

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 3 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2014

課題番号：26670035

研究課題名(和文)モノアミン神経伝達物質によるシナプス恒常性維持機構の解明

研究課題名(英文)Elucidation of molecular mechanisms for synaptic homeostasis regulated by monoaminergic neurotransmitters

研究代表者

富田 泰輔 (Tomita, Taisuke)

東京大学・薬学研究科(研究院)・教授

研究者番号：30292957

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：モノアミン神経伝達物質であるドーパミンやセロトニンが関連するシナプス形成・維持機構を解明する目的で、シナプスオーガナイザー分子の一つとして知られるEphA4のシナプス形成能と、さらにその代謝機構について検討を行った。その結果、ドーパミン刺激を受けた部位でEphA4がD2受容体経路の活性化を介して膜結合型メタロプロテアーゼであるADAM10によって代謝されることでドーパミン作動性シナプスが新たに形成される可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：To elucidate the molecular mechanisms how monoaminergic synapses are generated and maintained, we have analyzed the synaptogenic activity and metabolism of EphA4 receptor, which is known as a synaptic organizer membrane protein. We found that EphA4 is shed by membrane-bound metalloprotease ADAM10 that is activated by dopamine D2 receptor. Proteolytic fragment of EphA4 is capable to generate synapses. Thus, we hypothesized that ADAM10-mediated shedding of EphA4 by dopamine D2 receptor activation would lead to generate new dopaminergic synapses.

研究分野：病態生化学

キーワード：プロテアーゼ シナプス EphA4

1. 研究開始当初の背景

記憶や認識などを処理する脳は神経細胞を最小の機能単位として、神経細胞シナプスを介してつながる綿密なネットワークを形成して中枢神経系を構築している。シナプス構造の形成には軸索の終末部のシナプス前末端と樹状突起側のシナプス後末端の両者に存在する分子が相互作用する必要がある。2000年に Neuroigin がシナプスを誘導する「シナプスオーガナイザー」として同定され、注目されるようになった(Scheiffele et al., Cell 2000)。Neuroigin はプレシナプスに局在する Neurexin をリガンドとする、ポストシナプスに局在する接着分子である。興味深いことに Neuroigin 1 はグルタミン酸作動性ポストシナプスを形成する樹状突起上のスパインに局在するという特異性を有し、Neuroigin 2 や4はGABA作動性シナプスの形成に必要である(Sudhof, Nature 2008; Siddiqui and Craig, Curr Opin Neurobiol 2011)。

一方、モノアミン神経伝達物質であるドーパミンやセロトニンが関連するネットワークは神経精神疾患において重要な創薬介入点であるが、そのシナプス形成・維持機構については殆ど明らかになっていない。興味深いことに、シナプスオーガナイザー分子の一つとして知られる EphA4 は線条体においてドーパミンシナプスに存在し、線条体発生過程に必要であることが示されている(Passante et al., Development 2009)。

申請者はこれまでに NMDA 受容体を介した刺激が膜結合型プロテアーゼ ADAM10 の活性を抑制し、最終的にシナプスオーガナイザーである Neuroigin 1 の細胞表面の量を規定していることを見出し、シナプス形成機構と膜タンパク質代謝機構の間に機能連関が存在することを明らかにした(Suzuki et al., Neuron 2012)。一方 EphA4 も同様の切断を受けることが報告されているが(Inoue et al., J Cell Biol 2009)、ドーパミンシナプス形成機構や可塑性との関係については不明である。

2. 研究の目的

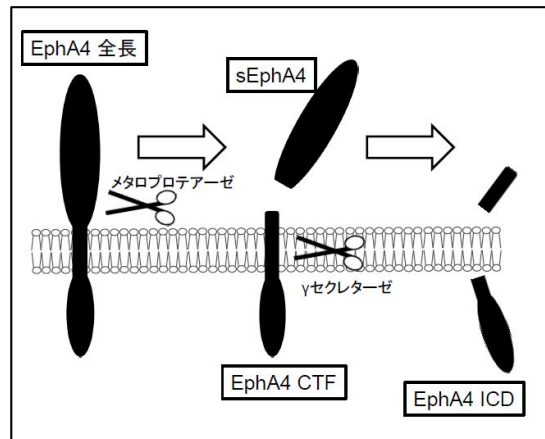
本研究においては EphA4 および他の EphA 受容体ファミリー分子がモノアミン神経伝達物質シナプスの形成および維持に関わる分子機構を解明することを目的として研究を行った。

