

研究報告書

「光による細胞内輸送とシナプス可塑性の制御」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 23 年 10 月～平成 29 年 3 月

研究者: 松田 信爾

1. 研究のねらい

速い興奮性伝達は AMPA 型グルタミン酸受容体 (AMPA 受容体) によって担われる。神経活動の変化によってシナプス伝達効率が長期的に低下ないし増強する現象は長期抑圧 (LTD) および長期増強 (LTP) と呼ばれ、神経回路レベルにおける記憶・学習の実体であると考えられている。LTD や LTP の分子実体は、神経活動によって引き起こされるシナプス後部における AMPA 受容体の選択的エンドサイトーシスやエキソサイトーシスであることが近年明らかとなった。しかし、このようなシナプスにおける分子レベルの変化 (AMPA 受容体の輸送) と回路レベルの変化 (LTD や LTP) と個体レベルにおける記憶・学習過程の関係については未だ十分に明らかではない。例えば、AMPA 受容体のサブタイプを変異させたマウスでは、確かに分子レベルではリン酸化やエンドサイトーシス過程が障害され、脳切片において検討すると LTD や LTP が障害され、さらに個体レベルでは記憶・学習過程が変化する。しかし、分子の変化や回路の変化が直接に個体レベルでの記憶・学習を変化させたのかどうかについてはこれらの相関的な解析方法では明らかではない。

近年、光遺伝学の進歩により、膜電位を光照射によって制御し、個々の神経活動の変化と回路や個体レベルでの変化を直接的に対応づけることが可能となってきた。そこで申請者は個々のシナプスにおける可塑性変化そのものを光照射によって制御できないかと着想した。小胞体輸送はエンドソームにおける pH 変化によってリソソーム方向への輸送が制御されることに着目し、エンドソームの pH を光遺伝学を用いて制御することを試みたところ、培養細胞における予備実験に成功した。そこで、本申請では、申請者がこれまでに培ってきた細胞内輸送過程の知識と技術を活かし、神経細胞内において AMPA 受容体輸送を光照射によって制御することにより、記憶・学習過程を分子・回路・行動レベルにおいて初めて直接的に統合的に解明することを目指す。さらに本技術を応用して、ゴルジ体やミトコンドリアの機能を光照射で制御する技術も開発する。

2. 研究成果

(1) 概要

本研究は長期抑圧の誘導を光によって制御する技術を開発しそれにより長期抑圧と記憶・学習との関連性を直接的に解明しようとするものである。そのためにまず長期抑圧の分子機構の詳細の解明を行った。長期抑圧は細胞表面の AMPA 受容体数が減少することによって引き起こされることが明らかになっていたが、その分子機構は不明であった。本研究により、長期抑圧誘導の分子機構として以下の点が明らかになった。基底状態ではリン酸化されている TARP が長

期抑圧誘導刺激により脱リン酸化されるとアダプタータンパク質の1つであるAP-2に結合できるようになる。これにより AMPA 受容体-TARP 複合体が効率的にクラスリン被覆ピットに取り込まれ、エンドサイトーシスにより初期エンドソームへと輸送される。その後、別のアダプタータンパク質である AP-3 に結合して後期エンドソーム・リソソームに運ばれることにより、長期にわたって細胞表面の AMPA 受容体の数が減少し、長期抑圧が引き起こされる。

上記の結果から長期抑圧の誘導には初期エンドソームの機能が必須であることが明らかになった。そこでこの細胞内小器官の機能を光によって制御する技術の開発を行った。初期エンドソームはその内部が細胞質に比べて酸性化しており、その酸性化が機能に必須であることが知られていた。そこで、光合成細菌由来のプロトンポンプに変異を導入することで、初期エンドソームに局在し、光照射によって酸性化を阻害することのできるプロトンポンプを開発した。このプロトンポンプを海馬の培養細胞に発現させ長期抑圧誘導刺激を与えた際に細胞表面の AMPA 受容体の減少がおきるか否かを解析した。その結果、光により AMPA 受容体のエンドサイトーシスが阻害されることが明らかになった。さらにこのプロトンポンプを小脳プルキンエ細胞特異的に発現する遺伝子改変マウスを作製し、このマウスの小脳長期抑圧並びに運動学習が光によって影響を受けるか否かを解析した。その結果、光照射により小脳の長期抑圧、運動学習の両方が阻害されることが明らかになった。このことから小脳長期抑圧はある種の運動学習を直接制御していることが示された。

