

## 自己評価報告書

平成23年 5月 9日現在

機関番号：82609

研究種目：基盤研究 (B)

研究期間：2008～2011

課題番号：20300135

研究課題名 (和文)

神経活動依存的に発現するプロトカドヘリンのスパイン形成における役割

研究課題名 (英文)

Roles of a neural activity-regulated protocadherin in spine formation

研究代表者

山形 要人 (YAMAGATA KANATO)

財団法人東京都医学研究機構・東京都神経科学総合研究所・副参事研究員

研究者番号：20263262

研究分野：神経科学

科研費の分科・細目：神経科学・神経化学・薬理学

キーワード：樹状突起 スパイン プロトカドヘリン 神経活動

## 1. 研究計画の概要

シナプス可塑性の分子機構を明らかにするため、神経活動によって発現制御される分子をクローニングし、シナプスにおける機能的役割について解析してきた。その中の一つである arcadlin は、神経活動によって誘導される新しいプロトカドヘリンである。その機能的役割として、当初は神経活動によって誘導され、シナプス結合を強化すると考えていたが、「シナプス接着に必要な N-cadherin と結合し、そのエンドサイトーシスを誘導する結果、スパイン数を減少させる」ことを見出した (*Neuron*, 2007)。この知見をさらに発展させるため、以下の計画を実行する。

- |   |
|---|
| <p>(1) Arcadlin によるチャンネル・受容体などのエンドサイトーシス制御の可能性</p> <p>(2) Arcadlin-N-cadherin 複合体のエンドサイトーシスの分子機構</p> <p>(3) Arcadlin 発現制御因子の検討 (特に COX-2 による発現制御)</p> <p>(4) Arcadlin および COX-2 欠損マウスを用いた個体レベルの解析</p> |
|---|

## 2. 研究の進捗状況

- (1) Arcadlin-N-cadherin 複合体とグルタミン酸受容体 (GluR1 と GluR2) との結合について、免疫沈降法により検討し、N-cadherin と GluR1、N-cadherin と GluR2 が結合することを明らかにした。次に、二種類のサブユニットの中で、arcadlin が誘導される条件では GluR1 が細胞表面から減少することをピオチン化実験により明らかにした。
- (2) ポストシナプスにおけるエンドサイトーシスの機構に dynamin-3 が関与している。

Endophilin-3 は、dynamin-3 と結合し、エンドサイトーシスを制御することを既に報告している (*J. Biol. Chem.*, 2004)。さらに、arc が endophilin-3 と結合し、AMPA 受容体のエンドサイトーシスを調節することも知られている。そこで、今年度中に dynamin-3、endophilin-3 あるいは arc が arcadlin-N-cadherin 複合体のエンドサイトーシスに関わるかどうかを RNAi 法を用いて検証する。

(3) COX-2 による arcadlin の発現制御の検証：COX-2 を培養ニューロンに過剰発現させ、arcadlin が誘導され、スパインが減少することがわかった。さらに、COX-2 の特異的阻害薬である NS-398 がカイニン酸によるスパイン減少を抑制することも明らかにした。以上の結果から、「カイニン酸投与→COX-2 誘導→arcadlin 誘導→スパイン減少」という新しい伝達系の存在が示唆された。

(4) 行動学的解析：COX-2 ノックアウトマウスを用いて社会行動実験を行い、社会行動に異常がある可能性を見出した。今年度中に arcadlin KO についても同様の行動異常があるかどうかを検討する。

(5) その他：発達障害と TA02 遺伝子変異 自閉症における TA02 遺伝子のコピー数変異 (*New Engl. J. Med.*, 2008) や点突然変異 (私信) があることが明らかとなってきた。そこで、その病態学的意義を調べるため、初代培養ニューロンに変異 TA02 遺伝子を導入し、ニューロンの形態学的変化の有無を調べた。変異 TA02 を発現したニューロンはほとんどシナプスを作らず、スパインも形成しなかった。さらに、変異 TA02 を HEK293 細胞に発現させ、arcadlin 同種結合による arcadlin-N-cadherin 複合体のエンドサイ

