

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 3 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2011～2015

課題番号：23240053

研究課題名(和文) シナプス可塑性を支える新しいAMPA受容体輸送制御機構の解明

研究課題名(英文) Molecular mechanisms underlying AMPA receptor trafficking during synaptic plasticity

研究代表者

柚崎 通介 (Yuzaki, Michisuke)

慶應義塾大学・医学部・教授

研究者番号：40365226

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 31,400,000円

研究成果の概要(和文)：シナプス伝達の長期抑圧(LTD)現象は記憶・学習の基礎過程であり、シナプス後膜におけるAMPA受容体の減少によって起きる。LTDは、1)AMPA受容体を足場分子から外す、2)AMPA受容体をエンドサイトーシスする、の2つの過程からなる。これまで後者の過程を担う機構はよく分かっていなかった。また小脳LTDになぜデルタ2型グルタミン酸受容体(GluD2)が必要なのかも謎であった。今回の研究により、GluD2はAMPA受容体の足場タンパク質からの外れやすさを調節することが判明した。また神経活動に応じてエンドサイトーシスに必要な分子AP-2が集積しAMPA受容体と結合することが分かった。

研究成果の概要(英文)：It is believed that long-term depression (LTD) is mediated by AMPA receptor endocytosis at the postsynaptic site. During LTD, AMPA receptors are first liberated from their anchoring proteins at the postsynaptic site, diffuse to the perisynaptic site, where endocytosis takes place. However how AMPA receptors are selectively endocytosed remained largely unclear. In addition, it has been a mystery why the delta2 glutamate receptor (GluD2) is crucial for induction of cerebellar LTD. In this study, we found that GluD2 determined whether anchoring proteins were dissociated from AMPA receptors. In addition, we found how clathrin adaptor protein AP-2, an essential molecule for clathrin-dependent endocytosis, accumulated at the perisynaptic site and recognized the AMPA receptor complex during LTD.

研究分野：神経生物学

キーワード：グルタミン酸受容体 エンドサイトーシス 小脳 シナプス可塑性 プルキンエ細胞 LTD AMPA受容体  
マウス

### 1. 研究開始当初の背景

シナプス伝達の長期増強と長期抑圧(LTD)現象は記憶・学習の基礎過程であると考えられている。これらの現象の実体は、主にシナプス後膜における AMPA 型グルタミン酸受容体 (AMPA 受容体) の数の増減であると考えられている。従って AMPA 受容体選択的輸送機構の解明は神経科学における最重要課題の一つとなっている。

運動に関与する記憶には小脳平行線維—プルキンエ細胞シナプスにおける LTD が重要な働きを果たす。AMPA 受容体 GluA2 サブユニットは、足場タンパク質である GRIP によってシナプス後膜に安定化している。神経活動が亢進して GluA2 の細胞内ドメインのセリン残基 (S880) がプロテインキナーゼ C (PKC) によってリン酸化されると、GluA2 は GRIP から解離し、AMPA 受容体はクラスリン依存的にエンドサイトーシスされて LTD が起きると考えられている (Matsuda ら EMBO J, '00; Chung ら Science, '03)。一方、LTD には 1) 足場分子から外す過程、と 2) エンドサイトーシスを実行する 2 つの過程がある。しかし、従来のモデルでは前者の過程しか説明できず、後者の過程—AMPA 受容体がどのように神経活動亢進に応じて選択的にエンドサイトーシスされるのか—はよく分かっていない。興味深いことに δ2 型グルタミン酸受容体 (GluD2) 欠損マウスの小脳においては、神経活動を亢進させると GluA2 がリン酸化され GRIP から解離するが、AMPA 受容体はエンドサイトーシスされず LTD が起きない (Kondo ら Eur J Neurosci, '05)。すなわち GluD2 による細胞内シグナリング経路の理解が小脳 LTD の分子機構解明の鍵を握っていると考えられた。

シナプス前膜においては、神経活動の亢進に応じてシナプス小胞がクラスリン依存性エンドサイトーシスによって選択的に取り込まれる。この時に細胞内 Ca 濃度の上昇によってホスファチジルイノシトールビスリン酸 (PIP2) の合成酵素である PIP5K の脱リン酸化が起きることがきっかけとなることが分かってきた (Nakano-Kobayashi ら EMBO J, '07)。そこで同様の機構が LTD 誘導時においてもシナプス後膜で起きている可能性があると考えられた。

