

機関番号：12601

研究種目：若手研究B

研究期間：平成21年度～平成22年度

課題番号：21790265

研究課題名（和文）

NMDA 受容体/PSD-95/SPAL-1/Rap シグナルによる高次脳機能の制御機構

研究課題名（英文）

The role of NMDA receptor/PSD-95/SPAL-1/Rap signaling in higher brain function

研究代表者

川崎 善博 (Kawasaki Yoshihiro)

東京大学・分子細胞生物学研究所・講師

研究者番号：10376642

研究成果の概要（和文）：

私たちは今回 SPAL-1 KO マウスの海馬 CA1 および CA3 領域の詳細な電気生理学的解析を行った。その結果、海馬 CA1 では大きな異常は観測されなかったが、海馬 CA3 においては、KO マウスの p42/44MAPK の活性が著しく減少しており、また苔状線維 LTP およびテタヌス時の脱分極が著しく障害されていることを明らかにした。本研究の進展により苔状線維 LTP 新たなメカニズムが解明されることが期待される。

研究成果の概要（英文）：

In this study, we carried out a series of electrophysiological recordings with a focus on CA1 and CA3 regions in hippocampal slices from SPAL-1 KO mice. Most of the electrophysiological properties of the CA1 were normal. However, we found mossy fiber LTP recorded in CA3 region was significantly impaired. Furthermore, we found that phosphorylation of p42/44 MAPK is significantly reduced in the stratum lucidum of CA3. Our study may contribute to the elucidation of the novel mechanism of mossy fiber LTP.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成21年度	2,100,000	630,000	2,730,000
平成22年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・医化学一般

キーワード：SPAL, PSD-95, NMDA 受容体

1. 研究開始当初の背景

私たちは、大腸癌抑制遺伝子産物 APC (Adenomatous polyposis coli) が細胞増殖や細胞運動を制御する分子機構について解析を行ってきた。その一環として APC 結合タンパク質を探索し、思いがけず PSD-95 を同定した。PSD-95 はシナプス後肥厚 (PSD) を構成する主要タンパク質の一つで、NMDA 受容体と結合するアダプタータンパク質として、PSD

の維持、NMDA 受容体のクラスターリング、NMDA 受容体からのシグナル伝達制御などに関与している。PSD-95 ノックアウトマウスの解析により、PSD-95 が高次脳機能の発現に重要な役割を果たしていることが示されている。

そこで、神経系に対象を移して解析を進めた結果、APC がニューロンでも発現しており、PSD において NMDA 受容体および PSD-95

と複合体を形成していることを見出した (Genes Cells 5, 815-822, 2000)。さらに PSD-95 結合タンパク質として SPAL-1 を同定し、その基本的な機能解析を行った (Genes Cells 7, 607-61, 2002)。

国内では、私たち以外に SPAL-1 に関して成果発表を行っている研究グループはない。国外では、アメリカの Sheng のグループが、SPAL-1 が PSD において NMDA 受容体および PSD-95 と複合体を形成していること、SPAL-1 が Rap1 および Rap2 に特異的な GAP であること、SPAL-1 がスパイン (樹状突起に無数に見られる棘状の小突起で、興奮性シナプス形成の場) の形態制御する事などを示した (Neuron, 31, 289-303, 2001)。さらに最近、シナプス強度のホメオスタシス制御に関与している事などを報告した (Neuron, 58, 571-583, 2008)。しかし、これらはすべて初代培養ニューロンに SPAL-1 やその変異体を強制発現させることにより得られた結果であり、生体内での本来の生理機能を反映しているとは言い難い。Sheng から直接得た情報によれば、彼らのグループは SPAL-1 ノックアウトマウスは作製していない。これに対して私たちは、当初より SPAL-1 の生理機能の解明を目指し、早期に SPAL-1 マウスの作製に成功している。Rho ファミリーや Ras 等の他の低分子量 G タンパク質に比べて、Rap に特異的な GAP の変異マウスを用いた研究はあまり行われておらず、特に神経系の分野では私たちの SPAL-1 ノックアウトマウスが初めてである。したがって、ノックアウトマウスという強力なツールを有し、生理機能を解析するのは本研究のみであり、国内外を問わず独自性が高い。

2. 研究の目的

本研究では、私たちが作製した SPAL-1 ノックアウトマウスを用いて多角的な解析を行い、SPAL-1 の生理機能を明らかにすることを目的とする。さらに、高次脳機能の発現制御における、NMDA 受容体/PSD-95/SPAL-1 複合体 → Rap のシグナル伝達経路の生理的役割を明らかにする。

高次脳機能と密接に関連している「シナプスの可塑的变化」の分子機構を考えるうえで、最近 Rap の下流で活性化される MAPK が注目されている。例えば、p38 および JNK はエンドサイトーシスにより AMPA 受容体をシナプス表面から取り除くように働くことで、海馬の機能を制御している (Cell, 110, 443-55, 2002; Neuron, 46, 905-916, 2005)。個体レベルでも、Rap シグナルを阻害すると p42/44 に依存した LTP (Long-term potentiation; 学習・記憶に密接に関連したシナプス伝達効率の増強) が阻害される (Neuron, 39, 309-325, 2003)。これらを手がかりにして、生理的な SPAL/Rap シグナルと p38, JNK, p42/44 の関係や、さらにその下流で制御を受ける AMPA 受容体のエンド