3. 研究の方法

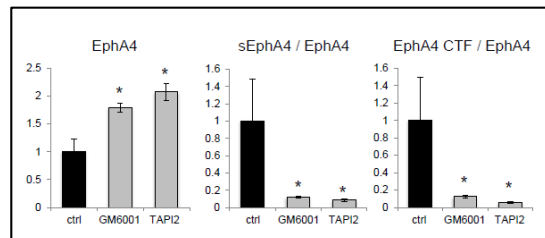
主にラット由来初代培養神経細胞や培養細胞系を用い、各種ドーパミン受容体アゴニスト、アンタゴニスト刺激を行い、EphA4 のプロセッシングに影響を与える下流シグナル経路の特異性について検討した。また各種プロテアーゼ欠損細胞を用いて EphA4 代謝に関わる分子の解明を行った。

4. 研究成果

初代培養神経細胞において内因性 EphA4 は Pre および Post シナプスの両方に局在していることが免疫細胞染色により明らかとなった。また細胞表面上に存在する EphA4 がメタロプロテアーゼによって切断を受け、細胞外に N 末端領域を大きく含む sEphA4 が分泌され、膜上に残された C 末端断片 (C-terminal fragment; CTF) が引き続き γ セクレターゼによって切断を受けて分解されることが、薬理的な解析から確認された。



sEphA4 産生酵素は様々なメタロプロテアーゼを阻害する GM6001 や TAPI2 によって阻害を受けること、また脳由来膜画分のインキュベーションによっても産生が認められたことなどから、膜結合型マトリクスメタロプロテアーゼや ADAM プロテアーゼによって切断が行われていると推測された。

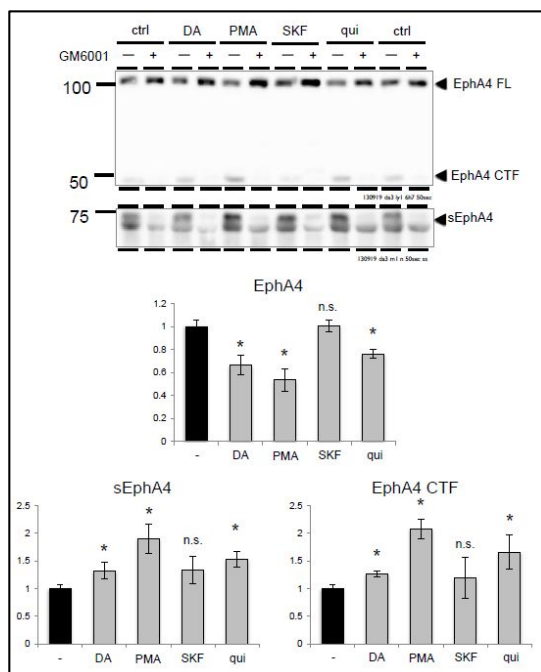


そこで各種プロテアーゼ欠損マウス由来不死化線維芽細胞を用いて検討したところ、ADAM10 ノックアウトマウス由来線維芽細胞において有意に sEphA4 産生量の低下が認められた。そこで *Adam10^{flx/flx}* マウス由来初代培養神経細胞に組み換えアデノウイルスを用いて Cre リコンビナーゼを発現させ検討を行ったところ、やはり sEphA4 産生量が有意に低下したことから、EphA4 の細胞外切断酵素は ADAM10 が主要なプロテアーゼであると考えられた。

Eph 受容体ファミリーの1つである EphB2 はリガンドである ephrinB との結合依存的にメタロプロテアーゼによって切断を受ける。一方、EphA4 については定かではない。そこで初代培養神経細胞に対してオリゴマー化したリコンビナント ephrinB-Fc を添加し検討

