

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 31 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K14309

研究課題名（和文）細胞内カルシウム放出の制御を介したシナプス伝達修飾機構の解明

研究課題名（英文）Elucidation of the mechanism of modulation of synaptic transmission by the regulation of intracellular calcium release

研究代表者

真鍋 俊也（Manabe, Toshiya）

東京大学・医科学研究所・教授

研究者番号：70251212

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,000,000円

研究成果の概要（和文）：これまで機能がほとんど解明されていないカルシウム動態調節分子の役割を明らかにすることを試みた。この分子のシナプス部位特異的遺伝子改変マウスを作製し機能解析を行った。海馬スライス標本を用いた電気生理学的解析においては、シナプス後部特異的な分子A欠損マウスでは長期増強が有意に減弱し、シナプス前終末特異的な分子A欠損マウスでは、低頻度持続刺激によるシナプス応答が増大することを見出した。行動実験においては、分子B欠損マウスにおいて、異常がある可能性を見出した。

研究成果の概要（英文）：In this study, we tried to elucidate roles of molecules that regulate calcium dynamics. We analyzed the functions of the molecules whose roles in calcium dynamics are not well known, using synapse site-specific gene-targeted mice. In the electrophysiological analysis with hippocampal slices, long-term potentiation of excitatory synaptic transmission was significantly reduced in postsynaptic site-specific Molecule A-deficient mice, whereas synaptic responses were increased during prolonged low-frequency stimulation in presynaptic terminal-specific Molecule A-deficient mice. We also found the possibility of the impairment in behavioral tests in Molecule B-deficient mice.

研究分野：神経科学

キーワード：神経科学 生理学 生体分子 脳・神経 遺伝子 シナプス伝達 可塑性 カルシウム

1. 研究開始当初の背景

記憶などの高次脳機能は、シナプスにおける伝達効率の長期的変化によりもたらされ、一部の例外を除いて、シナプス後細胞で発現するとされている。私たちの研究室も含め、世界中の多くの研究室でシナプス後細胞での可塑性誘導・発現機構が明らかにされており、細胞内のCa²⁺動態が重要であると考えられているが、その機構については不明の点が多い。一方、可塑性が誘導されるためには、神経伝達物質の放出や放出機構自体の可塑的变化が決定的に重要であるが、これまでこの領域については研究が十分に進んでいない。シナプス前終末での放出過程の可塑性を明らかにしなければ、シナプス機能のごく一面しかみていないことになり、シナプス可塑性の本質の全貌を解明することは難しい。ある種の神経疾患では、神経伝達物質の放出機構の異常が関与しており、その短期的・長期的修飾機構を明らかにすることは、基礎神経科学だけでなく、臨床的にもきわめて大きな意義を有する。

細胞内Ca²⁺濃度の調節機構に関しては多くの分子が関与するが、そのひとつとして分子Aおよび分子Bがある。これらの分子はおもに小胞体(ER)上に存在することは知られているが、それらの機能については、これまで神経系以外の組織で解析が進められ、神経系における役割については、まだほとんど明らかになっていない。分子Aはこの現象に必須の分子であり、分子BがCa²⁺センサーの役割を果たすと考えられているが、分子Aの欠損マウスは成長不全を示し、周産期致死であるため、その表現型については十分解析されていない。ごく最近になって、分子Aが小脳機能に、分子Bがアルツハイマー病に関与する可能性が示唆されている。

2. 研究の目的

本研究計画では、マウス海馬CA1領域の興奮性シナプスをモデルとして、正常マウス、シナプス後細胞特異的コンディショナルノックアウトマウス(cKO)マウス、および、シナプス前終末特異的cKOMausを作製し、その海馬スライス標本を用いて、分子Aおよび分子Bによる小胞体および終末内のCa²⁺動態調節が、CA1領域における長期増強(LTP)や長期抑圧(LTD)などのシナプス後性の可塑性の誘導・発現において、どのような役割を果たすか、また、海馬CA1シナプスでの神経伝達物質の放出およびその可塑性をどのように修飾するか、さらに、LTPがシナプス前終末で誘導・発現することが知られている海馬CA3領域苔状線維シナプスでのシナプス前終末における神経伝達物質放出機構とLTPの誘導・発現にどのように関与するかを明らかにする。また、分子Aおよび分子BによりCaMKIIが活性化される可能性があるため、

そのリン酸化や下流分子であるRac1/Cdc42の活性化が変化しているかどうかを検討する。さらに、これらのcKOMausを使って、分子Aおよび分子BによるCa²⁺制御機構が個体レベルでどのような役割を果たしているかを解明する。

