

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 10 日現在

機関番号：33303

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24700348

研究課題名(和文) イノシトールリン脂質 PIP2 のシナプス構造可塑性への影響

研究課題名(英文) Elucidation of the effect of PIP2 on the synaptic plasticity

研究代表者

上田 善文 (UEDA, Yoshibumi)

金沢医科大学・医学部・特定助教

研究者番号：60391877

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000 円、(間接経費) 1,020,000 円

研究成果の概要(和文)：シナプスは外からの入力に応じてそのサイズや形態を変えるために、神経回路ネットワークに柔軟性を与え、記憶、学習に貢献する。ホスファチジルイノシトール3,4,5-三リン酸(PIP3)は、記憶のモデルとなるシナプス可塑性および樹状突起の育成に重要であることは知られていたが、シナプスに対する影響は、ほぼ明らかにされていなかった。私は、神経回路が維持されている海馬スライスおよび2光子顕微鏡を用いて、PIP3がスパイン(シナプス後膜)の上に生成するフィロポディア様突起の形成を制御することが明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Synapses change its morphology and size in response to outputs out of a brain, and therefore provide flexibility to neuronal network in brain. Phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate (PIP3) plays important roles in neuronal functions such as dendritic arborization and synapse plasticity. It has been unknown how PIP3 work for synapses. In the present study, I found that PIP3 regulates spinule formation in a single dendritic spine during long-term potentiation.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：脳神経科学、神経科学一般

キーワード：神経科学 脳神経 脂質 FRET 蛍光寿命 シナプス可塑性

## 1. 研究開始当初の背景

神経回路網において、シナプスは、記憶、学習の根底をなす最小素子と考えられている。故に、シナプスの振る舞いを明らかにすることは、記憶、学習を理解するうえで重要である。スパインは  $1\mu\text{m}^3$  以下の微細な構造ではあるが、入力に応じてサイズを多様に変化させる。また、大きなスパインは、より神経細胞同士のシグナルを伝えやすくするなど、スパインのサイズと機能には密接な関係がある(Nature,429:761-6 (2004))。

近年、二光子顕微鏡およびグルタミン酸 uncaging 法の開発により、一つのスパインに刺激を与え、スパインの大きさを変えることが可能となった(シナプス構造可塑性)(Nature,429:761-6 (2004))。この結果、Actin、CaMKII や Ras などのシグナル伝達のプレーヤーが、その制御を行っていることを当時、所属していた研究室を含めた多くの研究室が明らかにしつつある(Nat neurosci.10:1104-12 (2004), Curr Opin Neurobiol.2:313-21(2011))。一方で、代謝型グルタミン酸受容体の直下に位置する PIP2、ホスファチジルイノシトール 3,4,5 トリン酸(PIP3)などのイノシトールリン脂質代謝系においては、その代謝酵素の異常によって、精神遅滞を伴う病気を引き起こし、スパイン形態、サイズに異常を引き起こす(Neuron 50:37-388(2006))。特に PIP2 は、コフィリン、プロフィリン、ピンキュリンなどのアクチン重合を制御するほとんどのたんぱく質と結合する(Physiol Rev.90:259-89 (2010))。よって、PIP2 の増減がシナプスのサイズに影響を与えていることは推測できるが、実際、生理的条件下およびスパインのサイズの変化に伴い、PIP2 がどの程度変化し、それがどの程度構造可塑性に影響を与えるのか全く分かっていない。

## 2. 研究の目的

シナプスのサイズはアクチンの重合、分解によって制御されているが、ホスファチジルイノシトール 4,5 トリン酸(PIP2) は、アクチンの重合、分解に関わるほとんどのタンパク質に結合するためシナプスサイズの制御に必須であると考えられるものの未だ検証されていない。そこで、本研究では、棘突起(スパイン)における PIP2 動態の可視化技術、および、PIP2 の量をコントロールする技術を駆使して、PIP2 のシナプスの構造可塑性への影響を探っていくことを目的とした。

