

氏 名 岩田 亮平

学位(専攻分野) 博士(理学)

学位記番号 総研大甲第 1685 号

学位授与の日付 平成26年3月20日

学位授与の要件 生命科学研究科 遺伝学専攻
学位規則第6条第1項該当

学位論文題目 RacGAP α 2-chimaerin adjusts spine morphological features
and cognitive ability

論文審査委員 主 査 准教授 小出 剛
教 授 川上 浩一
教 授 平田 たつみ
准教授 平田 普三
教 授 饗場 篤 東京大学

論文内容の要旨
Summary of thesis contents

Dendritic spines are post-synaptic structures that play a central role in excitatory synaptic transmission. Morphological characteristics of spines form the basis of synapse function and that of cognitive ability in the mammalian brain. To date, it remains largely unknown how the morphological features of spines and cognitive ability in adulthood are determined during development.

α -chimaerin is a Rac-specific GTPase-activating protein (RacGAP), which inactivates Rac-GTPase; Rac-GTPase is a positive regulator of actin polymerization. α -chimaerin is composed of $\alpha 1$ - and $\alpha 2$ -isoforms ($\alpha 1$ -chimaerin and $\alpha 2$ -chimaerin) generated as alternatively spliced products. Some in vivo functions of α -chimaerin are known by studies in α -chimaerin-deficient (α ChnKO) mouse lines: For example, α -chimaerin regulates midline axon guidance of the corticospinal tract and central pattern generator as a key mediator of ephrinB3/EphA4 forward-signaling, and its loss-of-function results in hopping gaits in the animal. These reports reveal important roles for α -chimaerin in regulation of actin dynamics in axonal growth cones during axon guidance. On the other hand, at present, there is little in vivo evidence for the involvement of α -chimaerin in dendritic spine morphogenesis, which also largely relies on regulation of actin dynamics. Furthermore, the contributions of α -chimaerin to higher brain functions remain totally unexplored. The present study reveals that $\alpha 2$ -chimaerin during development is involved in spine morphogenesis and plays a role in adjustment of cognitive ability in adulthood.

First, to investigate roles of α -chimaerin and its isoforms in neuronal circuit and animal behavior, I performed behavioral tests on a series of global and conditional KO mice of α -chimaerin and its isoforms. Intriguingly, global α ChnKO mice exhibited a variety of phenotypes, including increased contextual fear learning, increased locomotor activity, and decreased anxiety-like behavior, in addition to their hopping gait. Dorsal telencephalon (DT)-specific α -chimaerin KO (DT- α ChnKO) mice also showed increased contextual fear learning, although they showed normal phenotypes in other behavioral paradigms examined. The increased contextual fear learning was observed in $\alpha 2$ -chimaerin-specific KO ($\alpha 2$ KO) mice and DT-specific $\alpha 2$ KO (DT- $\alpha 2$ KO) mice, too, but not in $\alpha 1$ -chimaerin-specific KO ($\alpha 1$ KO) mice or adult-specific $\alpha 2$ KO (Ad- $\alpha 2$ KO) mice. These results suggest that $\alpha 2$ -chimaerin acts in the DT during development to establish normal contextual fear learning in adulthood.

Next, I analyzed morphological changes that may be responsible for increased contextual fear learning ability of the DT- $\alpha 2$ KO mice. I have focused on hippocampus (particularly hippocampus CA1) because I found that $\alpha 2$ -chimaerin expression is highest in the hippocampal CA1 and that DT- $\alpha 2$ KO mice showed increases not only in the contextual fear learning but also in another hippocampus-dependent learning paradigm. I found no alterations in gross axonal projection patterns and dendrite morphology of hippocampal neurons of DT- $\alpha 2$ KO mice.

(別紙様式 2)
(Separate Form 2)

However, the DT- α 2KO mice exhibited increased spine size and density of hippocampal CA1 pyramidal neurons; I did not observe similar phenotypes in either Ad- α 2KO or DT- α 1KO mice. Similar spine enlargement was observed in young DT- α 2KO mice. These results suggest that α 2-chimaerin during development contributes to dendritic spine morphology (e.g. size and density) in adulthood. Consistent with the increment of spine size and density, basal synaptic transmission was increased in DT- α 2KO mouse hippocampal slices. To obtain further insight into the mechanisms by which α 2-chimaerin regulates spine morphogenesis, I performed single-cell overexpression experiments. The overexpression of α 2-chimaerin in the hippocampal pyramidal neurons of young wild-type mice decreased spine size. On the other hand, overexpression of the RacGAP-inactive form of α 2-chimaerin failed to alter spine size. These results suggest that RacGAP activity of α 2-chimaerin regulates spine size through cell-autonomous mechanism.

