

平成 22 年 12 月 10 日現在

研究種目：基盤研究 (B)
 研究期間：2007～2009
 課題番号：19300128
 研究課題名 (和文) シナプス可塑性を担う、足場タンパク質 PSD-95 による情報伝達調節機構の解明
 研究課題名 (英文) Regulation of synaptic transmission by the scaffolding protein PSD-95

研究代表者
 土井 知子 (DOI TOMOKO)
 京都大学・大学院理学研究科・准教授
 研究者番号：00397580

研究成果の概要 (和文)：変異PDZドメインを導入したNMDA受容体非結合型のPSD-95-EGFPをノックインした遺伝子改変マウスを樹立し、細胞組織レベル、個体レベルの解析を行った。その結果、PDZドメイン結合はPSD-95を安定にシナプスに局在させるために重要であり、NMDA受容体とPSD-95のPDZドメインを介した直接結合が正常なシナプス情報伝達の調節に必須であることが示唆された。

研究成果の概要 (英文)：The scaffolding molecule PSD-95 at excitatory synapse is composed of three PDZ domains and SH-GK domain. We examined the roles of PDZ1 and PDZ2 binding by using mice that carry mutated PDZ1 and PDZ2. The results suggest that the PDZ binding stabilizes PSD-95 localized at synapses, which allows normal regulation of synaptic transmission via the direct binding of NMDAR and PSD-95.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	3,900,000	1,170,000	5,070,000
2008年度	3,500,000	1,050,000	4,550,000
2009年度	3,500,000	1,050,000	4,550,000
年度			
年度			
総計	10,900,000	3,270,000	14,170,000

研究分野：神経生物学、分子薬理学

科研費の分科・細目：神経科学・神経化学・神経薬理学

キーワード：PDZドメイン、シナプス可塑性、シナプス後肥厚、MAGUKファミリー

1. 研究開始当初の背景

(1) NMDA型グルタミン酸受容体(NMDA受容体)はシナプス可塑性を担う中心的分子であり、その電位依存性かつ神経伝達物質依存性カルシウムチャネルとしての機能は、神経細胞に多様な反応性を賦与している。

NMDA受容体の足場タンパク質であるPSD-95の機能は、シナプスのNMDA受容体近傍に多様なシグナル伝達分子を活動依存的に集積させることであり、それに伴うシグナル伝達の質的变化が可塑性を反映していると考えられる。

(2) PSD-95は、3個のPDZドメインを含む5個のドメイン構造をしており、複数のPDZドメインによるシグナル分子の集積機構、さらにPSD-93、SAP102、SAP97という類似の足場タンパク質との役割分担、作用機構の相違が十分明らかでない。これら多様な分子群は哺乳類以降の生物にのみ見出される分子群であり、複雑な脳機能を担う分子基盤として各々の機能を明らかにすることは重要である。

2. 研究の目的

興奮性シナプス後細胞の足場タンパク質PSD-95による情報伝達調節機構の解明を目的とする。具体的には、NMDA受容体非結合型PDZドメインを持つ変異型PSD-95を用いて、PDZ変異によってPSDのどのタンパク質の発現や局在に変動をきたすのかを調べて、正常なシナプス伝達のために必要な情報伝達系、及びPSD-95との結合によってもたらされるNMDA受容体のチャンネル活性や細胞内局在の調節機構を解明する。

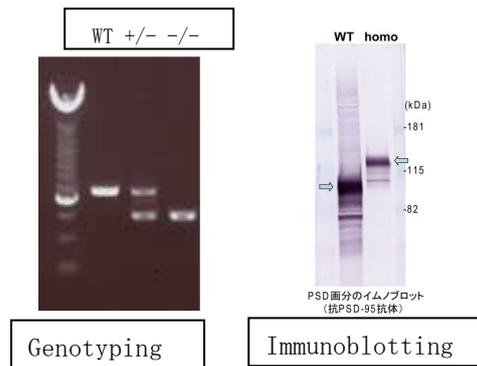
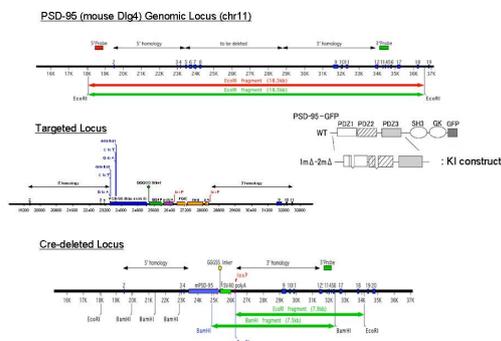
3. 研究の方法

独自に設計開発したNMDA受容体に結合しない、PDZドメイン変異PSD-95を導入したノックインマウスを確立し、その表現型を神経細胞組織レベル、個体レベルで解析する。

