δ-catenin による樹状突起の形態変化誘導に関する解析

落石 知世・市川 眞澄*

近年、様々な解析技術の発達により、神経細胞への強力な興奮性の入力によりシナプス領域の形態変化が誘導されることが報告されている。特にフィロポディア(filopodia)の伸展と新たなスパインの形成は、シナプスの可塑性と深く関連していることが強く示唆されている。しかし、神経細胞の脱分極性のシグナルが細胞骨格系のシグナルに変換され、それがアクチン(actin)の再構築を促し樹状突起に変化を誘導するメカニズムについてはほとんど解析が進んでいない。そこで本総説では樹状突起からスパインや filopodia を誘導する役割を担う候補タンパク質の一つであるデルタカテニン(δ-catenin)について紹介する。

1. はじめに

デルタカテニン(δ-catenin)は yeast two-hybrid assay により、アルツハイマー病の原因遺伝子の一つであるプレセニン 1 (presenilin 1)のループ領域と結合するタンパク質として同定された¹⁴⁾。分子量は約132kDa で、哺乳類の脳に特異的に発現し、遺伝子の配列上にアルマジロリピート(Armadillo(Arm)-repeat)と呼ばれる42個のアミノ酸の繰り返し配列を10個有し^{11,14)}、アルマジロリピートスーパーファミリーに属する(図1)。このファミリーに属するタンパク質は Arm repeat の部分でカドヘリン(classical

図1 δ-catenin の構造と Arm-repeat superfamily A: δ-catenin は全長1225aa から成り、中央部分に10個の Arm-repeat をもつ。このドメインで cadherin と結合する。またC末に PDZ 結合モチーフをもち(DSWV)ここで Erbin, S-SCAM, PSD95 と結合する。その他 polyproline tract (216-226) や核移行シグナルも存在する(811-817)。B: Arm-repeat superfamily を示す。Armadillo protein はショウジョウバエの上皮細胞の極性に関連する遺伝子である。同じファミリーの属する β-catenin は13個の Arm repeat を持つ。

*Tomoyo OCHIISHI, 独立行政法人産業技術総合研究所脳神経情報研究部門(〒305-8566 茨城県つくば市東1-1-1)
Masumi ICHIKAWA, (財)東京都医学研究機構東京都神経科学総合研究所 基盤技術研究部門(〒183-8526 東京都府中市武蔵台2-6)
Vol. 20, No. 4 (2003)

cadherin)のjuxtamembrane セグメントと結合し、その機能を調節することが知られており、 δ -catenin も脳で cadherin やベータカテニン (β -catenin)と結合する^{1, 4, 10, 12)}。

また、 δ -catenin はC末に PSD95/Dlg-A/ZO-1 (PDZ) ドメインに対する結合モチーフ (DSWV)を有し、それによりスカフォールド分子 (Scaffolding molecule)であるエスーエスカム (S-SCAM)³⁾、デンシン-180 (Densin-180)⁵⁾、アービン (Erbin)⁶⁾と結合することが報告されている。このことから δ -catenin は神経細胞のシナプス領域で何らかの機能を持つことが推測されるが実際にはその解明はほとんど進んでいない。

2. δ -catenin の局在部位

δ -catenin は大脳皮質に最も多く発現する²⁾。特に成熟した神経細胞では樹状突起に局在し、免疫電顕法を用いた解析ではシナプス後肥厚部 (postsynaptic density; PSD)

とその周辺に強い免疫反応産物の蓄積が認められた (図 2 A)。また、シヨ糖密度勾配法を用いてラット脳の各画分を解析した結果、 δ -catenin は PSD 画分に強い発現が認められるが、シナプス小胞を含む画分には全く発現が認められなかった (図 2 B)。このことから δ -catenin はシナプス後部で機能する蛋白質であると考えられる。

さらに、免疫沈降法を用いた解析により δ -catenin は前述の cadherin, β -catenin, Scaffolding molecule の他に PSD95, NMDA 受容体, AMPA 受容体, GABA A 受容体等とも結合しシナプス領域で巨大な分子複合体を形成していることが明らかとなった (図 3)。

3. δ -catenin の形態変化誘導と PDZ 結合モチーフ

δ -catenin の現在明らかにされている最も重要な機能は、ある種の細胞や神経細胞での突起の伸展や filopodia を誘導する能力である。 δ -catenin を NDCK 細胞や PC12細胞

