

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 3 日現在

機関番号：82626

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24500400

研究課題名(和文) 神経活動履歴に伴う受容体輸送制御における Rab エフェクター分子の役割

研究課題名(英文) The role of Rab effector protein in the AMPA receptor trafficking associated with neural activity history

研究代表者

清末 和之 (Kiyosue, Kazuyuki)

独立行政法人産業技術総合研究所・バイオメディカル研究部門・グループリーダー

研究者番号：50356903

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000 円

研究成果の概要(和文)：シナプスの機能は輸送される受容体分子によって大きく規定されるが、その膜輸送機構による制御機構は不明である。Rab5のエフェクター蛋白質であるrabaptin-5の役割について以下の点について明らかにした。1) Rabaptin-5はグルタミン酸受容体のサブユニット特異的な輸送に関与、2) 神経活動履歴に応じてRabaptin-5の活動依存的変化、3) 恒常的シナプス可塑性への寄与。これらの結果は、受容体のエンドソームからのリサイクルを介した膜輸送経路がシナプス機能及び可塑性発現に重要であることを示している。

研究成果の概要(英文)：The function of synapses is defined largely by the receptor subunits to be transported, the control mechanism by a membrane transport including endosome and recycling endosome, is largely unknown. We focus on rabaptin-5, an effector protein of Rab5, in glutamate receptor trafficking, and have found as following points. 1) Rabaptin-5 is involved in subunit-specific transport of glutamate receptor, 2) activity-dependent changes in the Rabaptin-5 depending on the neural activity history, 3) contribution to the homeostatic synaptic plasticity. These results indicates that membrane transport route through the recycling from endosomes is critical for synaptic function and plasticity expression.

研究分野：神経科学

キーワード：膜輸送 シナプス可塑性 受容体

1. 研究開始当初の背景

シナプス可塑性の発現は、動的平衡にあった受容体の入れ替わりが、一過的にその平衡が崩れ、組み込み、もしくは、除去の増加によってシナプス強度が変化すると見ることが出来る。この受容体の膜輸送はサブユニットに依存していることが明らかになっており、GluA1/GluA2 のサブユニットからなる AMPA 型受容体はシナプス増強時にシナプスへ組込まれるが、通常時は GluA2/GluA3 サブユニットからなる受容体がシナプスに組込まれ、一方、GluA1/GluA2 サブユニットからなる AMPA 型受容体はシナプスから排除される。しかし、サブユニット特異的な膜輸送は、成熟度、細胞種や可塑性の種類によって相違点があり、解明には至っていない。サブユニット特異的な輸送はどのような膜輸送によって成り立っているのかは、ほとんど理解されていない。

一般に、膜タンパク質は ER で作られ、Golgi で修飾、その後、細胞膜へ輸送される。また、細胞膜にある膜タンパク質はエンドサイトーシスされ、エンドソームへ輸送され、一部はライソソームへ輸送され分解される。また、一部は、リサイクリングエンドソームへ輸送され、また、細胞膜へ輸送され再利用される(図)。LTP の発現時は、リサイクリングエンドソームからの AMPA 受容体の輸送が、EHD-1(Rme-1)を介した膜輸送によっていることが、また、別のグループは Rab8 に依存していることを示している。これらが全く別の経路であるか、それとも、連続した膜輸送系にあるかは明らかにされていない。さらに、どの様にして、GluA 1 ホモマー、または GluA1/GluA2 のヘテロオリゴマーのみを輸送を実現する機構は不明である。一方、LTD の発現時にはシナプス表面にある AMPA 受容体が GluA2 サブユニット依存的にエンドサイトーシスされ、Rab5 に依存した系で初期エンドソームへ運ばれる。初期エンドソームへ運ばれた受容体はリソソームへ行って分解されるか、リサイクリングエンドソームへ輸送され、再度、使われる。この再利用を考えたときに、エンドソームからリサイクリングエンドソームへ輸送に関わる

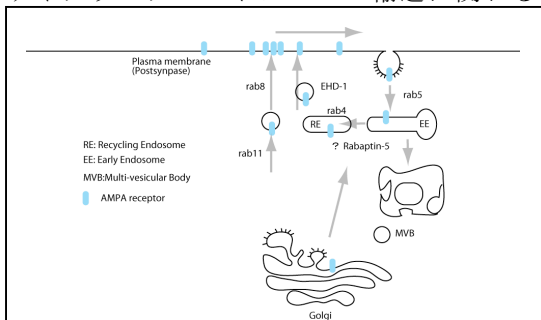


図 受容体膜輸送の概略
長期抑圧発現時には、Rab5 に依存した受容体の膜輸送、長期増強発現時には EHD-1、Ra8 に依存した膜輸送が関与している。受容体のリサイクルや合成からの経路は不明な点が多い。

分子の検討が必要である。Rabaptin-5 は Rab5 と Rab4 の両方に結合し、初期エンドソームから、リサイクリングエンドソームへの輸送に関与する分子であるとされているが、シナプスでそのように機能する分子であるかは不明である。

