

機関番号：12301

研究種目：基盤研究（A）

研究期間：2007～2010

課題番号：19200029

研究課題名（和文）アクチンによるシナプス機能制御とその高次脳機能における役割

研究課題名（英文）Actin-dependent regulation of synapse function and its role in higher brain function

研究代表者

白尾 智明（SHIRAO TOMOAKI）

群馬大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：20171043

研究成果の概要（和文）：

初代培養神経細胞系と遺伝子変異動物を用いて、神経細胞樹状突起スパイン内のアクチン結合タンパクの変化はシナプス機能変化に直接結びつくことを明らかとした。次いで、アクチン結合タンパクのスパイン内集積動態を測定することにより、グルタミン酸作動精神系繊維は、グルタミン酸受容体の二つのサブタイプを使って、両方向性にアクチン結合タンパクのスパイン内集積を制御していることが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：

We used primary neuronal cell culture and knockout mice, and showed that the expression levels of spinal actin-binding proteins are related to the synaptic function, such as synaptic strength and plasticity. Then we analyzed the dynamics of spinal accumulation of actin-binding proteins, and found that glutamatergic fibers regulate the accumulation bi-directionally using two subtypes of glutamate receptors.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	12,000,000	3,600,000	15,600,000
2008年度	5,100,000	1,530,000	6,630,000
2009年度	5,100,000	1,530,000	6,630,000
2010年度	5,100,000	1,530,000	6,630,000
年度			
総計	27,300,000	8,190,000	35,490,000

研究分野：シナプスのアクチン細胞骨格

科研費の分科・細目：脳神経科学・神経化学・神経薬理学

キーワード：シナプス、アクチン、ドレブリン、ノックアウト、LTP、グルタミン酸受容体

1. 研究開始当初の背景

研究開始当初においては、アルツハイマー病などにおける認知障害の臨床症状は、アミロイド斑やニューロフィブラリータ

ングルの出現などに比べ、大脳皮質におけるシナプス密度の減少に、より依存していることがわかり、認知障害の病態としてシナプス機能不全が注目を集め始めていた。

一方 *in vitro* 系を用いた研究により、シナプス後部スパインのアクチン細胞骨格動態異常により引き起こされる、シナプス形態的可塑性や伝達物質受容体トラップフィキングの障害が、シナプス機能不全の分子基盤の一つであることがわかり、実際さらに、アルツハイマー病やうつ病においても、生体シナプス内のアクチン結合蛋白の量的・質的異常が報告された。

シナプス機能不全には LTP や LTD などの比較的短期間に起こるシナプス可塑性と、より長期的なホメオスタティック変化としてのシナプス可塑性の両者に障害が起きている可能性がある。本研究で取り上げる「アクチンによるシナプス機能制御」は、従来指摘されていた長期のシナプス可塑性への関与に加えて、短期シナプス可塑性でも重要な役割を果たしていると考えられ、「アクチンによるシナプス機能制御」の高次脳機能において果たす役割の重要性が脚光を浴び始めていた。

我々はこれまでにシナプス発達メカニズムの研究を行い、発達過程の神経細胞においてアクチン結合蛋白ドレブリンの神経特異的アイソフォーム（ドレブリン A）が発現することが契機となり、アクチン細胞骨格動態が変化して、アクチン繊維がシナプス後部に集積し、その結果 PSD-95 などの足場蛋白の集積やスパインの形態形成が誘導されることを発見した (*J. Neurosci.* 2003)。また、スパイン形成後のホメオスタティックシナプス可塑性においてもドレブリン A の発現が必要であることを報告した (*J. Neurochem.*, 2006)。これらの成果から、アクチン結合蛋白の量的変化はスパインの形成および機能に重要な働きをしていることが示唆される。しかし、ドレブリン A の発現はスパイン形成

の十分条件ではなく (*Mol. Cell. Neurosci.*, 2005)、スパイン形成には AMPA 型グルタミン酸受容体活性によるドレブリン A の集積が必要であることが推測され、また、成熟後のシナプスにおいては、NMDA 型グルタミン酸受容体活性が、ドレブリン A 結合型のアクチン繊維のスパイン内集積を制御していることを発見している (*Mol. Cell. Neurosci.*, 2006)。