A

B

図2 δ -catenin はシナプス後部に局在する A:ラット海馬における δ -catenin の局在部位の免疫電顕像を示す。a中の破線で囲んだ領域をbとcにそれぞれ拡大して示した。シナプス後肥厚部 (PSD: 矢印) に免疫反応産物の強い蓄積が見られるのに対し、シナプス前部 (pre) には全く反応産物が認められない。Scale bar: 500nm (a), 200nm (b)

B:ラット脳画分の δ -catenin 抗体によるイムノプロット。 δ -catenin は PSD 画分に多く発現しているがシナプス小胞画分には存在しない。シナプス前部と後部の画分の純度を確認するためにそれぞれのマーカーである synaptophysin と PSD95でイムノプロットを行った。

図3 δ-catenin はシナプス後部の各種タンパク質と複合体を形成する ラット脳ホモジネートをδ-cateninの抗体で免疫沈降し、同時に沈降したタンパク質をイムノブロットで解析した。その結果、PSD95、NMDA 受容体 (NMDAR1、2A/B)、AMPA 受容体 (GluR2/4)、代謝型グルタミン酸受容体 (mGluR1α) の他、抑制性受容体 (GABA A) と結合していることが明らかとなった。一方シナプス前部のタンパク質である synaptophysin とは結合しない。

に強制発現させると、細胞の形態変化を誘導し lamellipodia や filopodia が出現する^{7,9)}(図4A)。またラット海馬初代培養系を用いた解析では、δ-catenin を培養初期の神経細胞 (~10DIV) に導入すると、多数の filopodia や neurite を誘導することができる(図4B)。この現象に必須な配列はC末に存在する105個のアミノ酸であり、その部位はまたアクチン (actin) の重合・脱重合を制御するコルタクチン (cortactin) との結合部位である。さらにδ-catenin と cortactin はサークファミリーキナーゼ (Src family kinase) によるδ-catenin のチロシン残基のリン酸化依存性に結合/解離する。このことからδ-catenin の突起伸展はリン酸化によって調節されている可能性が示唆されている。また Rho GTPase の阻害剤の作用を増強し、Rho による突起伸展作用の阻害を抑制し、突起を伸展させる(図4C)⁹⁾。

上述のようにδ-catenin は初代培養した幼若神経細胞では filopodia の誘導能を発揮する。しかし、成熟した神経細胞 (21DIV) にδ-catenin を導入しても細胞の形態変化を誘導することはほとんどできない(図5B)。一方、C末に存在する PDZ 結合モチーフを欠損したδ-catenin の変異体遺伝子 (ΔPDZ-BD) を導入すると成熟した神経細胞でも新たに多数の filopodia の伸展を誘導することが明らかになった(図5C、表1)。この形態変化の様子を PDZ-BD を導入して16時間後から time lapse で経時的に観察した結果、

新たな filopodia は既存のスパインが変化して誘導される場合と樹状突起のシャフト部分から直接出現する場合があることが明らかとなった(図6)。

そこで、ΔPDZ-BD によって誘導された形態変化について定量的に解析を行った。まず、培養後約3週間のラット海馬神経細胞に gene gun を用いてδ-catenin あるいはΔPDZ-BD とともに、形態を正確に把握するためにDsRed を同時に導入し、DsRed の発現パターンをもとに誘導された形態を調べた(図7A)。その結果、誘導された突起は平均の長さが4 μm 以上(図7B a)、先端部分の直径が0.2 μm にも満たず(図7B b)、これは Ziv と Smith の定義によれば¹⁵⁾ 明らかに filopodia 様の構造であった。またδ-catenin や GFP のみのコントロールと比較した結果、filopodia 様の突起が増加し、逆にスパインが減少しており、time lapse の結果を裏付けるものであった。しかし、全体の突起の数としては優位な変化は認められなかった(図7C)。

一般的に初代培養系はスライスカルチャーよりも突起の伸展等が起こりやすい。そこで、ラット海馬のスライスカルチャーを用いて同様の変化が観察されるかを解析した。生後6日目のラットより約400 μm の海馬スライスを作成し、1~2週間培養したものに gene gun を用いてΔPDZ-BD を導入したところ、CA1錐体細胞で分散培養系と同様に樹状突起に激しい形態変化が認められ、多くの filopodia が出現した(図8)。