(2) 詳細

研究テーマ A「長期抑圧の分子機構の解明」

長期抑圧の分子実体は細胞表面の AMPA 受容体数がエンドサイトーシスにより減少することであることが明らかになっている。しかし、どのようなメカニズムで AMPA 受容体がエンドサイトーシスされ、さらにエンドサイトーシスされた後リサイクルされることなく長期に渡って細胞表面の受容体数が減少するのかは不明であった。本研究により長期抑圧誘導の分子機構として以下の点が明らかになった。神経細胞に長期抑圧を誘導する刺激が加わると、AMPA 受容体に強固に結合するタンパク質である TARP の脱リン酸化が引き起こされる。脱リン酸化された TARP はアダプタータンパク質の1つでありクラスリン依存性エンドサイトーシスに必須の機能を持つ AP-2 に結合できるようになる。これにより AMPA 受容体-TARP 複合体が効率的にクラスリン被覆ピットに取り込まれ、初期エンドソームへと輸送される。初期エンドソーム上で AMPA 受容体-TARP 複合体は、別のアダプタータンパク質である AP-3 に結合して後期エンドソーム・リソソームに運ばれる。この過程を阻害すると AMPA 受容体-複合体は細胞表面へリサイクルされてしまうことも明らかになっている。これらのことから、AMPA 受容体-TARP 複合体は AP-2 および AP-3 と順次結合することにより初期エンドソームを経て後期エンドソーム・リソソームへと輸送され、長期にわたって細胞表面の AMPA 受容体の数が減少し、長期抑圧が引き起こされる。この結果は Nature Communications 誌に誌上発表し、F1000Prime に選ばれている。

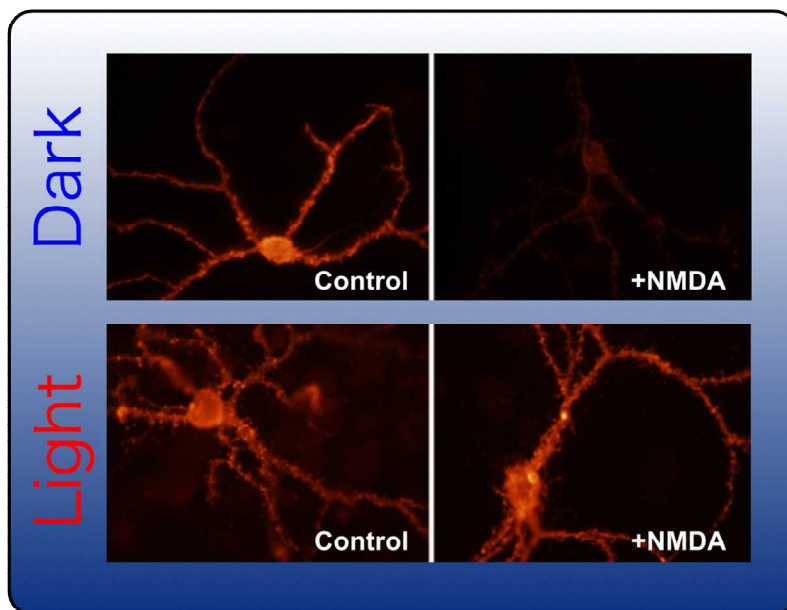
研究テーマ B「初期エンドソームの酸性化を光により制御するプロトンポンプの開発」

上記の結果から長期抑圧の誘導には初期エンドソームの機能が必須であることが明らかになった。そこでこの細胞内小器官の機能を光によって制御する技術の開発を行った。初期エンドソ

