

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 3 月 31 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総合研究所・脳発達・神経再生研究分野・プロジェクトリーダー
 研究者番号：20263262

研究成果の概要（和文）：Arcadlin は神経活動依存的に脳内で作られる膜蛋白質であり、TAO2-MEK3-p38 MAPK を活性化し、N-cadherin を細胞内移行させることによって興奮性シナプスを減らす。その生理作用、制御機構、ノックアウトマウス、病態との関連について解析した。その結果、1) arcadlin-N-cadherin 複合体は GluR2 と結合し、その内在化を促進すること、2) arcadlin の内在化が endophilin-3 や arc を介すること、3) arcadlin の発現制御に COX-2 が関わること、4) arcadlin ノックアウトマウスに行動異常が見られること、5) TAO2 の遺伝子変異が発達障害を起こす可能性などを見出した。

研究成果の概要（英文）：Arcadlin is an activity-regulated membrane protein that reduces excitatory synaptic number by activating the TAO2-MEK3-p38 MAPK signaling and inducing N-cadherin endocytosis. We have analyzed the physiological and pathological roles, regulatory mechanism, and knockout mice of arcadlin. As a result, we found 1) the arcadlin-N-cadherin complex associates with GluR2 and accelerates its endocytosis, 2) the internalization of arcadlin is mediated by endophilin-3 and arc, 3) arcadlin expression is regulated by COX-2, 4) arcadlin knockout mice show abnormal behavior, and 5) TAO2 mutation may cause developmental disorder.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	3,300,000	990,000	4,290,000
2009 年度	5,000,000	1,500,000	6,500,000
2010 年度	3,200,000	960,000	4,160,000
2011 年度	3,200,000	960,000	4,160,000
年度			
総計	14,700,000	4,410,000	19,110,000

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. 研究開始当初の背景

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、シナプス機能における役割について解析してきた。その一つである 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、

その後の解析から「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ことによりスパイン数を減少させる」ことを見出した（Neuron 56(3):456-71, 2007）。本研究課題では、この知見をさらに発展させる。

2. 研究の目的

(1) Arcadlin による受容体エンドサイト

ーシス制御の可能性

これまでに「神経活動→arcadlin の誘導→細胞外領域の同種結合→TA02/MEK3/p38 MAPK 活性化→arcadlin-N-cadherin 複合体の coendocytosis→スパイン減少」を示してきた。N-cadherin がグルタミン酸受容体 GluR2 と結合するという報告もあることから、グルタミン酸受容体の内在化が arcadlin によって制御されるかどうかを検証する。さらに、神経細胞に長期増強を起こすとスパイン容積が増大するが、arcadlin がそれに関わるかどうかを検討する。

(2) Arcadlin-N-cadherin 複合体のエンドサイトーシスの分子機構

ポストシナプスにおけるエンドサイトーシスの機構については、まだ不明な点が多い。Arcadlin のエンドサイトーシスは dominant negative dynamin によって阻害されることから、クラスリン依存性と考えられる。ポストシナプスの dynamin は、dynamin-3 が最も多い。代表者は、dynamin-3 と結合し、組織分布が酷似している endophilin-3 の解析を行ってきた (J. Biol. Chem. 279(22):23343-8, 2004)。さらに、神経活動依存的に発現する arc が endophilin-3 と結合し、グルタミン酸受容体のエンドサイトーシスを調節すると言った報告もある。そこで、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検討する。

(3) Arcadlin 発現制御因子の検討

COX-2(シクロオキシゲナーゼ 2)は、プロスタグランジン合成系の律速段階酵素である。てんかん発作や一過性脳虚血などによって脳内で誘導され、神経細胞死を促進することなどを報告してきた。一方、COX-2 がスパイン形態も制御するという知見も得ている。また、COX-2 を過剰発現するがん細胞では E-cadherin がダウンレギュレーションされている。そこで、COX-2 を培養ニューロンに過剰発現させ、arcadlin 発現やスパイン形態変化に及ぼす影響を調べる。