4. 研究成果

(1) ノックインマウス系統樹立：

PSD-95のPDZ1とPDZ2に特異的変異(PDZドメインのβB-βC loopの6残基欠失及び保存されている2残基の変異)を導入して、NMDA受容体に直接結合しない、変異PSD-95(C末にGFPを融合：1mD2mD-PSD95-EGFP)を導入したノックインマウスのホモ個体を樹立し、遺伝子背景を97%程度までC57BL/6Jに戻した。



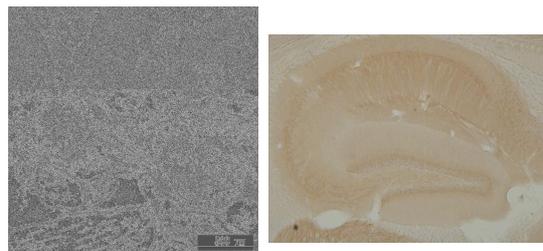
(2) 変異PSD-95の発現と集積：

ノックインした1mD2mD-PSD95-EGFP遺伝子の発現量は野生型PSD-95に比べて約5~8分の1程度に減少していた。ノーザン解析によってmRNA量を比較したところ、いずれもほぼ同程度であった。これは、タンパク質レベルで観察された量の違いは、PDZ結合の欠損がPSD-95の不安定化に寄与していることを示唆している。*in situ* hybridizationによって、ノックインマウス脳内の発現様式(場所)は野生型と変わらないことを確認した。

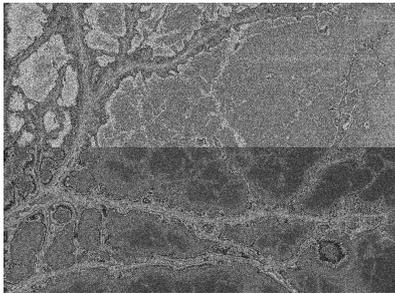
脳ホモゲネートからPSD画分を調整して、生化学的な局在状況を調べると、WTと同様な分画様式を示した。また、PSDに局在するSAP102、PSD-93、SAP97、NR1、NR2A、NR2B、GluA1、SynGAP、neuroligin-1をWTとKIマウスについて検討したところ、SAP102のみが約3.5倍の増加を示した。PSD-95のPSDにおける結合欠損はSAP102によって補償されていることが明らかとなった。PSDに輸送されたPDZリガンドタンパク質はPSD-95の結合能がないために、代わりにSAP102を足場タンパク質として活用していた。

(3) ノックインマウスの脳細胞形態：

ノックインマウス海馬領域の電子顕微鏡観察(図左)では、野生型とほぼ同様な組織構造が観察された。ゴルジ染色によっても、海馬領域の神経細胞の形態は野生型と著しく変わらないことが明らかとなった。抗GFP抗体を用いた免疫組織染色(図右)によって、海馬CA1領域や大脳に強く発現していることが確認された。



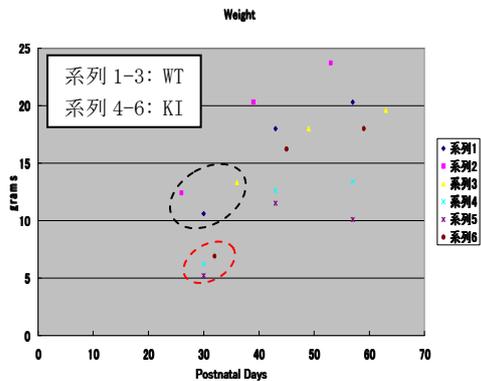
(4) 1mD2mD-PSD95-EGFPのシナプス局在：
 PSD-95のシナプス局在のためにN末領域とPDZ1、PDZ2ドメインが必須であるとドメイン欠損変異体の強制発現系を用いて報告されている。他方、SH3-GKドメインを欠損してもPSD-95のシナプス局在性は顕著に低下する。PSD-95がN末領域を介して複合体を形成するために、シナプス局在のためのPDZドメインの役割が明確になっていない。本ノックインマウスは野生型のPSD-95を発現しないので、PDZ1、PDZ2ドメイン結合がシナプス局在に必須であるかがはっきりわかる。本ホモマウスは非常に低い割合で妊娠出産することができた。子育てはできなかった。P0産仔の脳を用いて海馬分散培養を行い、さらに1mD2mD-PSD95-EGFP遺伝子を強制発現させると、野生型より効率は悪いが、シナプスに局在することがわかった。PSD-95は、PDZ1、PDZ2ドメイン結合がなくてもSH3-GKドメインがあれば、シナプスに輸送集積されることが明らかになった。



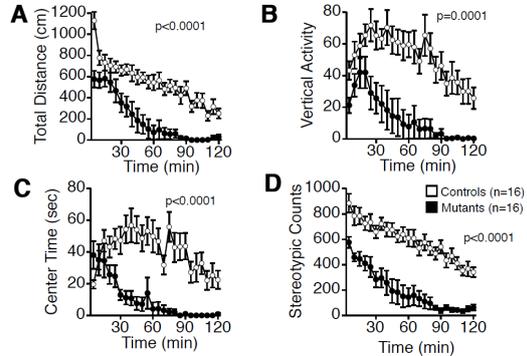
(1mD2mD-PSD95-EGFP由来のGFP蛍光観察)

