

令和 4 年 6 月 16 日現在

機関番号：34512

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2021

課題番号：18K06498

研究課題名（和文）シナプス可塑的变化におけるタンパク質供給機構の解明

研究課題名（英文）Uncovering the protein delivery mechanism in synaptic plasticity

研究代表者

中山 啓（Nakayama, Kei）

神戸薬科大学・薬学部・助教

研究者番号：40553590

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：局所翻訳産物に膜タンパク質が含まれるため、シナプスの可塑的变化において分泌経路に関わる細胞内小器官の局在が変化すると仮説を立てた。分泌経路に関わる細胞内小器官である「小胞体」や「小胞体-ゴルジ体中間区画」は、シナプス刺激を受けたシナプス後部の近傍へ集積するという観察結果を得た。次に、これら細胞内小器官が微小管に沿って移動することから、微小管動態とシナプス可塑性の関連を調べた。微小管重合阻害剤によってシナプス後部は肥大化し、微小管脱重合阻害剤処理によって、シナプス後部構造の変化が抑制された。これらの結果より、微小管動態がシナプス可塑性に関与することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究において、シナプス刺激に応じた局所翻訳の活性化と協調して細胞内小器官の局在が制御されることが明らかになった。さらに、それら細胞内小器官の局在制御に関わる微小管動態がシナプスの可塑的变化へ関与することも示唆された。シナプスの可塑的变化は記憶形成の細胞基盤であるため、これらの研究成果は、長期記憶形成機構の理解に貢献しうると期待される。

研究成果の概要（英文）：To test whether organelles involved in secretory pathway change their localizations during synaptic plasticity, live imaging of ER and ERGIC was performed. These organelles accumulated in the vicinity of the stimulated-spine. Microtubules play important roles in the motility of organelles in dendritic shaft. I therefore examined whether the dynamics of microtubules is involved in the synaptic plasticity. Spines are enlarged by the treatment with Nocodazole. In contrast, stimulation-induced change in spine was suppressed by Taxol treatment. These results suggested that the dynamics of microtubules is involved in the synaptic plasticity.

研究分野：細胞生物学

キーワード：シナプス可塑性 細胞内小器官 微小管

1. 研究開始当初の背景

長期間保持される記憶の形成には、タンパク質の新規合成が必要である。神経細胞に特徴的な翻訳制御機構として局所翻訳が知られている。局所翻訳は、刺激を受けたシナプス近傍で新規タンパク質合成を活性化する機構である。そのため、局所翻訳は、刺激を受けたシナプスへの迅速かつ効率的なタンパク質供給を可能にするシナプス結合の制御機構であり、記憶・学習において重要な役割を担うと考えられている。研究開始以前に、研究代表者らは、シナプス刺激に応じたタンパク質合成機構として、神経細胞に特徴的な翻訳制御機構である局所翻訳の解析を進めてきた。特に、局所翻訳を制御する RNA 顆粒の構成因子 RNG105 が、シナプス後部形態の可塑的变化や記憶・学習に必要であることを明らかにした。樹状突起シャフトでの局所翻訳が記憶形成に必要なタンパク質の新規合成機構であることから、局所翻訳産物が、どのようにして適切なシナプス後部へ効率的に供給されるかという重要な課題が浮上してきた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、局所翻訳産物が、刺激を受けたシナプス後部へ効率的に供給される機構を明らかにすることである。局所翻訳されるタンパク質には、神経伝達物質の受容体や電位依存性イオンチャンネルといった膜タンパク質が含まれる。これらの膜タンパク質は、分泌経路を介して細胞膜へ輸送され、シナプス機能を担う。そのため、局所的に翻訳された膜タンパク質を効率的にシナプス後部へ供給するために、シナプス刺激によって、局所翻訳の活性化と協調して、細胞内小器官も局在化するという可能性が考えられた。樹状突起に存在する分泌に関わる「小胞体-ゴルジ体中間区画」や「エンドソーム」といった細胞内小器官の動きは、シナプス刺激によって抑制されると報告されている。また、これらの分泌に関わる細胞内小器官は、微小管に沿って移動することも報告されている。そこで、局所翻訳された膜タンパク質を効率的に供給するために、微小管が再編成され、刺激されたシナプス後部の近傍へ分泌に関わる細胞内小器官が局在化すると仮説を立てた。この作業仮説を検証し、空間的に限局された適切なシナプス結合の制御を可能にする細胞内動態を明らかにすることを目指した。

3. 研究の方法

本研究では、海馬初代培養を用いて解析を行った。海馬分散培養を用いた第一の理由は、タンパク質合成に依存するシナプスの可塑的变化を誘導できる簡便な手法であるためである。従来、海馬スライス培養においてタンパク質合成に依存するシナプス構造の変化を誘導するためには、2光子励起による MNI-グルタミン酸の光分解に加えて、活動電位の同期もしくは BDNF の一過的な添加を組み合わせる必要があった。本研究開始以前に、研究代表者らは、海馬分散培養では、2光子励起による MNI-グルタミン酸の光分解のみでタンパク質合成に依存するシナプス後部の形態変化を誘導することを見出していたためである。第二の理由は、リン酸カルシウム法による遺伝子導入が簡便であるためである。本研究では、樹状突起やシナプス後部、細胞内小器官を可視化するために蛍光タンパク質を発現するプラスミドを初代神経細胞へ導入し、その動態を観察した。