4. PDZ 結合ドメインを介した標的タンパク質との相互作用

PDZ 結合ドメインの欠損によりδ-catenin は成熟した神経細胞でも filopodia を誘導できる。このことはδ-catenin の作用が PDZ 結合ドメインの標的となる PDZ ドメインを持つタンパク質との相互作用によって制御されていると考えられる。そこでつぎに、内因性のδ-catenin が標的タンパク質との結合を阻害される遊離したδ-catenin は新たな filopodia を誘導できるかを解析した。まず、δ-catenin のC末7個のペプチドに FITC を結合したものを、培養神経細胞の培養液に加え、一定時間後に固定し、形態を正確に把握するために DiI で染色した。その結果、ペプチドの導入により新たな filopodia の出現が観察された(図9)。これにより、ペプチドが標的タンパク質の PDZ ドメインと結合し、δ-catenin との結合が阻害されると遊離したδ-catenin は filopodia 誘導能を発現するようになると考えられる。

PDZ ドメインを持つタンパク質はシナプス領域で各種受容体と結合し、情報伝達に重要な役割を担うことが知られている。現在までのところ Erbin の PDZ ドメイン⁶⁾ および S-SCAM の PDZ5⁵⁾ がδ-catenin と直接結合することが知られている。そこで著者らは PSD95 とδ-catenin の結合部位を解析した。δ-catenin は PSD95 の PDZ ドメインの他、ポリプロリントラクト (polyproline tract) を介して SH3 ドメインと結合する可能性が考えられる。そこで polyproline tract の欠損変異体を作成して解析を行った。その結果、δ-catenin はその PDZ 結合ドメインを介して PSD95 の PDZ ドメインと直接結合することを明らかにした。また、PSD95 には PDZ ドメインが3つ存在する

図4 δ -catenin は neurite や filopodia を誘導する A : PC12細胞における δ -catenin の作用を示す。GFP- δ -catenin を強制発現させると neurite が出現する(b)が、GFP のみでは変化は現れない(a)。Scale Bar: $5\mu\text{m}$ B : (a, b) 培養開始後7日目に GFP- δ -catenin を導入したラット初代培養細胞。b は a の破線部分を拡大したもの。24時間以内に多数の filopodia や neurite を誘導する。一方 GFP のみのコントロールでは新たな突起の伸展は認められない(c, d)。d は c の破線部分を拡大したもの。Scale Bars: $50\mu\text{m}$ (a, c), $10\mu\text{m}$ (b, d) C : δ -catenin による突起誘導に関する予想されるメカニズム。Neurotrophin のような細胞外シグナルが Src family kinase の活性を調節することにより δ -catenin と cortactin の複合体が形成され、これが actin の重合・脱重合を制御する Arp2/3 に作用することにより突起の伸展が起こる。また δ -catenin は Rho の阻害剤の活性を助長することにより Rho の作用を阻害する (Martinez et al. J. Cell Biol. 2003より)。

図5 PDZ-BD は成熟神経細胞で新たな filopodia を誘導する A: full length- δ -catenin より PDZ 結合ドメインを含む 6 つのペプチド (PSD SWV) を欠損した変異体を作成した (Δ PDZ-BD δ -catenin)。B: (a) 培養 3 週間後の海馬初代培養細胞に GFP- δ -catenin を gene gun により導入すると、わずかに突起の数は増加するが、培養 1 週間の神経細胞のような filopodia や neurite の劇的な誘導はほとんどみとめられない。(b) GFP のみを導入したコントロール。(c) GFP- Δ PDZ-BD- δ -catenin を導入した神経細胞。幼若神経細胞に Full length の遺伝子を導入したときと同様に、劇的な filopodia の誘導は認められる。Scale Bars: 10 μ m

表1 幼若神経細胞と成熟神経細胞における δ -catenin の filopodia 誘導の比較

	Filopodia number/10mm segments	
	7DIV	21DIV
Full length δ -catenin	3.0+/-0.20**	1.7+/-0.23****
Δ PDZ-BD δ -catenin	1.5+/-0.19**	3.8+/-0.26****
GFP alone	0.5+/-0.14	0.3+/-0.02