を行ったが、EphA4 切断に大きな影響は認められなかった。また EphA4 の細胞質内領域はリガンドとの結合依存性にリン酸化を受けることが示されているため、EphA4 の kinase 活性を消失した変異体や、EphA4 の細胞質内リン酸化部位に点変異を導入し、これらの変異体の代謝について検討を行った。しかしいずれの変異体についても sEphA4 産生量に大きな変化は観察されなかった、これらの結果から、EphA4 シグナリングそのものは EphA4 代謝に大きな影響を与えないと考えられた。

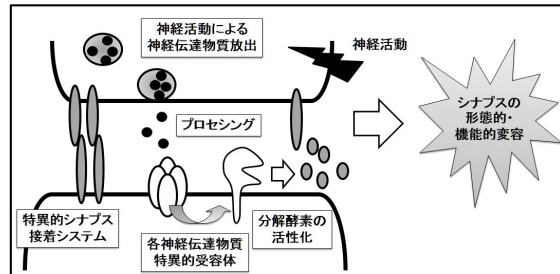
次に EphA4 の代謝とドーパミンシグナルの関係について検討を行った。ラット由来初代培養神経細胞に対してドーパミン (DA) 刺激を行った結果、sEphA4 産生量が有意に上昇した。同様の結果は ADAM プロテアーゼの活性化を促す PMA 処理によっても得られた。一方、ドーパミン D1 受容体アゴニストである SKF38393 ではそのような変化が認められなかったのに対して、ドーパミン D2 受容体アゴニスト quinpirole では sEphA4 産生量の増加が観察された。



以上の結果から、EphA4 はドーパミン、特に D2 受容体を介したシグナル経路の下流において ADAM10 が活性化され、細胞外領域が sEphA4 として分泌されることが考えられた。sEphA4 産生は細胞表面膜上の EphA4 存在量の低下につながることから、EphA4 が介在するシナプス結合が弱まる可能性が考えられた。今後、ドーパミン D2 受容体を介したシグナルによって制御されるシナプス形成機構もしくは可塑性との関連をさらに詳細に検討することで、EphA4 代謝が関与するシナプス恒常性維持機構が明らかになることが期待された。

また申請者がこれまでに明らかにしたグ

ルタミン酸刺激と Neuroligin 1 切断との機能的連関を考慮すると、それぞれの神経細胞シナプスにおける特異的な神経活動および神経伝達物質依存性のシグナルによって惹起されるシナプス接着分子の代謝が、活動依存性のシナプス形態および機能の変化を惹起し、可塑的な維持機構として働いていることが推測された。



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 4 件)

Taisuke Tomita: Physiological and pathological roles of proteolytic processing of autism-related neuroligin proteins. RIKEN BSI seminar. Nov 10, 2014, Wako, Japan

Taisuke Tomita, Takafumi Yumoto, Yosuke Nao: Activity-dependent proteolytic processing of synaptic adhesion molecules. "Proteases at work: cues for understanding neural development and degeneration" WORKSHOPS CURRENT TRENDS IN BIOMEDICINE at Campus Antonio Machado. Oct 22-24, 2014, Baeza, Spain

Yosuke Nao, Azusa Shiohara, Takafumi Yumoto, Takeshi Iwatsubo, Taisuke Tomita: Proteolytic cleavage of inhibitory synapse specific adhesion molecule neuroligin-2. "Proteases at work: cues for understanding neural development and degeneration" WORKSHOPS CURRENT TRENDS IN BIOMEDICINE at Campus Antonio Machado. Oct 22-24, 2014, Baeza, Spain

Taisuke Tomita: Activity-dependent proteolytic processing and neurodegenerative diseases. 2014 年 5 月 10 日 マックスプランク協会合同シンポジウム Max Planck Florida Institute for Neuroscience. Jupiter, USA

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ

<http://www.f.u-tokyo.ac.jp/~neurops/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

富田 泰輔 (TOMITA, Taisuke)

東京大学・大学院薬学系研究科・教授

研究者番号：30292957

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：