

## シナプスの細胞骨格

山崎博幸<sup>1</sup>、白尾智明<sup>1</sup>

<sup>1</sup>群馬大学大学院医学系研究科神経薬理学

### 1. はじめに

神経細胞には他の細胞と同じように、アクチンフィラメント、ニューロフィラメント（神経細胞における中間径フィラメント）、微小管と呼ばれる太さの異なる3種類の細胞骨格が存在する。ニューロフィラメント、微小管が主に細胞の構造的支持や細胞内物質輸送等の運動装置として働いているのに対して、アクチンフィラメントの機能はそのダイナミックな性質から多岐にわたっており、多くの種類のアクチン結合タンパク質により制御されている。アクチンは生体における最も主要なタンパク質の1つであるが、神経細胞ではシナプス部、特に興奮性シナプス後部を構成する樹状突起スパインに多量に存在している。一方、シナプス前部にも主に微小管及びアクチンを中心とした細胞骨格タンパク質が存在しており、シナプス小胞の輸送等に働いている。シナプス前部については他稿に詳述されているので、本稿ではこの樹状突起スパインの細胞骨格を中心に、その構造、形成メカニズムについて概説する。

### 2. 興奮性シナプス：樹状突起スパインの細胞骨格

樹状突起スパイン（以下スパイン）は樹状突起幹上に存在する約1-2ミクロン程度の小突起であり、成熟した典型的スパインは大きな頭部と細い頸部を持つキノコのような形をしている。スパイン上には主にグルタミン酸作動性の興奮性シナプスが形成される。スパインにはアクチンフィラメントが豊富に含まれており、微小管やニューロフィラメントは通常はほとんど検出されない。スパイン内部のアクチン細胞骨格は一様ではなく、部位によって形態的または質的に大きく異なっている。大きく分けると、シナプス前部のアクティブゾーンに向かい合っているシナプス後膜直下に存在するシナプス後肥厚（Postsynaptic density：以下 PSD）に付随したアクチン細胞骨格、スパイン頭部の複雑に入り組んだアクチン細胞骨格、およびスパイン頸部の直線的なアクチン細胞骨格に分けられる。

PSDは電子顕微鏡下では細胞膜と接した電子密度の濃い構造物として観察され、この部位に興奮性神経伝達を司るグルタミン酸受容体が多く局在している。PSDに含まれるタンパク質は神経伝達物質受容体の他に様々な種類のものが発見されており、代表的なものではグルタミン酸受容体の足場として機能する PSD-95 等の足場タンパク質群、シナプス前部との結合に働くカドヘリン等の細胞接着タンパク質群、 $\alpha$ スペクトリン等のアクチン結合タンパク質群等が挙げられる。近年の質量分析装置を用いた網羅的な探索では、主要なものだけでも約400種類のタンパク質が同定されている<sup>1</sup>。様々な PSD タンパク質が同定された中で量的に主要なタンパク質は、細胞骨格の基礎となるアクチンの他にカルシウ

ム・カルモジュリン依存性プロテインキナーゼ II (CaMKII) が占める割合が多い。CAMKII は  $\alpha$  タイプ、 $\beta$  タイプの 2 つの異なるサブタイプにより構成される多量体として存在しており、学習・記憶の様な脳機能に非常に重要なタンパク質である<sup>2</sup>。CaMKII はセリン/スレオニン側鎖のリン酸化酵素であるが、なぜ酵素のような修飾タンパク質が PSD に大量に含まれるのかは謎であった。近年、岡本らは生化学的手法を用いて、CaMKII がアクチンフィラメントを束化しスパインの形態調節に関わっている事を明らかにした<sup>3</sup>。PSD-95 等の足場タンパク質が PSD の膜側に多く局在しているのに対して、CaMKII は PSD の細胞質側に多く局在している<sup>4</sup>。また、CAMKII は  $\alpha$  タイプ、 $\beta$  タイプ合わせて PSD に含まれるタンパク質の約 9% を占めるといふ実験結果もあることから<sup>5</sup>、PSD に付随した細胞骨格は膜タンパク質の下部、つまり細胞質側に発達しており、CAMKII を非常に多く含むという特色がある。