Full length δ -catenin は幼若神経細胞で多数の filopodia を誘導するが、成熟神経細胞ではそのような変化はほとんど起こらない。一方、 δ -catenin の PDZ 結合ドメインを欠損すると成熟神経細胞でも劇的な filopodia 誘導を引き起こすことが可能となる。

*FL δ -catenin vs GFP; $p < 0.000005$

** Δ PDZ vs GFP; $p < 0.000005$

FL δ -catenin vs Δ PDZ; no significant differences in 7DIV

*** Δ PDZ vs GFP; $p < 0.00005$

**** Full length δ -catenin vs GFP; $p < 0.0005$

***** FL δ -catenin vs Δ PDZ; $p < 0.005$

図6 Δ PDZ-BDにより誘導された Filopodia の time laps イメージング A, B: 成熟したラット海馬初代培養細胞に GFP- Δ PDZ-BD- δ -catenin を導入し約16時間後から5分ごとに共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察した。新たな filopodia は樹状突起のシャフトから直接,あるいは既存のスパインから(矢印)誘導された。Scale Bars: 10 μ m(A), 5 μ m(B)

(PDZ1~PDZ3)ことから実際に結合するドメインを調べた結果 PDZ2と結合することが明らかとなった。

そこで, これら δ -catenin と直接結合する標的タンパク質の PDZ ドメインのみの遺伝子を神経細胞に導入し, δ -catenin の PDZ 結合ドメインと結合させることにより, 内因性の標的タンパク質との結合を阻害した。その結果, S-SCAM の PDZ5, Erbin PDZ, PSD95 の PDZ2を導入した神経細胞では新たな filopodia が誘導されたが, S-SCAM の PDZ1~4 や PSD95 の PDZ1および3, PDZ2の GLGF モチーフにポイントミューテーションを入れた遺伝子では形態変化を誘導することはできなかった(図11)。これらの結果から, δ -catenin と PDZ ドメインを介して結合するタンパク質との相互作用により成熟神経細胞での filopodia の伸展が制御され, スパインの形成や維持に重

要な役割を果たしている可能性が示唆された。

一方, 培養初期の幼若神経細胞においてはシナプス形成が不完全で, 標的となる蛋白質が発現していないか, まだ発現が不十分であるために δ -catenin は標的蛋白質と結合する割合が相対的に少なく, 細胞内に遊離する δ -catenin により filopodia を誘導すると推測される。

5. 興奮性刺激による形態変化と δ -catenin

これまで, δ -catenin が成熟神経細胞において, シナプス領域で情報伝達に重要な役割を担う PSD95や S-SCAM とその特定の PDZ ドメインを介して結合しており, 結合が外れることにより δ -catenin 本来の機能である突起伸展や filopodia 形成能が発揮されることが明らかとなった。

図7 ΔPDZ-BD- δ -cateninによって誘導される突起の定量的解析 A:培養3週間後の海馬初代培養細胞に GFP-Full length- δ -catenin(a-d)あるいは GFP-PDZ-BD- δ -catenin(e-h)を DsRed とともに導入した。(a)および(b)の波線で囲んだ部分をそれぞれ(b-d)および(f-g)に示す。(b)GFP-full length δ -catenin, (c) DsRed, (d) bおよび cを重ね合わせたイメージ, (f) GFP-PDZ-BD δ -catenin, (g) DsRed, (h) f および gを重ね合わせたイメージ。GFP と DsRed は全く同様の部位に発現していることから δ -cateninは新たに誘導された突起の先端部分まで存在していることが確認された。Scale Bars: 50 μ m(a), 10 μ m(b) B: Full length δ -catenin, PDZ-BD δ -cateninあるいは GFP のみを導入して24時間後の神経細胞における突起の長さ先端部分の直径の比較。PDZ-BD δ -cateninを発現した細胞では長さが4 μ m 以上(a), 頭部の直径が0.2 μ m 以下(b)であり, 明らかな filopodia の形態を示した。* $p < 0.0005$ C: Full length δ -catenin, PDZ-BD δ -cateninあるいは GFP のみを導入し24時間後の神経細胞におけるスパインと filopodia の樹状突起10 μ m 当たりの密度の比較。ΔPDZ-BD δ -catenin ではスパインの密度が減り filopodia の密度が増加しているが全体としての突起の数には大きな変化は認められない。*** $P < 0.0005$

