様　式　C－19、F－19、Z－19　(共通)

科研費
KAKENHI

# 科学研究費助成事業　　研究成果報告書

平成 26 年　 6 月　 4 日現在

機関番号：８２４０１
研究種目：基盤研究(C)
研究期間：2011～2013
課題番号：２３５００４７２

研究課題名（和文）受容体トラフィッキングのキネティック解析によるシナプス可塑性分子機構の解明

研究課題名（英文）Elucidation of molecular mechanism of synaptic plasticity by kinetic analysis of receptor trafficking

研究代表者
山口　和彦（Yamaguchi, Kazuhiko）

独立行政法人理化学研究所・脳科学総合研究センター・研究員

研究者番号：００１９１２２１

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　3,900,000円、（間接経費）　　1,170,000円

研究成果の概要（和文）：運動学習の基礎となる小脳プルキンエ細胞シナプスの長期抑圧の分子機構として、定量的な検証が全くなかった。本研究では受容体の安定化プールサイズ、受容体エンドサイトーシス反応速度を測定し、受容体の細胞内リサイクリングプールがLTDの際、減少することを発見した。グルタミン酸受容体に蛍光蛋白質のタグをつけ、画像解析したところ、受容体がLTDに際し、樹状突起スパイン内からシャフト部へ移動することが観察された。

研究成果の概要（英文）：Long-term depression (LTD) of synaptic transmission provides a mechanism of motor leaning, and as a mechanism of LTD, destabilization and consequent elimination of glutamate receptor (GluR) via endocytosis has been proposed, however, no quantitative examination has been performed. Here, stable pool size of GluR and its destabilization upon LTD was quantified, and rate constant of endocytosis of GluR was measured and compared between before and after LTD-induction. Then, I developed a mathematical model of GluR trafficking upon LTD, which predicts partial loss of recycling internal pool of GluR. Image analysis of GluR, tagged by fluorescent protein, indicated translocation of internal GluR from the spine to the dendritic shaft upon LTD, which is consistent with the prediction by the mathematical model of GluR trafficking in cerebellar Purkinje cell.

研究分野：複合領域

科研費の分科・細目：脳神経科学　　神経・筋肉生理学

キーワード：小脳　運動学習　シナプス可塑性　長期抑圧　グルタミン酸受容体　エキソサイトーシス　エンドサイトーシス　数理モデル

１．研究開始当初の背景

(1)小脳における運動学習：小脳は運動学習の中心的役割を果たしていると考えられる。小脳皮質の唯一の出力細胞であるプルキンエ細胞には感覚情報および運動指令コピ-を伝える平行線維と運動の誤りを伝える登上線維がシナプス結合を作り、登上線維の伝えるエラーシグナルと同時期に興奮した平行線維シナプスの伝達効率が長期に抑圧される（長期抑圧 LTD）ことが運動記憶の基礎メカニズムと考えられてきた。近年、LTD の分子機構として、登上線維、平行線維の同時反復刺激により Ca イオンが大量に細胞内に流入し、C 型蛋白質リン酸化酵素（PKC）を活性化し、これにより AMPA 受容体の一つの構成蛋白質 GluA2 の C 末がリン酸化され、それまで結合していた足場蛋白質から遊離し、シナプス膜から脱安定化され自由に拡散するようになり、エンドサイトーシスにより細胞内に内在化されシナプスより除去される、という仮説が有力視されていた。しかし、通常何%の AMPA 受容体が安定化されてシナプス膜に存在するのか？登上線維+平行線維同時刺激で何%の受容体が脱安定化されるか、といった定量的な検証は全く行われていなかった。

(2)大脳における記憶学習においてもシナプス膜での AMPA 受容体密度の増加がシナプス伝達の長期増強 LTP をひき起こし、この増加にはエキソサイトーシスが関与していることが知られていた。さらに受容体は通常からエキソサイトーシスによる表在化とエンドサイトーシスによる内在化によるリサイクリングが行われており、このバランスがエキソサイトーシスに偏ることで長期増強 LTP が生じ、エンドサイトーシスに偏ることで長期抑圧 LTD が生じるとの仮説も提出されていた。しかし、この受容体のエキソ／エンドサイトーシスによるトラフィッキングの速度を正確に測定した報告はなかった。

２．研究の目的

(1)小脳プルキンエ細胞の平行線維シナプスにおける長期抑圧 LTD の分子機構の定量的解明：　従来の研究では遺伝子操作により、ある蛋白質の遺伝子をノックアウトした結果、記憶や学習ができなくなることを指標に分子メカニズムが考察されてきたが、多数の蛋白質が候補となり、全体を統合してシステムとして理解するアプローチがなされていなかったので、小脳プルキンエ細胞平行線維シナプスにおいて何%が安定化しているか、通常の受容体エンドサイトーシスおよびエキソサイトーシス、また安定化と脱安定化の速度定数はどのくらいか、をまず測定し通常時の AMPA 受容体のトラフィッキングの定量的記述を行う。次いで LTD を生じさせた後、これらのパラメータのどの部分が実際変化したか、計測し、実験データに依拠した数理モデルを構築し、LTD の全容の解明を目指す。