これら、シナプス局所における膜輸送が、シナプス活動によって、どのような制御を受けて、受容体の輸送を変化させ、シナプスの特性を変化させることを理解することは、可塑性の分子機構の正確な理解につながる重要な課題と考えられる。特に、受容体のリサイクルから再利用に至る系については、ほとんど明らかにされていない。

2. 研究の目的

申請者は受容体の膜輸送機構に着目し予備研究をすすめ、「神経活動に依存した Rab エフェクター蛋白質の変化」を明らかにしている。この事実から、「神経活動履歴に伴う受容体の輸送制御は、Rab エフェクター分子の活動依存的な制御に起因する」との仮説をたて、膜輸送システムがシナプス可塑性発現に果たす役割を明らかにすることを目的としている。本研究では Rab5 のエフェクター蛋白質であり、エンドソームへの膜融合蛋白質として同定されている Rabaptin-5 に着目して、受容体輸送における役割を明らかにいく。

3. 研究の方法

(1) 受容体のシナプス発現の定量：膜輸送機構において、Rab エフェクター蛋白質である rabaptin-5 の AMPA 型受容体の膜輸送に与える機能を調べるために、海馬培養神経細胞に遺伝子導入しその後、シナプス表面に発現しているグルタミン酸受容体をサブユニット特異的抗体にて検出、定量した。

(2) シナプス機能の電気生理学的評価：

(1) 同様に、培養神経細胞に遺伝子導入、ホールセルレコーディング法を適用しシナプス電流を計測した。これにより過剰発現した場合に機能を評価し、また、標的遺伝子を shRNA 等によりノックダウンすることによって、シナプス機能を電気生理学的に解析した。

4. 研究成果

(1). Rabaptin-5 はグルタミン酸受容体のサブユニット特異的な輸送に関与

神経細胞に Rabaptin-5 を過剰発現し、シナプス表面に発現する受容体をサブユニット特異的な抗体で検出し定量すると、GluA1 サブユニットが有意に増加することを明らかになった(図1)。しかし、GluA2 サブユニットには有意な変化は見られなかった。このことは、Rabaptin-5 を介した膜輸送システムに AMPA 型受容体のサブユニット特異的な輸送システムを亢進する可能性を示唆している。

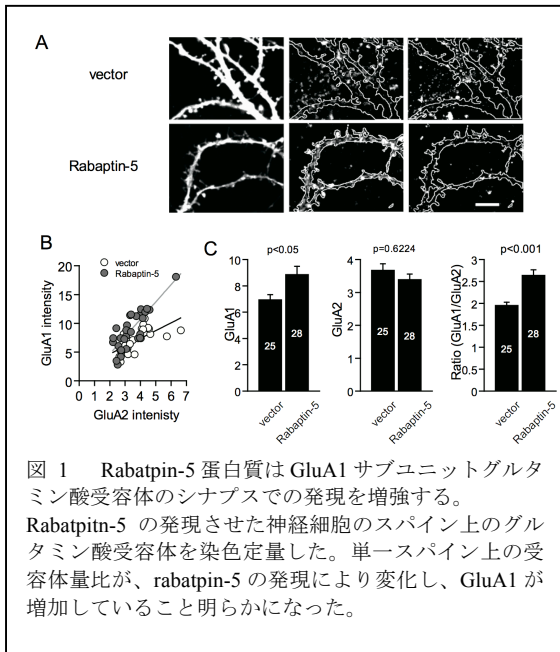


図1 Rabaptin-5 蛋白質は GluA1 サブユニットグルタミン酸受容体のシナプスでの発現を増強する。Rabaptin-5 の発現させた神経細胞のスパイン上のグルタミン酸受容体を染色定量した。単一スパイン上の受容体量比が、rabaptin-5 の発現により変化し、GluA1 が増加していることが明らかになった。

(2). 神経活動履歴に応じて Rabaptin-5 の活動依存的変化

Rabaptin-5 の過剰発現実験において、幼若期は発現が可能であるが、成熟した神経細胞では、ほとんど発現できなかった。プロモーターは同一であること、GFP は幼若・成熟神経細胞で関係なく発現することから、成熟神経細胞において分解制御等の発現抑制制御機構の存在が推測された。そこで、成熟に伴い亢進する神経活動に着目し、神経活動と分解制御の関係を検討した。結果、神経活動が高いほど rabaptin-5 の分解が進むことが明らかとなり、少なくともシナプス活動、それによって引き起こされる細胞内カルシウム濃度の増加が、その機構を活性化していることを明らかにした。(図2)。

