

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 5 月 31 日現在

機関番号：82609

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2011

課題番号：22700405

研究課題名（和文）ホスホリパーゼ A₂ による AMPA 受容体の動態制御機構の解明研究課題名（英文）Regulatory mechanism of AMPA receptor dynamics by phospholipase A₂

研究代表者

平林 哲也（HIRABAYASHI TETSUYA）

財団法人東京都医学総合研究所・生体分子先端研究分野・主席研究員

研究者番号：90345025

研究成果の概要（和文）：

小脳における運動学習と記憶の分子基盤とされる長期抑圧には、プルキンエ細胞に発現する AMPA 型グルタミン酸受容体 GluR2 の細胞内動態の制御が重要である。細胞質型ホスホリパーゼ A₂α を介して生体膜リン脂質から遊離するアラキドン酸による GluR2 動態の制御メカニズムを明らかにするために、ケージド化合物を用いた細胞内アラキドン酸濃度の時空間制御、蛍光標識した GluR2 動態の可視化、およびリン脂質組成の解析を試みた。

研究成果の概要（英文）：

Trafficking of AMPA-type glutamate receptor subunit GluR2 in Purkinje neurons is a key mechanism to modulate long-term depression (LTD) in the cerebellum, which contributes to certain forms of motor learning and coordination. We have shown that full activation of cytosolic phospholipase A₂α and consequent liberation of arachidonic acid from membrane phospholipids are required for the prolonged decrease in the synaptic-surface expression of GluR2. To elucidate the regulatory mechanism of GluR2 dynamics by phospholipase A₂ and arachidonic acid, we attempted spatial and temporal control of local free arachidonic acid liberation using photolysis of caged compounds, visualization of internalized GluR2 movement, and comparative analysis of phospholipid composition.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2011 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：総合領域

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：神経可塑性、アラキドン酸、蛍光イメージング

1. 研究開始当初の背景

小脳における記憶・学習の分子基盤とされる長期抑圧(long-term depression; LTD)は、

神経活動に伴ってプルキンエ細胞のシナプス後膜に発現する AMPA 受容体 GluR2 サブユニットが選択的にエンドサイトーシスされ

ることにより、シナプス伝達効率の低下が長時間持続すると考えられている。我々はプルキンエ細胞に高発現し、大きな細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇とリン酸化シグナルの両方が揃った時にのみ活性化して生体膜リン脂質からアラキドン酸を特異的に遊離させる細胞質型ホスホリパーゼ $A_2\alpha$ (cPLA₂ α) に着目して長年研究を進めてきた。GluR2 のエンドサイトーシスはプロテインキナーゼ $C\alpha$ (PKC α) による Ser880 残基のリン酸化が引き金となるが、コンピューターシミュレーションから考案された従来の仮説では、PKC α → MAP キナーゼ → cPLA₂ α → アラキドン酸 → PKC α というポジティブフィードバック機構が働いて PKC α が長時間活性化され続けることで LTD が持続するというものであった (J. Neurosci. 21:5693, 2001, Neuron 54:787, 2007)。しかしながら、PKC α が一過性にしか活性化しなくても小脳 LTD が起きる (Mol. Cell. Neurosci. 35:38, 2007) ことを別のグループが報告しており、我々の研究においても LTD の誘導の際には、cPLA₂ α の活性化とアラキドン酸産生は数分程度で十分であるという結果を得ていた (J. Cell Sci. 121: 3015-24, 2008)。したがって、従来の持続的な PKC と cPLA₂ α の活性化による LTD の持続というポジティブフィードバック仮説には修正の必要性が生じていた。さらに、本研究の開始時期に、cPLA₂ α 欠損マウスを用いて、in vitro スライス実験における LTD の消失とアラキドン酸投与による回復、ならびに覚醒状態における視機能眼球運動の短期順応が抑制されることが示され (Proc. Nat. Acad. Sci. 107:3198, 2010)、cPLA₂ α とアラキドン酸による小脳 LTD の制御メカニズムの重要性が改めて認識されていた。

