

微小管結合蛋白による NMDA 受容体輸送調節と神経可塑性

Microtubule-Binding Proteins Support Synaptic Plasticity by Regulating Transport of NMDA Receptors

武井陽介^a, 廣川信隆^b

Yosuke Takei and Nobutaka Hirokawa

^a筑波大学医学医療系 解剖学・神経科学研究室, 人間総合科学研究科感性認知脳科学^b東京大学大学院医学系研究科 分子構造・動態・病態学講座

要旨 神経細胞相互の情報のやりとりはシナプスで行われる。神経伝達が効率よく行われるためには、受容体がシナプスに集積されることが必要であるが、この輸送メカニズムには不明な点が多い。モーター分子群キネシンスーパーファミリー蛋白は、ATP の加水分解により生ずるエネルギーを使って微小管上を移動し、受容体などの膜蛋白や細胞骨格蛋白複合体等多様なカーゴの細胞内輸送を行う。そのひとつ KIF17 は NMDA 型グルタミン酸受容体サブユニット 2B (NR2B) を輸送し、この輸送が記憶・学習・神経可塑性に必須の基盤となっている。輸送の制御は神経活動依存的に行われ、リン酸化によるカーゴの荷おろし、CREB を介した KIF17 の生合成増加などが明らかになった。一方、非モーター微小管関連蛋白 MAP1A による受容体輸送サポートが存在することも解明され、全体として NMDA 受容体輸送が多段階制御下に輸送されている様子がわかりつつある。

キーワード：NMDA 受容体, 細胞内輸送, キネシンスーパーファミリー蛋白, 微小管関連蛋白, 神経可塑性

1. はじめに

動物が環境に適応し生き延びていくためには、絶えず周囲の状況を認知し、記憶し、過去の記憶と照合しながら自分の行動パターンを変えていかなければならない。そのための生理学的な基盤が神経回路の可塑性である。神経細胞に内在する可塑性メカニズムは海馬錐体細胞において分子レベルで詳細に調べられているが、最も重要な働きをしているのが N-methyl-D-aspartate (NMDA) 受容体である。

NMDA 受容体は、イオンチャネル型グルタミン酸受容体であり、NR1 および NR2 を含むヘテロ 4 量体となって機能する。NR2 のサブユニットには NR2A, NR2B, NR2C, NR2D の 4 種あるが、海馬錐体細胞では NR2A と NR2B が機能的に重要である。静止膜電位では NMDA 受容体は細胞外マグネシウムによってチャネル活性がオフになっている。神経細胞が高頻度刺激されるとマグネシウムイオンが外れ、チャネルは陽イオンを通過させる。NMDA 受容体活性化はカルシウムイオンの細胞内流入に続いて Ca²⁺/カルモジュリン依存性プロテインキナーゼ II (CaMKII) 等を含むリン酸化経路の活性化を引き起こし、長期増強や長期抑制を誘導する。

NMDA 受容体が機能するためには、細胞体や樹状突起で生合成された後、樹状突起の内部をシナプス後部へ運ばれ、

最終的に膜表面に発現される必要がある。このような NMDA 受容体輸送システムには微小管を利用するもの、アクチン線維を利用するもの等が存在するが、NMDA 受容体に関しては微小管依存性輸送が比較的詳細に明らかにされている。そこで今回の小論では微小管を基盤に働く蛋白と、その調節機構に焦点をあてて概覧する。

2. 微小管依存性の NMDA 受容体輸送

微小管は直径 25 nm の中空円筒状の細胞骨格であり、 α -チューブリンと β -チューブリンが 1:1 に結合したヘテロ二量体を基本単位として作られている。個々の微小管では α -チューブリンと β -チューブリンが一定の向きに配列されるため、プラス端とマイナス端が区別される。このような微小管の極性を基礎として、分子モーターによる輸送の方向性が決定されている。微小管に結合して細胞内輸送を行う分子モーターは、キネシン関連分子モーターと細胞質ダイニンに大きく分けられ、どちらもアデノシン三リン酸を加水分解する酵素であり、その際に発生するエネルギーを利用して微小管上を移動する。キネシン関連分子モーターのほとんどは微小管上をマイナス端からプラス端に向かって移動する順行性の分子モーターであり、細胞質ダイニンと一部のキネシン関連分子モーターはプラス端からマイナス端に向かって移動する逆行性の分子モーターである。キネシン関連分子モーターにはヒトあるいはマウスで 45 種の遺伝子が存在し、それら