3. 研究の方法

分子Aおよび分子Bの海馬CA1シナプスおよびCA3苔状線維シナプスのシナプス部位特異的欠損マウスを作製する。それぞれの変異マウスから海馬スライス標本を作製し、細胞外電位記録法やホールセル・パッチクランプ記録法により電気生理学的解析を進める。シナプス前終末およびシナプス後細胞特異的に分子Aおよび分子Bが欠損しているマウスを用いて、入出力関係やシナプス前性短期可塑性などのシナプス伝達の基本特性やLTPやLTDなどの長期シナプス可塑性に異常がみられるかどうかを検討する。また、これらの変異が、個体レベルでどのような行動学的異常を引き起こすかを検討し、分子Aおよび分子Bの高次脳機能における役割を明らかにする。さらに、分子Aおよび分子Bが関与する行動学実験において、分子Aおよび分子Bの発現がどのように調節されるかを生化学的に解析する。また、分子Aおよび分子Bの下流シグナル系の生化学的解析も行う。これらの解析により、分子Aおよび分子Bが関与する現象のシナプス機能と高次脳機能における役割を解明する。

本研究計画では、中枢神経系における分子Aおよび分子Bの役割を明らかにするため、シナプス・ネットワークレベルでは海馬スライス標本を用いた電気生理学的解析を、個体レベルでは高次脳機能を検討できる神経行動学的解析とそれに伴う生化学的解析を行う。ここで使用する遺伝子改変マウスは、すでに作製済み、あるいは、入手済みである。ここでは、以下の4種類のマウスを適宜交配し、実験に用いるマウスを作製する。分子Aの遺伝子がCre-loxPシステムにより破壊される変異マウス。分子Bの遺伝子がCre-loxPシステムにより破壊される変異マウス。海馬CA3錐体細胞特異的にCreを発現するノックインマウス(GluK4の遺伝子座にCre遺伝子を挿入)。CaMKII α プロモータによりCreを発現するトランスジェニックマウス(ここで用いる系統は、海馬内においては、CA3錐体細胞ではCreを発現せず、CA1錐体細胞でのみ発現がみられる当研究室保有のものである)。

CA1シナプスのシナプス後部での分子Aおよび分子Bのシナプス伝達とその可塑性における役割の解析：分子A/loxPマウスとCaMKII α /Creマウスを掛け合わせることで、海馬CA1領域の錐体細胞でのみ分子Aが欠損する変異マウスを作製する。分子Bについても、同様に変異マウスを作製する。分子Aおよび分子Bのダブルノックアウトマウス

スについても同様の解析を進める。これらの変異マウスでは、CA3 錐体細胞ではCreが発現していないため、その軸索であるシャッフアー側枝のシナプス前終末では遺伝子操作の影響は受けない。したがって、シャッフアー側枝とCA1 錐体細胞間に形成されるCA1 シナプスにおいては、シナプス前終末では分子Aおよび分子Bが発現しているが、シナプス後細胞には発現しないことから、シナプス後細胞における分子Aおよび分子Bの機能を選択的に解析できることになる。これらの変異マウスを用いて、以下のような解析を進める。免疫電顕による形態学的解析やPSD分画を用いた生化学的解析などにより、予想通りにシナプス後細胞のみで分子Aおよび分子Bが欠損していることを確認する。海馬スライス標本を用いて、CA1 シナプスにおけるシナプス伝達の基本特性を電気生理学的に解析する。具体的には、シナプス後部の伝達物質に対する感受性の変化を明らかにするために、細胞外電位記録による入出力関係の解析、ホールセル記録による微小興奮性シナプス後電流 (mEPSC) の解析などを行う。シナプス後細胞依存性の短期可塑性である短期増強 (STP) に異常がみられるかどうかを確認する。具体的には、長期的な可塑性を誘導できない比較的弱い高頻度刺激 (たとえば、20 Hz、1秒刺激や100 Hz、0.1秒刺激など) を与えて、STPに異常があるかどうかを観察する。記憶形成の基盤であると考えられているシナプス後細胞依存性のLTP、あるいは、LTDに異常があるかどうかを観察する。具体的には、100 Hz、1秒刺激を1回、あるいは、100 Hz、1秒刺激を10秒間隔で4回与えるなどして、LTPを誘導する。ナイーブなスライス標本、および、シナプス活動を引き起こしたスライス標本を用いて、分子Aおよび分子Bにより活性化される可能性のあるCaMKII α のリン酸化やその下流分子であるRac1/Cdc42の活性 (GTP-Rac1/Cdc42を測定) を生化学的に解析する。

