

平成 22 年 5 月 31 日現在

研究種目：若手研究(B)
 研究期間：2008～2009
 課題番号：20700307
 研究課題名（和文）シナプス形成を調節するテレンセファリン結合分子群の網羅的解析
 研究課題名（英文）Proteomic analysis of telencephalin-binding proteins regulating synapse formation
 研究代表者
 古谷 裕 (Furutani Yutaka)
 独立行政法人理化学研究所・シナプス分子機構研究チーム・研究員
 研究者番号：80392108

研究成果の概要（和文）：終脳神経細胞特異的に発現し、樹状突起フィロポディアに局在する細胞接着分子テレンセファリンと細胞外マトリックスタンパク質ビトロネクチンが特異的に結合する。この結合を利用して、ビトロネクチンコートしたビーズを培養海馬神経細胞に撒き、激しいテレンセファリンの集積を誘導した。この際に、テレンセファリンと共に集まってくる分子をビーズと共に回収し網羅的に同定した。この中には樹状突起フィロポディアに局在する数種類のシグナル分子が含まれていた。

研究成果の概要（英文）：Telencephalin is specifically expressed by spiny neurons within the telencephalon and abundantly localized to dendritic filopodia. We identified an extracellular matrix molecule, vitronectin, as a specific ligand for telencephalin. When vitronectin-coated beads were added to cultured hippocampal neurons, they adhered onto dendrites and strongly induced telencephalin accumulation. Then, we performed proteomic analysis of neuronal complex bound to vitronectin-coated beads. We determined several signaling molecules localized to dendritic filopodia.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|---------|-----------|-----------|-----------|
| 2008 年度 | 2,100,000 | 630,000 | 2,730,000 |
| 2009 年度 | 1,300,000 | 390,000 | 1,690,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,400,000 | 1,020,000 | 4,420,000 |

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：神経科学 ・神経科学一般

キーワード：テレンセファリン、プロテオミクス、樹状突起フィロポディア、スパイン、シナプス形成、細胞接着分子、神経細胞

1. 研究開始当初の背景

テレンセファリンは 1987 年、森憲作によってモノクローナル抗体 271A6 が抗原として認識する分子として発見され(PNAS 84: 3921,

1987)、1994 年に吉原良浩がその構造について発表した(Neuron 12: 541, 1994)。この発表以来、終脳神経細胞の樹状突起特異的に局在する細胞接着分子であることが解り、近年国内外の研究グル

ープがテレンセファリンに注目し研究を進めている。2006年に松野仁美によってテレンセファリンがスパインの前駆体である樹状突起フィロポディア形成を促進することが示された(J. Neurosci. 26: 1776, 2006)。私はテレンセファリン細胞内領域が **Ezrin/Radixin/Moesin(ERM タンパク質)** と結合し、フィロポディアの伸長を制御していることを明らかにした(J. Neurosci. 27: 8866, 2007)。これまでの研究でスパイン形成に関わる接着分子は数多く報告されてきたが(Curr. Opin. Neurobiol. 16: 95, 2006)、樹状突起フィロポディア形成を制御する接着分子はテレンセファリンが初めてであり、これに結合して活性を制御する分子もERMタンパク質が初めての報告である。また、テレンセファリン細胞外領域がプロテアーゼにより切断されることでスパイン形成を促進すると報告された(J. Cell Biol. 178: 687, 2007)。このようにテレンセファリンはフィロポディア形成とスパイン成熟を調節する細胞接着分子であることが明らかになった。

2. 研究の目的

私たちの研究により、樹状突起フィロポディア形成にはテレンセファリンの細胞外領域と細胞内領域の両方が重要であることが分かっている。しかし、これまでにテレンセファリンに結合しフィロポディア形成を制御する分子はERMタンパク質以外に解っていなかった。また、ERMタンパク質の活性はリン酸化と脱リン酸化により制御されているが、樹状突起フィロポディアにおいて活性を制御しているキナーゼとホスファターゼは明らかになっていない。さらに、ERMタンパク質の下流でアクチンの重合と脱重合を制御しているシグナルカスケードも解明されていない。そこで、テレンセファリンによる樹状突起フィロポディア形成の分子機構を詳