PSD 以外のスパイン頭部の細胞骨格はアクチンフィラメント及びアクチン結合タンパク質を主とした成分から成り立っていると考えられている。PSD やシナプス前部を含まず、この部分のアクチン細胞骨格のみを生化学的に分離することが困難なことから、PSD のような網羅的な研究はまだこれからの課題である。しかしながら、これまでの研究でスパインのアクチン細胞骨格の調節に重要で且つ PSD から離れた細胞内分布をしめすタンパク質がいくつか同定されてきた。重要なものとしては、ドレブリン A、コータクチン、Arp2/3 等が挙げられる。ドレブリン A はスパインに局在するアクチンフィラメント側方結合タンパク質で、アクチンフィラメントと他のアクチン結合タンパク質との結合を制御することにより、比較的安定なアクチン細胞骨格を形成する。実際、初代培養神経細胞に強制発現させるとスパインの形態を著しく変化させることから、アクチンフィラメントの再構成を介してスパインの形態形成に関わっていると考えられている<sup>6,7</sup>。Arp2/3 はアクチンに相同性を持つ Arp2、Arp3 を中心とした 7 つのサブユニットからなる複合体で、アクチン重合開始のための重合核の形成、またアクチンフィラメントの枝分かれに重要な働きをしている。コータクチンは WASP ファミリータンパク質と同様 Arp2/3 活性化因子の 1 つであり、Arp2/3 によるアクチンフィラメントの枝分かれ構造形成の調節に機能している<sup>8</sup>。Arp2/3 によるアクチンフィラメントの網状構造形成は上記の活性化因子の他に、Rho ファミリーのような低分子量 G タンパク質群及びその調節因子、プロフィリンやコフィリン等の単量体アクチン結合タンパク質等の様々なタンパク質活性のバランスにより成り立っていると考えられる。

スパイン頭部のアクチン細胞骨格はスパイン内部のように入り組んでおらず、直線的な束化されたアクチンフィラメントが観察される<sup>9</sup>。スパイン頭部ではドレブリンの結合したアクチンフィラメントはあまり存在せず、ファッシンなどの束化蛋白の働きが大きいと想像される。マッシュルーム型の大型スパインの頸部にはアクチンフィラメントの他にスパインアパラタスと呼ばれる複雑な膜構造が存在していることがある。スパインアパラタスの機能は未だ不明な点が多いが、樹状突起の小胞体由来であると考えられることから細胞

内カルシウムの放出・貯留に関わっていると考えられている<sup>10</sup>。

スパインの細胞骨格をアクチンのみに限って俯瞰してみると、アクチンフィラメントはいわゆるトレッドミリング(アクチン線維の両端で重合と脱重合を行うことによって線維の長さが一定に保たれる現象)により、絶えずかなりの速さで入れ替わっている<sup>11</sup>。しかしながら、そのダイナミクスは部位によってかなり異なっており、PSD 付近の膜近傍ほど素早く入れ替わっており、内部にいくにしたがって安定になっていく<sup>12</sup>。内部のアクチンの安定性とドレブリン結合アクチンの内部分布一致は興味深い。これらのことから、スパイン内部のアクチン細胞骨格には部位によって相当の差異があると考えられる。また、これらのスパインにおける細胞骨格は各々独立したものではなく、アクチンの動的な性質からもわかるようにダイナミックに相互作用していると考えられる。PSD から離れた位置に局在するコータクチンが PSD の代表的なタンパク質 **Shank** と結合し、またドレブリンも同様に PSD に多い **Homer** と結合することからも、PSD とその他のアクチン細胞骨格が密接に関わっていることが窺い知れる。

