

主論文の要約

Girdin Phosphorylation Is Crucial for Synaptic Plasticity and Memory: A Potential Role in the Interaction of BDNF/TrkB/Akt Signaling with NMDA Receptor

Girdin のリン酸化はシナプス可塑性と記憶に極めて重要である：
NMDA 受容体と BDNF/TrkB/Akt シグナリングの相互作用における役割

名古屋大学大学院医学系研究科 細胞情報医学専攻
臨床薬物情報学講座 医療薬学分野

(指導：山田 清文 教授)

中井 剛

【緒言】

シナプス可塑性とは、神経活動に依存して化学的または電気的な信号伝達の効率を長期的に変える能力であり、特に海馬神経細胞においては様々な記憶の形成に関連していると考えられている。シナプス可塑性における強力な分子メディエーターとして brain-derived neurotrophic factor (BDNF) やその受容体である TrkB が挙げられ、学習や記憶に重要な役割を果たすと考えられている。また、セリン/スレオニンキナーゼである Akt は TrkB により活性化され、様々なリン酸化基質を介して、脳の発達、老化、神経変性および精神疾患に関与していることが知られている。アクチンに結合し様々な細胞の移動を調節する Akt の基質として Girdin が同定されている。これまでの研究により、Girdin は海馬の神経細胞の移動に重要であるが、その作用は Akt によるリン酸化に非依存的であることが示されている。今回、我々はシナプス可塑性に関与する BDNF/TrkB/Akt シグナリングにおけるリン酸化 Girdin の役割を解明するため、Akt による Girdin のリン酸化部位である 1416 番目のセリン残基 (Girdin S1416) をアラニンに置換し、Akt によるリン酸化を受けない *Girdin*^{SA/SA} マウスや *Girdin* ヘテロノックアウト (*Girdin*^{+/-}) マウスを用いて解析を行った。

【方法および結果】

TrkB/PIK3/Akt pathway を介した BDNF による Girdin S1416 のリン酸化の増加

胎生 15-16 日目の野生型 (*Girdin*^{+/+}) および *Girdin*^{SA/SA} マウスの海馬から初代培養海馬神経細胞を調製した。培養 14 日目に PBS (control) または BDNF (50 ng/mL) を処置した後、タンパクを回収して Western blotting 法により解析を行った (Fig. 1)。その結果、control 群と比べ、BDNF 処置群では Akt および Girdin のリン酸化が共に有意に上昇した (Fig. 1A-B)。また、Girdin S1416 のリン酸化の上昇は Trk inhibitor K252a、PI3-K inhibitor LY294002、Akt inhibitor IV によって阻害された (Fig. 1C-E)。

Girdin^{SA/SA} マウスの海馬におけるシナプスの形態と可塑性

8-12 週齢の *Girdin*^{+/+} および *Girdin*^{SA/SA} マウスの脳を 1.5% パラホルムアルデヒドで灌流固定し、200 μ m のスライスを作成した後、DiOlistic 標識した。海馬歯状回顆粒細胞 (DGCs) を共焦点顕微鏡により観察し、その樹状突起およびスパインを NeuroLucida software を用いて解析した。その結果、*Girdin*^{SA/SA} マウスの DGCs のスパインの体積および頭部直径は *Girdin*^{+/+} マウスのスパインと比べ有意に減少していた (Fig. 2)。

次に、*Girdin*^{SA/SA} マウスにおけるシナプスの特性について調べるために、8-12 週齢の *Girdin*^{+/+} および *Girdin*^{SA/SA} マウスの脳から 400 μ m の海馬急性スライスを作製し、電気生理学的解析を行った (Fig. 3)。その結果、*Girdin*^{SA/SA} マウスの DGCs では long-term potentiation (LTP) の障害が認められた (Fig. 3E-F)。さらに、記憶に重要な役割を果たすことが知られている NMDA 受容体と AMPA 受容体の電気刺激応答について調べ、それらの比である NMDA/AMPA ratio を比較した。*Girdin*^{SA/SA} マウスは *Girdin*^{+/+} マウスに比べ NMDA/AMPA ratio が有意に低下していた (Fig. 3I-J)。同様の障害は *Girdin*^{+/-}

マウスにおいても認められた (Fig. 3G,H,K,L)。

Girdin S1416 のリン酸化と NR2B のリン酸化の関連

LTP、記憶の形成、シナプス可塑性などへの関連が示唆されている NMDA 受容体サブユニットの NR2A および NR2B のリン酸化についてマウス海馬神経細胞を用いて調べた (Fig. 4)。Girdin^{+/+}マウス海馬神経細胞において、BDNF 処置により、NR2A のリン酸化には変化は認められなかったが、NR2B のリン酸化は有意に上昇した (Fig. 4A-B)。一方、Girdin^{SA/SA}マウス海馬神経細胞では、BDNF 処置による NR2B のリン酸化の上昇は認められなかった (Fig. 4E)。

Girdin と Src キナーゼおよび NR2B との相互作用

Girdin はキナーゼ活性を持たず、Src キナーゼと相互作用することが報告されている。そこで、Girdin と Src および NR2B との相互作用について調べた。Girdin-V5/Src/NR2B を強制発現させた HEK293T 細胞のタンパクを回収し、抗 NR2B 抗体で免疫沈降したところ、Girdin と Src は共免疫沈降した (Fig. 4F)。

Girdin^{SA/SA} および Girdin^{+/-}マウスの行動薬理学的解析

恐怖条件付け試験での訓練後に Girdin^{+/+}マウスの海馬 DG で Girdin S1416 のリン酸化が有意に上昇した (Fig. 5B)。そこで、7-20 週齢の雄性 Girdin^{SA/SA} および Girdin^{+/-}マウスの行動薬理学的解析を行った。両マウスは共に恐怖条件付け試験や新奇物体認知試験および水迷路試験によって評価される恐怖記憶、物体認知記憶および空間学習に障害が認められた (Fig. 6A-F)。情動行動については両マウス共に障害を認めなかった (Table 1)。

【考察】

本研究で BDNF が引き起こす Girdin S1416 のリン酸化は TrkB/Akt の下流で起こることが明らかとなった。また、海馬神経細胞における Girdin S1416 のリン酸化の欠損は、スパインの体積や頭部直径、LTP、NMDA/AMPA ratio、NR2B のリン酸化の減少を引き起こし、Girdin^{SA/SA} マウスでは記憶の障害が認められた。また、Girdin^{+/-}マウスは Girdin^{SA/SA} マウスと類似した電気生理学的特性や行動薬理学的表現型を示した。さらに、HEK293T 細胞において Girdin と NR2B および Src キナーゼとの相互作用が認められた。

以上の結果より、BDNF 刺激による Akt のリン酸化は Girdin S1416 のリン酸化を誘発し、Src キナーゼを介して NR2B のリン酸化 (NMDA 受容体の活性化) をもたらすものと考えられる。さらに、そのリン酸化は海馬でのスパインの微細構造変化 (シナプス後肥厚部の増加) と NMDA/AMPA ratio の増大と共に LTP の増強に参与していることが示唆される。Girdin S1416 のリン酸化は、シナプスの構造的および機能的な修飾と長期記憶の形成に関与しているものと思われる (Fig. 7)。

【結語】

Akt によって誘発される活動依存的な Girdin S1416 のリン酸化は、海馬の記憶形成の基礎となるシナプス可塑性に関わる NMDA 受容体の活性化に極めて重要な役割を果たすことが示唆された。