

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 9 日現在

機関番号：13501

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25640009

研究課題名(和文) シナプス成熟におけるAMPKサブファミリーのシグナルネットワークの動態解析

研究課題名(英文) Analysis of signal dynamics mediated by AMPK subfamily in synapse maturation

研究代表者

大塚 稔久(OHTSUKA, Toshihisa)

山梨大学・総合研究部・教授

研究者番号：40401806

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：14種類のセリン・スレオニンリン酸化酵素からなるAMPKファミリーは、神経細胞の極性形成を制御していることが明らかになりつつある。本研究では、1) サブファミリーメンバーであるMARK4およびAMPK1が生化学的に神経終末のシナプス小胞およびアクティブゾーンに局在すること、2) CASTのリン酸化が神経伝達物質の放出に参与していること、3) SAD-A/Bが細胞死を制御している可能性を示唆するデータが得られた。これにより、AMPKファミリーが神経終末のアクティブゾーンにおいても機能して、細胞極性のみならず、シナプスからの神経伝達物質の放出を制御していることが明らかとなっていった。

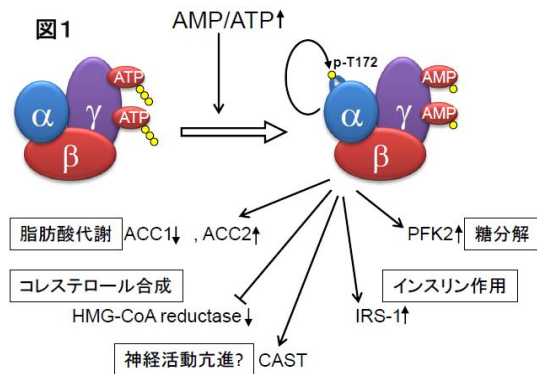
研究成果の概要(英文)：Accumulating evidence suggests that serine /threonine kinase AMPK subfamily regulate neuronal polarization such as axon/dendrite formation. Here, we show that 1) MARK and AMPK1 are biochemically localized and expressed in the nerve terminals, in particular synaptic vesicles and active zone fractions; 2) phosphorylation of CAST regulates release of neurotransmitter from the active zone; and 3) SAD family may be involved in cell death. These results suggest that AMPK family member regulate not only neuronal polarization but also neurotransmitter release from the nerve terminals.

研究分野：神経生化学

キーワード：分子細胞神経科学 アクティブゾーン

1. 研究開始当初の背景

生体内の代謝において最も重要な高エネルギー担体は ATP であり、ATP の加水分解産物 AMP を感知して活性化される酵素として、AMP-activated protein kinase (AMPK) が知られている (Hardie et al., 2012. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*) (図1参照)。最近、AMPK が PI3 キナーゼの局在を制御して発生過程の軸索形成を制御していることが報告された (Amato et al., 2011. *Science*)。しかし、脳神経細胞における局在やどのようなタイミング・場所で活性化されるのかは依然不明であり、脳高次機能の発現における特異的な基質は未だ報告されていない。研究代表者は、これまで神経伝達物質の放出を制御する構造体・アクティブゾーンの構造と機能に関する研究を推進してきた (Ohtsuka et al., 2002. *J. Cell Biol.*; Takao-Rikitsu et al., 2004. *J. Cell Biol.*; Hida and Ohtsuka, 2010. *J. Biochem.*; tom Dieck et al., 2012. *J. Neurosci.*)。その過程で、AMPK がアクティブゾーン特異的蛋白質 CAST を直接リン酸化することを見出した。興味深いことに、申請者がアクティブゾーンに局在するリン酸化酵素として発見した極性制御分子 SAD キナーゼ (Inoue et al., 2006. *Neuron*) も同じセリン残基をリン酸化した (未発表データ)。そこで、SAD は AMPK サブファミリーの一員でもあることから、AMPK による CAST のリン酸化動態を明らかにすることで、最終的には神経伝達物質の放出と極性形成 (軸索形成) に共通した分子メカニズムを発見し解明できるのではないかとの着想に至った。



2. 研究の目的

本研究では、体内の代謝変動 (AMP/ATP 比率) によって活性化されるリン酸化酵素 AMP-activated kinase (AMPK) に着目し、AMPK によるアクティブゾーン蛋白質 CAST のリン酸化動態や AMPK 自身の活性化動態を可視化、測定することで、軸索・シナプスの成熟過程におけるリン酸化代謝制御機構の全容解明を目的とする。得られる成果は神経伝達物質の放出機構と軸索形成 (極性形成) に共通したシグナル伝達機構の発見・解明につながることを期待できる。さらに、遺伝子改変マウスを用いたリン酸化動態のプロファイリングを行い、精神神経・神経変性疾患の発