また、細胞内領域が長い arcadlin のスプライズバリエーション(arcadlin-L)を見出しており、その選択的スプライズ機構を解析する。

(4) Arcadlin および COX-2 欠損マウスを用いた個体レベルの解析

Arcadlin 及び COX-2 ノックアウトマウスを用いて、行動実験を行い、野生型と比較する。

(5) Arcadlin 情報伝達系の異常と病態

自閉症などの発達障害患者の一部に、TA02

遺伝子のコピー数異常 (New Engl. J. Med. 358(7):667-75, 2008) や点突然変異 (私信) が存在することが分かってきた。その病態学的意義を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) Arcadlin による受容体のエンドサイトーシス制御の可能性: HEK293 細胞に arcadlin/TA02/MEK3/p38 MAPK とグルタミン酸受容体を発現させ、膜蛋白質を沈降後、グルタミン酸受容体に対する抗体を用いてウエスタンブロットを行った。そして、arcadlin 誘導前後での受容体の内在化を比較した。また、長期増強によるスパイン増大における arcadlin の役割を調べるため、培養海馬ニューロンのタイムラプス観察を行った。

(2) Arcadlin-N-cadherin 複合体のエンドサイトーシス機構の解析

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検討した。すなわち、arcadlin/TA02/MEK3/p38 MAPK と endophilin-3 あるいは arc を HEK293 細胞に発現させ、arcadlin の内在化が endophilin-3 や arc によって変化するかどうかをタイムラプス顕微鏡にて観察した。

(3) Arcadlin 制御因子の解析

COX-2 を培養ニューロンに過剰発現させ、arcadlin 発現が変化するかどうかを免疫化学的に検討した。また、COX-2 の特異的阻害薬である NS-398 がスパイン形態変化に及ぼす影響を調べた。

また、一部のイントロンを含んだ arcadlin の mini-gene を構築し、様々なスプライズ因子とともに細胞に発現させ、arcadlin のスプライズ機構を解析した。

(4) Arcadlin と COX-2 遺伝子欠損マウスを用いた個体レベルの解析

一般的な行動実験に加え、i) モリス水迷路、ii) 文脈的恐怖条件付け試験を行った。さらに、社会行動については、iii) ネスト形成、iv) 社会的相互作用を調べた。

(5) Arcadlin 情報伝達系の異常と病態

初代培養ニューロンに TA02 変異遺伝子を導入し、ニューロンの形態変化を調べた。さらに、TA02 遺伝子のノックイン (KI) かつ floxed マウスを作成した。このノックインマウスの脳切片に DiI を遺伝子銃で撃ち込み、海馬の神経細胞を可視化した。

4. 研究成果

(1) Arcadlin による受容体エンドサイトー

ーシス制御の可能性

「神経活動 → arcadlin の誘導 → arcadlin-N-cadherin 複合体の coendocytosis」の結果として生じるシナプス機能の変化を検討するため、本分子複合体が稼働しているシナプスにおける、神経伝達物質受容体の分布変化について検討した。まず、本分子複合体の標的候補であるグルタミン酸受容体 GluR1 と GluR2 について、免疫沈降法によりタンパク質間相互作用を検討した。その結果、N-cadherin と GluR2 の結合が安定して得られた。次に、これらの受容体が、arcadlin が誘導される条件下で特有の挙動 (GluR1: 細胞表面から減少、GluR2: 短鎖型が表面に増加、長鎖型が減少) を示すことを、培養ニューロンのビオチン化実験により明らかにした。

また、arcadlin のスパイン容積増大における役割を検討するため、化学的長期増強 (chemical LTP) を野生型と arcadlin KO ニューロンに起こさせた。四時間後の樹状突起スパインを比較したところ、野生型ではスパイン幅はほとんど変わらなかったのに対し、arcadlin ノックアウトではスパイン幅が拡大していた。この結果から、arcadlin は生理的長期増強においてもスパイン容積を元に戻すように働くと考えられた。