そこで、本研究では、PIP2 プローブ、二光子顕微鏡グルタミン酸 uncaging 法、および局所的 PIP2 除去技術を用い、以下の点を明らかにしていく。

(1) 単一スパインにおける PIP2 の動態観察

スパインに構造可塑性を引き起こした際、PIP2 がいつ、どのように変化するかを調べる。さらに変化した PIP2 がスパインだけで

なく、樹状突起上で、どのように変化するかを調べる。

(2) PIP2 が構造可塑性を制御するメカニズムの解明

コフィリン、WASP、プロフィリン、アクチニンなどのタンパク質は、アクチンの重合、分解、形態の制御などの機能を持っている。これらのタンパク質は PIP2 と結合することが知られている。PIP2 が、どのタンパク質を介して構造可塑性を誘導するのかを検証した。

## 3. 研究の方法

申請者は、蛍光寿命を基にした PIP3 の新規蛍光プローブを開発し(図 1)、海馬スライス CA1 錐体細胞において PIP3 の動態をスパインレベルで明らかにした(PIP3 regulates spinule formation in dendritic spines during structural long-term potentiation. (J Neurosci. 2013 Jul 3;33(27):1104-7)。申請者のプローブ分子の特徴は、脂質結合ドメインを変えることにより、その他の脂質分子に応用可能であることである。そこで、本研究では、PIP2 プローブを作製し神経細胞内での PIP2 動態を明らかにする。

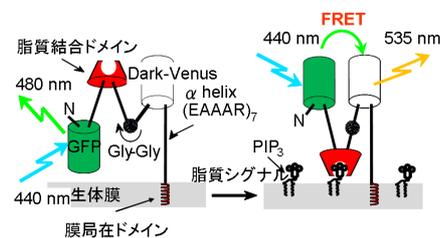


図1) 緑色蛍光タンパク質(GFP)、蛍光を発しないYFP(Dark-YFP)をプローブ分子に導入する。脂質分子を選択的に認識する部位として、脂質結合ドメイン(LBD, lipid binding domain)を導入する。CFP-LBD-YFP間を剛直な、 $\alpha$ ヘリックスで連結し、このヘリックスにGly-Glyを1箇所導入し、ここを起点にプローブ分子が回転できるようにした。膜局在ドメインを用いて膜に連結する。細胞膜内で脂質分子が産生されると脂質結合ドメインに結合し、GFP、Dark-YFP間の距離及び相対的配向の変化によってFRETが変化する。この際、GFPの蛍光寿命が変化するため、これより脂質の量を定量する。

## 4. 研究成果

作製した PIP2 プローブを、海馬スライス CA1 錐体細胞に遺伝子銃によって発現させた。PIP3 プローブの場合は、PIP3 が樹状突起に比べて、スパインにより多く蓄積していたが、PIP2 プローブでは、スパインだけでなく、樹状突起にも PIP2 が存在していることが明らかとなった(図 2)。さらに、グルタミン酸 uncaging 法を用いて、単一スパインにシナプス構造可塑性を誘導すると、PIP2 の量に変化はなかった。シナプス構造可塑性誘導時に、減少する PIP3 とは異なった挙動を示すことがわかった。PIP2 は、PIP3 に対して 100-1000 倍豊富に存在し、PIP3 の変化量は PIP2 には影響がないと考えられる。今後、PIP2 がシナプス構造可塑性に影響を与えるかを 2 つの手法を用いて調べる。一つ目は、PH ドメインの過剰発現の系。二つ目は、ラパマイシンシステムを用いた PIP2 除去の系である。一つ目は、PIP2 に選択的に結合する

PH ドメインを細胞内に過剰発現する。この PH ドメインによって PIP<sub>2</sub> はマスクされると期待される。過去に、PIP<sub>3</sub> をマスクする PH ドメインを過剰発現した神経細胞において、機能的な可塑性が抑えられることが知られている。この状態でスパインに刺激を加えた際に、シナプス構造可塑性に影響がどうかを検証する。

