

樹状突起機能制御研究チーム

Laboratory for Regulation and Function of Dendritic Spines

チームリーダー SHENG, Morgan H.

我々が全般的に関心を持っているのは、脳シナプスにおける長期情報保存の分子の形態学的な原理である。このプロジェクトの目的は、主だったニューロンの樹状突起軸上に見られる小さい突出物である、樹状突起棘の形態形成を調節する分子メカニズムを解明することである。これらのシナプス後部の特殊化は、非常に異種性が高く、その形状はきわめて可塑的である。このようなニューロン構造物の中でも、樹状突起棘はおそらく、その形態と数の点で最も際立った活性依存性的な変化を示す。樹状突起棘の形態形成の調節はシナプスおよび神経回路の可塑性にとってきわめて重要であると広く信じられている。しかし、樹状突起棘の形成や、その大きさおよび形状を調節する分子メカニズムについては比較的わずしか知られていない。さらに、*in vivo* での樹状突起の情報処理や認知機能（例えば学習や記憶）における樹状突起棘の実際の役割については不明である。最近になって樹状突起棘に特異的なタンパク質成分のクローニングに進展がみられたことから、樹状突起の形態形成の分子メカニズムに突破口が開かれた。樹状突起棘を調節する特異的な分子が同定されれば、生体におけるこれらの分子の生理学的重要性を検討するための遺伝子レベルでの研究ができるであろう。

我々の研究目的は次の通りである。

(1) 樹状突起棘調節タンパク質の同定、並びに、樹状突起棘の数、大きさおよび形状を決定するシグナル回路の分子の特性の解明。

(2) 培養ニューロンと薄片培養における樹状突起棘の増殖および運動性のタイムラプスイメージング（時間差画像解析）、並びに、このような動きに対する樹状突起棘調節タンパク質の影響。すなわち、樹状突起棘調節タンパク質の運動およびシナプス活動によるこれらの運動調節についてタイムラプスイメージングを行う。

(3) *in vivo* での樹状突起棘の形態形成に対する樹状突起棘調節分子の関与を確認するための樹状突起棘調節分子のトランスジェニック操作、および、脳の機能と生理学的性質に変化を生じるように遺伝子操作されたこれらのマウスにおける樹状突起棘の形態的变化の相関性。

1. 樹状突起棘の形態形成の分子メカニズム

Homer と Shank は、シナプス後部肥厚部（PSD）の相互作用している足場タンパク質であり、樹状突起棘の増大を促進するために互いに協調する。神経活動によって極初期遺伝子として誘導される Homer 1 のスプライシング変異体である Homer 1a の機能を検討してきた。Homer 1a は、Homer の多量体化領域を欠いているために、Homer 1 の天然のドミナントネガティブと考えられる。我々は、Homer 1a の一過性過剰発現（これは内在性遺伝子の誘導を真似たものである）によって、海馬ニューロンにおける樹状突起

棘およびシナプスの喪失が起こることを明らかにした。このような形態学的影響に関連して、Homer 1a はまた、培養された薄片状海馬におけるシナプス伝達も阻害する。（興奮性シナプス可塑性研究チームとの共同研究で実施した電気生理学の実験）

コルタクチンは、よく知られた Shank に結合するアクチン調節分子である。我々は、樹状突起棘の形態形成におけるコルタクチンの役割を検討してきた。野生型と、ドミナントネガティブと推定される領域とを過剰発現させることによって、コルタクチンが、海馬ニューロンで樹状突起棘の頸部の長さを調節するのに関与することを明らかにした。この研究プロジェクトは現在も継続中である。