(2)シナプス可塑性に伴う AMPA 受容体動態の画像解析：シナプス可塑性発現時に AMPA 受容体が細胞内でどのような動態を示すが、特に分布に変化が見られるか、画像解析する。まずは通常状態での AMPA 受容体の細胞表面の分布と細胞内分布を培養したプルキンエ細胞を用いて画像解析し、さらに LTD 発現前後での受容体の分布変化を明らかにする。そして生きた細胞において、実際に蛍光ラベルした受容体が、刺激により LTD を生じる際にどのような動態を示すかを画像解析し、数理モデルでの解析と合わせ、LTD の分子機構の包括的解明を目的とする。

３．研究の方法

(1)生理学的方法：麻酔した若い成熟ラット（生後 3 週）より小脳を摘出し、低温下で切片を作製する。顕微鏡下で全細胞パッチクランプ法により、30℃前後でシナプス電流の記録を行う。プルキンエ細胞の細胞体より、パッチクランプ法によりシナプス電流を記録する。シナプス電流は平行線維領域を電気刺

激することにより生じさせる。抑制性シナプスは阻害剤により阻害しておく。単離された興奮性シナプス電流は AMPA 受容体を介した電流である。プルキンエ細胞における受容体エキソ/エンドサイトーシスを測定するために、それぞれの阻害剤を細胞外から、あるいは細胞内から投与した。また光分解することによって初めて効果を生じるケージ化阻害ペプチドを開発し、これを用いて正確に受容体エンドサイトーシスの速度定数を求める。これらの結果を総合して数理モデルを構築し、実験データをフィットすることで、AMPA 受容体の安定化シナプスプール、可移動性シナプスプール、可移動性内在性プールのサイズを求め、LTD 誘導によるパラメータの変化を定量的に検討する。

(2)画像解析法：プルキンエ細胞における AMPA 型グルタミン酸の動態を画像解析するためには培養細胞系を用いる。麻酔下で取り出した妊娠 19-20 日のラット胎児の小脳を酵素で単離しガラス底の培養皿で、37℃、5% 炭酸ガスの雰囲気の中で 3 週間以上培養する。表在化した AMPA 受容体は、AMPA 受容体サブタイプ分子 GluA2 の N 末を認識するモノクローナル抗体を用いて検出する。一方細胞内に分布する AMPA 受容体は、細胞を固定後、膜を透過化した後、GluA2/3 の C 末を認識する抗体を用いて 2 次蛍光抗体を用い、検出する。蛍光抗体法には共焦点顕微鏡を用いる。生きた細胞での GluA2 分子の動態観察のため、まず緑色蛍光蛋白質 GFP をレンチウイルスベクターを用いて培養プルキンエ細胞に発現させる。3 週間培養した後、赤色蛍光蛋白質 mCherry でタグを付けた GluA2 をシンドビスウイルスベクターを用いてプルキンエ細胞に発現させる。2 重に蛍光蛋白質を発現したプルキンエ細胞を共焦点顕微鏡下で選択し、化学刺激を与えた時の GluA2 の動態、樹状突起スパインの形状等をタイムラプス法により継時的に画像記録する。この GluA2 動態に対する PKC 阻害剤、蛋白質分解酵素阻害剤等の効果を解析する。

**４．研究成果**

(1)シナプスにおける通常時の AMPA 受容体の動態：得られた実験結果は以下のモデルに基づいて定量解析した（図 1）。まず通常時のシナプス膜における AMPA 受容体数は興奮性シナプス電流 EPSC の大きさに比例すると考え、これを 100%とした。パッチ電極内にエキソサイトーシス阻害剤であるテタヌストキシンを入れ細胞内投与することで受容体エキソサイトーシスを完全に阻害した。