トーシスを調べたが、全く内在化が見られなかった。以上の結果から、TA02 を介する N-cadherin 内在化がシナプス形成に必須であると考えられた。

### 3. 現在までの達成度

②おおむね順調に進展している（今年度中に行う実験もあるが、他はおおむね順調に進んでおり、予想外の結果も得られている）

### 4. 今後の研究の推進方策

(1) おおむね達成されている。

(2) Dynamin-3、endophilin-3 あるいは arc の mRNA に対する siRNA を海馬ニューロンに導入し、膜表面の arcadlin 及び N-cadherin 量を surface labeling によって定量する。ノックダウンされているかどうかは、それぞれの抗体を用いて確認する。さらに、この時のスパイン形態・大きさ・密度を計測し、野生型と比較する。

(3) おおむね達成されている。

(4) COX-2 ノックアウトマウスの社会行動異常を見出しているので、次に arcadlin ノックアウトマウスについても nesting behavior や resident-intruder test などの社会行動実験を行う。

(5) TA02 変異（ノックイン）・ノックアウトマウスを現在作製中である。そのスパイン形態および行動に及ぼす影響を検討する。

### 5. 代表的な研究成果

（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 6 件）

- ① Non-clustered protocadherin. Kim SY, Yasuda S, Tanaka H, Yamagata K, Kim H. **Cell Adh Migr.** 5(2):97-105, 2011. 査読有
- ② p38 MAP kinase inhibitors as potential therapeutic drugs for neural diseases. Yasuda S, Sugiura H, Tanaka H, Takigami S, Yamagata K. **Cent Nerv Syst Agents Med Chem.**, 11(1):45-59, 2011. 査読有
- ③ Endothelial microsomal prostaglandin E synthase-1 facilitates neurotoxicity by elevating astrocytic Ca<sup>2+</sup> levels. Takemiya T, Matsumura K, Sugiura H, Yasuda S, Uematsu S, Akira S, Yamagata K. **Neurochem Int.** 58(4):489-96, 2011. 査読有

- ④ Endothelial microsomal prostaglandin E synthase-1 exacerbates neuronal loss induced by kainate. Takemiya T, Matsumura K, Sugiura H, Maehara M, Yasuda S, Uematsu S, Akira S, Yamagata K. **J Neurosci Res.** 88(2):381-90, 2010. 査読有
- ⑤ Transducing neuronal activity into dendritic spine morphology: new roles for p38 MAP kinase and N-cadherin. Sugiura H, Tanaka H, Yasuda S, Takemiya T, Yamagata K. **Neuroscientist.** 15(1):90-104, 2009. 査読有
- ⑥ Mek3. Yasuda S, Sugiura H, Yamagata K. **UCSD-Nature Molecule Pages** doi:10.1038/mp.a001507.01, 2009. 査読有

〔学会発表〕（計 3 件）

- ① カイニン酸によって生じる樹状突起スパイン減少における p38 MAP キナーゼの役割 安田新、杉浦弘子、田中秀和、竹宮孝子、山形要人 第44回 日本てんかん学会、岡山コンベンションセンター「ママカリフォーラム」(2010-10-14)
- ② Protocadherin arcadlin regulates seizure-induced synaptic loss by activating p38 MAP kinase signaling. Yasuda S, Sugiura H, Tanaka H, Takemiya T, Yamagata K. BIT Life Sciences' 3<sup>rd</sup> Annual Protein and Peptide Conference (Pepcon)-2010, Beijing, People's Republic of China, (2010-03-21)
- ③ The role of two Arcadlin splicing variants in synaptic remodeling. Yasuda S, Sugiura H, Maeno-Hikichi Y, Takemiya T, Tanaka H, Yamagata K. 第31回日本神経科学大会、東京 (2008-07-11)

〔図書〕（計 2 件）

- ① Mek3. Yasuda S, Sugiura H and Yamagata K. **Encyclopedia of Signaling Molecules**, in press. 査読無
- ② Activity-dependent spine remodeling and brain disorders. Takigami S, Yasuda S, Sugiura H, Tanaka H and Yamagata K. in "Dendritic Spines: Biochemistry, Modeling and Properties", pp91-112, Nova science publishers, New York, 2009. 査読無