二つ目の手法として、近年、光刺激によって局所的に PIP<sub>2</sub> を消去する方法が可能となった (J.AM.CHEM.SOC.133:12-14(2011))。FK506 binding protein (FKBP) を PIP<sub>2</sub> 代謝酵素 (Inp54p) と連結し、一方で、FKBP-rapamycin binding domain (FRB) を細胞膜に結合させる。光刺激によって、Caged-rapamycin から rapamycin をスパインに産生させる。FKBP および FRB は rapamycin 存在下で結合するために、FKBP-Inp54p が細胞膜に集まり、PIP<sub>2</sub> を消去する。この手法を用いて、PIP<sub>2</sub> を消去した際に、シナプス構造可塑性に変化があるかを検証する予定である。

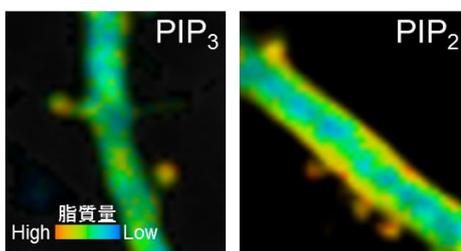


図2. PIP<sub>3</sub> および PIP<sub>2</sub> の FLIM プローブを海馬スライス CA1 細胞に発現させたときの FLIM イメージ。両者ともスパインが赤く、脂質が局在していることを示している。PIP<sub>2</sub> では、スパインのみならず樹上突起にも多量に存在することが確認できる。

また、過去 4 年間行ってきた研究を PIP<sub>3</sub> regulates spinule formation in dendritic spines during structural long-term potentiation. (J Neurosci. 2013 Jul 3;33(27):1104-7) として報告した。内容は、以下のものである。PIP<sub>3</sub> FLIM プローブ、FLIMPA3 を海馬スライス CA1 錐体細胞に、遺伝子銃を用いて遺伝子を導入した。遺伝子導入後 24 時間後、2 光子顕微鏡下で、PIP<sub>3</sub> の動態を観察すると、PIP<sub>3</sub> が、スパインに局在していることがわかった。PIP<sub>3</sub> は、PI3K によって産生され、PTEN によって、脱リン酸化される。以前の報告で、PI3K は、神経細胞全体に局在しているが、活性化型 PI3K は、専らスパインに局在している AMPA 受容体と結合することによって、活性化型受容体となる。つまり、PIP<sub>3</sub> の産生は、専らスパインで起きていることを意味している。次に、PTEN の局在も過去に調べられていて、スパインよりもむしろ樹状突起に局在している

ことが明らかとなっている。これらの知見および今回、私たちが行った PIP<sub>3</sub> の産生酵素および代謝酵素の阻害剤を用いた実験から、PIP<sub>3</sub> がスパインに局在しているのは、これらの酵素の局在によって起きるものであることがわかった。グルタミン酸をスパインに与え、構造可塑性を誘導すると、初めから存在した PIP<sub>3</sub> が速やかに消去されることがわかった。阻害剤を用いた実験結果より、この反応は、スパインのサイズの変化に伴う、PIP<sub>3</sub> の濃度が低い樹状突起からの膜の流入によって、PIP<sub>3</sub> 濃度が薄まった結果であることがわかった。Subspine イメージングを行うと、spinule に PIP<sub>3</sub> が蓄積していることがわかった。さらに、PIP<sub>3</sub> の蓄積がより多い spinule の方が、より長い時間 spinule を形成していることがわかった (図 6)。Spinule は、グルタミン酸刺激、電気的な神経刺激によって、産生することが知られており、シナプスの前膜と新たなシナプス結合を構築することによって、神経回路ネットワークの再構築に貢献していることが知られている。本研究では、spinule の形成、維持に PIP<sub>3</sub> がその場で働いていることを、直径 1 μm のスパイン imaging を基に明らかにしたという点が革新的である。

