

令和 3 年 6 月 7 日現在

機関番号：31201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06466

研究課題名(和文) PSD-Zip70の刺激依存的脱リン酸化および局在変化によるシナプス可塑性制御

研究課題名(英文) Regulation of synapse plasticity by stimulation-dependent dephosphorylation and translocation of PSD-Zip70

研究代表者

真柳 平 (Mayanagi, Taira)

岩手医科大学・医歯薬総合研究所・講師

研究者番号：20432544

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)：神経細胞シナプスに存在するPSD-Zip70は神経伝達物質グルタミン酸の刺激を受けることによって脱リン酸化され、脂質結合シャペロンタンパク質Unc119との結合状態が変化して速やかに局在および相互作用タンパク質を変化させることを明らかにした。刺激によるPSD-Zip70の変化は一過的なRap2活性化を引き起こし、シナプス後部応答性の低下を引き起こすことを明らかにした。さらにPSD-Zip70の欠失はシナプス応答の可塑性に異常が生じ、不安亢進や作業記憶、認知機能が障害されたことから、高次脳機能に重要な刺激依存的なシナプス伝達制御機構の一端を明らかにする成果が得られた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

神経細胞はシナプスを介して他の神経細胞と回路を形成し、情報を伝達する。我々は神経細胞が神経伝達物質グルタミン酸の刺激を受けるとシナプスに存在しているPSD-Zip70タンパク質が速やかに働きを変化させ、シナプスの応答性を調節しているRap2タンパク質の機能を制御していることを明らかにした。マウスを用いた実験からPSD-Zip70はストレスによる神経機能の変化に関わっており、PSD-Zip70がないと短期記憶の障害、不安の増大が生じることも見出ししている。今回明らかにしたシナプス伝達を制御する仕組みは記憶や感情の調節など脳の複雑な働きを理解する上で重要な知見となる。

研究成果の概要(英文)：In response to glutamate stimulation, dephosphorylated PSD-Zip70 rapidly translocates from the postsynaptic site to endosomes via binding to lipid chaperon Unc119. The depletion of PSD-Zip70 at postsynaptic sites causes transient activation of Rap2, which impairs postsynaptic responsiveness via internalization of AMPA-type glutamate receptors. Deficiency of PSD-Zip70 in the hippocampus failed to induce long term depression, a form of activity-dependent synaptic plasticity. Further, PSD-Zip70-knockout mice exhibits defects in working memory and cognition as well as enhanced anxiety-like behaviors. These findings provide molecular foundation to elucidate the regulatory mechanism in stimulation-dependent synaptic plasticity concerning higher brain function such as memory and emotional control.

研究分野：神経科学

キーワード：シナプス可塑性 タンパク質局在変化 リン酸化・脱リン酸化 グルタミン酸 PSD-Zip70

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

神経細胞間で形成されるシナプスは神経回路網の基本単位であり、シナプス機能制御は複雑な脳の機能を理解する上で必要不可欠な重要課題である。グルタミン酸は中枢神経系においてを主要な興奮性神経伝達物質であり樹状突起上の微小突起(スパイン)上にシナプスが形成される。グルタミン酸の受容体としてはイオンチャネルである NMDA 型(NMDA-R)、AMPA 型(AMPA-R)およびカイニン酸型、G タンパク質共役の代謝型(mGluR)が存在している。通常のシナプス伝達は主に AMPA-R が担っており、NMDA-R は通常不活性だが強い刺激で脱分極すると活性化して Ca^{2+} の流入を引き起こし、可塑的なシナプス応答変化の引き金となる。シナプス可塑性として代表的な NMDA-R 依存性の長期増強(LTP)では高頻度刺激によってシナプス後部の応答性が増大し、逆に長期抑制(LTD)では低頻度刺激によって応答性が減少する。このシナプス応答性の変化は表出によって機能的な AMPA-R 数の変化によってもたらされる(Cingolani and Goda, *Nat. Rev. Neurosci.*, 2008, Luscher et al., *Nat. Neurosci.*, 2000) (図1)。