ームはその内部が細胞質に比べて酸性化しており、その酸性化が機能に必須であることが知られていた。そこで、光合成細菌由来のプロトンポンプに変異を導入しさらに初期エンドソームに局在するタンパク質との融合タンパク質とすることで、初期エンドソームに局在し、光照射によって酸性化を阻害することのできるプロトンポンプを開発した。このプロトンポンプを培養 HEK293 細胞に発現させ、実際にエンドソームの pH が光に依存して可逆的に変化することを明らかにした。さらに、このプロトンポンプを発現させた HEK293 細胞では光によりデキストランの取り込み量が減少することが定量的に示された。

研究テーマ C「長期抑圧の光制御と学習機能の解析」

このプロトンポンプを海馬の培養細胞に発現させ長期抑圧誘導刺激を与えた際に細胞表面の AMPA 受容体の減少がおきるか否かを解析した。海馬の培養神経細胞上の AMPA 受容体は長期抑圧を誘導する NMDA



処理によりエンドサイトーシスされることが知られているが、この NMDA 依存的なエンドサイトーシスがプロトンポンプを発現させた神経細胞では光照射により阻害できることを免疫組織化学的手法および Live imaging を用いて明らかにした。次に長期抑圧と運動学習の関連性を直接的に解明するため小脳プルキンエ細胞

にプロトンポンプを発現させることを試みた。子宮内エレクトロポレーション法により小脳プルキンエ細胞にプロトンポンプを過剰発現させたところ、細胞の形態の異常が見られ、子宮内エレクトロポレーション法によるプルキンエ細胞へのプロトンポンプの導入は細胞毒性を持っている可能性が考えられた。そこでレンチウイルスベクターを用いて、プロトンポンプを過剰発現させた。この場合プルキンエ細胞に形態の異常などは見られていないが、プルキンエ細胞以外の細胞にも遺伝子の導入が見られた。そこで ROSA locus を利用して Cre recombinase により組み換えが起きたときにのみプロトンポンプが発現するノックインマウスを作成した。プロトンポンプを小脳プルキンエ細胞特異的に発現する遺伝子改変マウスを作製し、このマウスをプルキンエ細胞特異的プロモーターL7 の制御下に Cre を発現するマウスとかけ合わせることで、小脳プルキンエ細胞特異的にプロトンポンプを発現するマウスを作製した。このマウスの小脳長期抑圧並びに運動学習が光によって影響を受けるか否かを解析した。その結果、光照射により小脳の長期抑圧、運動学習の両方が阻害されることが明らかになった。このことから小脳長期抑圧はある種の運動学習を直接制御していることが示された。

3. 今後の展開

本研究により長期抑圧の誘導を光により阻害する技術が完成し、またその技術を用いて小脳長期抑圧が運動学習を直接制御していることが明らかになった。この研究結果を踏まえ、海馬をはじめ脳の様々な領域での長期抑圧が実際の脳機能にどのような影響を与えているのかを解明していきたい。さらに脆弱性 X 症候群、アンジェルマン症候群といった神経疾患では長期抑圧が過剰に亢進していることが知られている。これらの疾患のモデルマウスの長期抑圧を光で阻害した場合、その病態にどのような影響が出るかを解析することで、長期抑圧の亢進と神経疾患との関連性も直接的に解明していきたい。

4. 評価

(1) 自己評価

(研究者)