^a〒 305-8575 茨城県つくば市天王台 1-1-1

2015 年 12 月 9 日受付

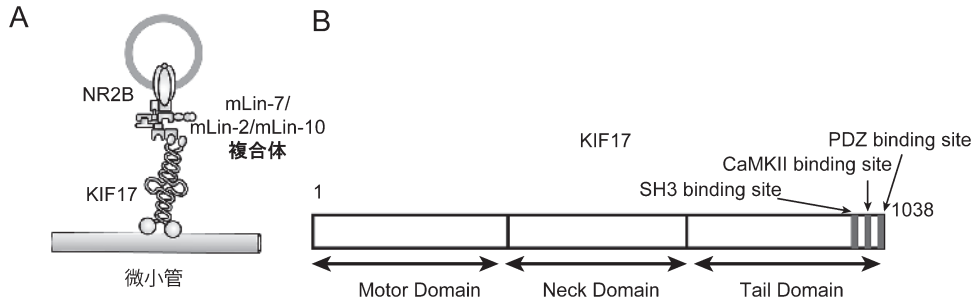


図1 KIF17. A, NMDA 受容体を微小管上で輸送する KIF17. B, KIF17 の一次構造.

は1次構造に基づいて Kinesin-1 から Kinesin-14 までの 14 のファミリーに分類されている¹⁾.

KIF17は Kinesin-2 ファミリーに属する 170 kDa の分子モーターであり、NMDA 受容体サブユニット NR2B を輸送する²⁾. KIF17 は直接 NR2B に結合するのではなく、KIF17 の C 末端にあるカーゴ結合ドメインが mLin-10 (Mint1/X11) に結合する. mLin10 は mLin-2 (CASK), mLin-7 (MALS/Veils), NR2B と蛋白複合体を形成する (図 1A). KIF17 は海馬, 大脳新皮質, 大脳基底核等, 終脳を中心とした部位の成熟した神経細胞に強く発現し, 免疫細胞化学で細胞内局在を調べると樹状突起シャフトに強いシグナルが見られる.

蛍光タグを融合させた全長 KIF17 蛋白 (YFP-KIF17) を分散培養したマウス海馬神経細胞 (16.5 日胚から採取して培養 10 日) に発現させ, ライブイメージングを行うと, 小さな小胞様構造が樹状突起に局在し, 順行性または逆行性に平均 $0.76 \mu\text{m}/\text{sec}$ の速度で移動していた³⁾. この小胞様構造は, 樹状突起シャフトに局在し, シナプス領域には侵入しなかった. Yin らの実験によれば, NR2B-EGFP の移動速度は $0.71 \mu\text{m}/\text{sec}$ (培養 9 日海馬分散培養) と KIF17 の移動速度に近い値を示した⁴⁾. Yin らの報告では, NR2A-EGFP の動きは $1.0 \mu\text{m}/\text{sec}$ とやや速い.

一方, Washbourne らは, 蛍光タグを融合させた NR1 のライブイメージングを分散培養したラット大脳皮質神経細胞 (新生児から採取して培養 3 日) を用いて行い, 輸送されるクラスターの速度を $4 \mu\text{m}/\text{sec}$ としている⁵⁾. この輸送クラスターの 90.5% が NR2B を含んでおり, Guillaud や Yin らの報告と比較して, 非常に速い動きを示している. この差が種差, 神経細胞の成熟度, 培養条件などいずれの相違に起因するものか今のところ不明であるが, 何らかの分子機構の差異を示しているとすれば興味深い. Washbourne らの観察した NR1 の動きはビンブラスチンで抑制されることから, 微小管依存性の輸送を見ていることは確かである.

3. NMDA 受容体輸送と神経可塑性, 記憶学習

Yin らは KIF17 ノックアウトマウス (*kif17*^{-/-} マウス) を作製して神経可塑性における KIF17 の役割を検討した⁴⁾. GFP-NR2A と GFP-NR2B を神経細胞に発現させライブイメージングを行ったところ, *kif17*^{-/-} マウスの神経細胞樹状突起

内部では NR2B の輸送低下が見られたが, NR2A の輸送は正常であった. 海馬急性スライスを作製し, CA1 領域において Schaffer 側枝-CA1 錐体細胞シナプスで電気生理学的実験を行い, 野生型と *kif17*^{-/-} マウスの間で比較した. *kif17*^{-/-} マウス神経細胞は, シナプスの入出力と二連発刺激促進 (PPF) に差がなく, *kif17*^{-/-} マウス神経細胞のシナプスの応答性や短期可塑性は保たれていることがわかった. 一方, 高頻度刺激で誘発される長期増強や低頻度刺激で誘発される長期抑制が低下していた. ホールセルパッチクランプ法を用いて錐体細胞の NMDA 受容体依存性シナプス後電流 (EPSC) を測定したところ, *kif17*^{-/-} マウス神経細胞では野生型と比較して減少していることがわかった. 以上から, *kif17*^{-/-} マウスでは NMDA 受容体機能低下とそれに基づく神経可塑性の低下が起きていることが示された. *kif17*^{-/-} マウスでは Morris 水迷路における空間記憶, 恐怖条件付け学習の文脈テストなど, 海馬依存性記憶の低下が認められた.

