

精神疾患原因遺伝子による興奮性シナプスの機能制御

国立精神・神経医療研究センター神経研究所
病態生化学研究部細胞生化学研究室
林 崇

1. 目的

近年の研究から、多くの精神疾患原因遺伝子は脳シナプスおよびその周辺に発現し機能していることが明らかになってきた。また、これまでに開発され、実際に臨床使用されている精神疾患に対する薬物も、その多くがシナプスをターゲットとしている。したがって、これらの事実から、中枢神経系におけるシナプス機能の不全が精神の変調を誘発するものと考えられる。しかしながら、多様な精神疾患が発症する機構に関しては未知の部分が多く残されており、現状、その治療は必ずしも容易ではない。将来的な精神疾患の治療あるいは予防につながる基礎医学的研究は極めて重要であるが、そもそも、正常な脳機能を支える多くのシナプス局在分子の動態研究自体も未だ十分にはなされていない。更に、脳機能の破綻としての各種の精神疾患については、シナプスの維持・安定化機構の変調からそれぞれの精神疾患の発症に至るまでの分子レベルの変化に関して、詳細な解明が俟たれる状況にある。

当研究室ではこれまで、興奮性シナプス伝達と可塑性の分子機構を主な研究対象としてきた。ヒトを含む哺乳類の中枢神経系において、主要な興奮性の神経伝達物質はグルタミン酸である。グルタミン酸作動性の興奮性シナプスを構成するイオンチャンネル型グルタミン酸受容体の内、特にAMPA型グルタミン酸受容体（AMPA受容体）のシナプス発現における局在と輸送の制御は、興奮性シナプス機能に重要な役割を果たす。我々は、可塑性に関わるAMPA受容体のチロシンリン酸化(Hayashi T *et al.* Nature. 1999; Hayashi T *et al.* J. Neuroscience. 2004; Hu JH *et al.* Neuron. 2010)やAMPA受容体およびNMDA型グルタミン酸受容体のパルミトイル化(Hayashi T *et al.* Neuron. 2005; Lin DT *et al.* Nature Neuroscience. 2009; Hayashi T *et al.* Neuron. 2009)による新規制御機構を明らかにした。これら一連の研究の過程で、AMPA受容体の翻訳後修飾に伴う局在変化に関しては、全反射蛍光顕微鏡を用いた1分子イメージング技術を用いて、生きた培養神経細胞での受容体挙動の継時的変化を示した。また、グルタミン酸受容体と精神疾患との関係については、知的障害家系のヒトAMPA受容体上の点突然変異に伴う受容体局在の異常とイオンチャンネルとしての性質の変化(Wu Y *et al.* PNAS. 2007)および双極性障害と統合失調症に関連するパルミトイル化修飾酵素との相互作用の異常(Thomas GM *et al.* Neuron. 2012; Thomas GM *et al.* J. Neuroscience. 2013)を報告した。

本研究において、これまでに行なってきた興奮性シナプスにおけるグルタミン酸受容体のリアルタイムな1分子イメージング可視解析技法を応用し、主に大脳皮質の培養神経細胞を用いて、精神疾患原因遺伝子が興奮性シナプスの維持と変調の過程に与える影響を解析した。各種の精神疾患原因遺伝子のシナプスにおける機能解明は、脳神経系の分子制御機構とその破綻に関する新たな知見をもたらし、将来的な治療法開発の基盤となることが期待される。

2. 方法

近年のイメージング技術および解析技法の飛躍的発展と、分子脳科学において確立された各種手法の組み合わせにより、シナプスの形成および維持・調節機構に関する知見が蓄積しつつある。殊に、生体での1分子挙動の可視化は急速に進歩し、中枢神経系においても、スパイン形態の刺激依存的な変化とシナプ

スにおける受容体 1 分子の局在変化の継時的同時観察が可能になった。Green Fluorescence Protein (GFP) を発光タグとしたタンパク質分子の細胞内局在解析は、現在、生命科学に無くてはならない手法となっている。pH感受性の改変GFPであるpHluorin(フルオリン)を分子発光タグとして利用し(Miesenboeck G *et al.* Nature. 1998)、神経細胞における樹状突起あるいはスパインでのグルタミン酸受容体の細胞表面局在を解析する試みには、数グループの先行研究があった(Kopec CD *et al.* J. Neuroscience. 2006; Ashby MC *et al.* J. Neuroscience. 2006)。我々は、これらの研究を応用し、pHluorinタグ付きAMPA受容体サブユニットpH-GluA1およびpH-GluA2の分子修飾に伴う 1 分子のシナプス発現変化を、培養神経細胞において、継時的に可視化することに初めて成功した(Lin DT *et al.* Nature Neuroscience. 2009)。