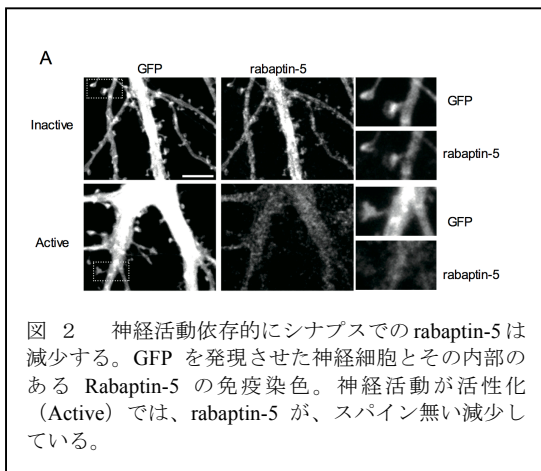


図2 神経活動依存的にシナプスでの rabaptin-5 は減少する。GFP を発現させた神経細胞とその内部のある Rabaptin-5 の免疫染色。神経活動が活性化 (Active) では、rabaptin-5 が、スパイン無い減少している。

(3). 恒常的シナプス可塑性への寄与

(1). (2). の結果から、神経活動依存的な変化から Rabaptin-5 が恒常的シナプス可塑性の責任分子の可能性が推測された。恒常的シナプス可塑性では、神経活動の抑制により、GluA1-AMPA 受容体の増加によって微小シナプス後電流の増加、波形の変化が起こる。そのため、Rabaptin-5 のノックダウンにより、このシナプス特性の変化が阻害されるかを検討した。shRNA をもちいたノックダウンの結果、恒常性シナプス可塑性の抑制が認められた。このことは、Rabaptin-5 が恒常的シナプス可塑性の発現において一因を担っていることを示唆している。

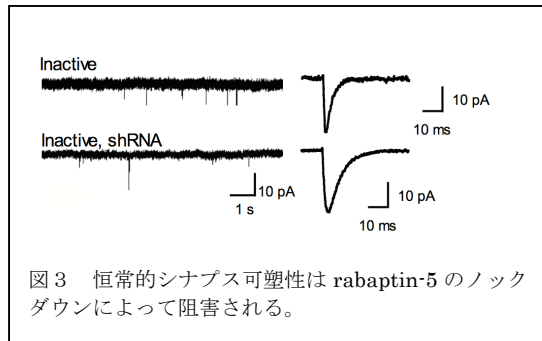


図3 恒常的シナプス可塑性は rabaptin-5 のノックダウンによって阻害される。

(4). 長期増強発現及びメタ可塑性への寄与

神経活動依存的に rabaptin-5 が制御され、それが、AMPA 型受容体の輸送へ影響をあたえることが明らかになり、長期増強に代表されるシナプス可塑性、及び、いわゆる可塑性の可塑性であるメタ可塑性に関与することが強く示唆される。関与を検討するために、培養神経細胞の神経活動の程度を変化させた際に長期増強を誘導し、グルタミン酸受容体のシナプスへの組込みを定量した。その結果、低神経活動があるシナプスでは、GluA1 の組込みが起きるが、shRNA で rabaptin-5 をノックダウンすると、その組込みは抑制された。一方、高頻度の神経活動があるシナプスでは長期増強誘導刺激で、GluA2 が増加した。これらのことは、長期増強発現時に、シナプスがどのような神経活動状態にあったかに応じて、利用する受容体を変え、その分子機構に、rabaptin-5 が一旦を担っていることを示している。

以上により、膜輸送システムが、神経活動に応じて、利用する受容体を変化させる、シナプス可塑性における新しい制御機構の一旦であることを明らかにした。

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)

[学会発表] (計 6 件)

1) 清末和之、亀山仁彦、神経活動依存的 Rabaptin-5 の制御がグルタミン酸受容体サブユニット依存したシナプス輸送を制御す

- る、日本神経科学学会、2012年9月21日
- 2) Kazuyuki KIYOSUE, Kimihiko KAMAYAMA、
Synaptic activity controls the levels of
rabaptin-5 leading to the alteration of
glutamate receptor delivery to the synapse、
Society for Neuroscience、2012/10/14
- 3) Kazuyuki KIYOSUE, Kimihiko KAMAYAMA、
Inactivity up-regulates the levels of
rabaptin-5 leading to enhancement of
synaptic delivery of GluA1, American
society of cell biology、2012/12/17
- 4) 清末和之、亀山仁彦、神経活動依存的
Rabaptin-5の制御がLTP発現時のAMPA受容
体の表面発現を調整する、日本神経科学学会
2013年6月20日
- 5) 清末和之、亀山仁彦、膜輸送関連Rabエ
フェクター蛋白質のスプライスバリエント
によるAMPA受容体輸送、日本神経科学学会、
2014年9月11日
- 6) 大西恵、清末和之、Epstein Barr ウイル
ス由来の発現ベクターは神経細胞での長期
安定発現に有効である、日本神経科学学会
2015年7月28日

[図書] (計 0 件)

[その他]

特に該当せず

6. 研究組織

(1) 研究代表者

清末和之 (Kazuyuki KIYOSUE)
産業技術総合研究所 バイオメディカ
ル研究部門 グループリーダー
研究者番号：50356903