4. リン酸化による輸送制御

NMDA 受容体などの輸送は, いつも一定の速度で一定の量を目的地に運んでいるわけではなく, 神経活動の影響下にある. 代表的な例がリン酸化による制御である. KIF17 の場合, C 末端に存在するカーゴ結合領域で mLin-10 と結合する. KIF17 カーゴ結合領域には SH3 ドメイン, CaMKII 結合ドメイン, PDZ ドメインが隣接して配列している⁶⁾ (図 1B). 海馬分散培養神経細胞を用いた免疫細胞化学では, CaMKII と KIF17 が樹状突起で共局在していた. Guillaud らは, Neuro2A 細胞で強制発現とペプチドのマイクロインジェクションを組み合わせ蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET) を行う系を立ち上げ, KIF17 と mLin-10 の相互作用を可視化した⁶⁾. その結果, Ser 1029 が CaMKII によってリン酸化されると KIF17 と mLin-10 の相互作用が低下し FRET シグナルが減弱する. これらの結果は, 神経細胞で CaMKII によって KIF17 Ser1029 がリン酸化されるとカーゴが分子モーターから外れ, シナプス後部近傍の樹状突起シャフトにおいて『荷おろし』が行われることを示唆する.

このような KIF17 Ser1029 のリン酸化による輸送制御が果たして脳の中で実際に起きているのか検討するために, Yin らはリン酸化状態を模倣する三種類の正常及び変異 KIF17

を発現するトランスジェニックマウスを作製し解析した⁷⁾。まず野生型の全長 KIF17 を発現するベクター、Ser1029 のリン酸化状態を模倣する変異 KIF17 を発現するベクター (S1029A), Ser1029 のリン酸化状態を模倣する変異 KIF17 を発現するベクター (S1029D) を作製し, CaMKII プロモーターの下流で外来遺伝子を発現するトランスジェニックマウスを作製し (ライン名 TgS, TgA, TgD) 更に外来遺伝子を *kif17*^{-/-} のバックグラウンドで発現する 3 系統が作製された (TgS/*kif17*^{-/-}, TgA/*kif17*^{-/-}, TgD/*kif17*^{-/-})。TgA/*kif17*^{-/-} と TgD/*kif17*^{-/-} マウスでは *kif17*^{-/-} マウスと同様に NR2B の樹状突起内輸送とシナプス分布の低下, および NMDA 受容体依存性の興奮性シナプス後電流低下, Morris 水迷路での記憶障害が確認された。TgS/*kif17*^{-/-} マウスではこれらの異常がレスキューされていた。プレフェルジン A を用いた post-Golgi 輸送の比較では, TgD/*kif17*^{-/-} マウス神経細胞では NR2B の樹状突起内輸送が低下しているのに対し, TgA/*kif17*^{-/-} マウス神経細胞では NR2B の樹状突起内輸送低下はみられないがシナプス表面への発現が減少していた。この結果は細胞レベルで示されたリン酸化による荷おろしの機構が生体内でも行われていることを示唆している。

5. 分子モーターとカーゴの量による輸送制御

野生型マウスにモリス水迷路トレーニングを行い, 空間記憶が形成されると, 海馬錐体神経細胞の KIF17 と NR2B が増加する⁴⁾。同時に Ser-133 がリン酸化された活性化型 CREB が増加することと, KIF17 遺伝子と NR2B 遺伝子の 5' 側発現調節領域に CREB 結合ドメインが存在することから⁸⁾, KIF17 と NR2B の発現量は神経活動依存性に CREB 活性化を介して制御されていると考えられる。

一方, *kif17*^{-/-} マウスの神経細胞では KIF17 と NR2B 両者の蛋白発現量とメッセンジャー RNA 量が低下し, 逆に, KIF17 の過剰発現トランスジェニックマウスでは増加していた。また, 活性化型 CREB の量も *kif17*^{-/-} マウスの神経細胞で減り, KIF17 の過剰発現トランスジェニックマウスでは増えていた。これらのデータは, 分子モーター KIF17 の量が CREB の活動レベルを決め, CREB の活動レベルが逆に KIF17 と NR2B のレベルを決めるという機能的相互作用の存在を示唆している。実際, 海馬神経細胞に CREB のドミナントネガティブ変異体を発現させると KIF17/NR2B レベルは低下し, 活性

