

令和 2 年 6 月 1 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K07104

研究課題名(和文) RICS依存性Cdc42シグナルによるスパイン形態制御機構の解析

研究課題名(英文) Regulation of spine morphology by RICS-dependent Cdc42 signaling

研究代表者

中村 勉 (Nakamura, Tsutomu)

東京大学・定量生命科学研究所・客員准教授

研究者番号：30302798

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)：当研究室で同定したRICSは、興奮性シナプスのシナプス後肥厚に局在してグルタミン酸受容体およびPSD-95と複合体を形成し、Cdc42GAPとしてCdc42下流のシグナル伝達系を制御する。その伝達系の候補としてCdc42-PAK-LIMK-Cofilin経路を予想し、その解析を実施した。解析結果を総合すると、グルタミン酸の興奮性刺激により、グルタミン酸受容体-CaMKII-RICS-Cdc42から、PAKを経てCofilinに至る経路が予想通り動くことが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

高次脳機能の重要な細胞基盤として、グルタミン酸の興奮性刺激に依存したスパイン形態やシナプス伝達効率の制御が考えられている。Cofilinはスパイン骨格を構成するアクチン線維の動態を調節するタンパク質なので、上記のシグナル伝達経路によるアクチン動態の調節が、スパイン形態やシナプス伝達効率の制御に関与している可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We previously identified RICS, which is localized in the postsynaptic density and forms a complex with glutamate receptors and PSD-95. RICS functions as a Cdc42GAP that regulates the downstream Cdc42-mediated signaling. We hypothesized that RICS regulates the Cdc42-PAK-LIMK-Cofilin signaling pathway and tested the hypothesis in this study. We conducted in vitro experiments using primary cultured neurons derived from wild-type and RICS KO mice, inhibitors, and dominant negative mutants. We found that stimulation of neurons with glutamate leads to the activation of PAK, LIMK, and Cofilin in the CaMKII- or RICS-dependent manner. This finding suggests that glutamate, an excitatory neurotransmitter, activates Cdc42-PAK-LIMK-Cofilin signaling through glutamate receptors, CaMKII, and RICS.

研究分野：神経科学

キーワード：シグナル伝達 シナプス スパイン グルタミン酸受容体 CaMKII Cdc42 アクチン

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

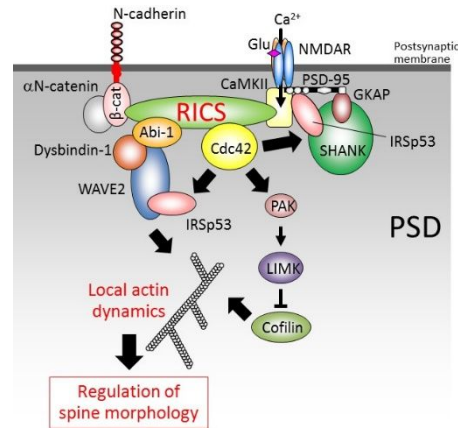
私たちは、 α -catenin 結合能を有する Cdc42GAP 分子として、大脳皮質・扁桃体・海馬・小脳などのニューロンのみで強く発現する RICS を同定した。RICS はグルタミン酸シナプスのシナプス後肥厚に局在し α -catenin、N-cadherin、NMDA 受容体、PSD-95 と複合体を形成していること、グルタミン酸刺激により CaMKII 依存的リン酸化を受けて Cdc42GAP 活性が抑制されること等を見出した。すなわち、RICS は NMDA 受容体シグナリングとシナプス接着とをリンクする分子で、活動依存的に Cdc42 から下流へのシグナル伝達を制御していると考えられた(図)

2. 研究の目的

Cdc42 下流のシグナルは複数のエフェクター分子を介してアクチン動態を制御しており、スパインにおいては活動依存的な形態変化やシナプス伝達の可塑的变化に関与している。しかしながら、RICS により制御を受ける Cdc42 シグナル伝達経路は特定できていなかった。私たちは、PSD に局在する Cdc42 エフェクターである PAK および IRSp53 に着目した。予備的な解析や先行研究の結果などを総合すると、RICS の下流で

- ・ Cdc42 PAK LIMK Cofilin 経路
- ・ Cdc42 IRSp53 WAVE2/Abi-1/Dysbindin-1 経路
- ・ IRSp53 PSD-95/SHANK 経路

が動くことが予想できた(図)。これらの Cdc42 シグナルの解明が RICS と高次脳機能との関連を調べる上で不可欠であると考えられ、RICS により制御される Cdc42 シグナルの特定とスパイン形態を制御するメカニズムを明らかにすることを目的とした。



3. 研究の方法

実験系として、RICS がプレドミナントに発現しているマウス大脳皮質ニューロンおよび小脳顆粒ニューロンを用いた。野生型マウス・RICS ノックアウトマウスに由来する大脳皮質および小脳顆粒培養ニューロンを用いて、以下の解析を行った。

(1) Cdc42 PAK LIMK Cofilin 経路

グルタミン酸刺激により全 PAK に対する活性型(自己リン酸化型)PAK の量比が増加するかを、ウエスタン法により調べた。同様に、KN-93、RICS-R58M、Cdc42-T17N(ドミナントネガティブ変異体)により PAK 活性化が阻害されるか調べた。RICS-R58M および Cdc42-T17N はアデノウイルスを用いて導入した。