細に調べるために、テレンセファリン細胞外領域に結合する分子を明らかにすると共に、テレンセファリン細胞内領域またはERMタンパク質と相互作用し、これらの活性を制御する分子を明らかにすることを第1の目的とした。また、テレンセファリン遺伝子欠損マウスは野生型に比べスパイン成熟が早いことが解っており、一度形成された神経回路をテレンセファリンの働きでリセットし、新たな神経回路を作り直すことが難しいのではないかと予想している。いわば頭の固い柔軟性のない状態になっていると考えている。哺乳類の終脳神経細胞特異的に発現するテレンセファリンは頭の柔軟性を調節し、記憶や情動など高次脳機能の可塑性を保つ重要な分子であるとの仮説のもとに、テレンセファリンの活性と頭の固さや柔軟さとの関係をマウス行動実験により示すことを第2の目的とした。

具体的な目的として、テレンセファリンによる樹状突起フィロポディア形成とスパイン成熟の分子機構を解明するために、

- (1) これまで同定されているERMタンパク質以外にも様々なタンパク質がテレンセファリンの細胞外または細胞内に結合し、フィロポディア形成複合体を形成していると考えられる。この複合体に含まれる分子を質量分析器により同定し、抗体染色により局在を決め、培養海馬神経細胞を用いて機能を解析する。そして、樹状突起フィロポディア形成、維持、またはスパイン成熟のどの段階に関わるか明らかにする。
- (2) ERMタンパク質のリン酸化は樹状突起フィロポディアの先端部分特異的に起きており、フィロポディアの伸縮を制御しているものと考えられる。しかし、フィロポディアにおいてERMタンパク質をリン酸化するキナーゼは明らかになっていない。また、フィロポディアにおけるERMタンパク質のリン酸化はスパインへと成熟するに従い全く観られなくなる。このことから、ERMタンパク質を脱リン酸化するホスファターゼがシナプス形成の調節に重要な働き

を持つものと考えられる。そこで、ERM タンパク質のリン酸化と脱リン酸化を制御するキナーゼとホスファターゼの解析を行い、フィロポディア形成のオンオフを制御している分子を明らかにする。

- (3)ERM タンパク質は Rho-GDP dissociation inhibitor と結合することが報告されており、また、Rho の活性化と密接な関係を持っていることが解っている。また、Rho ファミリー分子である Rho, Cdc42, Rac などがアクチン骨格を持つ突起形成に関わっていることが明らかになっているが、樹状突起フィロポディア形成を司る Rho ファミリー分子は明らかになっていない。そこで、どの Rho ファミリー分子が樹状突起フィロポディアにおけるアクチン重合を制御しているのかを示す。
- (4) (1), (2), (3) より明らかにされた分子よりフィロポディア形成を司るシグナルカスケードを予測する。
- (5) スパイン形成を促進したテレンセファリン遺伝子欠損マウスとフィロポディア形成を促進したトランスジェニックマウスと野生型マウスとの行動解析を行う。これらのマウスにおける樹状突起の形態の違いにより高次脳機能が異なり、頭が固い、柔らかい、程よいなどの行動変化を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) テレンセファリン結合分子の網羅的解析

これまでの研究で、テレンセファリンの細胞外領域に細胞外マトリックスタンパク質であるビトロネクチンが結合することが解っている。ビトロネクチンコートしたマグネットビーズを培養海馬神経細胞に播くと、これらのビーズは主に樹状突起と細胞体に結合する。結合したビーズの周りにはビトロネクチンに結合するようにしてテレンセファリンが集まってきており、さらにテレンセファ

リン結合タンパク質である活性型 ERM タンパク質やこれに結合する PI(4,5)P₂ やアクチンなどが集積していることを確認している。このビーズを磁石で回収し、ビーズに結合していたタンパク質を質量分析器により同定した。

(2) ERMタンパク質のリン酸化と脱リン酸化を制御するキナーゼとホスファターゼの同定

これまでに神経細胞以外の細胞も合わせ ERM タンパク質をリン酸化するキナーゼが6つ報告されている。また、これらのキナーゼ以外に Allen Brain Atlas などのデータベースを検索することにより終脳で発現するキナーゼとホスファターゼを選択する。さらに、(1)で同定された複合体を構成する分子の中にキナーゼまたはホスファターゼが含まれていた場合に候補へ加え、これらの候補がフィロポディア形成の盛んな時期である培養14日目またはスパイン形成の盛んな時期である培養21日目の海馬神経細胞で発現していることを抗体染色により確かめ、樹状突起フィロポディアに局在するか調べた。