### 2. 研究の目的

本研究では、(1) LTD 誘導時における GluD2 による細胞内シグナリングを解明する、(2) シナプス後膜におけるエンドサイトーシス実行分子の制御機構を解明する、という 2 つのアプローチにより、小脳・海馬を含めた新しい統合的な LTD の分子機構モデルの確立を目指した

### 3. 研究の方法

(1) GluD2 を介した AMPA 受容体エンドサイトーシス制御機構の解明

GluD2 の細胞内ドメインが LTD 誘導に必須であることが既に分かっていることを利用し、この部位に結合する細胞内タンパク質を同定し、どのように AMPA 受容体エンドサイトーシスを制御するのかを明らかにする。また GluD2 の細胞外ドメインに結合する Cbln1 や D-Ser がどのようにこのシグナリング経路を駆動するのかを解明する。

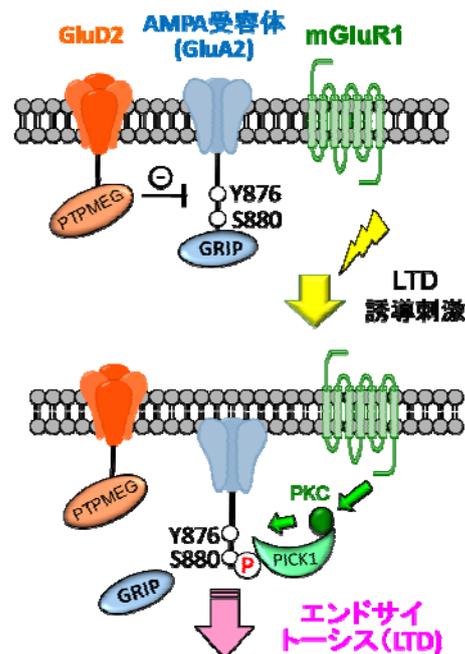
### (2) AMPA 受容体エンドサイトーシス実行経路の制御機構の解明

シナプス前膜における神経活動依存性エンドサイトーシス活性化経路に関する近年の知見を参考にして、シナプス後膜において、①PIP5K の活性がどのように制御されるか、②クラスリンアダプター分子 AP-2 がどのようにして活性化した AMPA 受容体を認識するのかに焦点を当てて解明する。

### 4. 研究成果

#### (1) GluD2 を介した AMPA 受容体エンドサイトーシス制御機構

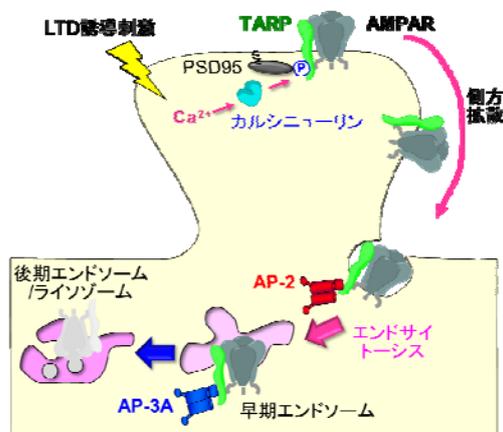
GluA2 の S880 の近傍にはチロシンキナーゼによってリン酸化される部位 (Y876) が存在する。Y876 がリン酸化されていると S880 におけるリン酸化が阻害されることを見出した。GluD2 の細胞内ドメインにはチロシン脱リン酸化酵素 (PTPMEG) が結合することにより、GluA2 の Y876 のリン酸化を阻害する。逆に GluD2 欠損マウスでは GluA2 の Y876 リン酸化が亢進するために LTD 刺激によっても S880 リン酸化が起きず AMPA 受容体エンドサイトーシスが起きない。このように GluD2 は PTPMEG を介して LTD の起きやすさを調節することを解明し (下図; PNAS '13)、長年の謎であった小脳 LTD における GluD2 受容体の役割が初めて明らかになった。