2. 研究の目的

本研究は、「樹状突起スパインのアクチン細胞骨格」と「神経伝達物質受容体」間に存在すると考えられる双方向性の制御メカニズムを解明することを目的とする。

3. 研究の方法

初代神経細胞培養系はバンカー法を用いた (*J. Neurosci.* 2003)。免疫染色には、深麻酔後の動物を、4%パラホルムアルデヒドを用いて環流固定後、脳を取り出し、クリオスタットを用いて凍結切片を作成し、定法により免疫染色を行った。培養神経細胞の場合は、4%パラホルムアルデヒドで直接固定し、免疫染色を行った。タンパクの動態計測はドレブリンおよび PSD95 等に GFP を融合させたベクターを作成し、リポフェクタミンを用いたトランスフェクション法やマイクロインジェクション法により遺伝子導入を行い、褪色後蛍光回復法 (FRAP) により、タンパク動態を解析した。電気生理学的解析は海馬スライス標本作製し、field potential を測定して、シナプス後長期増強、長期抑制を観察した。行動解析は行動バッテリー法により行った。

4. 研究成果

初代培養神経細胞を用いた *in vitro* 実験

系では、(1) 成長円錐を樹状突起スパインのモデルとして用いて、アクチン結合蛋白ドレブリンがアクチン線維の retrograde flow を制御していることがわかった (JNC 2009)。また同時に、(2) 種々のアクチン結合蛋白の成長円錐およびシナプスへの局在を免疫組織化学的に明らかにした。ドレブリンEとニューラビン II は成長円錐のアクチン弓に濃縮していた。また、ニューラビン I は成長円錐内に瀰漫性に存在していた。ドレブリン A は成長円錐では検出できなかった。一方、チュブリンやVAMP 2などは成長円錐中心部に分布し、アクチン結合蛋白とは対照的な分布パターンを呈していた。ゲルゾリン、ファシン、リン酸化コフィリン、CaMKII などには、特徴的な分布は認められなかった。シナプス部へは、ドレブリン A が局在していた。次に、(3) 遺伝子工学的に、初代培養神経細胞樹状突起スパインのドレブリンをノックダウンして、足場蛋白の集積やスパインの形態に加えて、スパインの電気生理学的性質もドレブリン依存性に変化することを明らかとした (JCS 2009)。一方、セロトニン受容体やL型カルシウムチャネルがドレブリンのスパイン集積に影響を及ぼすことが示唆され、またドレブリンやアクチンのスパイン内集積度がシナプス後部神経細胞の種類や発達段階によって異なることがわかってきた。(4) スパイン内ドレブリン動態を制御するメカニズムとして、AMPA 受容体活性を介したメカニズム (JCS 2009)、スパイン内カルシウム濃度を介したメカニズム (投稿中) が存在することを明らかとした。(5) ドレブリンのアイソフォームの相違は樹状突起スパイン内のアクチン細胞骨格のダイナミズムの変化に相関していることがわかった。

また、ノックアウトマウス DAKO を用いた in vivo 実験で(1) NMDA 受容体のホメオス

タチック可塑性はドレブリン A 依存性であることを示した (JCN 2009)、(2) 高次脳機能解析および電気生理学的解析を行い、LTP 形成および fear conditioning 等に関する影響を解析し、DAKO は contextual memory に障害があることが判った。また、一定の成熟過程で電気生理学的性質や水迷路試験で異常が認められた。しかしながら、ニッスル染色による脳の層構造の異常やゴルジ染色による樹状突起スパイン数の顕著な差は認められなかった。但し、電子顕微鏡による解析で、パーフォレイテッドスパインの割合が高いことが示唆された (Neuroscience 2010; 投稿準備中)。

また強制水泳テストでは野生型と DAKO には有意差は認められなかったが、嗅球除去処置によりマウスは徐々に活動量が増加し、その増加量に野生型と DAKO には差があることが示唆された。さらに、AP5 投与により急性に起こる NMDA 受容体に関する恒常性維持可塑性が消失していることが判った (J. Comp. Neurol. 2009)。