化型固定化 (CA, constitutive active) 変異体では増大する。KIF17 の過剰発現トランスジェニックマウスはモリス水迷路の空間記憶形成が野生型マウスよりも速かった⁸⁾。

以上の研究は, 神経細胞の活動に依存するかたちでモーター (KIF17) とカーゴ (NR2B) の量が共に変化し, 記憶・学習のような脳機能を調節している可能性を示唆している。マウス以外で同様の例としては, アメフラシのエラ引き込み反射に関わるニューロンでセロトニン反復投与により長期促進が起きるが, この際にキネシン重鎖のアップレギュレーションが必要とされることが報告されている⁹⁾。

6. 微小管関連蛋白による輸送サポート

微小管関連蛋白 (Microtubule-associated Proteins: MAPs) は, 微小管に結合する一群の蛋白であり, キネシン関連分子のようなモーター活性を持たない。神経系で多く発現するものに, Tau, MAP1B, MAP1A, MAP2 がある。この中で, Tau, MAP1B, MAP2, は軸索や樹状突起の形態形成や成長円錐の運動性に関わることが報告されていたが¹⁰⁾, MAP1A のみ長年機能が不明のままだった¹¹⁾。

MAP1A は分子量 350 kDa の大きな蛋白であり, 翻訳後に heavy chain (重鎖) と light chain 2 (LC2, 軽鎖) に分解され, 重鎖と軽鎖は複合体をつくる (図 2A)。MAP1A が微小管に結合するためには軽鎖と重鎖の両方が必要である¹²⁾。その後 Brecht らによりシナプス後部に集積し NMDA 受容体の足場を形成する蛋白 PSD-93 と MAP1A が結合することが示され, シナプス機能に関与する可能性が示唆された (図 2A, 2B)¹³⁾。MAP1A 側の結合ドメインは重鎖の C 末端寄りの短い領域で, PSD-93 及び PSD-95 の Guanylate kinase (GK) ドメインと結合する¹³⁾。

MAP1A ノックアウトマウス (*map1a*^{-/-} マウス) は恐怖条件付け学習で記憶低下が認められた¹⁴⁾。海馬急性スライスを用いた実験では *map1a*^{-/-} マウスにおいて長期増強, 長期抑制, NMDA 受容体依存性シナプス後電流が低下しており, NMDA 受容体機能低下とそれに基づく神経可塑性の低下が起きていることが示された。*map1a*^{-/-} マウス神経細胞では NR2A と NR2B の細胞全体での発現量には差がないが, 細胞表面へ発現して機能する受容体が減っていた。更に, EGFP-NR2A と EGFP-NR2B を細胞に導入してライブイメージングを行ったところ, *map1a*^{-/-} マウス神経細胞では EGFP-NR2A

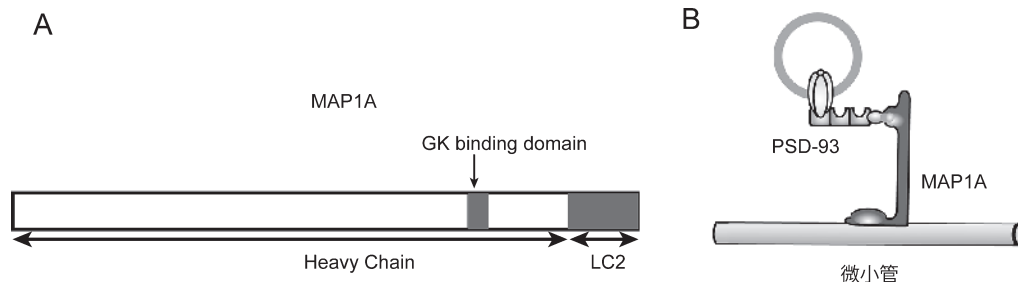


図 2 MAP1A. A, MAP1A の一次構造。LC2, light chain2. B, 微小管上で NMDA 受容体を繫留する MAP1A と PSD-93 の複合体。

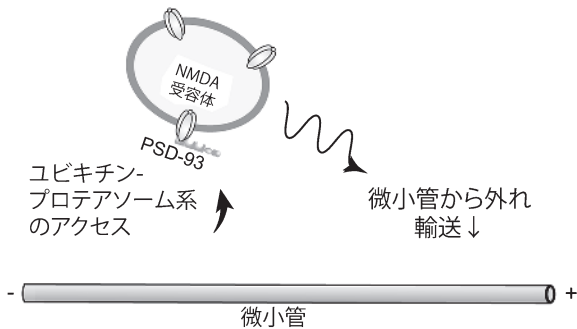


図3 MAP1A ノックアウトマウス神経細胞でのNMDA受容体輸送異常.

とEGFP-NR2Bの輸送が共に低下していた。*map1a*^{-/-}マウス神経細胞では野生型と比較して微小管ポリマーとPSD-93間の結合が低下していた。高カリウムによる脱分極刺激で神経細胞を刺激すると、PSD-93が分解されるが、*map1a*^{-/-}マウス神経細胞では野生型と比較してこの分解が亢進していることがわかった。

以上から、*map1a*^{-/-}マウス神経細胞では①NR2A, NR2B輸送低下、②PSD-93の微小管からの離脱傾向、③PSD-93不安定化、があることがわかった。すなわち樹状突起でMAP1AはPSD-93とNR2A/NR2Bの複合体を微小管に繫留しているが、*map1a*^{-/-}マウス神経細胞では図3に示すようにこの繫留が失われてNR2A/NR2Bの輸送効率が低下したり、PSD-93が蛋白分解を受けやすくなったりしていることが推察された。すなわちMAP1Aによる繫留機構がNMDA受容体輸送と局在の安定性を高めていると考えられる。

7. まとめ

以上述べたように、NMDA受容体の輸送は多段階の調節を受けている。すなわち、a)リン酸化による『荷おろし』、b)分子モーターとカーゴの生合成増加による量的増強、c)細胞骨格への繫留による安定化機構、などによる複数の制御システムの存在が明らかになった。a), b)は神経活動依存性の、c)は神経活動非依存性のメカニズムである。

これらの輸送制御機構の使い分け、NMDA受容体以外の

神経伝達物質受容体輸送の制御、a)の荷おろし後、シナプスで膜表面に発現するまでの輸送メカニズム等、不明な点が多いが、これらを明らかにすることによって神経可塑性分子機構の基本的理解が進むことが期待される。

謝 辞

本研究の一部は、文部科学省科学研究費補助金・特別推進研究及び日本医療研究開発機構(AMED)の「脳機能ネットワークの全容解明プロジェクト」(平成27年度に文部科学省より移管)の支援によって行われた。

文 献

- 1) Hirokawa, N., Niwa, S. and Tanaka, Y.: *Neuron*, **68**, 610–638 (2010)
- 2) Setou, M., Nakagawa, T., Seog, D.H. and Hirokawa, N.: *Science*, **288**, 1796–1802 (2000)
- 3) Guillaud, L., Setou, M. and Hirokawa, N.: *J. Neurosci.*, **23**, 131–140 (2003)
- 4) Yin, X., Takei, Y., Kido, M.A. and Hirokawa, N.: *Neuron*, **70**, 310–325 (2011)
- 5) Washbourne, P., Bennett, J.E. and McAllister, A.K.: *Nat. Neurosci.*, **5**, 751–759 (2002)
- 6) Guillaud, L., Wong, R. and Hirokawa, N.: *Nat. Cell Biol.*, **10**, 19–29 (2008)
- 7) Yin, X., Feng, X., Takei, Y. and Hirokawa, N.: *J. Neurosci.*, **18**, 5486–5499 (2012)
- 8) Wong, R.W., Setou, M., Teng, J., Takei, Y. and Hirokawa, N.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **99**, 14500–14505 (2002)
- 9) Puthanveetil, S.V., Monje, F.J., Miniaci, M.C., Choi, Y.B., Karl, K.A., Khandros, E., Gawinowicz, M.A., Sheetz, M.P. and Kandel, E.R.: *Cell*, **135**, 960–973 (2008)
- 10) Takei, Y., Teng, J., Harada, A. and Hirokawa, N.: *J. Cell Biol.*, **150**, 989–1000 (2000)
- 11) Hirokawa, N.: *Curr. Opin. Cell Biol.*, **6**, 74–81 (1994)
- 12) Chien, C.L., Lu, K.S., Lin, Y.S., Hsieh, C.J. and Hirokawa, N.: *Exp. Cell Res.*, **308**, 446–458 (2005)
- 13) Brenman, J.E., Topinka, J.R., Cooper, E.C., McGee, A.W., Rosen, J., Milroy, T., Ralston, H.J. and Brecht, D.S.: *J. Neurosci.*, **18**, 8805–8813 (1998)
- 14) Takei, Y., Kikkawa, Y.S., Atapour, N., Hensch, T.K. and Hirokawa, N.: *J. Neurosci.*, **35**, 15539–15553 (2015)