また、同時に、この論文で用いた PIP<sub>3</sub> 蛍光寿命プローブ分子を始めとした蛍光プローブの総説を Application of FRET probes in the analysis of neuronal plasticity. (Front Neural Circuits. 2013 Oct 10;7:163.) として報告した。

さらに、PIP<sub>3</sub> と同様に脂質セカンドメッセンジャーとして、細胞の分化、増殖、膜輸送などに関与しているジアシルグリセロール (DAG) についての論文も Sphingomyelin regulates the transbilayer movement of diacylglycerol in the plasma membrane of Madin-Darby canine kidney cells. FASEB J., Vol.27, No.8, 3284-3297 (2013.) として報告した。内容については、DAG は、親水性部分が小さいシンプルな脂質である。よって、細胞膜における、膜間移項 (フリップフロップ) が数分以内に速やかに起きることが、リポソーム膜を使った実験で報告されていた。一方、生体膜では不明な点が多く、今回、私たちは、MDCK 細胞を用いて、DAG のフリップフロップが、生体膜では容易に起きず、同じく細胞膜に 5% ほど存在するスフィンゴミエリンの量に依存することがわかった。細胞膜でフリップフロップが、阻害されていることが明らかになったために、細胞膜の外層と内層において、DAG の分布が異なることが期待された。そこで、細胞膜外層の DAG の存在を調べてみると、細胞膜の細胞質側に比べて、多量の DAG が確認できた。これは、細胞膜の非対称性を利用した DAG によるシグナル伝達が存在する可能性を示しており、細胞膜非対称性の生理的意味の 1 つを明らかにしたものである。また、細胞外物質に常に曝され

ている消化組織などでスフィンゴミエリンの量が減ると、DAGの透過率が上がってがんを誘導する可能性がある。今後、スフィンゴミエリンをターゲットにした抗がん剤の開発につながる可能性が期待できる。

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)

Ueda Y, Kwok S. and Hayashi Y.  
Application of FRET probes in the analysis of neuronal plasticity.  
Front. Neural. Circuits, Vol.7, No.163, 1-19  
(2013). Review. (査読有)

Ueda Y\*. and Hayashi Y.  
(\*Corresponding author)  
PIP3 Regulates Spinule Formation in Dendritic Spines during Structural Long-Term Potentiation.  
J. Neurosci., Vol.33, No.27, 11040-7 (2013).  
(査読有)

Ueda Y, Makino A, Murase-Tamada K, Sakai S, Inaba T, Hullin-Matsuda F, Kobayashi T.  
Sphingomyelin regulates the transbilayer movement of diacylglycerol in the plasma membrane of Madin-Darby canine kidney cells.  
FASEB J., Vol.27, No.8, 3284-3297 (2013).  
(査読有)

[学会発表](計1件)

The 36<sup>th</sup>, Japan neuroscience meeting (ポスター発表) (京都:京都国際会議センター)  
2013年6月20-23日  
Ueda Y. and Hayashi Y.  
ホスファチジルイノシトール 3,4,5-3リン酸は、構造可塑性誘導時に、スパイン上のspinuleの形成を制御する

[図書](計1件)

Multifaceted probing  
Yoshibumi Ueda  
International innovation,  
Issue 120, 90-92 (2013). Review

[その他]

プレスリリース  
上田善文客員研究員、牧野麻美特別研究員、酒井祥太客員研究員、稲葉岳彦基礎科学特別研究員、ウラン-松田フランソワーズ客員研究員、小林俊秀主任研究員  
細胞膜の外層・内層の非対称性が生理活性脂質「DAG」の移動を制御  
- スフィンゴミエリンをターゲットにした

抗がん剤の開発に期待 -  
2013年6月6日  
独立行政法人理化学研究所

6. 研究組織

上田 善文 (UEDA, Yoshibumi)  
金沢医科大学・医学部・特定助教  
研究者番号: 60391877