本研究では、上記の実績をふまえ、精神疾患原因遺伝子によるシナプス制御機構に関して、興奮性シナプスの制御・調節機構および神経細胞の機能維持という視点からの解明を目指した。実験には、主にマウス胎児の脳皮質から作製した培養神経細胞を用い、全反射顕微鏡による 1 分子観察技法を応用したイメージング技術と分子生物学的手法を組み合わせ、シナプス周辺および神経細胞内に発現する精神疾患原因遺伝子による興奮性シナプス制御機構の解析を行なった。そして、これまでに明らかにしてきたAMPA受容体のシナプス局在と輸送における分子挙動変化を指標とし、更に多様な条件下での興奮性シナプス制御の直接的イメージングを試みた。特に、シナプスの変調状態を導くスパイン構造の縮退あるいは変性を伴う様な精神疾患原因遺伝子およびその関連分子に関して、それらの発現ベクターを神経細胞外からトランスフェクションして過剰発現させる、あるいは逆にsiRNAを用いて内在性タンパク質の発現を抑制する等の手法により、精神疾患原因遺伝子によるシナプス制御を中心に解析を進めた。中でも、興奮性シナプス後膜の接着因子である知的障害・自閉症原因遺伝子Interleukin-1 receptor accessory protein-like 1 (IL1RAPL1)とその下流シグナル伝達系による興奮性シナプス制御機構を集中的に解析した。この研究手法を応用し、他にも精神疾患に関わるタンパク質翻訳後修飾を触媒する一群の酵素やシグナル分子が、興奮性シナプスの形成・調節に与える影響について、生きた神経細胞での継時的イメージング解析を行なった。

3. 結果

我々のこれまでの 1 分子イメージング観察系では、全反射蛍光顕微鏡の焦点制御に関する技術的な問題で、長期観察による分子挙動の継時的変化を追うまでには至っていなかったが、全反射顕微鏡(オリンパスIX81N-ZDC2-1ベース)に電動制御系を組み込んだ、より長期の継時的かつ自動的な焦点維持システムによる計測系を確立し終えた。この改良により、目的タンパク質分子に注目した数時間以上の継時的計測が可能になった。同観察系により、先ず、知的障害・自閉症原因遺伝子IL1RAPL1の興奮性シナプスにおける機能解析を行なった。これまでに、興奮性シナプスに発現する膜受容体であるIL1RAPL1の細胞内領域に結合する分子として、低分子量G蛋白質Rhoを活性化するRhoGEFの一種であるMcf21を同定した。更に、Mcf21によって活性が調節されるRhoAから下流のROCKキナーゼを介したシグナル系により、スパイン構造を支えるアクチン細胞骨格系が制御され、IL1RAPL1依存的な興奮性シナプスの形成とそれに続く成熟・安定化が促進されて、AMPA受容体各サブユニットGluA1、GluA2、GluA3の分子局在と輸送に影響を与えることを明らかにした(Hayashi T *et al.* PLoS One. 2013)。本研究では、上記の様に、IL1RAPL1による興奮性シナプス制御がグルタミン酸受容体 1 分子の動態に与える影響を可視化解析し、興奮性シナプスの形成・維持および成熟・安定化の過程をイメージとして明らかにした。

また、自閉症等多くの精神疾患の発症との関連が示唆されている細胞内シグナル分子Auts2分子についても解析を進め、脳皮質の発達過程における神経細胞内でのAuts2局在の変化と機能異常との関係を報告した(Hori K *et al.* Cell Reports. 2014)。

4. 考察

本研究で確立したイメージング観察系と解析手法を応用し、これまで可視化できなかった、シナプスにおける様々なタンパク質 1 分子の詳細な挙動の解明が可能な状況にある。

可逆的なタンパク質翻訳後修飾であるパルミトイル化を触媒する酵素群の内、DHHC5とDHHC8は神経系で高発現を示し、それぞれ双極性障害と統合失調症に関連する遺伝子である。我々は、既に、DHHC5/8とAMPA受容体結合分子GRIP1bおよびPICK1が会合し、パルミトイル化を介してシナプスでのAMPA受容体発現が制御されることを見出した(Thomas GM *et al.* Neuron. 2012; Thomas GM *et al.* J. Neuroscience. 2013)。今後、興奮性シナプス制御のイメージング解析を手掛りとして、シナプスにおけるリン酸化やパルミトイル化シグナルの異常に伴うシナプス機能破綻と精神疾患の視点からも解析を行ない、正常な脳機能およびその変調状態におけるスパイン構造とシナプスの制御機構を解明し、また、精神疾患の将来的な治療につながる基礎的知見の確立を目指す予定である。

5. 参考文献

Hayashi T, Yoshida T, Ra M, Taguchi R, Mishina M.

IL1RAPL1 associated with mental retardation and autism regulates the formation and stabilization of glutamatergic synapses of cortical neurons through RhoA signaling pathway.

PLoS One. 8, e66254 (2013).

Thomas GM, Hayashi T, Huganir RL, Linden DJ.

DHHC8-dependent PICK1 palmitoylation is required for induction of cerebellar long-term synaptic depression.

Journal of Neuroscience. 33, 15401-15407 (2013).

Hayashi T.

Evolutionarily conserved palmitoylation-dependent regulation of ionotropic glutamate receptors in vertebrates.

Neurotransmitter. 1, e388 (2014).

Hori K, Nagai T, Shan W, Sakamoto A, Taya S, Hashimoto R, Hayashi T, Abe M, Yamazaki M, Nakao K, Nishioka T, Sakimura K, Yamada K, Kaibuchi K, Hoshino M.

Cytoskeletal regulation by AUTS2 in neuronal migration and neuritogenesis.

Cell Reports. 9, 2166-2179 (2014).

Hayashi T.

The origin and diversity of PICK1 palmitoylation in the Eutheria.

Neurotransmitter. 2, e802 (2015).