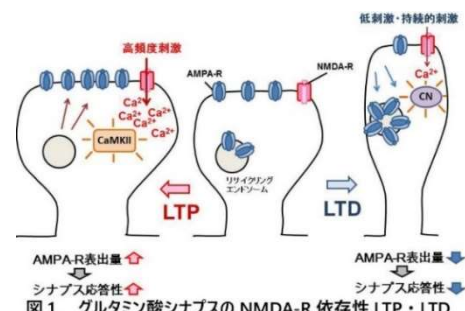


図1. グルタミン酸シナプスの NMDA-R 依存性 LTP・LTD

シナプス後部には伝達物質受容体を構造的に支える裏打ちとしてシナプス後肥厚部(PSD)が存在している。我々はロイシンジッパーとコイルドコイルドメインが特徴的な PSD タンパク質として PSD-Zip70 を同定、その機能を解析してきた(Konno et al, *J. Cell Sci.* 2002, Maruoka et al. *J. Neurosci.*, 2005)。PSD-Zip70 欠失(PSD-Zip70KO)マウスを作成して解析を進めたところ、PSD-Zip70 欠失は不安増強、作業記憶および認知機能の障害を引き起こし、その原因として前頭前皮質(PFC)および海馬の機能不全が生じていることを突き止めた(Mayanagi et al., *J. Neurosci.* 2015)。PSD-Zip70KO マウスの PFC・海馬ではシナプス成熟が障害されており、その原因として AMPA-R の動態制御に関わる低分子 G タンパク質 Rap2 の異常活性化を明らかにした。さらに Rap2 調節因子である SPAR (RapGAP:不活性化因子)および PDZ-GEF1/2 (RapGEF:活性化因子)が PSD-Zip70 との結合によって制御されており、PSD-Zip70 欠失によるこれらの制御破綻が Rap2 の異常活性化、AMPA-R の表出障害、ひいてはシナプス成熟不全を引き起こすという分子メカニズムを解明した(図2)。

この PSD-Zip70 についての解析の中で、グルタミン酸刺激によって PSD-Zip70 が顕著な局在の変化を示すことを見出した。同時にグルタミン酸刺激は PSD-Zip70 の脱リン酸化を起こすことも確認した。Rap2 活性および AMPA-R の表出制御に関わる PSD-Zip70 がシナプス後膜から離脱することは刺激依存性のシナプス応答性の変化に影響を与えることを強く示唆する。これらのことから PSD-Zip70 の刺激依存性の局在/リン酸化レベルの変化はシナプス可塑性制御に果たす役割について解析を進めた。

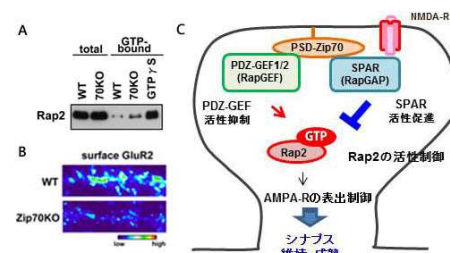


図2. PSD-Zip70 による Rap2 活性調節を介したシナプス成熟制御
A. PSD-Zip70 欠失による Rap2 異常活性化
B. PSD-Zip70 欠失による AMPA-R の表出量減少
C. PSD-Zip70 は Rap2 活性調節を介してシナプス成熟を制御している

2. 研究の目的

本研究課題では刺激依存的に生じる PSD-Zip70 の脱リン酸化および局在変化の仕組みとシナプス可塑性における意義を解明することを目的とする。

これまでシナプス可塑性に関わる因子の報告は多い。しかし PSD-Zip70 のように脱リン酸化は NMDA-R 依存性の Ca^{2+} 濃度上昇、そして局在変化は AMPA-R 依存性とそれぞれ異なる経路が引き金となる例は知られていない。グルタミン酸刺激によって生じる PSD-Zip70 の機能的変化がシナプス応答性の可塑性に果たす役割を明らかにすることを旨とする。