2. 研究の目的

ホスホリパーゼ A_2 の活性化を介した脂質代謝のうち、特に遊離アラキドン酸の生成によって AMPA 型グルタミン酸受容体サブユニット GluR2 の細胞内動態が制御される仕組みを明らかにすることを目的とした。そのために、ケージド化合物を用いて神経細胞内局所でのアラキドン酸生成を擬似的に再現し、スパイン表面に発現する GluR2 を標識した後の細胞内動態をリアルタイムで追跡することを目指した。

3. 研究の方法

(1) 小脳プルキンエ細胞の初代培養

生後 0~1 日目の新生仔マウスの小脳由来の細胞をポリリジンコートしたガラス底ディッシュで分散培養し、B-27 と L-グルタミンを添加した Neurobasal-A 培地で 3~4 週間

培養した。プルキンエ細胞の同定には、抗 calbindin D 抗体を用いた。

(2) ケージドアラキドン酸を用いた遊離アラキドン酸生成の制御

東邦大の古田らが開発した光分解性保護基を導入したケージドアラキドン酸を用いて、405 nm パルスレーザーの局所照射により局所で遊離アラキドン酸を生成させることで、細胞内アラキドン酸濃度の時空間制御を行った。細胞内における遊離アラキドン酸生成の評価系として、GFP 融合ジアルシグロリン γ の細胞質から細胞膜への移行を用いた。

(3) GluR2 動態の可視化

シグナル配列と HaloTag を N 末側に融合した GluR2 をシンドビスウイルスもしくはレンチウイルスの発現系を用いて強制発現させた後、細胞膜を透過しない蛍光性リガンドを用いて細胞膜表面に局在する GluR2 のみを標識することで、グルタミン酸やアラキドン酸による刺激後の GluR2 の細胞内局在の経時変化を共焦点顕微鏡およびインキュベータ蛍光顕微鏡により追跡した。

(4) リン脂質組成の解析

組織や細胞から Bligh & Dyer 法により脂質を抽出し、液体クロマトグラフと直結した三連四重極型質量分析装置 (4000QTRAP) を使用して、エレクトロスプレーイオン化質量分析法 (LC/ESI-MS/MS) により、リン脂質組成の網羅的な解析を行った。

4. 研究成果

小脳における運動学習と記憶の分子基盤とされる長期抑圧に重要な AMPA 型グルタミン酸受容体 GluR2 の細胞内動態について、プルキンエ細胞に高発現して大きな細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇と MAP キナーゼを介したリン酸化シグナルによって活性化し、生体膜リン脂質からアラキドン酸を特異的に遊離させる細胞質型ホスホリパーゼ $A_2\alpha$ (cPLA₂ α) が重要である。内在性 GluR2 の抗体染色とアラキドン酸投与実験により、cPLA₂ α の作用によって生じたアラキドン酸がエンドサイトーシス後の GluR2 の細胞内リサイクリングを阻害し、分解経路へと切り替えることにより細胞表面の GluR2 の数が持続的に減少して長期抑圧が持続される可能性が示唆されたので、より直接的にアラキドン酸による GluR2 の細胞内動態が制御される仕組みを検証するために、ケージド化合物を利用した細胞内アラキドン酸濃度の時空間制御と、エンドサイトーシスによる内在化後の GluR2 の細胞内輸送経路と動態の可視化の

実現を中心として研究を進めた。

光分解性保護基であるBhc基でケージングしたアラキドン酸に加えて、新たに3種類の新規ケージドアラキドン酸化合物を用いて、紫外線レーザー照射による遊離アラキドン酸の局所生成をGFP融合ジアシルグリセロール γ の細胞質から細胞膜への移行を指標として検討したところ、そのうちの1種が光分解による良好なアラキドン酸生成能を示すことが分かった。一方、GluR2の可視化については、当初C末側に光活性化を利用できる蛍光タンパク質PA-GFP(A206K)を融合したGluR2を利用することを試みたが、C末側への蛍光タンパク質への付加によりGluR2のエンドサイトーシスおよびその後の細胞内輸送が正常に起こらないことが判明したため計画を変更し、蛍光安定性、蛍光強度、内在性GluR2との挙動の一致を指標として新たなコンストラクトの検討を行った。その結果、シグナル配列とHaloTagをN末側に融合したGluR2を強制発現させ、細胞膜表面に局在するGluR2のみを蛍光リガンドで標識し、その後の細胞内動態をリアルタイム蛍光観察するのが本研究の目的に適していることが示唆された。現在、上記の2つの実験系を組み合わせることにより、プルキンエ細胞内でのアラキドン酸の局所生成を時空間制御した際に、シナプス表面からエンドサイトーシスされた後のGluR2の細胞内動態がどのように変化するかを検討中である。また、cPLA $_2$ α 欠損マウス脳由来のリン脂質組成を解析した結果、リン脂質に占めるホスファチジルコリンの割合には有意な変化は見られなかったが、グルタミン酸および塩化カリウムの投与によって化学的にLTD誘導刺激を行った場合にみられるアラキドン酸遊離は、cPLA $_2$ α 欠損マウスで抑制されることを確認した。