GluD2 はチロシン脱リン酸化を介して LTD の「起き易さ」を制御する

(2)AMPA 受容体エンドサイトーシス実行経路の制御機構の解明

シナプス後部においても、細胞内 Ca 上昇に引き続いてカルシニューリンが PIP5K を脱リン酸化することによって活性化されて PIP2 が合成され、クラスリン依存的エンドサイトーシスに必須な AP-2 を局所的に集積させることを明らかにした (*Neuron* '12)。一方、カルシニューリンは AMPA 受容体副サブユニット TARP の脱リン酸化も引き起こし、その細胞内ドメインに AP-2 が結合することによって AMPA 受容体がエンドサイトーシス経路の積み荷として特異的に認識されることを解明した (下図; *Nature Commun* '13)。このように LTD におけるエンドサイトーシス実行過程の一端を遂に明らかにすることに成功した。



AMPA 受容体のエンドサイトーシスは TARP の脱リン酸化によって担われる

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 26 件中 19 件) 全て査読有

- ① Andrew R. Gallimore, A. Radu Aricescu, Michisuke Yuzaki, Radu Calinescu (2016). A Computational model of the GluA2-Y876/GluA2-S880 master switch for cerebellar long-term depression. **PLoS Comput Biol.** 12: e1004664 Published online. doi:10.1371/journal.pcbi.1004664.
- ② Wataru Kakegawa, Nikolaus Mitakidis, Eriko Miura, Manabu Abe, Keiko Matsuda, Yukari Hayashi-Takeo, Kazuhisa Kohda, Junko Motohashi, Akiyo Takahashi, Soichi Nagao, Shin-ichi Muramatsu, Masahiko Watanabe, Kenji Sakimura, Radu Aricescu, Michisuke Yuzaki (2015) Anterograde C1q11 signaling is required in order to determine and maintain a single-winner climbing fiber in the mouse cerebellum. **Neuron.** 85, 316-329. doi:10.1016
- ③ Kohtarou Konno, Keiko Matsuda, Chihiro

Nakamoto, Motokazu Uchigashima, Taisuke Miyazaki, Miwako Yamasaki, Kenji Sakimura, Michisuke Yuzaki, Masahiko Watanabe (2014) Enriched Expression of GluD1 in Higher Brain Regions and Its Involvement in Parallel Fiber-Interneuron Synapse Formation in the Cerebellum. **J. Neurosci.** 34, 7412-7424. doi: 10.1523/jneurosci.0628-14.2014.

- ④ Aya Ito-Ishida, Shigeo Okabe, Michisuke Yuzaki (2014) The role of Cbln1 on Purkinje cell synapse formation. **Neurosci Res.** 83, 64-68. doi: 10.1016/j.neures.2014.01.009.
- ⑤ Aya Ito-Ishida, Wataru Kakegawa, Kazuhisa Kohda, Shigeo Okabe, Michisuke Yuzaki (2014) Cbln1 down-regulates the formation and function of inhibitory synapses in mouse cerebellar Purkinje cells. **Eur. J. Neurosci.** 8, 1268-80 doi: 10.1111/ejn.12487.
- ⑥ Kyoichi Emi, Wataru Kakegawa, Eriko Miura, Aya Ito-Ishida, Kazuhisa Kohda, Michisuke Yuzaki (2013) Reevaluation of the role of parallel fiber synapses in delay eyeblink conditioning in mice using Cbln1 as a tool. **Front. Neural Circuits.** Published online. doi: 10.3389/fncir.2013.00180.
- ⑦ Kazuhisa Kohda, Wataru Kakegawa, Michisuke Yuzaki (2013) Unlocking the secrets of the  $\delta 2$  glutamate receptor: a gatekeeper for synaptic plasticity in the cerebellum. **Commun. Integr. Biol.** 6, Published online. doi: 10.4161/cib.26466.
- ⑧ L. Benjamin Hills, Amira Masri, Kotaro Konno, Wataru Kakegawa, Anh-Thu N. Lam, Elizabeth Lim-Melia, Nandini Chandy, R. Sean Hill, Jennifer N. Partlow, Muna Al-Saffar, Ramzi Nasir, Joan M. Stoler, A. James Barkovich, Masahiko Watanabe, Michisuke Yuzaki, Ganeshwaran H. Mochida (2013) Deletions in GRID2 lead to a recessive syndrome of cerebellar ataxia and tonic upgaze in humans. **Neurology.** 81, 1378-86. doi: 10.1212
- ⑨ Shinji Matsuda, Wataru Kakegawa, Toshihiro Nomura, Kazuhisa Kohda, Michisuke Yuzaki (2013) Stargazin regulates AMPA receptor trafficking through adaptor protein complexes during long-term depression. **Nature Commun.** 4, Published online. doi: 10.1038
- ⑩ Kazuhisa Kohda, Wataru Kakegawa, Shinji