3. 研究の方法

(1) PSD-Zip70 の局在制御

図3に示したドメイン毎の部分欠失型の PSD-Zip70 (図の Myc タグの他に EGFP 融合型も作成)を用い、神経細胞に発現させてタイムラプス蛍光観察を行い、局在変化に必要な部位を特定した。さらにその局在制御に関わる結合タンパク質についても検索した。さらに免疫染色及びタイムラプス蛍光観察によって PSD-Zip70 の局在変化に伴う SPAR、PDZ-GEF1/2 など結合タンパク質および AP2、Rab5 など小胞輸送タンパク質について PSD-Zip70 との共局在性および刺激前後での局在変化について確認した。

(2) PSD-Zip70 の脱リン酸化と結合タンパク質の変化

脱リン酸化部位を特定するために、図3の部分欠失型 PSD-Zip70 を神経細胞に Nucleofector で高効率に導入・発現させ、グルタミン酸刺激による脱リン酸化が起こらなくなるものを

Western 解析により特定した。次いでその欠失領域に含まれるリン酸化部位候補の点変異型を作製し、刺激依存的リン酸化部位を特定した。その部位に点変異を導入したものを恒常的リン酸化型、リン酸化不能型としてその後の解析に利用した。

また、Rap1/2 活性を調節する SPAR、PDZ-GEF1/2 など、PSD-Zip70 結合タンパク質について、刺激依存的な結合性の変化、Rap1/2 活性の変化について解析した。結合タンパク質との相互作用は免疫沈降、Rap1/2 活性は GST 融合 RalGDS タンパク質による pull-down アッセイによって評価した。

(3) 刺激依存的シナプス応答性の可塑的变化への役割解明

野生型および PSD-Zip70KO マウスの海馬脳スライスを用いて、海馬 CA1 で認められる NMDA 依存性の LTP、LTD について PSD-Zip70 欠失の影響を詳細に検証した。

さらに、特定した局在変化不能型、恒常リン酸化型、リン酸化不能型およびそれらを組み合わせた変異型 PSD-Zip70 を用いて電気生理学的解析によりシナプス可塑性について解析した。培養海馬神経細胞を用いてグルタミン酸刺激有無による AMPA-R の表出量の変化を検出し、電気的なシナプス応答性の変化に関する生化学的解析から検証を進めた。

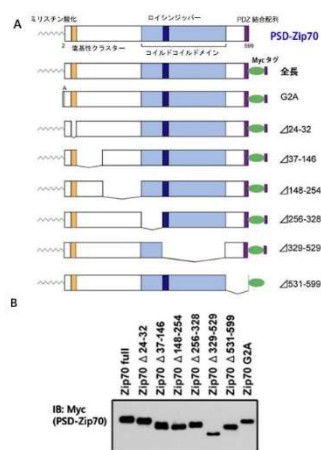


図3. PSD-Zip70 部分欠失型
A. PSD-Zip70 のドメイン構造および部分欠失型の発現
B. 部分欠失型の発現確認

4. 研究成果

(1) PSD-Zip70 の局在制御

刺激前には PSD-Zip70 はシナプス後膜への集積している。それが刺激後には非常に速やかに小胞状に見えるエンドソームへの集積が見られた(図4)。この局在変化は主に AMPA-R を介した脱分極性の刺激によることを特定した(図5)。図3で示した PSD-Zip70 のドメインごとに様々に部分欠失させた EGFP 融合タンパク質を用いて、局在制御に関わる責任領域の特定を行った。その結果、膜へのターゲティングには N 末端に存在するミリスチン酸による脂質修飾が重要であり、一方でシナプス後部への集積は C 末側に存在するコイルドコイルドメインが必要であることが分かった。さらに、刺激依存的な PSD-Zip70 の局在変化に関しては意外にもそのいずれでもない中央部に位置する領域が必須であることを特定した(submitted)。