A Full length δ -catenin B Δ PDZ-BD δ -catenin

C GFP alone

図8 ラット海馬スライスにおける Δ PDZ-BD δ -cateninの形態変化誘導 ラット海馬スライスに gene gun を用いて Full length δ -catenin (A), Δ PDZ-BD δ -catenin (B) あるいは GFP (C) を導入し 2-photon レーザー顕微鏡を用いて解析した。その結果、スライスにおいても Δ PDZ-BD δ -catenin は劇的に filopodia 様構造を誘導することが観察された。

A

B

図9 δ -cateninのPDZ結合ドメインのペプチドは成熟神経細胞で filopodia を誘導する δ -cateninのPDZ結合ドメインのペプチド(ASPDSWV)に FITC を結合し、神経細胞の培養液中に投与し、約60時間後に形態変化を観察した(Aa)。正確な形態を観察できるように細胞は固定後 DiI で染色した(Ab)。その結果 PDZ 結合ドメインのペプチドを投与したものは filopodia を誘導した。一方コントロールのペプチドでは形態の変化は認められなかった(Ac, d)。定量的な解析でも優位な差が認められた(B)。Scale Bars: 5 μ m。
* $p < 0.05$

図10 δ -catenin と PSD95の結合 A: δ -catenin と PSD95 の結合部位を解析するため Full length δ -catenin, Δ PDZ-BD あるいは δ -catenin の polyproline tract を欠損した変異体 Δ Pro を PSD95 遺伝子とともに COS7 細胞に共発現させ、 δ -catenin 抗体で免疫沈降を行い、イムノブロットにより解析した。その結果、 δ -catenin は PDZ 結合ドメインが欠損すると PSD95 と結合できないことが明らかとなった。B: PSD95 には 3 つの PDZ ドメインが存在することから各ドメインのみの遺伝子を、Full length δ -catenin とともに COS7 細胞に共発現させ、 δ -catenin 抗体で免疫沈降を行い、イムノブロットにより解析した。その結果、 δ -catenin は PSD95 の PDZ 2 と結合することが明らかとなった。また PDZ2 の GLGF モチーフにポイントミューテーションを入れた遺伝子 (DLGF; PSD95-PDZ2MT) では結合が阻害された。

図11 δ -catenin に直接結合する PDZ ドメインは成熟神経細胞において filopodia を誘導する A: 成熟神経細胞に δ -catenin と結合する PSD95-PDZ2(b), S-SCAM-PDZ5(f), Erbin-PDZ(g), を導入し形態変化を解析した。その結果これらの遺伝子により filopodia 様の形態が誘導された。一方結合しない PSD95-PDZ1(a), -3(c), PSD95-PDZ2MT(d), および S-SCAM-PDZ3(e) では新たな形態変化の誘導は認められなかった。Scale Bars: 5 μ m B: 各ドメインによって誘導される filopodia を定量的に解析した結果、 δ -catenin の PDZ 結合ドメインと直接結合する PDZ ドメインは優位に filopodia を誘導することが明らかとなった。このことは内因性の δ -catenin が標的タンパク質との結合を阻害されると、遊離 δ -catenin は本来の機能である filopodia 誘導能を発揮することができることを示唆している。

****,***p<0.0005

海馬スライスカルチャーにテタヌス刺激を加えたり⁸⁾, 興奮性受容体のアゴニストを加えると, filopodia 様の突起が伸展することが報告されていることから¹³⁾, このような現象に δ -catenin が関与するか解析した。

約3週間培養を続けた海馬神経細胞をグルタミン酸あるいは mGluR1 のアゴニストである DHPG を加えると, δ -catenin と PSD95 の結合が一定の時間経過で外れることが明らかとなった。これらの結果は神経細胞への興奮性入力により δ -catenin と PDZ ドメインを介して結合するタンパク質が外れ, 遊離した δ -catenin が cortactin 等の細胞骨格系のタンパク質を制御するタンパク質群と作用して, 刺激による新たな filopodia 誘導の引き金となっている可能性を示唆している。

