

47. スパイン内 NMDA 受容体輸送機構の解明

武井 陽介

筑波大学 医学医療系 解剖学・神経科学研究室

Key words : NMDA 受容体, シナプス, 細胞内輸送, MAP1A, 神経可塑性

緒言

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 Ca^{2+} /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 (Long-term potentiation, LTP) や長期抑制 (Long-term depression, LTD) 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¹⁾、分子モーター KIF17 によるものがとりわけ詳細に調べられている²⁾。今回我々は、微小管関連蛋白 MAP1A による新しい NMDA 受容体輸送システムサポート機構を見出したので報告する。

方法および結果

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³⁾。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、MAP1A のみ長年機能が不明のままだった⁴⁾。

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⁴⁾。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 (図 1A)。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 1B)。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。

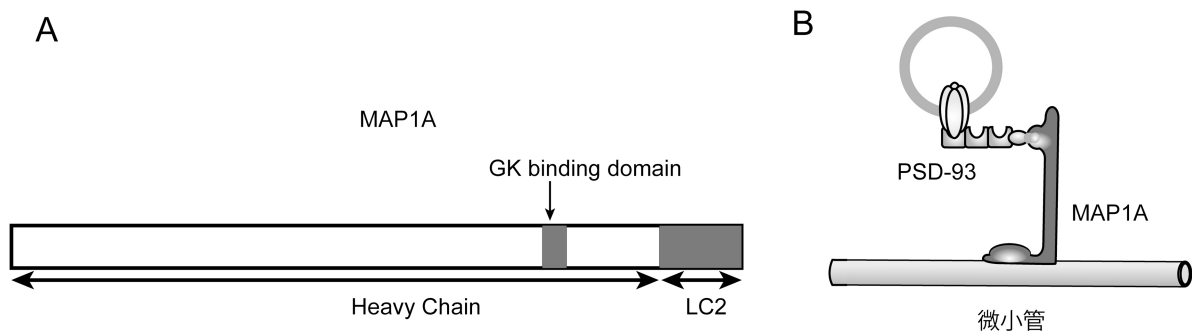


図1. MAP1A 分子

(A) MAP1A 重鎖。(B) PSD-93 と NMDA 受容体の複合体が MAP1A を介して細胞骨格 (微小管) に繋留されている。

我々は、MAP1A の生体内での機能を知るため、MAP1A ノックアウトマウス (*map1a*^{-/-}マウス) を作製し、野生型マウス (*map1a*^{+/+}マウス) と比較した。この変異マウスは恐怖条件付け学習で記憶低下が認められた (図 2A: 恐怖文脈条件付け、図 2B: 恐怖音条件付け)。

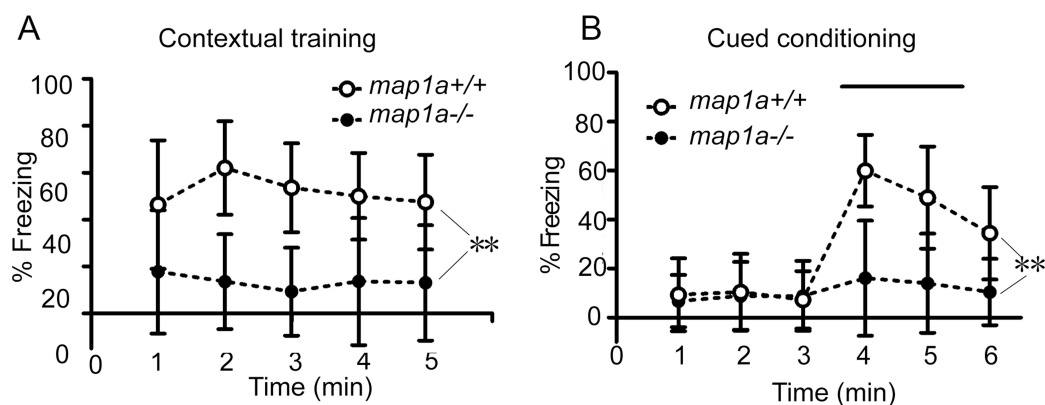


図2. 恐怖条件付け

恐怖条件付け。野生型マウスと MAP1A ノックアウトマウスの比較。

(A) 恐怖文脈条件付け。** $p < 0.01$ 、two-way ANOVA。(B) 恐怖音条件付け。** $p < 0.01$ 、two-way ANOVA。

海馬急性スライスを用いた実験では、海馬 CA1 領域の Schaffer collateral-CA1 シナプスにおいて、*map1a*^{-/-}マウスでは長期増強、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 (図 3A、3B、3C)。

