

平成 30 年 5 月 21 日現在

機関番号：13401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08151

研究課題名(和文) 脂質関連分子を介する新たなAMPA型グルタミン酸受容体のシナプス集積機構の解明

研究課題名(英文) Study on a new synaptic accumulation mechanism of AMPA receptor by lipid-related molecules

研究代表者

謝 敏カク (XIE, MINJUE)

福井大学・子どものこころの発達研究センター・助教

研究者番号：40444210

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：シナプス可塑性の仕組みは、学習記憶のモデルとして盛んに研究され、関連遺伝子やタンパク質の同定とその役割の理解が深まりつつある。本研究では、膜脂質の一種PIP3と特異的に結合するPhldb2が、シナプスが形成されるスパインにPIP3依存的に局在し、グルタミン酸受容体のシナプス内係留とPSD-95の細胞内動態に関与することを突き止めた。また、Phldb2欠損マウスの海馬CA1シナプスでは、長期抑制と長期増強の両方のシナプス可塑性が欠如していることも見出した。これらの知見は、シナプス可塑性における膜脂質-タンパク質相互作用の重要性を提起し、その分子実体を明らかにした点で重要な発見である。

研究成果の概要(英文)：The essential involvement of phosphoinositides in synaptic plasticity is well-established, but incomplete knowledge of the downstream molecular entities prevents us from understanding it completely. Here, we determined that Phldb2, of which pleckstrin-homology domain is highly sensitive to PIP3, functions as a phosphoinositide-signaling mediator for synaptic plasticity. Phldb2 bound to postsynaptic scaffolding molecule PSD-95 and was crucial for localization and turnover of PSD-95 in the spine. Phldb2 also bound to GluA1, GluA2 and CaMKII. Phldb2 was indispensable for the interaction between NMDA receptors and CaMKII, and the synaptic density of AMPA receptors. Therefore, PIP3-responsive Phldb2 is pivotal for induction and maintenance of LTP. Phldb2 unexpectedly bound to AP2 and this was necessary for AMPA receptor endocytosis. Long-term memory formation as well as LTP and LTD was indeed impaired in our Phldb2<sup>-/-</sup> mice.

研究分野：医歯薬学

キーワード：Phldb2 LTD LTP CamKII PIP3 AMPAR

## 1. 研究開始当初の背景

シナプス伝達とその調節機構の理解は、脳の高次機能や精神・神経疾患を解明する上で必要である。シナプス可塑性は、シナプス前後の神経細胞の協調的な活動によりシナプスでの情報伝達効率が変化する現象であり、実験的に長期増強 (LTP) および長期抑圧 (LTD) 現象として捉えられている。中枢神経系での速い興奮性シナプス伝達はイオン透過型のグルタミン酸受容体である AMPA-R により担われており、シナプス後肥厚部 (PSD) を伴うシナプス後膜上に集積した AMPA-R の発現量がシナプス後応答の大きさを決定していることが近年明らかにされている (Hayashi et al., *Nature* 7:397;1999, Matsuzaki M et al., *Nat Neurosci.* 4:11;2001)。近年、膜脂質の一種ホスファチジルイノシトール(3,4,5)三リン酸(PIP3)がスパインに局在し、シナプス後膜で AMPA-R クラスタリングの維持に働き LTP を制御することが報告された (Arendt KL et al., *Nature Neurosci.* 2010)。

我々は、PIP3 と高感度に結合する PH (pleckstrin homology) domain を持つ Phldb2 (pleckstrin homology-like domain, family B, member 2) の解析を進めた過程で (Takabayashi, T and Xie M-J et al., *J. Biol. Chem.* 2010)、この Phldb2 が海馬の神経細胞に発現し、AMPA-R と結合することを見出した。さらに、我々が作製した Phldb2 ノックアウト (Phldb2 KO) マウスでは、細胞膜上 GluR2/総 GluR2 の発現が減少していることを観察している。また、化学的な LTD を NMDA 処理により誘導しても、Phldb2 KO マウスでは細胞膜上 GluR2/総 GluR2 の減少が Wild type マウスに比較して少ないことを観察した。これは、Phldb2 KO マウスで GluR2 のエンドサイトーシス阻害がされたと考えられる。そこで、我々は Phldb2 がシナプス可塑性形成にも重要な役割を担う可能性を検討することとした。

## 2. 研究の目的

脳の高次機能にはシナプスの伝達効率の動的な制御 (シナプス可塑性) が深く関与している。PIP<sub>3</sub> が興奮性シナプス伝達を担う AMPA-R の PSD 上での発現に重要な役割を持つことが示唆されている。しかし、PIP<sub>3</sub> と AMPA-R を繋ぐ分子実体やその制御機構は解明されていない。我々は、PIP<sub>3</sub> に高い親和性を持つ Phldb2 が成熟した脳にも発現し、神経細胞の興奮性シナプスが形成される樹状

突起スパインに PIP<sub>3</sub> 依存的に局在していることを見出した。そこで、PIP<sub>3</sub>, Phldb2, AMPA-R の神経細胞膜上発現の分布を明らかにしながら、膜脂質制御の視点から AMPA-R のシナプス集積とその調節の分子機構を解明する。