これまでに小脳 LTD に関わる分子メカニズムの解析は国内外で数多くなされており、特に PKC α などの GluR2 のエンドサイトーシスに不可欠なキナーゼ群などをはじめとしたシグナル伝達経路やこの受容体サブユニットのシナプスへの局在を制御する相互作用分子群の同定はこれまでに大きな進歩がみられたが、シナプス膜上の GluR2 がエンドサイトーシスされた後の持続的減少を実現する分子メカニズムは諸説が提唱されているものの、その検証や証明は未だ不十分である。本研究のように脂質代謝による GluR2 の動態制御という視点で小脳 LTD の基本メカニズムに迫ろうとする試みはまだ少なく、細胞内における人工的な遊離アラキドン酸生成の時空間制御という試みはアラキドン酸の関与する生体反応機序の解明に非常に有用であり、神経科学の研究手法として新

たな分野を切り開くだけでなく、炎症やアレルギーなど神経以外の研究分野への応用も可能であり、脂質研究の分野におけるインパクトは大きいと予想される。また従来、小脳の主な働きは運動の記憶・学習・制御と考えられてきたが、最近の研究では小脳は知覚情報の統合や情動の制御にも重要であること明らかになってきている。統合失調症患者では脳のアラキドン酸含量が著しく減少して PLA $_2$ 活性の異常が見られることが報告されており、PLA $_2$ による神経可塑性の制御メカニズムを解明することにより将来的に統合失調などの神経疾患の予防治療に新しい方策を提供することとなれば、社会に対する貢献も期待される。

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 Nakahigashi K, Doi H, Otsuka A, Hirabayashi T, Murakami M, Urade Y, Tanizaki H, Egawa G, Miyachi Y, Kabashima K. PGD $_2$ induces eotaxin-3 via PPAR γ from sebocytes: A possible pathogenesis of eosinophilic pustular folliculitis. *J Allergy Clin Immunol.* 129:536-543, 2012, 査読有、DOI:10.1016/j.jaci.2011.11.034
- ② Murakami M, Taketomi Y, Miki Y, Sato H, Hirabayashi T, Yamamoto K. Recent progress in phospholipase A $_2$ research: from cells to animals to humans. *Prog Lipid Res.* 50:152-92, 2011, 査読有、DOI:10.1016/j.plipres.2010.12.001
- ③ Ueno N, Taketomi Y, Yamamoto K, Hirabayashi T, Kamei D, Kita Y, Shimizu T, Shinzawa K, Tsujimoto Y, Ikeda K, Taguchi R, Murakami M. Analysis of two major intracellular phospholipase A $_2$ s in mast cells reveals crucial contribution of cPLA $_2$ α , not iPLA $_2$ β , to lipid mobilization in proximal mast cells and distal fibroblasts. *J Biol Chem.* 286: 37249-63, 2011, 査読有、DOI:10.1074/jbc.M111.290312

[学会発表] (計 1 件)

- ① 平林哲也、横山浩平、堀山正雄、島村透、片桐千仞、村上 誠、脂肪滴形成における脂質代謝酵素 PNPLA5 の機能解析、日本生化学会大会第 84 回年会、2011.9.24、京都

〔図書〕（計 1 件）

- ① 村上誠、佐藤弘泰、平林哲也、山本圭、
武富芳隆「ホスホリパーゼ A₂ の生理的・
病理的役割」実験医学 28 (20), 114-125,
2010

6. 研究組織

(1) 研究代表者

平林 哲也 (HIRABAYASHI TETSUYA)
財団法人東京都医学総合研究所・生体分子
先端研究分野・主席研究員
研究者番号：90345025

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし