

AIR MAIL



Futai, K. et al. : Nature Neuroscience, 10 : 186-195, 2007

PSD-95 とニューロギリンを介した 新たな逆行性情報伝達機構の発見

二井健介, 林 康紀

神経細胞間の情報伝達は、シナプスとよばれる接合部を介して行われており、シナプス情報伝達は主に一方方向、つまりシナプス前細胞から後細胞へ行われると考えられてきた。今回われわれは、シナプス後部に特異的に存在する PSD-95 とニューロギリンが、逆行性にシナプス前部の機能を調節していることを明らかにした。

中枢神経における興奮性シナプス伝達は、シナプス前末端 (varicosity) からグルタミン酸が放出され、シナプス間隙を経て、シナプス後細胞の棘突起 (spine: スパイン) に存在する、グルタミン酸受容体に結合しシナプス後細胞を活性化させることにより行われる (順行性伝達: 図 1 A, 2)。シナプス前末端と棘突起は 2 つの独立した構造であるが、協調して発達することがわかっている¹⁾。この協調関係の機構を説明するには順行性伝達だけではなく逆行性伝達が存在し、双方向で情報伝達することが重要であると考えられる。これまで、逆行性伝達物質として、アラキドン酸、エンドカナビノイド等の分子が報告されているが、それらの分子がシナプスの協調機構に関与しているという報告はなかった。そこでわれわれは、シナプス後肥厚に存在する PSD-95 に着目した。PSD-95 は MAGUK (membrane associated guanylate kinase) タンパク質の 1 つで、PDZ, SH3, GK という 3 つの特徴的なドメイン構造をもち、それらを介してさまざまなタンパク質と結合することが知られている構造タンパク質である。PSD-95 を海馬単離培養細胞に強制発現するとスパインは成熟し、AMPA 型グルタミン

酸受容体 (AMPA) 応答が増大することが報告されていたが、この効果は主としてシナプス後部の AMPAR の数が増大することによるものであると考えられ、PSD-95 が伝達物資放出機構へ寄与しているかどうかは着目されなかった²⁾。しかし、PSD-95 を強制発現したシナプスのシナプス前末端は末端特異的タンパクの免疫染色強度が増大することが報告されていたため、PSD-95 が逆行性にシナプス前末端へ何らかの機能的な修飾をしているのではないかと考えた。

シナプス後部の PSD-95 がシナプス伝達物質放出確率を制御する

われわれはラット海馬スライス培養を作製し、遺伝子銃により PSD-95 を強制発現した。強制発現された CA1 錐体細胞と近傍の対照細胞に全細胞記録し、CA3 錐体細胞からの Schaffer 側枝を刺激し、AMPA を介したシナプス後電流 (excitatory postsynaptic current: EPSC) を記録した。伝達物質放出確率は PPR (paired-pulse ratio) により判定した。これまでの研究から PPR と放出確率は逆相関しており、PPR が減少すると放出確率は増大していると考えられてきたの

Retrograde modulation of presynaptic release probability through signaling mediated by PSD-95-neuroigin
Kensuke Futai/Yasunori Hayashi : RIKEN-MIT Neuroscience Research Center, The Picower Institute for Learning and Memory, Massachusetts Institute of Technology (マサチューセッツ工科大学 Picower 学習・記憶研究機構理研-MIT 脳科学研究センター)