サイトーシス等に関して、生化学的解析および電気生理学的解析による検討を加える。

3. 研究の方法

野生型マウスおよび SPAL-1 ノックアウトマウスの海馬急性スライスを用い、種々の電気刺激プロトコルや薬剤処理下で、CA1 および CA3 の電気生理学的解析を行った。海馬急性スライスを種々の電気刺激プロトコルや薬剤処理を施した後、SPAL のリン酸化、Rap, p38, JNK, p42/44 の活性を生化学的あるいは組織学的に解析した。

4. 研究成果

私たちはこれまでに、SPAL-1 が海馬、扁桃体、大脳皮質など高次脳機能を司る領域の神経細胞で特に多く発現していることを見出し、これに着目し種々の行動実験を行った。その結果、モリス水迷路、恐怖条件付け (文脈学習)、瞬目反射学習 (トレース実験) など海馬依存的な学習実験で、ノックアウトマウスに著しい障害が見られ、SPAL-1 が海馬に関連した高次脳機能で重要な働きをしていることが判明した。さらに私たちは、SPAL-1 ノックアウトマウスの詳細な行動実験を行い、海馬依存性学習の障害に加えて、多動性や驚愕反応の増大などを見出している。この表現型は、ヒトの注意欠陥多動性障害 (ADHD)、統合失調症、脆弱X症候群等の精神疾患と類似している。脳の組織学的解析 (層構造、神経線維の走行、非対称性シナプスの基本構造など)、海馬 CA1 領域の電顕解析 (スパイン面積・密度、PSD 長の差など) では、現在までのところ野生型マウスとの大きな相違は認められていない。

今回海馬 CA1 領域の電気生理学的解析では SPAL-1 ノックアウトマウスで僅かな LTP 上昇が見られた以外は大きな異常は観測されなかった。しかしながら海馬 CA3 領域においては、ノックアウトマウスの p42/44 の活性が著しく減少しており、また mossy fiber LTP およびテタス時の脱分極が著しく障害されていることを明らかにした。この時、mossy fiber の走行、paired-pulse facilitation、frequency facilitation には異常がなかった。現在も更に詳細な解析が進行中である。

これまでの一般的な考えでは苔状線維 LTP の発現メカニズムは前シナプス依存的というのが主流で、後シナプスのメカニズム的な寄与は十分にはわかっていない。CA3 透明層における SPAL-1 の発現は主に後シナプスであり、また SPAL-1 ノックアウトマウスの透明層における p42/44MAPK の活性が著しく低下していることから、当該領域におけるシグナル伝達経路に何らかの異常があることは間違いない。海馬 LTP の分子メカニズムは記憶と学習のメカニズムの基盤を成していると考えられているため大きな関心が寄せられており、本研究のさらなる進展により苔状線維 LTP の SPAL-1

が関与する新たなメカニズム、また SPAL-1 ノックアウトマウスが呈する注意欠陥多動性障害(ADHD)や統合失調症様の表現型を含む行動異常のメカニズムの一旦が解明されることが期待される。また海馬 p42/44MAPK 活性の異常はてんかんと関係する事から、SPAL-1 がてんかん感受性に寄与するかも重要な研究課題である。

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. Kawasaki Y, Jigami T, Furukawa S, Sagara M, Echizen K, Shibata Y, Sato R, Akiyama T.
The APC-associated guanine nucleotide exchange factor Asef is involved in angiogenesis.
J. Biol. Chem., 285, 1199-1207, 2010.
2. Kawasaki Y*, Tsuji S*, Muroya K*, Furukawa S, Shibata Y, Okuno M, Ohwada S, Akiyama T.
The APC-associated exchange factors Asef and Asef2 are required for adenoma formation in *Apc*^{Min/+} mice.
EMBO Rep., 10, 1355-1362, 2009.
3. Kawasaki Y, Tsuji S, Sagara M, Echizen K, Shibata Y, Akiyama T.
APC and Asef function downstream of hepatocyte growth factor and phosphatidylinositol 3-kinase.
J. Biol. Chem., 284, 22436-22443, 2009.
4. Sagara M, Kawasaki Y, Iemura SI, Natsume T, Takai Y, Akiyama T.
Asef2 and Neurabin2 cooperatively regulate actin cytoskeletal organization and are involved in HGF-induced cell migration.
Oncogene, 28, 1357-1365, 2009.

[学会発表] (計 5 件)

1. ENS de Lyon-Todai Workshop
2010.11

川崎善博、秋山徹

Function of the tumour suppressor APC

2. 第 1 回構造生物学社会連携講座シンポジウム 2010.11

川崎善博、秋山徹

APC の異常と発癌

3. 日本分子生物学会 2009.12

川崎善博、辻真之介、室谷研、古川史織、大和田進、秋山徹

Role of the APC-associated guanine nucleotide exchange factor Asef/Asef2 in intestinal adenoma formation

4. 日本癌学会 2009.10

川崎善博、辻真之介、室谷研、古川史織、大和田進、秋山徹

Role of the APC-associated guanine nucleotide exchange factor Asef/Asef2 in intestinal adenoma formation

5. 日本細胞生物学会 2009.6

川崎善博、辻真之介、室谷研、古川史織、大和田進、秋山徹

Role of the APC-associated guanine nucleotide exchange factor Asef/Asef2 in intestinal adenoma formation

6. 研究組織

(1) 研究代表者

川崎 善博

研究者番号 : 1 0 3 7 6 6 4 2

(2) 研究分担者

()

研究者番号 :

(3) 連携研究者

()

研究者番号 :