- Matsuda, Tadashi Yamamoto, Hisashi Hirano, Michisuke Yuzaki (2013) The  $\delta 2$  glutamate receptor gates long-term depression by coordinating interactions between two AMPA receptor phosphorylation sites. **Proc Natl. Acad. Sci. USA.** 110, 948-957. doi: 10.1073
- ⑪ Michisuke Yuzaki (2012) Cerebellar LTD vs. motor learning—lessons learned from studying GluD2. **Neural Networks.** 47, 36-41. doi:10.1016
- ⑫ Aya Ito-Ishida, Taisuke Miyazaki, Eriko Miura, Keiko Matsuda, Masahiko Watanabe, Michisuke Yuzaki\*, Shigeo Okabe\* (2012) Presynaptically released Cbln1 induces dynamic axonal structural changes by interacting with GluD2 during cerebellar synapse formation. **Neuron.** 76, 549-564. (\*co-corresponding author). doi: 10.1016/
- ⑬ Jun Nishiyama, Yukari Hayashi, Toshihiro Nomura, Eriko Miura, Wataru Kakegawa, Michisuke Yuzaki (2012) Selective and regulated gene expression in murine Purkinje cells by in utero electroporation. **Eur. J. Neurosci.** 36, 2867-2876. doi: 10.1111
- ⑭ Toshihiro Nomura, Wataru Kakegawa, Shinji Matsuda, Kazuhisa Kohda, Jun Nishiyama, Takao Takahashi, Michisuke Yuzaki (2012) Cerebellar long-term depression requires dephosphorylation of TARP in Purkinje cells. **Eur. J. Neurosci.** 35, 402-410. doi: 10.1111
- ⑮ Takamitsu Unoki, Shinji Matsuda, Wataru Kakegawa, Ngo Thai Bich Van, Kazuhisa Kohda, Atsushi Suzuki, Yuji Funakoshi, Hiroshi Hasegawa, Michisuke Yuzaki\* and Yasunori Kanaho (2012) NMDA receptor-mediated PIP5K activation to produce PI(4,5)P2 is essential for AMPA receptor endocytosis during LTD. **Neuron.** 73, 135-148. doi:10.1016 (\*co-corresponding author)
- ⑯ Wataru Kakegawa, Yurika Miyoshi, Kenji Hamase, Shinji Matsuda, Keiko Matsuda, Kazuhisa Kohda, Kyoichi Emi, Junko Motohashi, Ryuichi Konno, Kiyoshi Zaitu, Michisuke Yuzaki (2011) D-Serine regulates cerebellar LTD and motor coordination through the  $\delta 2$  glutamate receptor. **Nature Neurosci.** 14, 603-611. doi: 10.1038
- ⑰ Michisuke Yuzaki (2011) Cbln1 and its family proteins in synapse formation and maintenance. **Curr. Opin. Neurobiol.** 21, 215-220. doi: 10.1016
- ⑱ Keiko Matsuda and Michisuke Yuzaki (2011) Cbln family proteins promote synapse formation by regulating distinct neurexin signaling pathways in various brain regions. **Eur. J. Neurosci.** 33, 1447-1461. doi: 10.1111
- ⑲ Kyoichi Emi, Kazuhisa Kohda, Wataru Kakegawa, Sakae Narumi, Michisuke Yuzaki (2011) A New Rapid Protocol for Eyeblink Conditioning to Assess Cerebellar Motor Learning. **Neurochem. Res.** 36, 1314-1322. doi: 10.1007
- [学会発表] (計 38 件中 25 件)
- ① 松田恵子、Timotheus Budisantoso、渡辺雅彦、崎村健司、柚崎通介. 苔状線維が放出する C1q タンパク質による苔状線維 - CA3 シナプス機能の制御 Feed-forward modulation of hippocampal mossy fiber-CA3 synaptic functions by C1q proteins, 第 93 回日本生理学会大会、フランス神経科学学会合同シンポジウム、2016 年 3 月 23 日、札幌コンベンションセンター (北海道札幌市)
- ② Michisuke Yuzaki. The C1q complement family synaptic organizers: complementary or essential?, Departmental Seminar Series, 2015 年 10 月 16 日, Northwestern University エバンストン (アメリカ)
- ③ Michisuke Yuzaki. The C1q complement family: unique functional and morphological regulators of synapses in the CNS, 7th MCCA-Asia meeting in China 2015 年 9 月 20 日, 上海 (中国)
- ④ 松田恵子、柚崎通介. 補体ファミリー分子による海馬 CA3 シナプス構築制御 Synaptic organization at CA3-mossy fiber synapse through novel C1q related molecules, 第 38 回日本神経科学大会 シンポジウム, 2015 年 7 月 30 日, 神戸国際会議場 神戸国際展示場 (兵庫県神戸市)
- ⑤ 掛川渉、柚崎通介. C1q ファミリー分子を介する新規シナプス競合・成熟化機構の解明 A novel mechanism underlying synaptic competition and maturation through C1q-family proteins, 第 38 回日本神経科学大会 シンポジウム, 2015 年 7 月 29 日, 神戸国際会議場 神戸国際展示場 (兵庫県神戸市)
- ⑥ 鈴木邦道、柚崎通介. 新規の人工的シナ