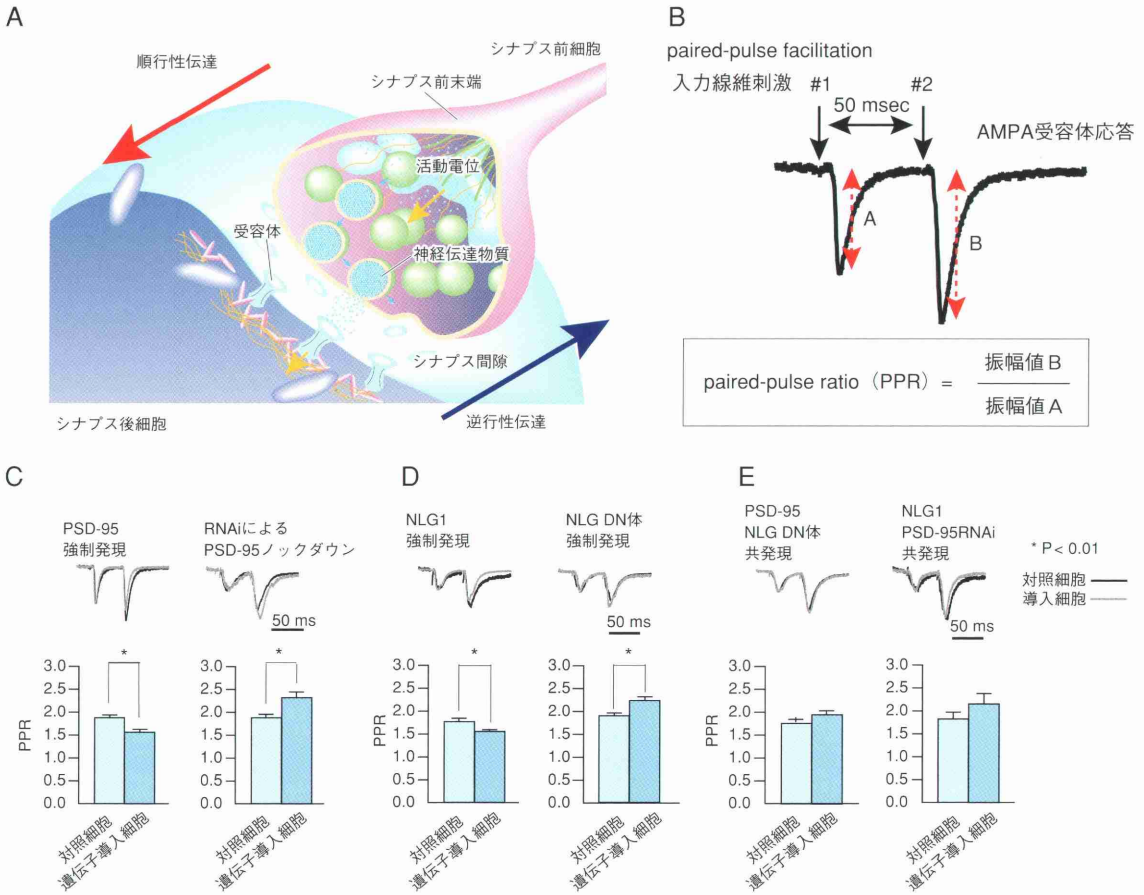


図1 シナプス後部のPSD-95とNLGはシナプス伝達物質放出確率を制御する

A) シナプスの形態。ピンク色で示したものがシナプス前末端、水色で示したものがシナプス後細胞の棘突起（スパイン）。両者には、シナプス間隙とよばれる隙間があり、神経伝達物質を介して情報をやり取りしている（文献6より改変転載）。B) PPF (paired-pulse facilitation) の測定法。PPFは入力線維を短時間に2回刺激した時に2回目の応答が増大する促進現象で、放出確率が増大することによって起こる。以下の実験では、2回目の応答の振幅値(B)を1回目の振幅値(A)で割った比(PPR)を遺伝子修飾した細胞群と対照細胞群間で比較している。C) PSD-95を強制発現するとPPRは減少し(左)、RNA干渉(RNAi)によりPSD-95タンパク質レベルを抑制するとPPRは増大した(右)。D) NLG1を強制発現するとPPRは減少し(左)、NLGの優勢抑制体(DN体)により内在性NLG機能を抑制するとPPRは増大した(右)。E) PSD-95強制発現下でNLGの機能を阻害するとPPRの変化は消失した(左)。さらにNLG1強制発現下で、PSD-95タンパク質レベルをRNAiにより抑制するとPPRの変化は消失した(右)

で、今回はその性質を放出確率の指標として用いた(図1B)³⁾。PSD-95を強制発現した細胞からのAMPA-EPSCによるPPRは対照細胞のPPRに比べて、有意に減少したことから、PSD-95は放出確率を増大させることが示された。しかしこの実験は強制発現という特殊な条件下で誘導された現象であり、内在性のPSD-95が放出機能に寄与しているかはわからない。そこでRNA干渉法を利用して内在性のPSD-95

のタンパク質発現レベルを減少させたところ、放出確率は減少した。このことからシナプス後部のPSD-95の発現レベルに応じて、放出確率が変化することが示された(図1C)。