グルタミン酸刺激により全 LIMK に対する活性型(リン酸化型)LIMK の量比が増加するかを、ウエスタン法により調べた。同様に、KN-93、RICS-R58M、Cdc42-T17N、PAK インヒビター IPA3 により LIMK 活性化が阻害されるか調べた。

グルタミン酸刺激により全 Cofilin に対する不活性型(リン酸化型)Cofilin の量比が増加するかを、ウエスタン法により調べた。同様に、KN-93、RICS-R58M、Cdc42-T17N、IPA3、LIMK インヒビター LIMKi3 または SR7826 により、上記の Cofilin 不活性化が阻害されるか調べた。

(2) Cdc42 IRSp53 WAVE2/Abi-1/Dysbindin-1 経路

Cdc42 の活性状態の違いが IRSp53、WAVE2、Abi-1、Dysbindin-1 の相互作用に影響するかを *in vitro* で解析した。培養ニューロンをグルタミン酸刺激し、IRSp53/WAVE2/Abi-1/Dysbindin-1 の複合体の結合状態に相違が生じるかを免疫沈降により調べた。

(3) Cdc42 IRSp53 PSD-95/SHANK 経路

Cdc42 の活性状態の違いが IRSp53、PSD-95、SHANK の相互作用に影響するかを *in vitro* で解析した。培養ニューロンをグルタミン酸刺激し、IRSp53/PSD-95/SHANK 複合体の結合状態に相違が生じるかを免疫沈降により調べた。

4. 研究成果

(1) Cdc42 PAK LIMK Cofilin 経路

グルタミン酸刺激により、全 PAK に対する活性型(自己リン酸化型)PAK の量比が増加することを見出した。このとき、Cdc42 に結合している PAK 量も増加していた。さらに、CaMKII 阻害剤 KN-93 処理および RICS-R58M(ドミナントネガティブ変異体)導入により PAK 活性化が阻害されることを見出した。RICS ノックアウトマウス由来ニューロンでは、この PAK の活性化は見られなかった。以上の結果から、PAK の活性化は CaMKII および RICS に依存していることが示された。

グルタミン酸刺激により、全 LIMK に対する活性型(リン酸化型)LIMK の量比が増加することを見出した。CaMKII 阻害剤 KN-93 処理および RICS-R58M(ドミナントネガティブ変異体)導入により LIMK 活性化が阻害された。さらに、RICS ノックアウトマウス由来ニューロンでは、LIMK

の活性化は見られなかった。以上の結果から、LIMK の活性化は CaMKII および RICS に依存していることが示された。

グルタミン酸刺激により、全 Cofilin に対する不活性型（リン酸化型）Cofilin の量比が増加することを見出した。CaMKII 阻害剤 KN-93 処理および RICS-R58M（ドミナントネガティブ変異体）導入により Cofilin 不活化が阻害された。さらに、RICS ノックアウトマウス由来ニューロンではこのような現象は見られなかった。以上の結果から、Cofilin 不活化は CaMKII および RICS に依存していることが示された。

以上の結果を総合し、グルタミン酸受容体の下流で、CaMKII および RICS を介して、Cdc42 PAK LIMK Cofilin の経路が動くことが明らかとなった。グルタミン酸の興奮性刺激に依存してスパインの形態が制御されることが高次脳機能の重要な細胞基盤と考えられているが、上記のシグナル伝達経路によりアクチン動態が調節されることが、スパイン形態制御に関与している可能性が示唆された。

（2）Cdc42 IRSp53 WAVE2/Abi-1/Dysbindin-1 経路

初代培養ニューロンをグルタミン酸刺激し、IRSp53/WAVE2/Abi-1/Dysbindin-1 複合体の結合状態に相違が生じるかを免疫沈降により調べたが、IRSp53 に結合している WAVE2、Abi-1 および Dysbindin-1 の量や、RICS に結合している Abi-1 量に変化は認められなかった。以上の結果から、Cdc42 IRSp53 WAVE2/Abi-1/Dysbindin-1 経路は RICS 下流の標的ではないか、あるいはプラス のシグナル伝達経路（例えば AMPA 受容体を介したグルタミン酸シグナルなど）が必要であると考えられた。

（3）Cdc42 IRSp53 PSD-95/SHANK 経路

初代培養ニューロンをグルタミン酸刺激し、IRSp53/PSD-95/SHANK 複合体の結合状態に相違が生じるかを免疫沈降により調べたが、IRSp53 に結合している PSD-95 および SHANK の量に変化は認められなかった。以上の結果から、Cdc42 IRSp53 PSD-95/SHANK 経路は RICS 下流の標的ではないか、あるいはプラス のシグナル伝達経路（例えば AMPA 受容体を介したグルタミン酸シグナルなど）が必要であると考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

| | |
|---|-----------------------|
| 1. 著者名 Nakamura T, Sakaue F, Nasu-Nishimura Y, Takeda Y, Matsuura K, Akiyama T | 4. 巻 34 |
| 2. 論文標題 The autism-related protein PX-RICS mediates GABAergic synaptic plasticity in hippocampal neurons and emotional learning in mice. | 5. 発行年 2018年 |
| 3. 雑誌名 EBioMedicine | 6. 最初と最後の頁 189-200 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） doi: 10.1016/j.ebiom.2018.07.011. | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である） | 国際共著 - |

〔学会発表〕 計0件

〔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 |
|---------------------------|-----------------------|----|
|---------------------------|-----------------------|----|