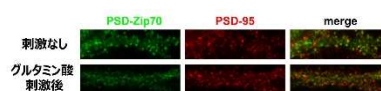


図4. グルタミン酸刺激による PSD-Zip70 の局在変化
海馬由来培養神経細胞における内在性 PSD-Zip70 の免疫染色像。グルタミン酸刺激有無による PSD-Zip70 (緑) の局在の変化を示す。PSD-95 (赤) はグルタミン酸シナプス後部のマーカー。

(2) PSD-Zip70 の脱リン酸化と結合タンパク質の変化

グルタミン酸刺激によって PSD-Zip70 の速やかな脱リン酸化を引き起こした。この脱リン酸化は NMDA-R 依存的な Ca^{2+} 濃度上昇が引き金となり、PP2A とカルシニューリン (CN、PP2B) が介在するものであることを明らかにした(図6)。さらに上記の局在制御領域に刺激依存的にリン酸化状態が変化するサイトを特定した。

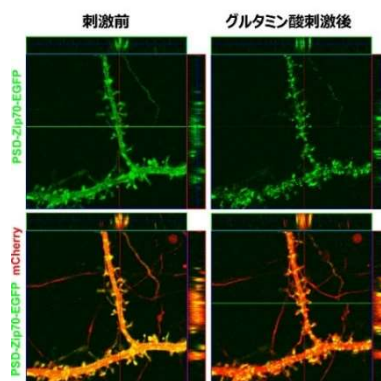


図5. PSD-Zip70-EGFP の刺激前後の局在変化
海馬由来培養神経細胞に PSD-Zip70-GFP (緑) および mCherry (赤) を発現させて共焦点レーザー顕微鏡による経時的観察像。PSD-Zip70-GFP はグルタミン酸刺激依存的に局在変化を示す。

さらに、我々は PSD-Zip70 の刺激依存的な局在変化に関わる因子として新規に脂質修飾タンパク質シャペロンとして知られる Unc119 との相互作用を見出した。Unc119 は網膜における視覚刺激受容に関わる ARL2/3 や免疫細胞における Src ファミリーチロシンキナーゼ FYN, LYN などの脂質修飾を受けたタンパク質の活性や局在を制御することが報告されている(Constantine et al. *Vision Res.*, 2012)。PSD-Zip70 も N 末端にミリスチン酸による脂質修飾を受けるが、さらに、中央部の刺激依存的局在制御領域のリン酸化状態によってこの Unc119 との結合状態が変化し、グルタミン酸刺激による速やかな局在の変化を担っていることを明らかにした(submitted)。つまりこの中央部の領域にグルタミン酸刺激依存的な脱リン酸化と、Unc119 との結合変化を介した局在制御との接点が存在することを見出した。

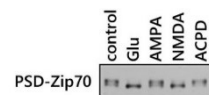


図6. PSD-Zip70 の脱リン酸化
グルタミン酸刺激による PSD-Zip70 の脱リン酸化。NMDA 型グルタミン酸受容体依存的に起こる。

また、PSD-Zip70 はシナプス後部でそれぞれ Rap GAP、RapGEF として働く SPAR および PDZ-GEF1/2 と相互作用し、Rap2 の活性を調節している(Mayanagi et al. *J. Neurosci.* 2015)。低分子 G タンパク質である Rap2 の活性化はシナプス後部の AMPA-R の表出量を減少させることでシナプス応答性の低下を誘導し、同時に TNIK、MINK といったエフェクター分子を介してアクチン細胞骨格依存的なスパイン形態制御にも関わっている(Stornetta and Zhu. *Neuroscientist*, 2011)。グルタミン酸刺激の有無に関してそれらとの相互について検証した。そ