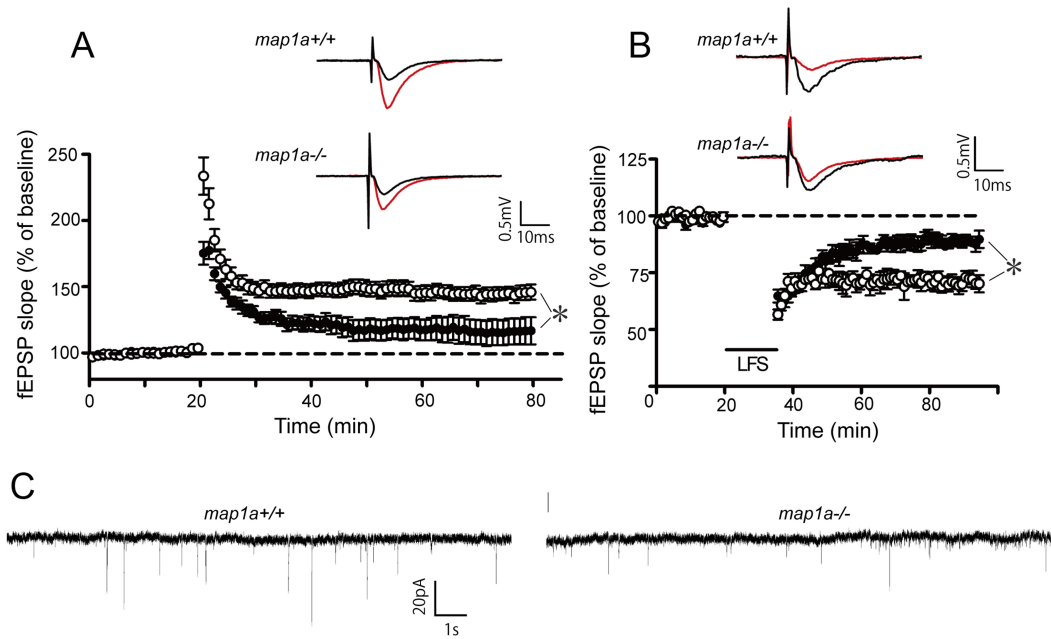


図3. 電気生理学的解析

(A) 長期増強 (LTP)。* $p < 0.05$, two-way ANOVA。(B) 長期抑制 (LTD)。* $p < 0.05$, two-way ANOVA。

(C) NMDA 受容体による mEPSC。いずれも野生型と MAP1A ノックアウトマウスの比較。

一方、Paired Pulse Facilitation (PPF、短期可塑性)には異常が認められなかった。*map1a*^{-/-}マウス神経細胞では NR2A と NR2B の神経細胞全体での発現量には差がないが、神経細胞表面へ発現して機能する受容体が減っており、NMDA 受容体のシナプスへの輸送が低下していることが示唆された。一方、AMPA 型グルタミン酸受容体サブユニット GluR1、GABA_A 型受容体 $\beta 2/3$ サブユニット、メッセンジャー RNA 結合蛋白 Pur *a* などの樹状突起における局在には変化が見られなかった。更に、EGFP-NR2A と EGFP-NR2B を神経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 クラスターと EGFP-NR2B クラスターの動きが共に低下していた。動きの低下は両方向性であり、EGFP-NR2A と EGFP-NR2B の輸送が全体として低下していることが示唆された。生化学的な解析では *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 間の結合が優位に低下しており、NMDA 受容体-PSD-93 複合体が MAP1A の欠失のため細胞骨格から解離している可能性が示唆された。更に、高カリウムによる脱分極刺激で神経細胞を刺激すると、ユビキチン・プロテアソーム系の働きにより PSD-93 が分解されることが知られているが、*map1a*^{-/-}マウス神経細胞では野生型と比較してこの神経活動依存性の PSD-93 分解が亢進していることがわかった。

考 察

以上から、*map1a*^{-/-}マウス神経細胞では、① NR2A、NR2B 輸送低下 ② PSD-93 の微小管からの解離傾向 ③ PSD-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た。また、MAP1A ノックアウトマウスの神経細胞では、NMDA 受容体の輸送とシナプスでの安定性が共に減少し、NMDA 受容体のシナプス機能低下から海馬 CA1 シナプス可塑性減弱と記憶・学習障害を引き起こしていると考えられた。

NMDA 受容体の輸送は KIF17 C 末端リン酸化による『荷おろし』、分子モーターとカーゴの生合成増加による量的増強などにより調節を受けているが¹⁾、今回新たに「細胞骨格への繫留による安定化機構」が明らかにされ、多段階の輸送制御システムが神経可塑性分子機構を構成していると考えられている。また、最近では統合失調症の患者のニューロンに受容体輸送を示唆する所見が見つかるなど、受容体輸送と精神神経疾患との関わりが深いことがわかってきた。従って、今回明らかになった受容体輸送サポートシステムに働きかける薬物や遺伝子治療の開発により、記憶障害や統合失調症の新しい治療戦略が生まれることが強く期待される。

共同研究者

本研究の共同研究者は、東京大学大学院医学系研究科の廣川信隆、吉川弥生、Harvard University のヘンシュ貴雄である。最後に、本研究にご支援を賜りました上原記念生命科学財団に深く感謝いたします。

文 献

- 1) Hirokawa N, Tanaka Y. Kinesin superfamily proteins (KIFs): Various functions and their relevance for important phenomena in life and diseases. *Exp Cell Res.* 2015;334(1):16-25. DOI:10.1016/j.yexcr.2015.02.016. PubMed PMID:25724902.
- 2) Yin X, Takei Y, Kido MA, Hirokawa N. Molecular motor KIF17 is fundamental for memory and learning via differential support of synaptic NR2A/2B levels. *Neuron.* 2011;70(2):310-25. DOI:10.1016/j.neuron.2011.02.049. PubMed PMID:21521616.
- 3) Takei Y, Teng J, Harada A, Hirokawa N. Defects in axonal elongation and neuronal migration in mice with disrupted tau and map1b genes. *J Cell Biol.*2000;150(5):989-1000. PMCID:PMC2175245. PubMed PMID:10973990.
- 4) Hirokawa N. Microtubule organization and dynamics dependent on microtubule-associated proteins. *Curr Opin Cell Biol.*1994;6(1):74-81. PubMed PMID:8167029.