CA1 シナプスのシナプス前終末での分子Aおよび分子Bのシナプス伝達とその可塑性における役割の解析：海馬スライス標本を用いて、電気生理学的解析を進める。CA1 シナプスでは、シナプス前性のLTPなどの長期可塑性は存在しないというのが一般的に認められているが、短期的なシナプス前性可塑性が存在することが知られている。次の項目について、順次実験を進める。2発刺激促進 (PPF：入力線維に50ミリ秒程度の間隔で2発刺激を与えると2発目のシナプス応答が増大する現象で、神経伝達物質放出確率に依存することが知られている)、テタヌス後増強 (PTP：NMDA受容体のアンタゴニストの存在下でLTPをブロックした状態で、100 Hz、1秒の高頻度刺激を与えたときにみられるシナプス前性の短期増強)、低頻度持続刺激 (5 Hz程度の刺激頻度で3分程度続けて刺激する。これにより、神経伝達物質放出確率

の変化やシナプス小胞の動態が明らかにできる)。分子Aおよび分子Bにより制御される現象が神経伝達物質放出に関与するという報告はこれまでまったくなく、もし異常が検出できれば、世界的に大きなインパクトを与えることは疑いない。

CA3 苔状線維シナプスのシナプス前終末での分子Aおよび分子Bのシナプス伝達およびその可塑性における役割：苔状線維シナプスでは、CA1 シナプスなどのより一般的なシナプスとは異なり、1 Hz程度の持続した低頻度刺激で、シナプス前性の大きなシナプス伝達増強が観察される (CA1 シナプスでは、ごく短期的な増強に引き続き抑圧が誘導される)。さらに、このシナプスでは、シナプス後性の長期可塑性は存在せず、シナプス前性のLTPおよびLTDが誘導される。そこで、苔状線維シナプスより、細胞外電位記録により、興奮性シナプス後電位を記録し、100 Hz、1秒の高頻度刺激を与え、当研究室で保有する歯状回でCreを発現する変異マウスでLTPに異常がみられるかどうかを観察する。また、1 Hz、3分の持続低頻度刺激を与え、LTDに異常があるかどうかを検討する。

分子Aおよび分子Bにより制御される現象が個体レベルにおける高次脳機能におよぼす影響に関する解析：これまで検討してきた遺伝子改変マウスを用いて、基本的な脳神経機能や高次脳機能を網羅的に解析できる行動実験バッテリーを行う。その中で異常が同定された項目について、詳細な神経行動学的解析を進める。また、海馬における電気生理学的解析で異常が観察された場合には、記憶形成に関与する行動学的解析をより詳細に進める。さらに、情動に関するバッテリー検査で異常が観察された場合には、扁桃体における電気生理学的解析を行う。

分子Aおよび分子Bのノックアウトマウスで異常が観察された行動実験における分子Aおよび分子Bの発現変化の生化学的解析：分子Aおよび分子Bが関与することが明らかになった行動実験で、その遂行により分子Aおよび分子Bの発現変化が起こるかどうかを確認するため、行動実験後の脳の各部位で分子Aおよび分子Bの発現量を測定するとともに、CaMKII α のリン酸化とRac1/Cdc42の活性を特定する。これにより、高次脳機能の発現における分子Aおよび分子Bおよびその下流での生化学的な調節機構を明らかにする。

4. 研究成果

本研究計画では、これまで中枢神経系での機能がほとんど解明されていないカルシウム動態調節分子の役割を明らかにすることを試みた。この分子のシナプス前終末およびシナプス後細胞それぞれでのシナプス伝達とその可塑性における役割とそれにより調節されるカルシウム動態のシナプスおよび高

次脳機能における役割を明らかにするために、この分子のシナプス部位特異的遺伝子改変マウスを作製し、その機能を電気生理学的、生化学的、および、行動学的解析により、分子、細胞、ネットワークおよび個体レベルで明らかにすることを試みた。まず、平成27年度は、海馬シナプス部位特異的にこの分子が欠損する変異マウスの作製を行い、その作出に成功した。平成28年度はこの変異マウスを用いた機能解析を進めた。海馬における当該分子の役割を明らかにするために、海馬スライス標本を用いた電気生理学的解析、および、個体マウスを用いた行動学的解析を行った。電気生理学的解析においては、海馬特異的コンディショナルノックアウトマウスから定法に従って海馬スライス標本を作製し、海馬CA1領域において細胞外電位記録法により興奮性シナプス応答を記録した。まず、分子Aのシナプス部位特異的遺伝子改変マウスの機能解析を進めた。シナプス後部およびシナプス前終末特異的な分子A欠損マウスでは、通常のシナプス応答には明らかな異常はみられなかったが、シナプス前性およびシナプス後性のいずれの可塑性においても異常を見出すことができた。具体的には、シナプス後部特異的な分子A欠損マウスでは、100Hz、1秒の高頻度刺激により誘導されるLTPが有意に減弱することを見出した。一方、シナプス前終末特異的な分子A欠損マウスでは、低頻度持続刺激によるシナプス応答が増大することを見出した。これらの結果から、この分子によるカルシウム動態調節によりシナプス可塑性が制御されることが明らかとなった。個体レベルでの行動実験においては、分子B欠損マウスにおいて、異常がある可能性を見出しており、これらの成果をまとめて、近いうちに論文として成果を発表する予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計5件)

