

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 2 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25830017

研究課題名(和文) シナプス機能及び記憶、学習過程におけるARF6の役割

研究課題名(英文) A role for ADP Ribosylation Factor 6 signaling in synaptic plasticity and motor learning

研究代表者

星子 麻記 (HOSHIKO, Maki)

大阪大学・生命機能研究科・招聘研究員

研究者番号：90645483

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：記憶、学習を支える分子メカニズムを解明するため、小脳におけるシナプス可塑性及びシナプス形態形成においてARF6が果たす役割を明らかにすることを目的とした。また、ARF6を介する分子経路の解明をおこなった。その結果、ARF6が小脳シナプス可塑性に関与していること、さらにプルキンエ細胞の形態形成を制御していることが明らかになった。さらに、ARF6には想定された下流分子候補であるPIP5Kを介さない分子経路が存在していることが分かった。また、候補分子の作用を検証するための小脳の培養系を確立することも出来た。

研究成果の概要(英文)：We examined a role for ARF6 in the synaptic plasticity and motor learning in the cerebellum. We found that ARF6 is involved in the synaptic plasticity in the cerebellum and controls the morphology of Purkinje cells. In addition, PIP5K is not involved in the ARF6 molecular pathway. Finally, we established the cerebellar culture systems for examining the effect of a candidate molecule.

研究分野：神経生理学

キーワード：シナプス 小脳 生理学 低分子量Gタンパク質

1. 研究開始当初の背景

超高齢社会を迎え、認知症や多くの精神・神経疾患患者数が増加の一途をたどっており、その根本的な治療のために記憶・学習の分子レベルでの解明の必要性が高まっている。哺乳類における速い興奮性シナプス伝達は、棘突起に存在する AMPA 型グルタミン酸受容体を介して行われている。短・中期的な記憶・学習の神経回路レベルでの実体は、神経活動の変化に応じたシナプス伝達効率の変化であると考えられている。例えば神経活動の亢進の結果、小脳プルキンエ細胞棘突起において AMPA 受容体がエンドサイトーシスされ、その結果、平行線維-プルキンエ細胞シナプス伝達が低下し、長期抑圧現象 (LTD) が起きる。LTD は小脳運動学習の基盤と考えられている。一方、より長期に持続する記憶には棘突起の形態変化が必要であることもわかってきた。しかし、シナプス可塑性と棘突起の形態変化を結びつける分子機構については十分わかっていない。

ARF は、Ras ファミリー低分子量 GTP 結合タンパク質である。ARF6 は主に細胞膜に局在し、エンドサイトーシスなどの小胞輸送を制御する。さらに Actin 骨格を制御することによって、上皮細胞での突起伸展や極性形成に関与するすなわち、LTD における AMPA 受容体のエンドサイトーシスや棘突起形態に関与する分子の候補の一つと考えられる。実際に、RNAi を用いた実験では ARF6 のノックダウンにより、海馬培養神経細胞の軸索や樹状突起の伸長・分枝・棘突起減少などが報告されている。また、野生型海馬神経細胞を用いた生化学的解析により、AMPA 受容体エンドサイトーシスに ARF6 が関与することも報告された (Scholz et al., Neuron, 2010)。しかし、ARF6 遺伝子欠損マウスは致死であるために、神経系における ARF6 の機能については不明な点が多い。

2. 研究の目的

本研究では、筑波大学金保研究室で作成された条件付き ノックアウトマウス (ARF6-flox) を供与していただき、小脳プルキンエ細胞特異的に ARF6 を欠損させることにより、シナプス可塑性および形態形成における ARF6 の機能を生化学・電気生理学・行動学的方法を多角的に用いて *in vivo* で解明することを目指した。

3. 研究の方法

本研究では、ARF6 の小脳プルキンエ細胞における形態形成、シナプス形成、そして予測される運動学習障害を検討するために、プルキンエ細胞特異的 ARF6 遺伝子欠損マウスを用いた。また、前述のように ARF6 の作用機序を明らかにするために、上流の候補分子のノックダウン、下流の候補分子の遺伝子欠損マウスを用いること、そしてそれら分子と ARF6 の関係を生化学的、電気生理学的手法を用いて解明することを目指した。また、最終的に運動学習に関わってくるかを行動解析を用いて検討することを念頭に研究を進めた。平成 25 年度前半は ARF6 の役割について集中的に実験を行い、これに平行してその上流、下流を検討するベクター等の作成を、平成 26 年度は一連のシグナルカスケードを明らかにするとともに、最終的な表現型解析を行うことを目指した。