(2) Arcadlin-N-cadherin 複合体の内在化機構の解析

HEK293 細胞に arcadlin/TAO2/MEK3/p38 MAPK と endophilin-3 あるいは arc を発現させ、arcadlin の内在化が endophilin-3 や arc 存在下で変化するかどうかをタイムラプス顕微鏡にて観察した。その結果、arcadlin の内在化は endophilin-3 共発現によってほぼ完全に抑制されることが分かった。これは、endophilin-3 がドーパミン受容体のエンドサイトーシスを抑制するという代表者らの報告 (*J. Biol. Chem.* 279(22):23343-8, 2004) に合致する。また、arc の共発現も arcadlin の内在化を抑制したことから、arcadlin-N-cadherin 複合体の内在化は endophilin-3 や arc によって抑制されていると考えられた。

(3) Arcadlin 制御因子の検討

COX-2 を培養ニューロンに過剰発現させ、arcadlin 発現を調べたところ、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 はカイニン酸によるスパイン退縮を抑制した。以上の結果から、arcadlin の発現誘導は COX-2 による制御を受けていることが明らかになった。

また、arcadlin のスプライシング機構を明らかにするため、まずスプライスアウトさ

れるイントロンを含んだ arcadlin の mini-gene を構築した。次に、arcadlin-L と短いバリエーション arcadlin-S を区別するため、arcadlin-S が出来ないような遺伝子変異を mini-gene に挿入し、HEK293 細胞に発現させたところ、arcadlin-L だけが翻訳されることを確認した。この実験系を用いて、神経細胞の pre-mRNA スプライシングを調節する Sam68、hnRNP A1、Nova1、srsf1-12 など様々な RNA 結合蛋白質の効果調べたが、arcadlin-L を増加させる因子 (srsf1, 3, 5 など) は見つかったものの arcadlin-S を増やす因子は見出せなかった。以上の結果から、脳内の神経細胞では、arcadlin-L を増やすスプライス因子が発現していないか、あるいは活性が低下していると考えられた。

(4) 行動学的解析: COX-2 ノックアウトマウスを用いて行動実験を行い、ネスト形成や母性行動などに異常を見出した。また、arcadlin KO についても同様の行動実験を行い、空間記憶に障害があることを見出した。

(5) Arcadlin 情報伝達系の異常と病態

自閉症患者の TAO2 遺伝子を解析し、TAO2 の触媒領域および調節領域に変異があることを見出した。そこで、最も機能に影響があると予想される変異を TAO2 cDNA に導入し、培養海馬ニューロンに発現させたところ、変異 TAO2 を発現したニューロンはほとんどスパインを形成しなかった。さらに、変異 TAO2 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、内在化は生じなかった。以上の結果から、TAO2 の変異により N-cadherin の内在化が障害され、シナプス形成に異常が出ている可能性が考えられた。

次に、TAO2 ノックインマウスを使って、予備的な行動実験を行ったところ、ネスト形成や社会的相互作用に異常が見られた。さらに、ノックインマウスの脳切片に DiI を撃ち込み、海馬の神経細胞を可視化したところ、ノックインマウスの樹状突起スパインは野生型に比べて成熟が遅れている傾向が見られた。

以上、本研究課題において、arcadlin の生理作用とその分子機構、制御機構、行動実験、そして病態との関連について解析を行った。Arcadlin およびその情報伝達系は、N-cadherin の内在化を介してスパイン形態を制御するが、このような伝達系は他では全く知られていない。そういう意味で、本研究により得られた成果は、世界的にもユニークかつインパクトがあるものと考えられる。また、homeostatic plasticity に関与する遺

伝子産物として arc や homer など知られているが、arcadlin に関する解析が最も進んでいる。さらに、本研究の成果はプロトカドヘリンの新しい機能を示す知見でもあり、情報伝達分子としての役割を付け加えたと言う点で意義深い。

今後は、1) TAO2 異常によって生じる発達障害の病態メカニズム、2) 軸索の形態変化における arcadlin の役割、を中心に分子・細胞・個体レベルの解析を行う予定である。

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 10 件)