(3) 樹状突起フィロポディア形成を制御するRhoファミリー分子の同定

Rho ファミリー分子である Rho, Cdc42, Rac などがアクチン骨格を持つ突起形成に関わっていることが解っているが、樹状突起フィロポディア形成を司る Rho ファミリー分子は明らかになっていない。ビーズの周りにテレンセファリンが集積する際に、ビーズを取り囲む無数の突起が形成される。この突起を形成する分子とフィロポディア形成する分子には相同性があり、どちらにもテレンセファリン、リン酸化 ERM やアクチンや PI(4,5)P₂ が集積してくる。このため、(1)で同定した分子の中から Rho ファミリー分子やその制御分子を選択した。

(4) 樹状突起フィロポディア形成を促進したトランスジェニックマウスの作製

私たちの研究により培養海馬神経細胞において活性化型 ezrin を過剰発現させると樹状突起フィロポディアの形成を促進することが解っている(J.

Neurosci. 27: 8866, 2007)。テレンセファリンプロモーターを利用して終脳神経細胞特異的に活性化型 ezrin を発現させたトランスジェニックマウスを作製した。

(5) マウス樹状突起の形態観察

活性化型 ezrin を発現するトランスジェニックマウスの海馬 CA1 領域において、錐体細胞を DiI でラベルし樹状突起フィロポディアとスパインの形態を明らかにした。

4. 研究成果

(1) テレンセファリン結合分子の網羅的解析

ビトロネクチンコートしたビーズを培養海馬神経細胞に加え、テレンセファリンと共にビーズに集積してきたタンパク質を質量分析器により網羅的に解析した。その結果 315 個のタンパク質を同定した。その中には Arp2 などフィロポディア形成に重要なアクチン結合タンパク質が多数含まれていた。また、アクチンの重合を制御する G タンパク質、ERM タンパク質のリン酸化に関わるキナーゼなどが含まれていた。

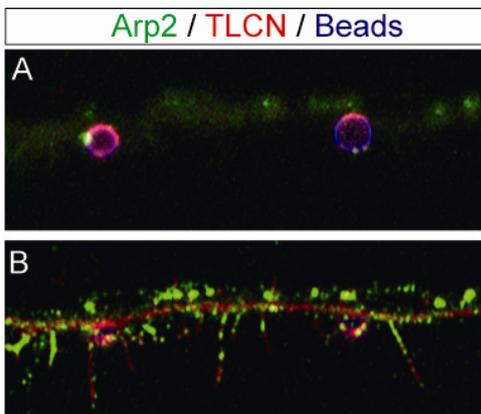


図 1、(A)アクチン骨格形成を制御するタンパク質 Arp2(緑)とテレンセファリン(赤)はビトロネクチンコートビーズ(青)の周りに集積している。(B)Arp2 は樹状突起フィロポディアでテレンセファリンと共局在している。

(2) ERMタンパク質のリン酸化と脱リン酸化

を制御するキナーゼとホスファターゼの同定

テレンセファリン結合タンパク質の網羅的解析により、ROCK1 と MARK α が同定された。以前にこれらのキナーゼは ERM タンパク質をリン酸化することが示されており、培養海馬神経細胞でも ERM タンパク質をリン酸化し銃所突起フィロポディア形成を制御すると考えられた。さらに、MARK α の抗体染色し局在を調べると、このキナーゼは樹状突起でテレンセファリンと共局在しており、テレンセファリンからシグナルを受け取り ERM タンパク質のリン酸化を制御する分子と考えられた。

(3) 樹状突起フィロポディア形成を制御する Rhoファミリー分子の同定

テレンセファリン結合タンパク質の網羅的解析から G α o, G α z, G α z, G β などの G タンパク質や Rho GEF, Rap GEF, Arf GEF など small GTPase の活性調節分子を同定した。これらのタンパク質が G タンパク質の活性化を調節することにより樹状突起フィロポディア形成やスパイン成熟に関わるアクチンの縮重合や膜輸送を調節していることが示唆された。