まず、長期抑圧の分子実体である AMPA 受容体の細胞内輸送の分子機構を明らかにし、その分子機構を基に、研究開始当初からの目標であった光により長期抑圧制御できる技術を開発することができた。またこの技術を用いて生体の小脳で長期抑圧を光で阻害すると、運動学習に異常が生じることが明らかになった。これらの結果から長期抑圧が運動学習に直結していることが示された。このことはシナプス可塑性という神経回路レベルの変化が脳の学習機能に直結していることを示す最初の成果であり、研究目標の重要な点は達成できたと考えている。また、この長期抑圧というシナプス可塑性はアンジェルマン症候群や脆弱性 X 症候群といった疾患のモデルマウスにおいて過剰に亢進していることが報告されている。これらの疾患モデルマウスの長期抑圧の亢進を光により阻害した場合に病状の改善などが見られるかを解析することにより、病態の理解に繋がっていくものと考えられる。さらにアルツハイマー病の原因タンパク質の1つであるアミロイド β を神経細胞に投与すると LTD 様の AMPA 受容体のエンドサイトーシスが引き起こされるという報告もある。このアミロイド β による AMPA 受容体エンドサイトーシスを光によって制御できるかも明らかにしていきたい。これらの研究を進めることにより将来的に様々な神経疾患を克服する基盤を築くことができると考えている。

(2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)。

(研究総括)

脳の機能は神経回路が担う。したがって学習・記憶等の脳機能の可塑的変化は神経回路における何らかの変化が担っているものと考えられる。脳機能の可塑性に関する多くの研究では特定の脳機能の変化に着目し、それに伴って起こっている分子・細胞レベルの変化を見だし、両者の相関から因果関係があるものと推測するものであり、その証明は容易ではない。松田研究者は光操作によって細胞レベルの変化を起こさせ、その結果生ずる脳機能の可塑性を見出すことで両者の因果関係を証明することに成功した。具体的には小脳のプルキンエ細胞におけるシナプス伝達の長期抑圧をAMPA受容体の細胞内輸送を光で操作することで変化させ、それによって運動学習が阻害されることを示すのに成功し、両者に因果関係が有ることを証明した。この結果自体大きな成果ではあるが、松田研究者が開発した新たなアプ

ローチは、原理的には脳の他の部位を介する記憶・学習などの機序の研究にも応用可能であり、当該分野の今後の発展にも大きく寄与する可能性を孕むものである。以上のことより松田研究者のおこなったさきがけ研究は極めて高く評価することができる。

松田研究者のこの大きな成功は、さきがけ研究の開始時から進めた地道な研究、すなわち初期エンドソームの酸性化を光により制御するプロトンポンプの開発や長期抑圧の分子機構の解明などの積み重ねの結果であり、五年間という長期に亙るサポートが可能なさきがけ研究がこれを可能としたものである。

5. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. Shinji Matsuda, Wataru Kakegawa, Timotheus Budisantoso, Toshihiro Nomura, Kazuhisa Kohda, Michisuke Yuzaki: Stargazin regulates AMPA receptor trafficking through adaptor protein complexes during long-term depression. *Nat Commun*, 4: 2759 DOI: 10.1038/ncomms3759 (2013). **F1000Prime RECOMMENDED**
2. Kazuhisa Kohda, Wataru Kakegawa, Shinji Matsuda, Tadashi Yamamoto, Hisashi Hirano, Michisuke Yuzaki: The delta2 glutamate receptor gates long-term depression by coordinating interactions between two AMPA receptor phosphorylation sites. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110(10): E948-57 (2013).

(2) 特許出願

研究期間累積件数: 0件

(3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

招待講演

Shinji Matsuda: Understanding and controlling synaptic plasticity

日本神経回路学会時限研究会「眼球運動を制御する小脳中枢機構の理解へのデータ駆動型アプローチ」2015年8月11日

松田信爾: Molecular mechanism and controlling method for long term depression

国際高等研究所研究会 2013年2月27-28日

国際シンポジウム

Shinji Matsuda: Intracellular trafficking of AMPA receptor-TARP complex

Annual Meeting of the Physiological society of Japan, Japan-China Joint Symposium

2016年3月23日

Shinji Matsuda: Molecular mechanism and controlling method for synaptic plasticity



Neuro2015 2015 年 7 月 30 日

著書

松田信爾:脳科学辞典「長期抑圧」原稿完成日:2015 年 9 月 17 日

DOI: 10.14931/bsd.6195