## 3. 研究の方法

### (1) 電気生理学的な LTD および LTP の解析を行った。

生後3週令野生型および Phldb2 KO マウスの培養海馬切片の CA1 領域に低頻度反復刺激による LTD および高頻度はんぶくしげきによる LTP の変化を検討した。

### (2) 電子顕微鏡レベルの SDS 処理凍結割断レプリカ標識法 (SDS-FRL 法) を行った。

この試験は、10 週令マウスの海馬固定組織を急速高圧凍結し、凍結割断レプリカを作製した後、SDS 処理により膜タンパク質以外の分子を洗い流してから、AMPA-R や NMDA-R に対する免疫金標識を行った。電子顕微鏡下で海馬 CA1 錐体細胞のシナプスを膜内粒子の集積を頼りに同定し、興奮性シナプス後膜の面積と AMPA-R や NMDA-R 標識数を測定した。

### (3) Phldb2 を介し、シナプス後肥厚部 (PSD) に存在する PSD-95 の局在の変化を検討した。

Phldb2 が PSD-95 に結合することを見出したが、PSD-95 局在への影響を検討した。具体的には、培養海馬神経細胞に tdTomato を発現導入し、PSD-95 に対する免疫染色標識を行った。蛍光強度の強さによりスパイン内 PSD-95 の局在のピークがスパイン head の辺縁から距離を測定した。

### (4) Phldb2 を介し、CaMKII-NMDAR 複合体の変化を検討した。

CaMKII と NMDA-R (NR2A, 2B, NR1) の複合体を調べるため、KO マウスおよび WT マウスの培養神経細胞を用い、CaMKII に対して免疫沈降を行った。さらに、Cos 7 細胞に Phldb2 とその結合分子 (AMPA-R, PSD-95, CaMKII) を発現導入し、Phldb2 に対して免疫沈降を行った。

## 4. 研究成果

### (1) Phldb2 はシナプス可塑性の発現に重要であることを見出した。

生後4週令マウスの脳スライスを作製し、高頻度電気刺激による LTP 誘導と低頻度電気刺激による LTD 誘導を海馬 CA1 シナプスを対象に行った。Phldb2 KO マウスでは LTP または LTD の誘導が完全に阻害されていたことから、Phldb2 はシナプス機能の増強と減弱の両方向、即ちシ

ナプス可塑性発現そのものに必須であることが示唆された。

(2) Phldb2 は AMPA-R 複合体を形成する。

Cos7 細胞に phldb2 と GluA1、または GluA2 を発現導入し、Phldb2 に対して免疫沈降すると、GluA1 と GluA2 の両方とも共沈されることから、Phldb2 がこれら AMPA-R サブユニットに直接結合することが示唆された。

(3) Phldb2 はシナプス膜表面におき AMPA-R および NMDA-R の発現密度の制御に関与する。

シナプス膜上の AMPA-R 発現に対する Phldb2 の役割を検討するために、凍結切断レプリカ標識 (SDS-FRL) 法を用いた AMPA-R 発現の高解像度解析を行った。総 AMPA-R 標識と GluA1 標識のラベルの両方で、シナプス面積と標識数の有意な正の相関が見られ、これは Phldb2 KO マウスでも確認された。しかし、KO マウスでは、総 AMPA-R 標識、及び GluA1 標識の両方の標識密度が野生型マウスの標識密度に比べ有意に低いことが分かり、phldb2 の欠損が、単一シナプスレベルにおける AMPA-R 発現密度の制御に関与することが明らかとなった。また、KO マウスに見られた標識密度の減少は、LTP の初期相に深く関与する GluA の標識密度で顕著であったことから、Phldb2 が AMPA-R 輸送機構の中でもシナプス可塑性に関わる機構に関与していることが強く示唆された。さらに、可塑性に関わる NMDA-R の NR1 の標識密度は KO マウスでの減少を確認した。

(4) Phldb2 は PSD-95 のスパイン内動態を制御する。

後肥厚部 (PSD) と呼ばれ、神経伝達物質受容体をはじめとする種々のシナプス機能分子が集積することで、機能的な分子複合体を形成している。興奮性シナプスでこの分子複合体形成に中心的な役割を担う分子 (足場タンパク質) PSD-95 のシナプス発現が Phldb2 の制御下にあるかどうかを検討する目的で、培養海馬神経細胞の PSD-95 局在を、免疫染色法より比較検討した。その結果、KO マウスでは PSD-95 局在のピークがスパイン head の辺縁から樹状突起シャフトに移動していた。さらに、paGFP-PSD-95 の培養海馬神経細胞への発現誘導後の PSD-95 拡散動態解析で、PSD-95 の拡散が KO マウスで遅いことが判明した。これらのことから、Phldb2 は PSD-95 のスパイン内局在および移動も制御していることが示唆された。