- プス接続分子 Cerebellin-Pentraxin (CPTX) を用いたシナプス形成および可塑性の制御 Modulation of synapse formation and plasticity by a novel artificial synapse connector, Cerebellin-Pentraxin (CPTX), 第 38 回日本神経科学大会 (国際学会), 2015 年 7 月 28 日神戸国際会議場 神戸国際展示場 (兵庫県神戸市)
- ⑦ Michisuke Yuzaki. The C1q complement family serve as essential synaptic organizers in the CNS, Department of Clinical Neurosciences Seminar Series, 2015 年 7 月 6 日, ケンブリッジ大学 ケンブリッジ (イギリス)
- ⑧ 掛川渉、柚崎通介. 補体 C1q ファミリー分子による小脳 プルキンエ細胞グルタミン酸シナプスの形成機能制御, 第 91 回日本生理学会大会, 2014 年 3 月 16 日, 鹿児島大学 (鹿児島県鹿児島市)
- ⑨ 松田信爾、柚崎通介. 分子の言葉で脳機能を語る—新しい分子生物学的アプローチ: Optogenetic control of synaptic plasticity by regulation of AMPA receptor endocytosis, 第 36 回日本分子生物学会年会, 2013 年 12 月 3 日~2013 年 12 月 6 日, 神戸国際会議場 (兵庫県神戸市)
- ⑩ Michisuke Yuzaki. The C1q complement family synaptic organizers: complementary or essential?, Cold Spring Harbor Asia Conferences, 2013 年 10 月 21 日~2013 年 10 月 25 日, Suzhou (China)
- ⑪ Michisuke Yuzaki. The complement family complements synapses: old but new synaptic organizers in the central nervous System, International Society for Neurochemistry, The 24th Biennial Meeting, 2013 年 08 月 23 日~2013 年 8 月 30 日, Cancun (メキシコ)
- ⑫ Michisuke Yuzaki. The ins and outs of GluD2: a regulator of synapse formation and functional plasticity, Gordon Research Conference on Cerebellum, 2013 年 8 月 11 日~2013 年 8 月 16 日, New Hampshire (USA)
- ⑬ Michisuke Yuzaki. The C1q complement family complements synapses: old but new synaptic organizers in the CNS, US-Japan Meeting on Synaptic Plasticity, 2013 年 7 月 17 日~2013 年 7 月 21 日, Seattle (USA)
- ⑭ 松田信爾、柚崎通介. 光による神経細胞機能制御: シナプス可塑性の制御技術の開発, 第 36 回日本神経科学大会, 2013 年 6 月 20 日~2013 年 6 月 23 日, 国立京都国際会館 (京都府京都市)
- ⑮ 松田恵子、柚崎通介. 次世代の担い手たちが創る神経科学の新しい潮流, 第 36 回日本神経科学大会, 2013 年 6 月 20 日~2013 年 6 月 23 日, 国立京都国際会館 (京都府京都市)
- ⑯ Michisuke Yuzaki. The C1q complement family synaptic organizers: complementary or essential?, Gordon Research Conference on Excitatory Synapses and Brain Function, 2013 年 6 月 9 日~2013 年 6 月 14 日, Les Diablerets (スイス)
- ⑰ 柚崎通介. シナプスの機能と形態はどのように制御されるのか?—小脳をモデルとして, 第 35 回日本神経科学大会, 2012 年 9 月 18 日~2012 年 9 月 21 日, 名古屋国際会議場 (愛知県名古屋市)
- ⑱ Michisuke Yuzaki. The C1 complement family complements ECM: old but new functional and morphological synaptic organizers., FENS ECM symposium, 2012 年 7 月 12 日~2012 年 7 月 13 日, Barcelona (スペイン)
- ⑲ Michisuke Yuzaki. Cbln1 and its family proteins; unique functional and morphological regulators of synapses, International Graduate School of Neuroscience (IGSN), 2012 年 4 月 26 日~2012 年 4 月 27 日, Bochum (ドイツ)
- ⑳ Michisuke Yuzaki. The ins and outs of GluD2 - How does GluD2 signal in Purkinje cells?, DRA symposium on Receptor Structure and Function, 2012 年 4 月 25 日, Copenhagen (デンマーク)
- ㉑ Michisuke Yuzaki. C1q family proteins—unique functional and morphological regulators of synapses, The 3rd European Synapse Meeting, 2011 年 10 月 13 日, Balatonfüred (ハンガリー)
- ㉒ Michisuke Yuzaki. Not an orphan anymore—GluD2 found two partners, Cbln and D-Ser, OXION seminar series, 2011 年 10 月 7 日, University of Oxford, Oxford (イギリス)
- ㉓ Michisuke Yuzaki. The ins and outs of GluD2 — Why and how Purkinje cells use the special glutamate receptor, The 4th International Symposium, Society for Research on the Cerebellum, 2011 年 9 月 18 日, 東京大学山上会館 (東京都文京区)