の結果、グルタミン酸刺激後の検体では PSD-Zip70 と SPAR および PDZ-GEF 1/2 との結合が減少していた。一方で、Unc119 との結合はグルタミン酸刺激後に強くなっており、局在に関する結果と相関が認められた。PSD-Zip70 は SPAR および PDZ-GEF1/2 と結合することで Rap2 活性を抑制しているが、グルタミン酸刺激後にその複合体からはずれ、エンドソームへと局在を移すことで一過的な Rap2 の活性化を誘導することを明らかにした (Submitted) (図 7)。

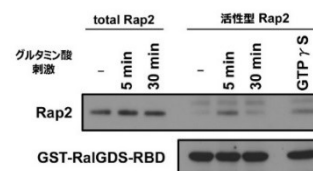


図 7. グルタミン酸刺激による一過的な Rap2 活性化

(3) 刺激依存的シナプス応答性の可塑的变化への役割解明

電気生理学的実験によってシナプス応答性における PSD-Zip70 の役割を確かめた。海馬スライスを用いて、CA1 領域に高頻度刺激あるいは低頻度刺激を加えることによってそれぞれ LTP および LTD が誘導される。ノックアウトマウスを用いて PSD-Zip70 を欠失した海馬スライスで解析を行うと、LTP は正常に認められる一方、LTD が誘導されないことを明らかにした (Submitted)。

さらに初代培養神経細胞を用いて、PSD-Zip70 および Rap2 の各種発現ベクターを遺伝子導入し、シナプス応答性の変化における PSD-Zip70-Rap2 経路の役割についてグルタミン酸刺激前後の AMPA-R の表出量への影響を指標として詳細に検証した。PSD-Zip70 の局在・リン酸化変異型、Unc119 や Rap2 の変異型を用いた結果から、グルタミン酸刺激による AMPA-R の表出制御を介したシナプス応答性の変化において、刺激依存的な PSD-Zip70 の機能変化は Rap2 活性制御を介して重要な位置づけを果たしていることが確認された (図 8)。

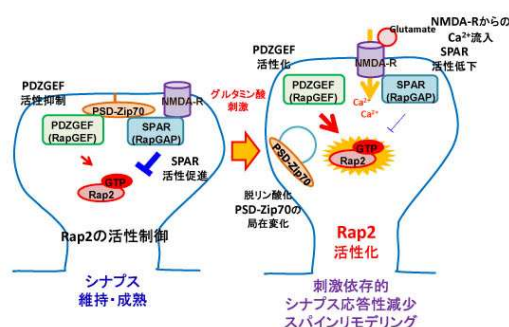


図 8. グルタミン酸刺激による PSD-Zip70 の機能変化に伴う Rap2 経路を介したシナプス応答性の減少およびスパインリモデリング

今回の研究によってグルタミン酸による神経刺激がどのような仕組みで PSD-Zip70 の機能を調節し、シナプス応答性の可塑的变化に影響を与えるのか明らかとすることができた。これまでの PSD-Zip70KO マウスを用いた解析から、PSD-Zip70 を欠失することによって作業記憶 (短期記憶) および認知機能の障害、さらに不安様行動の亢進が生じることが分かっている (Mayanagi et al. *J. Neurosci.* 2015)。特に作業記憶および不安様行動に関しては前頭前皮質における影響が大きく、認知については海馬が関与することを明らかにしている。今回明らかとなった PSD-Zip70 を欠失した海馬で見られた LTD 誘導の障害は上記の PSD-Zip70KO マウスで見られた行動異常において大きな影響を及ぼしていると考えられる。さらに、マウスモデルにおいて慢性的な社会性ストレスの負荷は PSD-Zip70-SPAR/PDZ-GEF1・2-Rap2 経路を介して、前頭前皮質での Rap2 の活性化を誘導することでシナプス応答性の低下、不安様行動の出現に関与していることを報告している (Mayanagi and Sobue. *Front. Cell Neurosci.*, 2020)。これらの結果から大脳皮質や海馬といったグルタミン酸を中心とした神経伝達を行う脳部位において PSD-Zip70 から Rap2 の活性制御を介したシナプス応答性は記憶や感情の制御といった脳高次機能について重要な役割を果たしていることが示唆された。不安亢進、作業記憶・認知の障害といった症状が病態に関わる不安障害やうつ病、統合失調症などの精神疾患において前頭前野や海馬のシナプス機能の異常が関係していることが報告されている (Stornetta and Zhu. *Neuroscientist*, 2011)。いずれの疾患もストレスが起因として関わることもよく知られている (Sanacora et al., *Neuropharmacology*, 2012)。今後これらシナプス機能異常に関わる精神疾患発症における PSD-Zip70-Rap2 経路の関与について解析が進むことによって、病態の理解および効果的な治療法開発へとつながることが期待される。

