice indicate a crucial role for Girdin in the nestin lineage. Asai M, Asai N, Murata A, Yokota H, Ohmori K, Mii S, Enomoto A, Murakumo Y, Takahashi M. *Biochem Biophys Res Commun.* 2012 Oct 5;426(4):533-8. doi: 10.1016/j.bbrc.2012.08.122. (査読有)

Involvement of Girdin in the determination of cell polarity during cell migration. Ohara K, Enomoto A, Kato T, Hashimoto T, Isotani-Sakakibara M, Asai N, Ishida-Takagishi M, Weng L, Nakayama M, Watanabe T, Kato K, Kaibuchi K, Murakumo Y, Hirooka Y, Goto H, Takahashi M. *PLoS One.* 2012;7(5):e36681. doi: 10.1371/journal.pone.0036681. (査読有)

[学会発表](計1件)

浅井直也、榎本篤、高橋雅英、中枢神経の発生における神経前駆細胞の移動へのアクリン結合タンパク Girdin の関与、第102回日本病理学会総会(北海道、札幌市、さっぽろ芸文館)2013年6月6日

[その他]

ホームページ等
http://www.med.nagoya-u.ac.jp/patho2/

6. 研究組織

(1) 研究代表者

浅井 直也 (ASAI Naoya)

名古屋大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号：80273233

(2) 研究分担者

永井 拓 (NAGAI Taku)

名古屋大学・医学部附属病院・准教授

研究者番号：10377426