(5) 行動テストバッテリー：

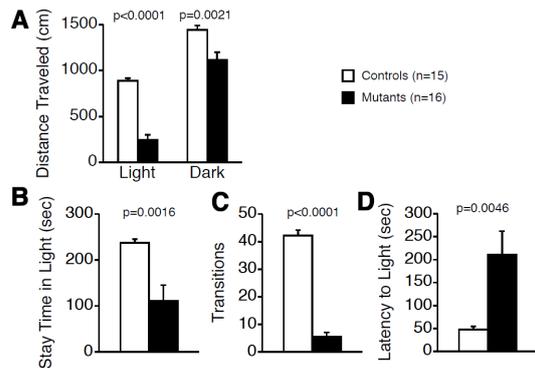
本マウスを飼育繁殖し、各16匹の♂野生型および♂ホモ個体について一連の行動テストバッテリーを実施した(宮川剛博士、高雄啓三博士との共同研究)。本ノックインマウスは体が小さく、活動量が極めて低い。野生型とホモ個体の体重差は、P30くらいの時期に特に顕著であった。Light/dark transition testでは不安様行動が亢進した表現型を示し、Porsolt forced swim testでは抗うつ剤投与時様の行動を示した。



Light/dark transition テストでは、明箱の滞在時間が短い、行き来した回数が少ない、最初に明箱に入るまでの潜時が長いなど、不安様行動の亢進が観察された。Elevated plus maze テストにおいても、同様な不安様行動の亢進が観察された。

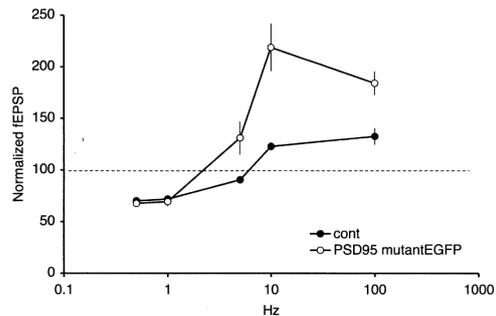


Open fields testでは、KIマウスの著しく低い活動量が観察された。



(6) 電気生理学的解析：

ノックインマウスの海馬スライスCA1領域の電気生理学的性質(細胞外興奮性シナプス後電場電位、PPF等)を調べた結果、正常なLTD誘導が起きる一方で、低周波でもLTPが誘導され、LTPの増強が観察され、異常なメタ可塑性を示した(塩坂貞夫博士、石川保幸博士との共同研究)。



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 土井知子、シナプス局在から見える PSD-95 ファミリーの機能多様性、生体の科学、査読無 61(5), 492-493 (2010)
- ② 土井知子、PSD-95 クラスターリングにおける PDZ ドメインの役割、生体の科学、査読無 58(2), 119-124 (2007)

[学会発表] (計3件)

- ① 湊原圭一郎、藤吉好則、土井知子、第 33 回日本神経科学大会(2010年9月2~4日)、神戸コンベンションセンター、Preferable binding of a novel synaptic adhesion molecule, LRRTM2 with SAP102.
- ② 市川昌平、関達也、藤吉好則、土井知子、第 32 回日本分子生物学会年会 (2009 年 12 月 9~12 日)、横浜国際会議、The ligand-binding of PDZ domains play different roles in the synaptic clustering of PSD-95 and SAP102.
- ③ 奥田明子、西村章子、藤吉好則、土井知子、第 82 回日本生化学会大会(2009年10月21~24日)、神戸コンベンションセンター、Characterization of hETBR expressed in *E. coli* for isolation of thermo-stable mutants.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

土井 知子 (DOI TOMOKO)
京都大学・大学院理学研究科・准教授
研究者番号：00397580

(2) 研究協力者

石川 保幸 (ISHIKAWA YASUYUKI)
奈良先端科学技術大学院大学・
バイオサイエンス研究科・助教
研究者番号：90346320

田村 英紀 (TAMURA HIDEKI)
奈良先端科学技術大学院大学・
バイオサイエンス研究科・助教
研究者番号：80437516

塩坂 貞夫 (SHIOSAKA SADA0)
奈良先端科学技術大学院大学・
バイオサイエンス研究科・教授
研究者番号：90127233

高雄 啓三 (TAKAO KEIZO)
自然科学研究機構・生理学研究所・
特任准教授
研究者番号：80420397

宮川 剛 (MIYAKAWA TSUYOSHI)
藤田保健衛生大学・総合医科学研究所・
教授
研究者番号：10301780

藤吉 好則 (FUJIYOSHI YOSHINORI)
京都大学・大学院理学研究科・教授
研究者番号：80142298