(4) フィロポディア形成に重要な働きをするシグナルカスケード予測

(1)で同定した分子の中に、CaMKII, IP3 レセプターなどカルシウム濃度を調節し、濃度依存的に活性化を制御するキナーゼが含まれていた。また、フィロポディアが軸索と接触した際に樹状突起にカルシウムの流入が起こることが報告されている。このため、フィロポディア形成や制御にカルシウムシグナルが重要な働きをしていると考えられた。

(5) 樹状突起フィロポディア形成を促進したトランスジェニックマウスの作製

テレンセファリンプロモーターにより活性化型 ezrin を発現させたトランスジェニックマウスを作製した。その結果、活性化型 ezrin が終脳特異的に発現しており、線条体と海馬歯状回、CA2, CA3 に強く発現するライン 1 と海馬歯状回、CA1, CA2, CA3 と大脳皮質に強く発現するライン 2 を得た。ライン 2 のマウスにおいて、生後 7 日目の CA1 錐

体細胞の形態を DiI によりラベルし観察したところ野生型より多くのフィロポディア様の突起が観察された。今後さらに発展させ、樹状突起の形態の違いとマウスの行動との関係を明らかにできる。

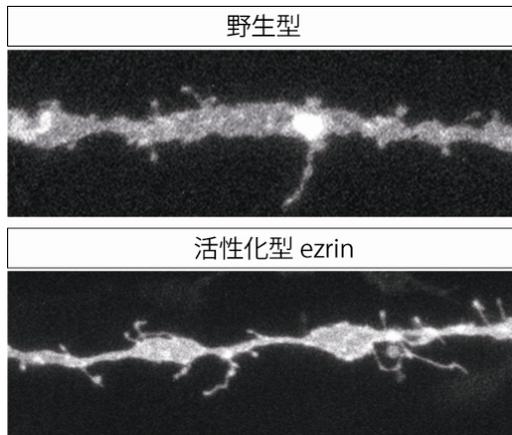


図 2、生後 7 日目の野生型と活性化型 ezrin を発現させたトランスジェニックマウスの海馬 CA1 錐体細胞を DiI ラベルした。活性化型 ezrin を発現させると樹状突起においてフィロポディア様の突起が増加する。

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 3 件)

- (1) C. Shimono, R. Manabe, T. Yamada, S. Fukuda, J. Kawai, Y. Furutani, K. Tsutsui, K. Ikenaka, Y. Hayashizaki, K. Sekiguchi “Identification and Characterization of nCLP2, a Novel C1q Family Protein Expressed in the Central Nervous System”
J. Biochem. 147: 565-579 (2010) 査読あり
- (2) A. Kato, AP Rooney, Y. Furutani, S. Hirose “Evolution of trappin genes in mammals”
BMC Evol Biol. 29:10:31 (2010) 査読あり
- (3) R. Manabe, K. Tsutsui, T. Yamada, M. Kimura, I. Nakano, C. Shimono, N.

Sanzen, Y. Furutani, T. Fukuda, Y. Oguri, K. Shimamoto, D. Kiyozumi, Y. Sato, Y. Sado, H. Senoo, S. Yamashina, S. Fukuda, J. Kawai, N. Sugiura, K. Kimata, Y. Hayashizaki, K. Sekiguchi “Transcriptome-based Systematic Identification of Extracellular Matrix Proteins”
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 105: 12849-12854 (2008) 査読あり

[学会発表] (計 2 件)

- (1) Y. Furutani, M. Kawasaki, H. Matsuno, K. Mori, Y. Yoshihara “Interaction between Telencephalin and Vitronectin Induces Phagocytic Synapses on Neuronal Dendrites”
The 39th Annual Meeting of the Society for Neuroscience, 2009/10/20, Chicago
- (2) Y. Furutani, M. Kawasaki, H. Matsuno, K. Mori, Y. Yoshihara “Phagocytic Synapses on Neurons Induced by Telencephalin-Vitronectin Interaction”
The 32nd Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society, 2009/9/16, Nagoya

6. 研究組織

(1) 研究代表者

古谷 裕 (Furutani Yutaka)

独立行政法人理化学研究所・シナプス分子機構研究チーム・研究員

研究者番号: 80392108