- ②④ Michisuke Yuzaki. Cbln1 and its family proteins in synapse formation and maintenance, In: Symposium on “Emerging synapse organizers in hippocampal neural circuits,” The 34<sup>th</sup> Annual Meeting of JNS, 2011年9月15日,パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)
- ②⑤ Michisuke Yuzaki. The delta glutamate receptors (GluD)—Yet another receptor for D-serine, International Symposium on the Function and dysfunction of D-amino acids in the central nervous system, 2011年9月11日, 東京医科歯科大学脳統合機能研究センター(東京都文京区)

[図書] (計 6件)

- ① Kazuhiisa Kohda, Wataru Kakegawa, Michisuke Yuzaki. Long-term depression at parallel fiber-Purkinje cell synapses. In: Essentials of Cerebellum and Cerebellar Disorders (Eds., Gruol, D.L., Koibuchi, N., Manto, M., Molinari, M., Schmahmann, J.D., Shen, Y), Springer, 2016.
- ② 掛川渉、松田恵子、柚崎通介. 補体 C1q ファミリー分子とシナプス形成・維持. In: Annual Review 神経 2016 (Eds., 鈴木則宏, 祖父江元, 荒木信夫, 宇川義一), 中外医学社, 2016, 276 pgs (35-50)
- ③ Shinji Matsuda, Michisuke Yuzaki. AP-4. In: Encyclopedia of Signaling Molecules (Eds. Choi, Sangdun), Springer, 2013, 2030pgs (124-128.)
- ④ Keiko Matsuda, Michisuke Yuzaki. Cbln1. In: Encyclopedia of Signaling Molecules (Eds. Choi, Sangdun), Springer, 2013, 2030pgs (257-260)
- ⑤ Kazuhida Kohda, Michisuke Yuzaki. Delta receptors. In: Encyclopedia of Signaling Molecules (Eds. Choi, Sangdun), Springer, 2013, 2030pgs (514-518)
- ⑥ 養老孟司、内山安男、柚崎通介. 南江堂, ブレインブック THE BRAIN BOOK みえる脳, (2012) 256 pgs(108-241)

[産業財産権]

- 出願状況 (計 0 件)  
○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

<http://www.yuzaki-lab.org/>

6. 研究組織

- (1)研究代表者  
柚崎 通介 (YUZAKI MICHISUKE)  
慶應義塾大学・医学部・教授  
研究者番号：40365226
- (2)研究分担者  
幸田 和久 (KOHDA KAZUHISA)  
慶應義塾大学・医学部・准教授  
研究者番号：40334388
- 掛川 渉 (KAKEGAWA WATARU)  
慶應義塾大学・医学部・専任講師  
研究者番号：70383718
- (3)連携研究者  
なし