Finally, I determined an upstream signaling mechanism involved in α 2-chimaerin-dependent spine morphogenesis. I hypothesized that ephrinA3/EphA4 forward-signaling may contribute to α 2-chimaerin-dependent spine morphogenesis, because it is reported that at the CA1, EphA4 is enriched in dendritic spines and ephrinA3 is located on the astrocytic processes near the spines; EphA4KO mice show increased spine size and density in hippocampal CA1 pyramidal neurons, which are similar to my observation of the DT- α 2KO mice. To test this hypothesis, I performed a spine retraction assay using slice cultures of the developing hippocampus. Consistent with previous reports, ephrinA-stimulation induced a reduction of spine numbers. By contrast, this ephrinA-induced spine retraction was suppressed in α 2KO neurons. These results support my hypothesis that α 2-chimaerin acts as a downstream effector of ephrinA/EphA4 forward-signaling in spine morphogenesis in the developing hippocampus.

Taken together, my findings suggest that developmental RacGAP α 2-chimaerin adjusts the hippocampal spine morphology in adulthood by mediating ephrinA/EphA4 forward-signaling, and establishes normal cognitive ability. These findings reveal a new mechanism operating in the developing brain to establish normal morphological features of dendritic spines and cognitive ability in adulthood, and provide insights into a therapeutic approach to treating neurodevelopmental psychiatric disorders, including autism spectrum disorders and schizophrenia.

α -chimaerinはRacを不活化するRacGAPと呼ばれるRac特異的GTPase活性化タンパク質であり、Rac GTPaseはアクチン重合を促進する働きがあることが知られている。この遺伝子産物は皮質脊髄路の正中線上の軸索ガイダンスやephrinB3/EphA4のシグナルを介した中枢パターン発生に関わっており、この α -chimaerinの自然突然変異体やノックアウト(KO)マウスはウサギ様の歩行パターンを示すようになる。 α -chimaerinは樹状突起スパインにも発現していることから、スパインのリモデリングやその機能にも関与していると考えられるが、その詳細はまだ不明であった。また、 α -chimaerinには同一遺伝子から選択的スプライシングによりコードされる $\alpha 1$ と $\alpha 2$ の二つのイソフォームがあり、その生化学的性質が異なることや、 $\alpha 1$ は成体で発現が高く $\alpha 2$ は発生・発達段階で発現が高いなどの違いがあることが報告されているが、これらがどのような機能的違いに関わっているか全く不明のままであった。

岩田亮平君は、博士課程における研究でこれらの問題の解明に取り組んだ。まず、恒常的に α -chimaerinがKOされた α ChnKOマウスの行動形質について詳細な解析を行った。その結果、多くの行動異常を示したが、特に恐怖条件付け文脈学習の亢進が見られたことから、海馬における α -chimaerinの機能に着目した。次に、海馬を含む背側終脳領域特異的に α -chimaerinをKOして調べたところ、多くの形質は正常だったものの、恐怖条件付け文脈学習では α ChnKOと同様に亢進がみられた。これらのことから、海馬を含む背側終脳領域における異常が恐怖条件付け文脈学習の亢進と関連している可能性が示唆された。次に、 $\alpha 1$ と $\alpha 2$ -chimaerinのいずれがこの恐怖条件付け文脈学習の亢進と関連しているか調べるために、イソフォーム特異的KOマウスを作製してその行動を調べた。その結果、 $\alpha 1$ KOマウスは正常な恐怖条件付け文脈学習を示したのに対し、 $\alpha 2$ KOおよび背側終脳領域特異的 $\alpha 2$ KOではその亢進が見られたことから、 $\alpha 1$ ではなく $\alpha 2$ -イソフォームが関与していることが示された。さらに、 $\alpha 2$ -chimaerinを成体特異的にKOして調べたところ、そのタンパク質の発現は見られなくなるが恐怖条件付け文脈学習は正常であった。このことから、 $\alpha 2$ -chimaerinが発生・発達段階で背側終脳領域に発現することが成体における恐怖条件付け文脈学習の調節に重要であることが示された。次に、海馬における形態学的解析を行ったところ、CA1錐体神経細胞における樹状突起スパインのサイズと密度の増加が生じていることを見出した。このスパインの形態変化は生後24日目で既にみられ、生後1か月以降に $\alpha 2$ -chimaerinをKOすることでは同様の変化は見られなかった。このシナプス形態変化はephrinB3/EphA4シグナルの下流で細胞自律的に生じ、この変化がシナプス伝達の効率にも影響することも示した。これらの結果から、岩田君は樹状突起スパイン形態の発達段階での基礎レベル調節が成体における認知能力の違いに関与しているとするモデルを提唱した。

(Separate Form 3)

この一連の研究は、発達段階における海馬 CA1 領域の樹状突起スパイン形態の調節が後の成体における認知能力に関与していることを示し、ヒトでの関連も期待される。研究は緻密に計画され、優れた実験により結果が裏打ちされている。審査員全員で審査した結果、本大学院における学位授与の水準を十分に満たす論文であると判断した。