(1) ARF6 による小脳 LTD および運動記憶制御機構を解明

プルキンエ細胞特異的 ARF6 ノックアウトマウスにおける小脳 LTD の有無を確認した。さらに神経活動を亢進させることによってどのように ARF6 が活性化されるのか (上流)、また ARF6 がどのように LTD を制御するのか (下流) を調べた。加えて個体レベルにおける小脳依存的運動学習に

についても視機能性眼球運動 (OKR) による検討を予定していたが、当初の仮説と異なる結果が出たため、行動実験までは至らなかった (研究成果の項目参照)。

(2) ARF6 によるプルキンエ細胞樹状突起・棘突起の形態制御機を解明

学習に伴う変化を棘突起レベルで検討するための前段階として、本研究期間においては、プルキンエ細胞の発達段階における形態形成における ARF6 の機能を解明した。子宮内電気穿孔法によって常時活性化型 ARF6 や活性阻害型 ARF6 を発現させたプルキンエ細胞における形態変化を観察した。これらの分子や、ARF6 に対する shRNA を発達時期特異的に発現させることにより、さまざまな発達時期における ARF6 の役割を *in vivo* のマウス小脳において調べた。

4 . 研究成果

(1) ARF6 による小脳 LTD および運動記憶制御機構を解明

条件付きノックアウトマウスを用いて、平行繊維-プルキンエ細胞シナプスにおいて、小脳シナプス可塑性の一つである LTP (長期増強) LTD (長期抑圧) を計測したところ、ARF6 欠損マウスでは、LTP は正常におこるが LTD に異常が見られることを見いだした。

(2) ARF6 によるプルキンエ細胞樹状突起・棘突起の形態制御機を解明

子宮内電気穿孔法を用いて、常時活性化型や活性阻害型 ARF6 を発現させ、プルキンエ細胞のマーカーである calbindin を用いて、導入細胞の形態変化を観察した。その結果、著名な形態異常が観察されたことから、ARF6 が小脳プルキンエ細胞の形態形成を制御していることがわかった。引き続き、導入細胞におけるシナプス形成、平行繊維-プルキンエ細胞シナプスの LTD 障害有無、登上線維のプルキンエ細胞への投射を検証する計画を立てていたが、研究期間半ばの所属研究室の移動に伴う、環境

の変化によってプルキンエ細胞への安定的遺伝子導入が出来ない状況が続いたために電気生理学的解析が大幅に遅れている。

ARF6 のシグナルカスケードを明らかにするために、ARF6 の下流分子の候補として、ホスファチジルイノシトール 4-リン酸 5-キナーゼ (PIP5K) は、ARF により直接活性化されることが示唆されている。小脳 LTD 発生機序における PIP5K の関与を明らかにするために、PIP5K リン酸化ペプチドを用いて、LTD の障害有無を検討したところ、リン酸化ペプチドによる障害はほとんど認められず、これは PIP5K を介さない ARF6 による分子経路の存在を示唆している。PIP5K を介さない分子経路の存在が明らかになったことで、当初予定していた PIP5K 遺伝子欠損マウスを用いた行動解析実験は実施しなかった。PIP5K を介さない、別の候補分子に関しては未だ不明であるが、この分子経路の特定は今後の最重要課題となってくるであろう。最後に、候補分子の作用を検証するための小脳の培養系を確立できた。今後、この培養系を用いて ARF6 のシグナルカスケードの解明に取り組む。本研究で得られた知見が、記憶、学習障害の基礎過程の解明に貢献し、認知症や発達障害の病体解明や治療法の開発に繋がることを期待したい。

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 0 件)

[学会発表] (計 2 件)

Naoyuki Matsumoto, Maki Hoshiko,
Nobuhiko Yamamoto
Mechanisms of synapse formation in
activity-dependent

thalamocortical axon branching
The 38th Annual Meeting Of the Japan
Neuroscience Society 2015, Japan
2015 年 7 月 29 日 神戸国際会議場、
神戸国際展示場、神戸（兵庫県）

Naoyuki Matsumoto, Maki Hoshiko,
Nobuhiko Yamamoto

Involvement of synapse formation
in activity-dependent
thalamocortical axon branching

The 37th Annual Meeting Of the Japan
Neuroscience Society

2014 年 9 月 11 日 パシフィコ横浜、
横浜（神奈川県）

〔その他〕

ホームページ等

大阪大学 山本研究室

<http://www.fbs.osaka-u.ac.jp/labs/neurobiology/>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

星子 麻記（HOSHIKO Maki）

大阪大学・生命機能研究科・

招聘研究員

研究者番号：9 0 6 4 5 4 8 3

(2)研究分担者

該当なし

(3)連携研究者

該当なし