シナプス後部のニューロリギンがシナプス伝達物質放出確率を制御する

われわれはPSD-95はシナプス後肥厚内に存在する

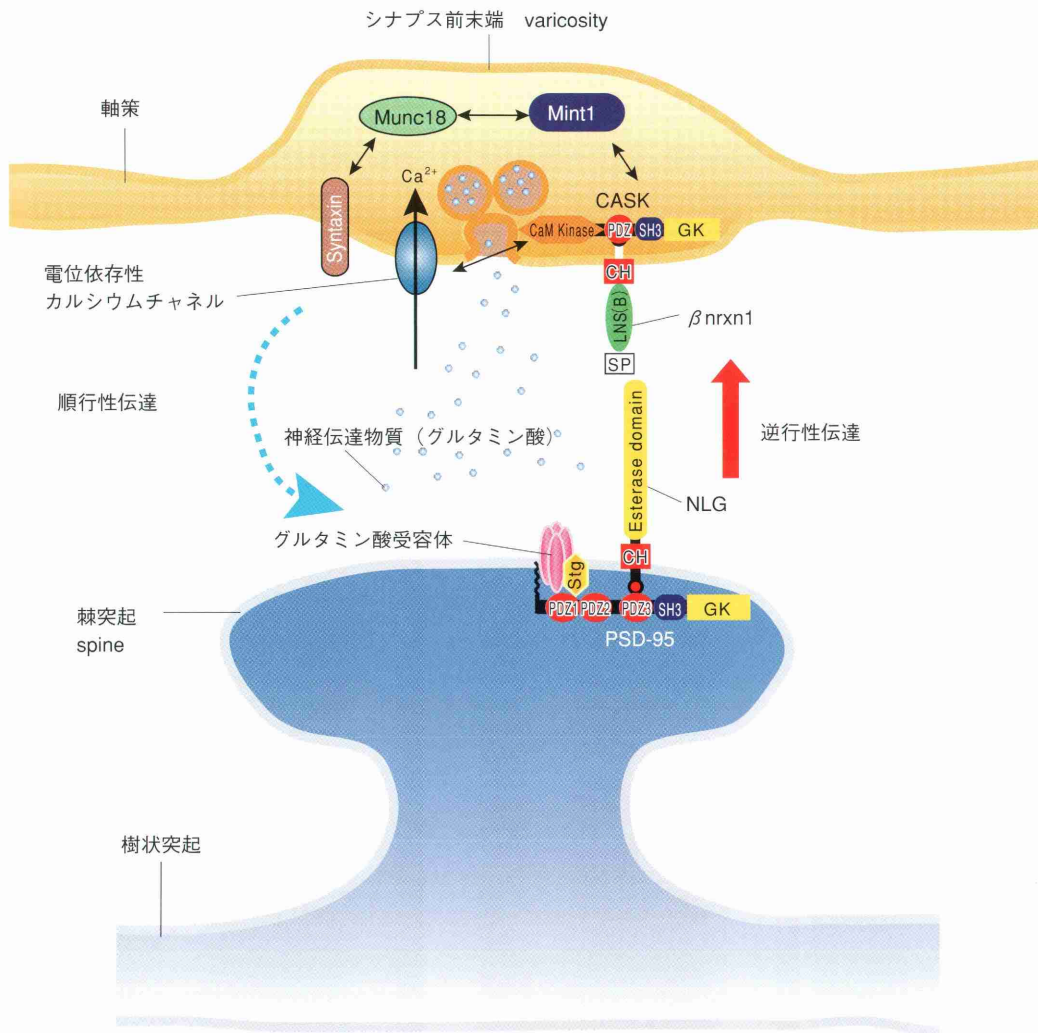


図2 PSD-95とNLGを介した逆行性情報伝達モデル

棘突起に存在するPSD-95および接着因子のNLGと β nrxn1を介して、シナプス後細胞から発せられる情報をシナプス前細胞が受け取り、グルタミン酸の放出確率が增大する。 β nrxn1はCASKというMAGUKタンパク質を介して電位依存性カルシウムチャネルやさまざまな伝達物質放出タンパク質と結合することで放出確率を制御していると考えられる

構造タンパク質であり、それ自身ではシナプス前末端へ作用することはできないため、PSD-95を介した逆行性シグナルはタンパク質相互作用を介しているのではないかと考えた。そこで、PSD-95に結合し細胞外ドメインをもつニューロリギン (neuroigin : NLG) に着目した⁴⁾。NLGはシナプス後部に存在する接着因子として知られており、細胞外ドメインを介して、シ