症機構の解明と新たな治療法の開発につながる基礎データの取得と提供を目的とする。

3. 研究の方法

本研究では、まず依然として不明な点が多い AMPK の脳シナプスにおける局在・発現プロファイルを構築する。そして、基質の一つであるアクティブゾーン蛋白質 CAST の機能修飾機構の解明を足がかりに、シナプス成熟 (軸索伸長・シナプス伝達) における AMPK のリン酸化動態を明らかにする。さらに、AMPK サブファミリーの特異抗体を作製し、AMPK サブファミリーのシナプス機能発現におけるネットワーク動態の解明を目指す。

4. 研究成果

(1) AMPK サブファミリーの特異抗体の作製

抗体作製のために各ファミリー分子に特異的な領域を用いた GST 融合蛋白質をモルモットに免疫してポリクローナル抗体の作成を試みた。いくつかの抗体において特異的なバンドが検出されたものの、概してバックが高かったため、抗体作製に成功した SAD-A および、購入した AMPK および MARK 4 の抗体を用いて、ラット大脳サブセルラーサンプルのウェスタンブロットを行った。SAD-A は、SAD-B と同じように (Inoue et al., 2006. *Neuron*) シナプス小胞画分および PSD 画分に濃縮したシグナルが得られた。また、AMPK および MARK も同様の局在を示した (投稿準備中)。これまでの研究から、AMPK ファミリーが神経細胞の局成形性、特に軸索の形成に関与していることが明らかとなっており、SAD-A や AMPK もおそらく、SAD-B と同様に軸索終末のシナプス小胞およびアクティブゾーンに局在していることが示唆された。残りのメンバーについても引き続き抗体作製を試みる。

なお、蛋白質レベルの解析に加え mRNA レベルの発現パターンも解析する目的で、in situ ハイブリダイゼーションも行う予定である。

(2) リン酸化による神経軸索形成の制御機構の解明

SAD キナーゼが CAST および ELKS の N 末のあるアミノ酸残基を特異的にリン酸化することを既に見出している (未発表データ)。そこで、CAST のリン酸化部位をアラニンおよびアスパラギン酸に置換した変異体を作成した。前者は、リン酸化が起らず、後者はリン酸化状態を模倣する変異体である。ラット上顎神経節初代培養細胞にこれらを導入して電気生理学的な解析を行ったところ、CAST のリン酸化がシナプス小胞のプールサイズを調整しているというデータを得た。あるパラメーターではアラニン変異体でもアスパラギン酸変異体でも同様のシナプス伝達の異常が検出できたことから、CAST のリン酸化状態のバランス (リン酸化 CAST と非リン酸化 CAST の比率) がシナプス伝達において重要な役割を担っているの

ではないかと推測される。興味深いことに、ラット上顎神経節初代培養細胞におけるファミリーメンバー-ELKS の局在を調べたところ、ELKS はシナプスパターンの局在を示さなかった。したがって、少なくともラット上顎神経節初代培養細胞においてはCASTのリン酸化が優位に機能していると考えられた。

現在、このリン酸化の上流のシグナル伝達機構は不明であるが、シナプス短期可塑性はシナプス終末のカルシウム濃度に大きな影響を受けることから、カルシウムイオン感受性の分子の関与が示唆される。既に私共はCASTがカルシウムチャネルの補助サブユニットであるbetaサブユニットに直接結合してチャネルの活性を性に制御していることを見出している (Kiyonaka et al., 2010. *J. Biochem.*) この相互作用がリン酸化によって調節されるかどうか興味深い点であり、生化学的解析を進めているところである。

また、AMPKファミリーをリン酸化する機能を持つLKB1も候補の一つとしてあげられる。最近、LKB1-AMPKのシグナル伝達経路がマウス網膜の異所性のシナプス形成を制御していることが明らかとなった (Samuel et al., 2014. *Nat. Neurosci.*) CASTノックアウトマウスの網膜では同様の異所性シナプスの形成が見られることから (tom Dieck et al., 2012. *J. Neurosci.*) LKB1からの上流シグナルを受けたAMPK1がCASTをリン酸化することも考えられる。現在この仮説についても、生化学的・細胞生物学的な実験系にて検証中である。