Fig.1

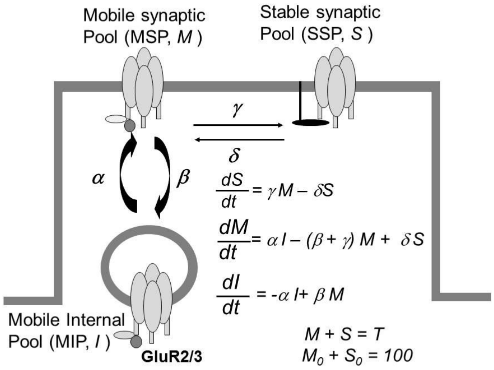


図 1. 小脳プルキンエ細胞平行線維シナプスにおける AMPA 受容体トラフィッキングの定量的モデル

残った EPSC は大変ゆっくりと減少したが、これは通常時の受容体脱安定化と考え脱安定化速度定数$\delta$を求めた（$\delta$: 0.0048 min$^{-1}$）。また実験地をフィットすることで受容体シナプス安定化プールの大きさを求めた（56%）。従って残りのシナプス受容体 44%は可移動性シナプスプールに属し、テタヌストキシンの作用下で内在化されたものと考えられた。エンドサイトーシス阻害剤投与下ではテタヌストキシンによる EPSC 振幅減少は阻害されたことから、側方拡散の寄与は極めて少ないと考えられた。次に受容体エンドサイトーシスの速度定数を正確に測定す

るため、GluA2 のエキソサイトーシスによるシナプス膜挿入を阻害するペプチドをケージ化したものを記録用ピペットより細胞内投与し、充分拡散させた後（15-20 分後)、紫外線照射により光分解させアンケージング後の急激な EPSC 振幅減少から受容体エンドサイトーシスの速度定数を求めた（$\beta$: 0.8 $min^{-1}$)。一方、受容体エンドサイトーシスを阻害した時にはエキソサイトーシスを介した受容体の増加により、EPSC 振幅が増加する現象が観察された。受容体エンドサイトーシスの阻害には、ダイナミンの膜透過性阻害剤であるダイナソール、細胞内投与したダイナミンの阻害ペプチド pepD15, そして AP2 のGluA2　C末端への結合を阻害するペプチド、pepAP2 を用いた。いずれの阻害剤も EPSC 振幅を徐々に増加させ、最大値はいずれの場合でも約 165%であった。EPSC 振幅上昇の時間経過は途中までは指数関数でフィットできたがリミターで上限は直線的に制限されていた。上昇の時間経過のフィッティングから受容体の細胞内プールの大きさは 70%と推定された。

(2)シナプス長期抑圧 LTD に伴う受容体トラフィッキング動力学の変化。テタヌストキシン投与後、充分時間がたった時点ではシナプスに残っている殆どの AMPA 受容体は安定化プールに属している。この時、LTD 誘導刺激により LTD を誘導することができた。脱安定化速度定数$\delta$が 5 分間の刺激の間、23 倍に増加していると仮定すると実験データをよく説明できた。しかし、数理モデルにおいて、テタヌストキシンなしの状態で$\delta$が 5 分間、23 倍に増加しても正常の LTD（30%減少）の半分以下の大きさの減少しか再現できず、他に$\beta$の増加、あるいは$\alpha$の減少、あるいは $I$ の減少が必要となり、可能性を検討した。LTD が生じた後、ケージ化阻害ペプチドを光分解したところ、$\beta$に変化は見られなかった。また、LTD 誘導後、ダイナソールを投与し EPSC 振幅を増大させた結果、120%にしか増大しなかった。この「ダイナソールによる EPSC 振幅の増大」の減少は、$\alpha$の減少では説明できず、$I$ の減少による全リサイクリング受容体プールの 47%の減少によってのみ、説明できた。この現象は同時に LTD 自体を定量的に説明した。

(3)LTD に伴う AMPA 受容体動態の画像解析. 培養プルキンエにおける AMPA 受容体のシナプス表面発現を、構成要素である GluA2 サブタイプの N 末を認識する抗体を用いて調べたところ、化学刺激により GluA2 表面発現のプンクタを持つ樹状突起スパイン数は 60%に減少した。また、細胞内 GluA2/3 の C 末を示す蛍光強度は減少し、スパイン内の AMPA 受容体プールが減少していることが示された。ウイルスベクターを用いて発現させた mCherry でタグされた GluA2 が、生きたプルキンエ細胞内でどのような動態を示すかを共焦点顕微鏡でタイムラプス観察した。その結果、化学刺激（高 K+グルタミン酸）により GluA2 はスパインからシャフト部へ、10-15 分の時間経過で移動した。この時、スパインの形状、密度に変化は見られなかった。この結果は生理実験の解釈、および数理モデルによる予測、の両者とよく一致した。またタンパク質分解酵素阻害剤は化学的 LTD の際の細胞内 GluA2 プールの減少を阻害しなかった。このことから、分解ではなく、移動が生じたと結論された。この研究により、予想外の全く新しいシナプス可塑性のメカニズムが発見された。この発見により、可塑性を制御する薬物療法への道が開ける可能性があり、運動障害後のリハビリテーションの促進薬などの探索やシナプス可塑性障害による学習障害などの治療薬の探索に展望を与える。

## 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）**

①Ito M, Yamaguchi K, Nagao S, Yamazaki T. Long-term depression as a model of cerebellar plasticity. Progress in Brain Research in press (2014)

②Kaneko M. Yamaguchi K, Eiraku M, Sato M, Takata N, Kiyohara Y, Mishina M, Hirase H, Hashikawa T, Kengaku M. Remodeling of monoplanar Purkinje cell dendrites during cerebellar circuit formation. PLoS One 6(5): e20108. Epub 2011 May 31.
doi: 10.1371/journal.pone.0020108.