SPAR は、その RapGAP とアクチンリモデリング活性（SPAR の異なるドメインによって媒介される）によって樹状突起棘の形態形成を調節する重要なシナプス後部タンパク質である。我々は、活動誘導性セリン/スレオニンプロテインキナーゼ（Snk として知られている）が SPAR に特異的に結合し、SPAR をリン酸化反応およびその後のユビキチン-プロテアソーム経路による分解反応のターゲットにすることを発見した。Snk は、NMDA 受容体が電位依存カルシウムチャンネルかのいずれかを通じたカルシウム流入によって誘導され、それ自体が、リン酸化とプロテアソーム媒介性分解によって脱安定化される。誘導後に活性型 Snk は、神経細胞における SPAR の喪失と、成熟した樹状突起棘およびシナプスの欠落を引き起こす。（PSD-95 によって標識した場合）このような方法で Snk は、神経細胞における活動の恒常性（シナプスのスケール変化）を維持する活性依存性のメカニズムに関与しているのかもしれない。樹状突起棘の形態形成への SPAR の関与には、樹状突起棘の調節における Rap の役割を含んでいた。Rap のドミナントネガティブ変異体および構造的に活性を示す変異体を用いた昨年度の実験は、活性型 Rap が樹状突起棘を脱安定化するように作用し、その結果糸状偽足の発生を増すという考え方を支持している。この点に関して、2 種類の Rap アイソフォーム（Rap1 と Rap 2）の活性には若干の差異がみられるようである。神経細胞における Rap の作用メカニズムを検討するために、我々は、GTP-Rap カラムを用いるアフィニティークロマトグラフィーによって推定上の Rap のエフェクターを精製した。これまでのところ、可能性のある Rap エフェクターとして STE 20 ファミリーのセリン-スレオニンプロテインキナーゼを同定したが、これについては確認する必要がある。この研究プロジェクトは現在も進行中である。

我々は、AMPA 受容体輸送と樹状突起棘の形態形成との間の関連についてさらに追求してきた。AMPA 受容体の GluR2 サブユニットの過剰発現がそれ自身で海馬ニューロンでの樹状突起棘のサイズと数を増大させることを明らか

にした。さらに驚くべきことに、通常は樹状突起棘を欠いている GABA 作動性の介在ニューロンにおける樹状突起棘形成を誘導するには GluR2 で十分である。GluR2 の細胞外 N 末端領域 (NTD) がこの効果を担っており、GluR2 の NTD の異種融合タンパク質は樹状突起棘の形態形成を阻害する。我々は、GluR2 の NTD が、樹状突起棘の成長および安定性、もしくはどちらかにとって重要な受容体-リガンド相互作用の部分として、細胞表面で機能を果たすと仮定している。

2. 樹状突起棘の動力学的タイムラプスイメージング

樹状突起棘は運動性が高いために、樹状突起棘の調節をさらに詳細に洞察するには実時間で研究が必須である。昨年度、我々は培養された神経細胞のタイムラプスイメージングのできる共焦点顕微鏡システムを確立した。可視化用細胞を充填するのに、トランスフェクションされた GFP ないしは感染された GFP を用いて、樹状突起棘の形態形成と運動性のタイムラプス記録にとって最適な培養条件を設定してきた。さらに、関心のあるシナプス後部タンパク質 (PSD-95, アルファ-アクチニン, コルタクチン, Shank など) に GFP (またはその変異体) を導入した遺伝子構成物とウイルスを作製してきた。

我々は、培地中で分離させた海馬ニューロンの PSD-95-GFP, コルタクチン-GFP, およびアクチニン-GFP のタイムラプスイメージングに成功した。シナプス刺激によって、樹状突起棘から樹状突起軸へのコルタクチン-GFP の転位が引き起こされることを発見した。現在、さまざまなタンパク質の細胞生物学的な振舞いの間での定量的な比較を進めるため、GFP 標識されたシナプス後部タンパク質の可動性と動きをコンピュータで測定する方法を開発しているところである。

3. 脳における樹状突起棘の機能的意義に対する遺伝学的アプローチ

上述の 2 つの目的は主として *in vitro* での実験に関係するため、我々は、遺伝学的実験方法を用いて、これまで行ってきた分子生物学的研究をマウスに拡張する計画を立てた。培養された神経細胞においては樹状突起棘の増殖にとって Shank が重要であることを証明したが、*in vivo* におけるその重要性については不明である。生体レベルでの Shank の機能を検討するために、Shank 1 (哺乳類における 3 個の Shank 遺伝子のうちの 1 つ) を欠損したノックアウトマウスを作製した。ES 細胞での相同組換えによって Shank 1 遺伝子を破壊し、ターゲットとなる対立遺伝子の生殖細胞伝達を達成した後に、ホモ接合体が繁殖された。このホモ接合体の変異体は、外観的には正常のようで、生存能力や繁殖力も示している。Shank 1^{-/-}マウスの詳細な表現型の分析は始まったところである。この Shank ノックアウトの実験の一部は条件的遺伝子操作研究チームの協力を得て行った。