さらに、AMPKファミリーをラット初代培養神経細胞に遺伝子導入し、その形態を詳細に解析したところ、SAD-A/Bファミリーを遺伝子導入したものが特に死細胞の割合が高かった。同様の表現型は非神経細胞のCOS7細胞でも観察された。また、阻害剤を用いた実験から、この細胞死がネクローシスによるものであることが示唆された。アポトーシスおよびオートファジーの阻害剤はほとんど影響が見られなかった。このことから、AMPKファミリーのSADサブファミリーが神経細胞および非神経細胞に共通したネクローシスシグナルを制御している可能性が示唆された。興味深いことに、リン酸化能を有さない変異体では影響がないことから、SADによる下流分子のリン酸化が重要なメカニズムの一つと考えられた。

(3) **CASTリン酸化部位変異導入マウスの作出**：アクティブゾーン蛋白質CASTおよびELKSのN末領域のセリン残基をアラニン残基に置換したノックインマウスのヘテロ個体の作製に成功した。現在、電気生理学的解析およびマウス行動学解析のために交配・繁殖を行っている。

また、CASTリン酸化のシナプス分子の発現・局在にたいする影響を解析するために、CASTリン酸化ノックインマウス的大脑から

シナプス画分を単離して各種のシナプス蛋白質 (アクティブゾーン、シナプス小胞、接着分子、チャネル、受容体、PSD関連分子) の抗体を用いたウェスタンブロットを試みる予定である。

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4件)

(1) Hagiwara, A., Yasumura, M., Hida, Y., Inoue, E., Ohtsuka, T. The planar cell polarity protein Vangl2 bidirectionally regulates dendritic branching in cultured hippocampal neurons. *Mol. Brain* 査読有 7(1), 2014, 79. DOI:10.1186/s13041-014-0079-5.

(2) Ishikawa, M., Shiota, J., Ishibashi, Y., Hakamata, T., Shoji, S., Fukuchi, M., Tsuda, M., Shirao, T., Sekino, Y., Ohtsuka, T., Baraban, J.M., Tabuchi, A. Identification, expression and characterization of rat isoforms of the serum response factor (SRF) coactivator MKL1. *FEBS Open Bio.* 査読有 3:387-393, 2013. DOI: 10.1016/j.fob.2013.09.001.

(3) Yoshioka, T., Hagiwara, A., Hida, Y., Ohtsuka, T. Vangl2, the planar cell polarity protein, is complexed with postsynaptic density protein PSD-95. *FEBS Lett.* 査読有 587(10): 1453-1459, 2013. DOI: 10.1016/j.febslet.2013.03.030.

(4) Ohtsuka, T. CAST: functional scaffold for the integrity of the presynaptic active zone. *Neurosci. Res.* 査読有 76(1-2): 10-15, 2013. DOI: 10.1016/j.neures.2013.03.003.

[学会発表](計6件)

(1) 大塚稔久、神経終末アクティブゾーンの分子構造基盤とその破綻～プレシナプスから精神神経疾患の発症機構を捉える～、招待講演、2014年8月15日、東京都医学総合研究所(東京都世田谷区)

(2) 大塚稔久、神経終末アクティブゾーンの分子構造基盤と生理機能～分子から精神神経疾患の病態解明へ向けて～、北里大学医学会招待学術講演会、2014年7月31日北里大学(東京都世田谷区)

(3)大塚稔久、CAST regulates the structure and function of presynaptic active zones、第 36 回日本分子生物学会講演発表、2013 年 12 月 4 日、神戸ポートアイランド (兵庫県神戸市)

(4)大塚稔久、The presynaptic active zone molecular organization and physiological functions、神経シナプス・アクティブゾーンの分子構造基盤と生理機能、神経構造生物学合同研究会、2013 年 11 月 19 日、生理学研究所 (愛知県岡崎市)

(5)大塚稔久、CAST Phosphorylation Mediates Short-term Synaptic Depression、Neuro2013、2013 年 6 月 20 日、国立京都国際会館、(京都府京都市)

(6) Toshihisa Ohtsuka Invited Speaker. CAST and vesicle cycling at the ribbon synapses. Ribbon Synapses Symposium. Sept.30,2013. Max-Planck-Institute for Experimental Medicine, Goettingen, (Germany).

〔図書〕(計 1 件)

(1) Ohtsuka, T. Network of Protein-Protein Interactions at the Presynaptic Active Zone, Chapter 3, 69-83, 2015, S. Mochida (ed.) Presynaptic Terminals,doi:10.1007/978-4-431-55166-9_3, Springer Japan.

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.med.yamanashi.ac.jp/basic/bioche01/>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

大塚 稔久 (OHTSUKA, Toshihisa)

山梨大学・総合研究部・教授

研究者番号：40401806