小胞体-ゴルジ体中間区画を可視化するために ERGIC53-EGFP タンパク質の発現ベクター、小胞体を可視化するために小胞体係留シグナルを付加した EGFP タンパク質 (ER-EGFP) の発現ベクターをそれぞれ作製した。これら発現ベクターを mCherry タンパク質の発現ベクターと共に初代神経細胞へ遺伝子導入した。その後、2光子励起によって単一シナプスを刺激し、シナプス後部の形態変化に加えて、それぞれの細胞内小器官の動態を観察した。また、微小管動態とシナプスの可塑的变化の関連について調べるため、微小管の重合阻害剤や脱重合阻害剤によるシナプス形態への影響を観察した。

4. 研究成果

局所翻訳と細胞内小器官の再編成が協調するか調べるため、シナプスの可塑的变化における細胞内小器官の局在変化を観察した。まず、ERGIC53-EGFP によって小胞体-ゴルジ体中間区画を可視化した。2光子励起による単一シナプス刺激を行うと、刺激を受けたシナプス近傍の樹状突起シャフトでの蛍光強度の上昇が観察された。次に、ER-EGFP によって、小胞体を可視化し、シナプスの可塑的变化における局在を観察した。単一シナプス刺激によって、刺激を受けたシナプス近傍での蛍光強度が上昇するという観察結果が得られた。以上の観察より、シナプスの可塑的变化において、刺激を受けたシナプス近傍の樹状突起内で分泌経路に関わる細胞内小器官が再編成され、局所翻訳によって新たに合成された膜タンパク質が刺激を受けたシナプス後部へと供給されることが示唆された。

樹状突起内の微小管に沿って、細胞内小器官が移動することが報告されている。そこで、微小管動態がシナプスの可塑的变化に関与するか調べた。まず、シナプスの可塑的变化における微小管動態を観察するため、微小管の+端を EB3-EGFP タンパク質によって可視化し、単一シナプス刺激による動態変化を観察した。しかしながら、EB3-EGFP タンパク質の発現によって、シナプス

の可塑的な変化が観察されなくなった。微小管の動態観察が可能で、シナプス可塑性へ影響を与えないように、EB3-EGFP タンパク質の発現量を適切にする必要があると考え、さまざまな条件を検討した。しかし、EB3-EGFP タンパク質の最適な発現量を見出すことができなかった。そこで、微小管動態がシナプスの可塑的变化に関与するかについて、薬理学的手法で調べた。まず、mCherry でシナプス後部を可視化した神経細胞に対して、微小管の重合阻害剤である Nocodazole を処理した。Nocodazole 処理によって、シナプス後部の構造が肥大化することを見出した。このことから、微小管の脱重合がシナプス後部の肥大化に関与する可能性が浮上した。そこで、微小管の脱重合阻害剤 Taxol 処理し、シナプス後部の形態変化に与える影響を調べた。Taxol 処理によって、単一シナプス刺激によるシナプス後部の構造変化が抑制されるという観察結果を得た。以上の結果より、細胞内小器官の局在を制御する微小管の動態も、シナプス結合の制御に重要であることが示された。

脳梗塞の回復時に損傷部位の機能を補完するために、神経ネットワークの再構築が起こる。このような神経ネットワークの再構築においても、記憶・学習と同様にシナプス結合の制御が重要となる。そこで、これまでに明らかにしてきたシナプス結合の制御機構の知見を用いて、脳梗塞の回復促進に貢献できる知識基盤を得るために、現在さらに研究を進めている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Nakayama T, Okimura K, Shen J, Guh YJ, Tamai T. K, Shimada A, Minou S, Okushi Y, Shimmura T, Furukawa Y, Kadofusa N, Sato A, Nishimura T, Tanaka M, Nakayama K, Shiina N, Yamamoto N, Loudon AS, Nishiwaki-Ohkawa T, Shinomiya A, Nabeshima T, Nakane Y, Yoshimura T	4. 巻 117
2. 論文標題 Seasonal changes in NRF2 antioxidant pathway regulates winter depression-like behavior	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 9594 ~ 9603
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.2000278117	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hasegawa Hiroshi, Kondo Mari, Hohjoh Hirofumi, Nakayama Kei, Segi-Nishida Eri	4. 巻 3
2. 論文標題 C-C Chemokine Receptor 5 (CCR5) Expression in the Infarct Brain of the Photothrombosis Mouse Model	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 BPB Reports	6. 最初と最後の頁 208 ~ 215
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1248/bpbreports.3.6_208	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件／うち国際学会 1件）

1. 発表者名 長谷川 潤、北條 寛典、近藤 真理、中山 啓、中川 公恵、瀬木-西田 恵里
2. 発表標題 光血栓性脳梗塞モデルにおけるC-Cケモカイン受容体5(CCR5)の発現誘導
3. 学会等名 日本薬学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Ohashi R, Nakayama K, Takao K, Shiina N
2. 発表標題 RNA granule protein RNG105 (caprin1) regulates dendritic mRNA localization and contributes to synaptic potentiation
3. 学会等名 日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中山啓、阿部学、山崎真弥、藤川顕寛、野田昌晴、二木啓、御子柴克彦、崎村建司、椎名伸之
2. 発表標題 RNG105, an RNA granule-associated RNA-binding protein, regulates the structural plasticity of spine and is required for memory formation
3. 学会等名 第41回 日本神経科学大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kei Nakayama, Manabu Abe, Maya Yamazaki, Akihiro Fujikawa, Masaharu Noda, Akira Futatsugi, Katsuhiko Mikoshiba, Kenji Sakimura, Nobuyuki Shiina
2. 発表標題 RNG105/caprin1, an RNA granule protein, regulates structural spine plasticity and is required for long-term memory formation
3. 学会等名 The 48th Society for Neuroscience Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------