③Yamashita N, Mosinger B, Roy A, Miyazaki M, Ugajin K, Nakamura F, Sasaki Y, Yamaguchi K, Kolattukudy P, Goshima Y. CRMP5 (Collapsin Response Mediator Protein 5) regulates dendritic development and synaptic plasticity in the cerebellar Purkinje cell. J. Neurosci. 31: 1773-1779, 2011.
doi: 10.1523/JNEUROSCI.5337-10.2011.

**[学会発表]（計 12 件）**

1. **山口和彦　小脳プルキンエ細胞長期抑圧で内在化した AMPA 受容体の細胞内分布　第 91 回日本生理学会大会　鹿児島** 3.17 (2014)

2. Yamaguchi K. Nitric oxide dependent change in AMPA receptor trafficking in Purkinje cell analysed using a kinetic model of receptor trafficking the 37th Congress of the International Union of Physiological Sciences (IUPS 2013) Birmingham UK 7.23 (2013)

3. **山口和彦、永雄総一　小脳平行線維-プルキンエ細胞間シナプスにおける AMPA 受容体トラフィッキングに対する側方拡散の寄与　第 90 回日本生理学会大会　東京** 3.28 (2013)

4. **山口和彦、永雄総一　小脳平行線維プルキンエ細胞間シナプス長期増強における** AMPA **受容体トラフィッキングのキネティック解析　第 35 回日本神経科学大会　名古屋** 9.21 （2012）

5. Yamaguchi, K. Nagao, S. Change in trafficking kinetics of AMPA-receptor underlying LTD revealed by photolysis of caged inhibitory peptide in cerebellar Purkinje cell 8th Federation of European Neuroscience Forum of Neuroscience Barcelona Spain 7.16 (2012)

6. **山口和彦，永雄総一　ケージ化阻害ペプチドを用いた受容体トラフィッキングのキネティック解析により解明された小脳** LTD **における** AMPA **受容体エキソサイトーシスの抑制　第 89 回日本生理学会大会　松本** 3.31 (2012)

7. Yamaguchi, K., Nagao, S. An analysis based on a data-driven kinetic model of receptor-trafficking in cerebellar Purkinje cell predicts insufficiency of receptor-destabilization as a mechanism of LTD. The 11th Japan-Korea-China Joint Workshop on Neurobiology and Neuroinformatics Okinawa 12.18 （2011）

8. Yamaguchi K and Nagao S. Multi-site modulation of AMPA-receptor trafficking during cerebellar LTD. 4th International Symposium of the Society for Research on the Cerebellum Tokyo 9.18 (2011)

9. Morimura N, Yasuda H, Yamada K, Tomioka N, Katayama K, Yamaguchi K, Ota M, Kamiya A, Aruga J. Lrfn2/SALM1 regulates excitatory synapse function in the hippocampus and its

deficient mice display mental disorder-like behavioral abnormalities. Symposium: Emerging synapse organizers in hippocampal neural circuits 34th Ann. Meeting of Jpn Neurosci. Soc. Yokohama 9.15 (2011)

10. **山口和彦、達　吉郎、永雄総一　AMP 型受容体エクソサイトーシスの活動依存性抑圧の平行線維－プルキンエ細胞間シナプスにおける長期抑圧発現への関与．　第 34 回日本神経科学大会　横浜**　9.15　(2011)

11. Yamaguchi.K, Tatsu Y, Nagao S. Ito M. Activity-dependent Change in AMPA-receptor trafficking investigated by photolysis of a caged inhibitory peptide in cerebellar Purkinje cell. 8th IBRO World Congress of Neurosci. Florence Italy, 7.16 (2011)

12. **山口和彦、達　吉郎、永雄総一．　小脳プルキンエ細胞における構成性および活動依存性 AMPA 受容体トラフィッキングのデータ駆動性キネティックモデル　第 88 回日本生理学会大会 横浜**　3.28　(2011)

## ６．研究組織

**(1)研究代表者**

**山口　和彦**　(YAMAGUCHI, Kazuhiko)

**独立行政法人理化学研究所・脳科学総合研究センター・研究員**

**研究者番号：**00191221