### 3. 樹状突起スパインの形成

樹状突起スパインの形成過程にはいくつかのパターンが存在すると考えられるが、なかでも、シナプス前部の結合及びその活動がスパインの形態形成、機能維持に重要である。初代培養神経細胞を発達段階に分けて観察すると、シナプスがまだ形成されていない幼弱な時にはキノコ状のスパインはほとんど見られず、代わりに細長いフィロポディアが多く見られる。発達が進みシナプス結合が機能し始めると、徐々にスパインの数が増えてくる。また、培養神経細胞のイメージング実験から、フィロポディアはシナプス活動やドレブリンAの結合したアクチンフィラメントの出現に依存してスパインへと形態変化を行う事が判明した<sup>13,14</sup>。これらの事から、フィロポディアがスパインの前駆体であることはほぼ明らかである。フィロポディアからスパインへの移行には、先ずシナプス前部の接触が必要であると考えられるが、このメカニズムにおいて細胞接着分子が重要な役割を果たしている事が分かってきた。ニューレキシン (**Neurexin**) は当初神経毒である $\alpha$ ラトロトキシンの受容体として単離されたタンパク質であるが、シナプス前部の膜表面に局在し、シナプス後部を誘導できることが分かった<sup>15</sup>。一方、ニューロライギン (**Neurologin**) はニューレキシンのリガンドとして単離されてきたタンパク質で、シナプス後部膜に局在し細胞外ドメインでニューレキシンと結合する。ニューロライギンもシナプス前部を誘導することが判明しており、さらにニューロライギン1は興奮性、ニューロライギン2は抑制性シナプスの分化に強く関与している事が分かってきた<sup>16</sup>。このように、ニューレキシン-ニューロライギンのような接着分子によるシナプス間結合はシナプス形成の初期から重要な働きをしており、この他にもいくつかの細胞接着分子がシナプス形成を誘導できることが明らかになっている。

スパイン形態形成に関しては前述のArp2/3やコータクチンのような直接細胞骨格に働く

アクチン結合タンパク質の他に、足場タンパク質、細胞接着分子、低分子量Gタンパク質及びその調節因子等が複雑に関わり合ってアクチンの制御を行っている。特にRhoファミリー低分子量Gタンパク質であるRho、Rac1、Cdc42のシグナル伝達カスケードは詳細に研究されており、多くの上流及び下流の分子が同定されている。これらの分子の上流にはグアニンヌクレオチド交換因子 (guanine nucleotide exchange factor: GEF) やGTP加水分解促進因子 (GTPase activating factor : GAP) が存在し、細胞内外から様々なシグナルを受けてRhoファミリー低分子量Gタンパク質の調節を行っている。主な下流分子としては、Rac1やCdc42のターゲット分子であるPak1や、Rac1とWAVEのアダプター分子として働くIRSp53等が挙げられる。Pak1の下流にはLIMKがあり、LIMKはアクチン脱重合因子であるコフィリンのリン酸化を行うことにより、コフィリンに対して制御を行っている<sup>17,18</sup>。

#### 4. 抑制性シナプスの細胞骨格

脳における主要な抑制性シナプスは GABA 作動性のシナプスであり、イオンチャネル内蔵型の GABA<sub>A</sub> 受容体が抑制性の神経伝達に働いている。GABA<sub>A</sub> 受容体は  $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$  のサブユニットの 5 量体で構成されていて、各サブユニットにはさらに複数の型 ( $\alpha$  : 1 ~ 6,  $\beta$  : 1 ~ 3,  $\gamma$  : 1 ~ 3) が存在する。抑制性シナプスは興奮性シナプスとは異なり、細胞体、樹状突起幹やスパインの付け根に存在し、またその電子顕微鏡像はシナプス後部肥厚があまり厚くないので、シナプス前部と後部が対称性を持つ構造をしている。抑制性シナプス後部の細胞骨格は未だ不明な点が多く、興奮性シナプスのような詳細な分子プロファイルはまだ分かっていないが、グルタミン酸受容体同様に GABA<sub>A</sub> 受容体にも足場構造が存在することが分かっている。Gephyrin は GABA<sub>A</sub> 受容体の  $\alpha$  サブユニットと結合し、GABA<sub>A</sub> 受容体のシナプスへのターゲットニング及びクラスターリングに関わる足場タンパク質として機能している。さらに Gephyrin はアクチン結合タンパク質のプロフィリン、Mena/VASP と結合することが分かっており、これらのタンパク質とシナプス部で共局在する事から、GABA<sub>A</sub> 受容体とアクチン細胞骨格をリンクさせる役目を担っていると示唆されている<sup>19</sup>。また、別の細胞骨格である微小管と Gephyrin との結合も報告されているが、これらの複合体のシナプスでの局在及び微小管が抑制性シナプスの細胞骨格として機能しているかどうかは不明である。

#### 5. 電気シナプスの細胞骨格

電気シナプスはコネキシンの 6 量体により構成されるギャップ結合と呼ばれるチャネルを介してシグナル伝達を行っており、その部位は非常に狭い間隙 (2nm 程度) が形成されている。神経細胞のギャップ結合には興奮性シナプスのような PSD 構造は存在しておらず、またギャップ結合下の細胞骨格についても不明な点が多い。アストロサイトのギャップ結合を構成するコネキシンのサブタイプの 1 つコネキシン 43 がアクチンフィラメント結合タンパク質ドレ布林と結合することが分かっており、細胞膜下のアクチン細胞骨格はギャ