6. おわりに

シナプスの可塑性現象の解明において, シナプス後肥厚部での各種の神経伝達物質の受容体と scaffolding molecule との巨大分子複合体の機能の解析は, 現在の神経科学で最も話題となっている分野の一つである。上述の結果は興奮性の入力による樹状突起の filopodia やスパイン形成と維持に δ -catenin が重要な役割を担っている可能性を示唆しており, シナプスの可塑性のメカニズムを解明する上で重要な結果である。さらに細胞接着因子と可塑性との関連を詳しく解析する上で重要な手がかりとなる。これらは δ -catenin が単にアルツハイマー病の関連タンパク質であるという事にとどまらず, 神経細胞の記憶・学習といった機能発現に伴うシナプスの形成にも関与し, 可塑性に伴う形態変化のメカニズムの解明に大きな役割を担うものと考えられる。

謝 辞

本総説の執筆の機会を与えてくださいました, 恩師であり本誌編集長の福岡女子大学教授 小泉修先生に厚くお礼申し上げます。本研究は1999年より2003年までハーバード大学医学部/Brigham and Women's 病院の Kenneth S. Kosik 教授の研究室で行われたもので, Kosik 教授ならびに Maria C. Martinez, Andrea Witt をはじめとする Kosik Lab. のメンバーに深く感謝いたします。電子顕微鏡技術でご協力いただいた東京都神経科学総合研究所の市川眞澄先生, 2-photon 顕微鏡技術でご協力いただいた RIKEN-MIT Neuroscience Research Center の林康紀先生および, 岡本賢一先生に心よりお礼申し上げます。

文 献

- 1) Goodwin, M., Kovacs, E.M., Thoreson, M.A., Reynolds, A.B. & Yap, A.S.: J. Biol. Chem. 278, 20533-20539 (2003).
- 2) Ho, C., Zhou, J., Medina, M., Goto, T., Jacobson, M., Bhide, P.G. & Kosik, K.S.: J. Comp. Neurol. 420, 261-276 (2000).
- 3) Ide, N., Hata, Y., Deguchi, M., Hirao, K., Yao, I. & Takai, Y.: Biochem. Biophys. Res. Commun. 256, 456-461 (1999).
- 4) Ireton, R.C., Davis, M.A., van Hengel, J., Mariner, D.J., Barnes, K., Thoreson, M.A., Anastasiadis, P.Z., Matrisian, L., Bundy, L.M., Sealy, L., Gilbert, B., van Roy, F. & Reynolds, A.B.: J. Cell Biol. 159, 465-476 (2002).
- 5) Izawa, I., Nishizawa, M., Ohtakara, K. & Inagaki, M.: J. Biol. Chem. 277, 5345-5350 (2002).
- 6) Laura, R.P., Witt, A.S., Held, H.A., Gerstner, R., Deshayes, K., Koehler, M.F., Kosik, K.S., Sidhu, S.S. & Lasky, L.A.: J. Biol. Chem. 277, 12906-12914 (2002).
- 7) Lu, Q., Paredes, M., Medina, M., Zhou, J., Cavallo, R., Peifer, M., Orecchio, L. & Kosik, K.S.: J. Cell Biol. 144, 519-532 (1999).
- 8) Maletic-Savatic, M., Malinow, R. & Svoboda, K.: Science 283, 1923-1927 (1999).
- 9) Martinez, M.C., Ochiishi, T., Majewski, M. & Kosik, K.S.: J. Cell Biol. 162, 99-111 (2003).
- 10) Ozawa, M. & Kemler, R.: J. Cell Biol. 142, 1605-1613 (1998).
- 11) Paffenholz, R. & Franke, W.W.: Differentiation 61, 293-304 (1997).
- 12) Thoreson, M.A., Anastasiadis, P.Z., Daniel, J.M., Ireton, R.C., Wheelock, M.J., Johnson, K.R., Hummingbird, D.K. & Reynolds, A.B.: J. Cell Biol. 148, 189-202 (2000).
- 13) Vanderklish, P.W. & Edelman, G.M.: PNAS, 1639-1644 (2002).
- 14) Zhou, J., Liyanage, U., Medina, M., Ho, C., Simmons, A.D., Lovett, M. & Kosik, K.S.: Neuroreport 8, 2085-2090 (1997).
- 15) Ziv, N.E. & Smith, S.J.: Evidence for a role of dendritic filopodia in synaptogenesis and spine formation. Neuron 17, 91-102 (1996).