【引用文献】

- Cingolani LA, Goda Y. *Nat. Rev. Neurosci.* 2008; 9(5): 344-356.
 Constantine R, Zhang H, Gerstner CD, Frederick JM, Baehr W. *Vision Res.* 2012; 75: 26-32.
 Konno D, Ko JA, Usui S, Hori K, Maruoka H, Inui M, Fujikado T, Tano Y, Suzuki T, Tohyama K, Sobue K. *J. Cell Sci.* 2002; 115(Pt 23): 4695-4706.
 Lüscher C, Nicoll RA, Malenka RC, Muller D. *Nat Neurosci.* 2000; 3(6): 545-550.
 Maruoka H, Konno D, Hori K, Sobue K. *J. Neurosci.* 2005; 25(6):1421-1430.
 Mayanagi T, Sobue K. *Front. Cell Neurosci.*, 2020; 13:564.
 Mayanagi T, Yasuda H, Sobue K. *J. Neurosci.*, 2015; 35(42):14327-14340.
 Sanacora G, Treccani G, Popoli M. *Neuropharmacology.* 2012; 62(1): 63-77.
 Stornetta RL, Zhu JJ. *Neuroscientist.* 2011; 17(1):54-78.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3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 Mayanagi Taira, Sobue Kenji	4. 巻 13
2. 論文標題 Social Stress-Induced Postsynaptic Hyporesponsiveness in Glutamatergic Synapses Is Mediated by PSD-Zip70-Rap2 Pathway and Relates to Anxiety-Like Behaviors	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Frontiers in Cellular Neuroscience	6. 最初と最後の頁 564
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fncel.2019.00564	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 -

1. 著者名 Takashi Okuno, Toshiyasu Imaizumi, Umi Sakamoto, Daisuke Sakai, Kazuhiro Fukuda, Atsushi Sanbe, Taira Mayanagi, Kenji Sobue, Daijiro Kurosaka.	4. 巻 70
2. 論文標題 Myocardin-related transcription factor A (MRTF-A) regulates TGF- β 2-induced type I collagen production in human lens epithelial cells.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 岩手医学雑誌	6. 最初と最後の頁 81-90
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 Kensuke Asakura, Taira Mayanagi, Shingo Kimura, Tamotsu Sugai, Takayuki Matsumoto, Kenji Sobue.	4. 巻 71
2. 論文標題 Kensuke Asakura, Taira Mayanagi, Shingo Kimura, Tamotsu Sugai, Takayuki Matsumoto, Kenji Sobue.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 岩手医学雑誌	6. 最初と最後の頁 9-19
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 2件）

1. 発表者名 真柳 平、祖父江 憲治
2. 発表標題 Involvement of Rap2-mediated prefrontal dysfunction in social stress-induced anxiety.
3. 学会等名 第41回 日本神経科学大会（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 真柳 平、祖父江 憲治
2. 発表標題 ストレス起因性の不安におけるRap2活性化を伴う前頭前皮質の機能低下の関与
3. 学会等名 日本生化学会 東北支部 第84回 例会
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
研究分担者	祖父江 憲治 (Sobue Kenji) (20112047)	岩手医科大学・その他・学長 (31201)	
研究分担者	木村 眞吾 (Kimura Shingo) (30214878)	岩手医科大学・医学部・准教授 (31201)	

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
---------	---------