Manabe, T. NMDA receptor-independent LTP in hippocampal interneurons. *J. Physiol.*, 2017, in press.

Kobayashi, S., Hida, Y., Ishizaki, H., Inoue, E., Tanaka-Okamoto, M., Yamasaki, M., Miyazaki, T., Fukaya, M., Kitajima, I., Takai, Y., Watanabe, M., Ohtsuka, T. and Manabe, T. The active zone protein CAST regulates synaptic vesicle recycling and quantal size in the mouse hippocampus. *Eur. J. Neurosci.* 44:2272-2284, 2016. DOI: 10.1111/ejn.13331

Nakazawa, T., Hashimoto, R., Sakoori, K., Sugaya, Y., Tanimura, A., Hashimoto-dani, Y., Ohi, K., Yamamori,

H., Yasuda, Y., Umeda-Yano, S., Kiyama, Y., Konno, K., Inoue, T., Yokoyama, K., Inoue, T., Numata, S., Ohnuma, T., Iwata, N., Ozaki, N., Hashimoto, H., Watanabe, M., Manabe, T., Yamamoto, T., Takeda, M. and Kano, M. Emerging roles of ARHGAP33 in intracellular trafficking of TrkB and pathophysiology of neuropsychiatric disorders. *Nat. Commun.* 7:10594, 2016
DOI:10.1038/ncomms10594

Nakamura, T., Arima-Yoshida, F., Sakaue, F., Nasu-Nishimura, Y., Takeda, Y., Matsuura, K., Akshoomoff, N., Mattson, S. N., Grossfeld, P. D., Manabe, T. and Akiyama, T. PX-RICS-deficient mice mimic autism spectrum disorder in Jacobsen syndrome through impaired GABA_A receptor trafficking. *Nat. Commun.* 7:10861, 2016. DOI:10.1038/ncomms10861

Wakabayashi, C., Numakawa, T., Odaka, H., Ooshima, Y., Kiyama, Y., Manabe, T., Kunugi, H. and Iwakura, Y. IL-1 receptor-antagonist (IL-1Ra) knockout mice show anxiety-like behavior by aging. *Neurosci. Lett.* 599:20-25, 2015. DOI:10.1016/j.neulet.2015.05.019

〔学会発表〕(計3件)

Mori, K., Koebis, M., Ohno, H., Kobayashi, S., Manabe, T., Aiba, A. and Iino, Y. Generation and characterization of calsyntenin triple knockout mice. (The Physiological Society of Japan, The 94th Annual Meeting) (2017年3月30日、アクトシティ浜松、浜松市)

Tanaka, T., Okuda, K., Kobayashi, S., Murakami, T., Fukaya, M., Takao, K., Watanabe, A., Hagiwara, M., Mizuguchi, M., Sakagami, H., Miyakawa, T. and Manabe, T. Functional analyses of the CDKL5, a causative gene for severe neurodevelopmental disorders accompanied by intractable epilepsies. (Society for Neuroscience, Annual Meeting) (2015年10月21日、シカゴ、米国)

Tanaka, T., Okuda, K., Kobayashi, S., Fukaya, M., Takao, K., Watanabe, A., Murakami, T., Hagiwara, M., Sakagami, H., Mizuguchi, M., Miyakawa, T. and Manabe, T. CDKL5 controls NMDA receptor function and regulates memory, emotion and seizure susceptibility. (Japan Neuroscience Society, Annual

Meeting) (2015年9月13日、神戸
国際会議場、神戸市)

〔図書〕(計1件)

真鍋俊也、中外医学社、恐怖記憶の神経
機構「Annual Review 神経2017」編
集：鈴木則宏、荒木信夫、宇川義一、桑
原聡、川原信隆、2017、P6-14

〔その他〕

ホームページ等

http://www.ims.u-tokyo.ac.jp/NeuronalNetwork/Neuronal_Network/Index_japanese.htm

6. 研究組織

(1) 研究代表者

真鍋 俊也 (MANABE, Toshiya)
東京大学・医科学研究所・教授
研究者番号：70251212