(5) Phldb2 は NMDAR-CaMKII-AMPA-R 局在調節機構の形成維持に重要であることを見出した。

興奮性シナプス伝達の可塑性は、NMDA 型グルタミン酸受容体 (NMDA-R) から流入する Ca<sup>2+</sup> がカルモジュリンキナーゼ II (CaMKII) の活性化を誘導し、種々の AMPA-R シナプス局在制御関連タンパク質のリン酸化を制御することで誘導される。従って、NMDA-R - CaMKII 複合体の形成は、シナプス機能変化の方向性を問わず、シナプス可塑性の発現そのものに重要である。そこで、Phldb2 の CaMKII との結合能を検討した結果、CaMKII に直接結合することを見出した。さらに、CaMKII と NMDA-R (NR2A, 2B, NR1) の複合体が、KO マウスで WT マウスに比べて顕著に減少していることを、培養神経細胞を用いた免疫沈降実験により明らかにした。これらの結果から、シナプス可塑性の発現そのものが KO マウスで障害された原因として、Phldb2 の欠損により CaMKII がシナプスに運ばれず、NMDAR からの Ca<sup>2+</sup> シグナルが AMPA-R に伝えられなくなったことが原因であると示唆された。

以上の研究結果から、Phldb2 は、膜脂質との相互作用を介してシナプス伝達関連タンパク質のシナプス集積を担う分子であり、シナプス可塑性の発現に必須な重要な分子であることを突き止めると同時に、シナプス可塑性のメカニズムの一端を明らかにした。

## 5. 主な発表論文等

### [雑誌論文] (計 3 件)

Zhong FF, Wu CL, Zhang YX, Sun XF, Xie MJ, Sato M. Effects of Buyang Huanwu decoction combined with edaravone on mitochondrial apoptotic pathway of nerve cells in mice with cerebral ischemia-reperfusion injury. *Int J Clin Exp Med* 10(4):6749-6755, 査読有, 2017.

Yagi H, Takabayashi T, Xie MJ, Kuroda K, Sato M. Subcellular distribution of non-muscle myosin IIb is controlled by FILIP through Hsc70. *PLoS ONE*, 12(2):e0172257, 査読有, 2017. doi: 10.1371/journal.pone.0172257.

Yagi H, Oka Y, Komada M, Xie MJ, Noguchi K, Sato M. Filamin A interacting protein plays a role in proper positioning of callosal projection neurons in the cortex. *Neurosci Lett*, 612:18-24, 査読有, 2016. doi: 10.1016/j.neulet.2015.11.049. Epub 2015 Dec 2.

### [学会発表] (計 6 件)

Xie MJ, Ishikawa Y, Yagi H, Matsuzaki H, Fukazawa Y, Sato M. Phosphoinositide-responsive Phldb2 regulates synaptic plasticity through

glutamate receptors. ポスター、The Society for Neuroscience 47th annual meeting、2017年11月11日、ワシントン、USA。

Xie MJ, Yagi H, Iguchi T, Oka Y, Fukazawa Y, Matsuzaki H, Iwata K, Ishikawa Y, Sato M. Phosphoinositide responsive Phldb2 regulates synaptic plasticity. ポスター、The Society for Neuroscience 46th annual meeting、2016年11月13日、San Diego, USA。

謝 敏カク、八木秀司、猪口徳一、岡 雄一郎、黒田一樹、深澤有吾、松崎秀夫、岩田圭子、石川保幸、佐藤 真：Phldb2, a phosphoinositide mediator, regulates synaptic plasticity through AMPA receptor and CaMK。ポスター、第38回日本生物学的精神医学会・第59回日本神経化学会合同年会、2016年9月8日、福岡県福岡市。

謝 敏カク、八木秀司、猪口徳一、岡 雄一郎、黒田一樹、深澤有吾、松崎秀夫、岩田圭子、柚崎通介、松田信爾、石川保幸、佐藤 真：膜脂質結合タンパク質 Phldb2 を介した AMPA 受容体局在制御機構。招待講演、第121回日本解剖学会総会・全国学術集会、2016年3月30日、福島県福島市。

Kuroda K, Yagi H, Xie MJ, Fukazawa Y, Oka Y, Iguchi T, Sato M. FILIP-related molecule binds to NMDA receptor and controls spine maturation and synaptic function of the hippocampal neuron. ポスター、The Society for Neuroscience 45th annual meeting、2015年10月19日、Chicago, USA。

謝 敏カク、八木秀司、猪口徳一、岡 雄一郎、黒田一樹、深澤有吾、松崎秀夫、岩田圭子、柚崎通介、松田信爾、石川保幸、佐藤 真：Phldb2 はシナプスの可塑性を制御する。ポスター、第38回日本神経科学大会、2015年7月30日、兵庫県神戸市。

〔その他〕

ホームページ等

<https://sites.google.com/site/kokoromatsuzaki/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

謝 敏カク (XIE, Min-Jue)

福井大学・子どものこころの発達研究センター・助教

研究者番号：40444210

### (2) 研究分担者

佐藤 真 (SATO, Makoto)

大阪大学・連合小児発達学研究所・教授

研究者番号：10222019

深澤 有吾 (FUKAZAWA, Yugo)

福井大学・学術研究院医学系部門・教授

研究者番号：60343745

黒田 一樹 (KURODA, Kazuki)

福井大学・学術研究院医学系部門・助教

研究者番号：60557966