Our overall interest is the molecular and morphological basis of long-term information storage in brain synapses. The objective of this particular project is to understand

the molecular mechanisms that control the morphogenesis of dendritic spines, which are tiny protrusions found on dendritic shafts of principal neurons. These postsynaptic specializations are remarkable for being highly heterogeneous and markedly plastic in form; among neuronal structures, dendritic spines show perhaps the most convincing activity-dependent changes in their morphology and number. It is widely believed that the regulation of dendritic spine morphogenesis is of central importance in the plasticity of synapses and circuits. However, relatively little is known about the molecular mechanisms that control the formation or the size and shape of dendritic spines. Moreover, the actual role of spines in dendritic information processing or cognitive function *in vivo* (e.g. learning and memory) is not known. Recent advances in the cloning of specific protein components of dendritic spines have opened an in-road into the molecular mechanisms of spine morphogenesis. The identification of specific molecules that regulate dendritic spines will allow genetic approaches to investigate their physiological significance in the organism.

Our experimental objectives are:

- (1) identification of spine regulatory proteins and molecular characterization of the signaling pathways that determine the number, size and shape of dendritic spines
- (2) time-lapse imaging of the growth and motility of dendritic spines in cultured neurons and slice cultures, and how this dynamic behavior is affected by spine regulatory proteins; time-lapse imaging of movements of spine regulatory proteins and their regulation by synaptic activity
- (3) transgenic manipulation of spine regulatory molecules in mice to confirm their involvement in dendritic spine morphogenesis *in vivo*; and correlation of changes in dendritic spine morphology in these genetically modified mice with altered brain functions and physiological properties.

Research Subjects and Members of Laboratory for Regulation and Function of Dendritic Spines

1. Molecular mechanisms of dendritic spine morphogenesis
2. Time lapse imaging of dendritic spine dynamics and their regulation
3. A genetic approach to the regulation and functional significance of dendritic spines in brain

Principal Investigator

Dr. Morgan H. SHENG

Postdoctoral Associates

Dr. Anthone DUNAH
Dr. Myung Jong KIM
Dr. Jacek JAWORSKI
Dr. Daniel PAK
Dr. Albert HUNG

誌 上 発 表 Publications

【雑誌】

(原著論文) *印は査読制度がある論文

- Lee S. H., Valtchanoff J. G., Kharazia V. N., Weinberg R., and Sheng M. H.: “Biochemical and morphological characterization of an intracellular membrane compartment containing AMPA receptors”, *Neuropharmacology* **41**, 680–692 (2000). *
- Hering H. and Sheng M. H.: “Dendritic spines: structure, dynamics and regulation”, *Nature Rev. Neurosci.* **2**, 880–888 (2001). *
- Hering H. and Sheng M. H.: “Direct interaction of frizzled-1, -2, -4, and -7 with PDZ domains of PSD-95”, *FEBS Lett.* **521**, 185–189 (2002). *
- Wyszynski M., Kim E., Dunah A., Passafaro M., Valtchanoff J. G., Serra-Pages C., Streuli M., Weinberg R. J., and Sheng M. H.: “Interaction between GRIP and liprin- α /SYD2 is required for AMPA receptor targeting”, *Neuron* **34**, 39–52 (2002). *
- Lee S. H., Liu L., Wang Y. T., and Sheng M. H.: “Clathrin adaptor AP2 and NSF interact with overlapping sites of GluR2 and play distinct roles in AMPA receptor trafficking and hippocampal LTD”, *Neuron* **36**, 661–674 (2002). *
- (総説)
- Hung A. Y. and Sheng M. H.: “PDZ domains: structural modules for protein complex assembly”, *J. Biol. Chem.* **277**, 5699–5702 (2002).
- Sheng M. H. and Kim M. J.: “Postsynaptic signaling and plasticity mechanisms”, *Science* **298**, 776–780 (2002).