ップ結合の安定化・維持に重要な働きをしていると考えられる<sup>20</sup>。神経細胞においてはコネキシンの別のサブタイプ、コネキシン 36 が細胞間接着部位の裏打ちタンパク質である ZO-1 と結合することが分かっている<sup>21</sup>。ZO-1 はアクチンフィラメントとの結合能があるので、コネキシン 36 は ZO-1 を介してアクチン細胞骨格と繋がっていると示唆されている。これらのことから、神経細胞の電気シナプスにおいてもアクチン細胞骨格を介したギャップ結合の安定化機構の存在が考えられる。

## 6. おわりに

シナプス部位の細胞骨格の研究は近年の質量分析機を用いた網羅的な研究やイメージング技術の向上によって著しく発展してきた。特にケイジドグルタミン酸（光を照射するとグルタミン酸を放出する化合物）や光活性化型 GFP 等の新しい研究ツールの登場は、2光子励起顕微鏡との組み合わせで非常に強力な研究ツールとなっている。また、スパイン形成及びシナプス形成を促進・調節するタンパク質の同定・解析も進んできて、それらの機能の詳細な分子メカニズムが明らかになってきている。しかしながらそれらを統合するような理論はまだ現れてはおらず、部分的な知見にとどまっている感は否めない。今後は、実験生物学的な手法のみならず、システム生物学等の計算機を用いた手法と組み合わせる事も必要だと思われる。

## 引用文献

- 1) Peng J, Kim MJ, Cheng D, et al. Semiquantitative proteomic analysis of rat forebrain postsynaptic density fractions by mass spectrometry. *J Biol Chem.* 2004; 279: 21003-11.
- 2) Silva AJ, Paylor R, Wehner JM, et al. Impaired spatial learning in alpha-calcium-calmodulin kinase II mutant mice. *Science.* 1992; 257: 206-11.
- 3) Okamoto K, Narayanan R, Lee SH, et al. The role of CaMKII as an F-actin-bundling protein crucial for maintenance of dendritic spine structure. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007; 104: 6418-23.
- 4) Petersen JD, Chen X, Vinade L, et al. Distribution of postsynaptic density (PSD)-95 and Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II at the PSD. *J Neurosci.* 2003; 23: 11270-8.
- 5) Cheng D, Hoogenraad CC, Rush J, et al. Relative and absolute quantification of postsynaptic density proteome isolated from rat forebrain and cerebellum. *Mol Cell Proteomics.* 2006; 5: 1158-70.
- 6) Hayashi K, Shirao T. Change in the shape of dendritic spines caused by overexpression of drebrin in cultured cortical neurons. *J Neurosci.* 1999; 19: 3918-25.
- 7) Sekino Y., Kojima N., Shirao T. Role of actin cytoskeleton in dendritic spine morphogenesis. *Neurochem Int.* 2007; 51: 92-104 (2007)
- 8) Daly RJ. Cortactin signalling and dynamic actin networks. *Biochem J.* 2004; 382: 13-25.