一方生化学的な解析では、今のところ他のスパイン機能蛋白の全能における発現量には顕著な変化は認められていない。しかしながら、通常ならば成熟脳ではドレブリンが可溶性画分からほとんど消失しているのに比較し、DAKO マウスでは半分程度のドレブリンは成熟脳でも幼若脳と同様に可溶性画分に回収されることが判った。また、FRAP 解析によりドレブリンの動態はアイソフォームにより異なることが示唆されているので、DAKO マウスのシナプトゾームにおけるドレブリン異常集積はドレブリンアイソフォームにより、細胞下マイクロドメインレベルでドレブリンの分布が異なるためである可能性が

示唆された。

一方、ドレブリン E および A の両者を KO したドレブリン完全 KO (DXKO マウス) を作成するために、まず、ドレブリン遺伝子の flox マウスを作製し、次に、この flox マウスを用いて、DXKO マウスを作成した。DXKO マウスでは、高次脳機能に直結すると考えられる、成熟脳における新生ニューロンの細胞移動に異常が出現することがわかった。

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 35 件)

1. 花村健次、水井利幸、柿崎利和、Roppongi TR, 山崎博幸、柳川右千夫、白尾智明 “Low accumulation of drebrin at glutamatergic postsynaptic sites on GABAergic neurons” *Neuroscience*. 査読有、2010. 169: 1489-150
2. Pérez-Martínez M, Gordón-Alonso M, Cabrero JR, Barrero-Villar M, Rey M, Mittelbrunn M, Lamana A, Morlino G, Calabia C, 山崎博幸、白尾智明、Vázquez J, González-Amaro R, Veiga E, Sánchez-Madrid F. “F-actin-binding protein drebrin regulates CXCR4 recruitment to the immune synapse” *J. Cell Sci*. 査読有、2010. 123:1160-1170
3. 児島伸彦、花村健次、山崎博幸、Ikeda T, Itohara S, 白尾智明 “Genetic disruption of the alternative splicing of drebrin gene impairs context-dependent fear learning in adulthood” *Neuroscience*. 査読有、2010. 165: 138-150
4. Aoki C, 児島伸彦、Sabaliauskas N, Shah L, Oakford J, Ahmed T, 山崎博幸、花村健次、白尾智明 “Drebrin A Knock-Out Eliminates the Rapid Form of Homeostatic Synaptic Plasticity at Excitatory Synapses of Intact Adult Cerebral Cortex” *J Comp Neurol*. 査読有、2009. 517:105-121
5. 水井利幸、児島伸彦、山崎博幸、Katayama M, 花村健次、白尾智明 “Drebrin E is involved in the mechanism regulating axonal growth through actin-myosin interactions.” *J Neurochem*. 査読有、2009. 109:611-622
6. Takahashi, T, 山崎博幸、花村健次、関野祐子、白尾智明 “AMPA receptor inhibition causes abnormal dendritic spines by destabilizing drebrin” *J Cell Sci*. 査読有、2009. 122:1211-1229
7. Song M, 児島伸彦、花村健次、関野祐子 Inoue KH, Mikuni M, 白尾智明 “Expression of drebrin E in migrating neuroblasts in adult rat brain: coincidence between drebrin E disappearance from cell body and cessation of migration” *Neuroscience*. 査読有、2008. 152:670-682
8. 安田浩樹、Yan Huang and Tadaharu Tsumoto, “Regulation of excitability and plasticity by endocannabinoids and PKA in developing hippocampus.” *Proc Natl Acad Sci (USA)*. 査読有、2008, 105(8): 3106-3111.
9. Aoki C, Mahadomrongkul V, Fujisawa S, Habersat R, 白尾智明 “Chemical and morphological alterations of spines within the hippocampus and entorhinal cortex precedes the onset of Alzheimer’s disease pathology in double knock-in mice” *J. Comp. Neurol*.