ナプス前末端に存在する β -ニューレキシン1 (β -neurexin : β nrxn1) と結合することが知られている。NLGのサブタイプの1つであるNLG1を強制発現したところ、PSD-95同様に放出確率は増大した。また内在性のNLGの機能を優勢抑制体 (dominant negative : DN体) を強制発現することにより抑制させたところ、放出確率が減少した (図1D)。よって、

NLGを介したシナプス間の接着作用がシナプス機能にも作用していることが示唆された。

PSD-95とNLGの効果には互いのタンパク質間相互作用が重要である

PSD-95またはNLGの遺伝子導入により、放出確率が同様に変化しても、2つのタンパク質が相互作用しているとは限らない。そこで、PSD-95の強制発現下で、NLGの機能をDN体により阻害する実験と、NLG1強制発現下でPSD-95のタンパク質レベルを減少させる実験を行った。もしそれぞれのタンパク質の効果が結合タンパク質に依存している場合、逆行性の効果はなくなることが予想される。結果はPSD-95もしくはNLG1単一の強制発現でみられた、PPRへの効果はみられなくなった(図1E)。よってPSD-95、NLG1の強制発現の効果には、お互いの結合が必要であると考えられる。

シナプス前部のニューレキシンが伝達物質放出確率を制御する

最後に、シナプス前末端に存在する β nrxn1のシナプス伝達に対する寄与を解析した。この実験は、 β nrxn1を強制発現させたシナプス前細胞に伝達物質放出を誘導させ、シナプス後細胞からEPSCを記録する必要があるため、その目的にはCA3からCA1への投射線維ではなく、CA3領域の連合線維を対象にした。CA3領域の錐体細胞は連合線維を介して、回帰性シナプス(CA3シナプス)を形成しており、無作為に2つのCA3錐体細胞へ全細胞記録をすると約50%の確率でシナプス応答を観測できる。CA3シナプスにおいてもPSD-95とNLGの逆行性情報伝達がみられることを確認した後、内在性の β nrxn1の機能をDN体により阻害したところ、放出確率は減少したことから、 β nrxn1は放出確率に寄与していることが示唆された。よって、PSD-95はNLG- β nrxn1とのタンパク質間相互作用により放出確率を制御していると考えられる(図2)。

おわりに

NLGと β nrxn1の結合がどのような機構で放出確率を制御しているのかは今回の報告ではわかっておらず、今後さらなる研究が必要である。今回の報告は接着因子の新たな機能を提示する発見であり、他の接着因子に関しても同様の研究を行うことによりシナプスの双方向情報伝達機構が解明されることが期待される。また、NLGと β nrxn1はともに自閉症の原因遺伝子であることが報告されており⁵⁾、今回のタンパク質間相互作用の機能意義をさらに研究することは自閉症の分子機能を明らかにする鍵となるかもしれない。

文献

- 1) Shepherd, G. M. & Harris, K. M.: Three-Dimensional Structure and Composition of CA3CA1 Axons in Rat Hippocampal Slices: Implications for Presynaptic Connectivity and Compartmentalization. *J. Neurosci.*, 18: 8300-8310, 1998
- 2) El-Husseini, A. E. et al.: PSD-95 Involvement in Maturation of Excitatory Synapses. *Science*, 290: 1364-1368, 2000
- 3) Zucker, R. S. & Regehr, W. G.: Short-term synaptic plasticity. *Annu. Rev. Physiol.*, 64: 355-405, 2002
- 4) Irie, M. et al.: Binding of Neuroligins to PSD-95. *Science*, 277: 1511-1515, 1997
- 5) The Autism Genome Project Consortium.: Mapping autism risk loci using genetic linkage and chromosomal rearrangements. *Nature Genetics*, 39: 319-328, 2007
- 6) 理化学研究所脳科学総合研究センターウェブサイト:
http://www.brain.riken.go.jp/japanese/g_braaw/g5_top.html

● 筆頭著者プロフィール ●

二井健介: 2001年東京大学医学部機能生物学専攻博士後期課程修了, 同年よりマサチューセッツ工科大学, Picower 学習・記憶研究機構に研究員として所属。'02~'05年理化学研究所脳科学総合研究センター・基礎科学特別研究員兼任。接着因子と逆行性伝達物質がどのような機構を介してシナプス機能へ関与しているか明らかにしていきたい。