- 9) Korobova F, Svitkina T. Molecular architecture of synaptic actin cytoskeleton in hippocampal neurons reveals a mechanism of dendritic spine morphogenesis. *Mol Biol Cell*. 2010; 21: 165-76.
- 10) Vlachos A, Korkotian E, Schonfeld E, et al. Synaptopodin regulates plasticity of dendritic spines in hippocampal neurons. *J Neurosci*. 2009; 29: 1017-33.
- 11) Star EN, Kwiatkowski DJ, Murthy VN. Rapid turnover of actin in dendritic spines and its regulation by activity. *Nat Neurosci*. 2002; 5: 239-46.
- 12) Honkura N, Matsuzaki M, Noguchi J, et al. The subspine organization of actin fibers regulates the structure and plasticity of dendritic spines. *Neuron*. 2008; 57: 719-29.
- 13) Maletic-Savatic M, Malinow R, Svoboda K. Rapid dendritic morphogenesis in CA1 hippocampal dendrites induced by synaptic activity. *Science*. 1999; 283: 1923-7.
- 14) Takahashi H, Sekino Y, Tanaka S, et al. Drebrin-dependent actin clustering in dendritic filopodia governs synaptic targeting of postsynaptic density-95 and dendritic spine morphogenesis. *J Neurosci*. 2003; 23: 6586-6595.
- 15) Ushkaryov YA, Petrenko AG, Geppert M, et al. Neurexins: synaptic cell surface proteins related to the alpha-latrotoxin receptor and laminin. *Science*. 1992; 257: 50-6.
- 16) Craig AM, Kang Y. Neurexin-neurologin signaling in synapse development. *Curr Opin Neurobiol*. 2007; 17: 43-52.
- 17) Ethell IM, Pasquale EB. Molecular mechanisms of dendritic spine development and remodeling. *Prog Neurobiol*. 2005; 75: 161-205.
- 18) Sala C, Cambianica I, Rossi F. Molecular mechanisms of dendritic spine development and maintenance. *Acta Neurobiol Exp*. 2008; 68: 289-304.
- 19) Fritschy JM, Harvey RJ, Schwarz G. Gephyrin: where do we stand, where do we go? *Trends Neurosci*. 2008; 31: 257-64.
- 20) Butkevich E, Hülsmann S, Wenzel D, et al. Drebrin is a novel connexin-43 binding partner that links gap junctions to the submembrane cytoskeleton. *Curr Biol*. 2004; 14: 650-8.
- 21) Li X, Kamasawa N, Ciolofan C, et al. Connexin45-containing neuronal gap junctions in rodent retina also contain connexin36 in both apposing hemiplaques, forming bihomotypic gap junctions, with scaffolding contributed by zonula occludens-1. *J Neurosci*. 2008; 28: 9769-89.

#### 図説 1

GFP 遺伝子を導入してある DIV 1 6 の初代培養海馬神経細胞を興奮性シナプスのマーカーである PSD-95 と抑制性シナプスのマーカーである VGAT の抗体でそれぞれ免疫染色した。PSD-95 の免疫陽性反応は主に樹状突起スパインに見られるのに対し (矢頭)、VGAT の免疫陽性反応は主に樹状突起幹に見られる。スケールバー : 5  $\mu$  m

#### 図説 2

興奮性シナプスと抑制性シナプスの模式図。興奮性シナプスは主に樹状突起スパインに存在し、AMPA 受容体や NMDA 受容体等のグルタミン酸受容体はシナプス後肥厚 (PSD) に多く見られる。それに対し抑制性シナプスは主に樹状突起幹に存在する。SV : シナプス小胞、GluR : グルタミン酸受容体、NX : ニューレキシン、NL1 : ニューロライギン 1, NL2 : ニューロライギン 2, GABAR :  $\gamma$ アミノ酪酸受容体、MT : 微小管

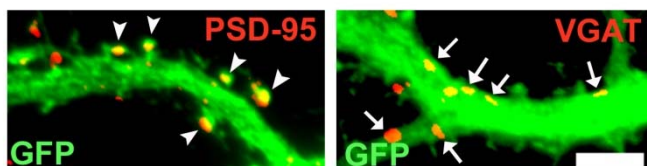


図 1

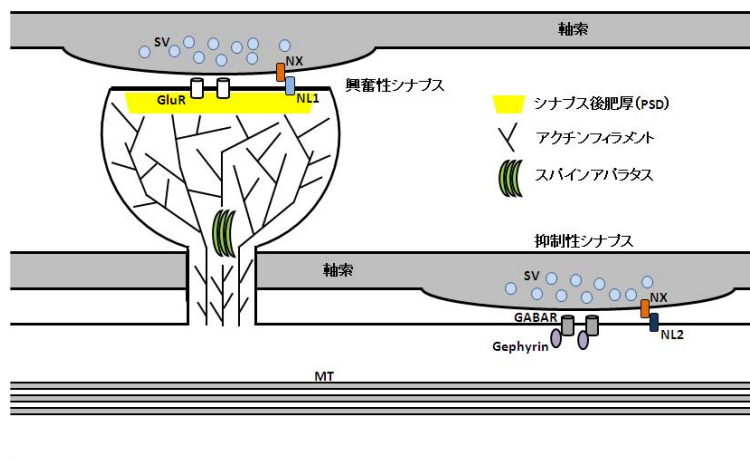


図 2