査読有、2007.505:352-362

10. 関野祐子、児島伸彦、白尾智明 “Role of actin cytoskeleton in dendritic spine morphogenesis” *Neurochem. Int.* 査読有、2007.51: 92-104
11. Kobayashi, Aoki C, 児島伸彦、山崎博幸、白尾智明 “Drebrin A content correlates with spine head size in the adult mouse cerebral cortex” *J. Comp. Neurol.* 査読有、2007.503:618-626

[学会発表] (計 87 件)

1. 白尾智明、花村健次 “Low accumulation of drebrin at glutamatergic postsynaptic sites on GABAergic neurons.” 10th Biennial Meeting of the Asia-Pacific Society for Neurochemistry .2010.10.17. Phuket Graceland Resort and Spa. (プーケット、タイ王国) (invited)
2. 白尾智明、花村健次、高橋秀人、水井利幸、関野祐子 ” Regulation of dendritic spine morphology by changing drebrin-A dynamics” 22nd The International Society of Nephrology Biennial Meeting, 2009. 2009.8.23. BEXCO. (釜山、大韓民国)、(invited)
3. 白尾智明 “Role of synaptic activity in spine morphogenesis” in the symposium “Intercellular communications in the brain”, 36th International Congress of physiological Sciences 2009. 2009.8.1. 国立京都国際会館(京都、日本) (Invited)
4. 白尾智明 “Ionotropic glutamate receptors modify dendritic spine morphology by regulating drebrin dynamics” 8th Biennial Meeting of the

Asia-Pacific Society for

Neurochemistry . 2008.6.24-26. Hope Hotel. (上海、中華人民共和国) (Invited)

5. 白尾智明 “Bidirectional regulation of NMDA receptor and actin cytoskeleton in dendritic spine” in the symposium of “Mechanisms of Structural Plasticity at Excitatory Synapses” 7th IBRO World Congress of Neuroscience, 2007.2007.7.17. Melbourne Convention and Exhibition Centre. (メルボルン、オーストラリア連邦) (invited)

[図書] (計 2 件)

1. 関野祐子、白尾智明 “Role for signal propagation through the hippocampal CA2 field in memory formation” , pp254-266. in Web Intelligence Meets Brain Informatics Ning Zhong, Jiming Liu, Yiyu Yao, Jinglong Wu, Shengfu Lu, Kuncheng Li (Eds) in *Lecture Notes in Artificial Intelligence*. Springer .2007. (book)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計 4 件)

名称：シナプス成熟障害モデル動物
発明者：白尾智明、児島伸彦、山崎博幸、関野祐子、花村健次
権利者：科学技術振興事業団
種類：特許
番号：特許第 4 5 5 0 5 3 0 号
取得年月日：平成 2 2 年 7 月 1 6 日
国内外の別：国内

名称：樹状突起スパイン移行配列
発明者：山崎博幸、関野祐子、白尾智明
権利者：科学技術振興事業団
種類：特許
番号：第4578149号
取得年月日：平成22年9月3日
国内外の別：国内

名称：ドレブリンA発現抑制動物神経細胞及び非ヒトモデル動物
発明者：白尾智明、佐治真理、関野祐子、小林利佳
権利者：科学技術振興事業団
種類：特許
番号：特許第4568463号
取得年月日：平成22年8月13日
国内外の別：国内

名称：ドレブリンA発現抑制作用を有するアンチセンスオリゴヌクレオチド
発明者：白尾智明、関野祐子、田中聡一
権利者：科学技術振興事業団
種類：特許
番号第4101467号
取得年月日：平成20年3月28日
国内外の別：国内

〔その他〕
ホームページ等
<http://neuro.dept.med.gunma-u.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

白尾 智明 (SHIRAO TOMOAKI)
群馬大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：20171043

(2) 研究分担者

関野 祐子 (SEKINO YUKO)
国立医薬品食品衛生研究所・薬理部・研究員
研究者番号：70138866

安田 浩樹 (YASUDA HIROKI)
群馬大学・大学院医学系研究科・准教授
研究者番号：60294071

(3) 連携研究者
()

研究者番号：