- ①過剰興奮によって生じるシナプス減少のメカニズム 安田新、杉浦弘子、山形要人 日本薬理学雑誌、印刷中。 査読無
- ②Non-clustered protocadherin. Kim SY, Yasuda S, Tanaka H, Yamagata K, Kim H. **Cell Adh Migr.** 5(2):97-105, 2011. 査読有
- ③p38 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
- ④Endothelial microsomal prostaglandin E synthase-1 facilitates neurotoxicity by elevating astrocytic Ca²⁺ 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
- ⑤Endothelial 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
- ⑥Transducing 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
- ⑦Mek3. Yasuda S, Sugiura H, Yamagata K. **UCSD-Nature Molecule Pages**

doi:10.1038/mp.a001507.01, 2009. 査読有

⑧Cyclooxygenase-2 plays a critical role in retinal ganglion cell death after transient ischemia: real-time monitoring of RGC survival using Thy-1-EGFP transgenic mice. Sakai Y, Tanaka T, Seki M, Okuyama S, Fukuchi T, Yamagata K, Takei N, Nawa H, Abe H. **Neurosci Res.** 65: 319-25, 2009. 査読有

⑨過剰興奮によって神経細胞内で作られる蛋白質の発見とその細胞障害機構の解明、山形要人、てんかん治療研究振興財団研究年報、20:23-30, 2009. 査読無

⑩ニューロンの過剰興奮後に生じるシナプス減少のメカニズム、田中秀和、安田 新、杉浦弘子、山形要人 実験医学 26:1257-1260, 2008. 査読無

[学会発表] (計 22 件)

- ① TSC 変異モデルにみられる興奮性シナプス形成異常のメカニズム、安田新、杉浦弘子、樋野興夫、山形要人 第 54 回日本神経化学学会大会、山代(2011-9-26)
- ② 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)
- ③ 多発性硬化症における膜型プロスタグランジン E 合成酵素 (mPGES-1) の修飾作用、竹宮孝子、竹内千仙、松本陽、神山邦子、植松 智、審良静男、山形要人、文沢久美子 Neuro2010、神戸コンベンションセンター (2010-09-02)
- ④ 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'rd Annual Protein and Peptide Conference (Pepcon)-2010, Beijing, People's Republic of China, (2010-03-21)
- ⑤ Electron microscopic studies on neuronal dendritic abnormality caused by TSC-2 mutation. Takigami, S. Yasuda, S. Sugiura, H. Yoshimura, Y. Takemiya, T. Yamauchi, T. Hino, O.

Yamagata, K. 第52回日本神経化学学会大会, 群馬, (2009-06-24)

- ⑥ 過剰興奮によって神経細胞内で作られる蛋白質の発見とその細胞障害機構の解明, 山形要人、てんかん治療研究振興財団第20回研究報告会、大阪、(2009-03-08)
- ⑦ てんかん病態におけるプロスタグランジン合成系の役割, 山形要人、第8回研究交流フォーラム、フィオーレ東京、(2009-1-21)
- ⑧ てんかんに伴う学習・記憶障害の分子メカニズム, 山形要人、第31回神経研シンポジウム「てんかん研究・治療 最前線」, 新宿明治安田生命ホール、(2008-10-24)
- ⑨ Endothelial mPGES-1 regulates Ca²⁺-dependent glutamate release from astrocyte via EP3. Takemiya T. Matsumura K. Sugiura H. Yasuda S. Uematsu S. Akira S. Yamagata K. 第51回日本神経化学学会大会, 富山, (2008-09-11)
- ⑩ 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)

①Mek3. Yasuda S, Sugiura H., 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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山形 要人 (YAMAGATA KANATO)
財団法人東京都医学総合研究所・脳発達・
神経再生研究分野・プロジェクトリーダー
研究者番号：20263262

(2) 研究分担者

杉浦 弘子 (SUGIURA HIROKO)
財団法人東京都医学総合研究所・基盤技術
研究センター・基盤技術研究職員
研究者番号：40162870

田中 秀和 (TANAKA HIDEKAZU)
大阪大学・医学系研究科・准教授
研究者番号：70273638

(3) 連携研究者

なし