

機関番号：8 2 4 0 1

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010 年

課題番号：20500363

研究課題名 (和文)

細胞内プール可視化によるアンパ受容体トラフィック制御機構の解明

研究課題名 (英文) Elucidation of regulatory mechanism of AMPA-receptor' s trafficking by visualization of its intracellular pool.

研究代表者

山口 和彦 (YAMAGUCHI KAZUHIKO)

独立行政法人理化学研究所・運動学習制御研究チーム・副チームリーダー

研究者番号：0 0 1 9 1 2 2 1

研究成果の概要 (和文)：

運動学習の細胞機構として、小脳プルキンエ細胞シナプスの伝達効率の長期間の低下 (長期抑圧 LTD) が考えられている。我々は培養したプルキンエ細胞にウイルスベクターを用いて緑色蛍光蛋白質、及び赤色蛍光蛋白質で標識したアンパ型グルタミン酸受容体を同時発現させることにより、学習刺激により樹状突起スパイン形態は変化せず、アンパ受容体がスパインからシャフト部へトランスロケートすることを画像解析を用いて見出した。

研究成果の概要 (英文)：

Long-term depression (LTD) of synaptic efficacy in the cerebellar Purkinje cell provides an underlying mechanism for motor learning. We analyzed distribution of intracellular pool of AMPA-receptors (AMPA-Rs) by means of double-expression of Green fluorescent protein (GFP) and Red fluorescent protein (mCherry)-tagged AMPA-Rs in cultured Purkinje cell. We found that LTD-stimulation caused translocation of intracellular pool of AMPA-Rs from the spine to the shaft of dendrite, but it caused no change in shape of the spine.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2009 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：脳神経科学・神経・筋肉生理学

キーワード：プルキンエ細胞・シナプス可塑性・受容体トラフィック
グルタミン酸受容体・スパイン・長期抑圧

1. 研究開始当初の背景

(1) 活動依存性受容体トラフィックと構成性受容体トラフィック：学習・記憶の基礎であるシナプス可塑性のメカニズムのひとつとして、アンパ型グルタミン酸受容体のシナプス後膜での発現数が変化することが知られている。アンパ受容体の圧倒的多数は細胞内にプールされており、シナプス後膜プールとの間で常時、受容体分子の構成性

トラフィックによる往来があり、運動学習の基礎メカニズムであるシナプス伝達の長期抑圧 (LTD) もエキソサイトーシスを介した膜への受容体挿入と、エンドサイトーシスを解した膜からの受容体除去の、平衡のシフトとして理解する必要があると思われる。しかしシナプス膜へのアンパ受容体の供給源である細胞内プール、特に最も重要なスパイン内プールの動態と LTD の関係を解析し

た研究は全く見当たらない。

(2) 海馬ではシナプス長期増強 LTP に伴い、スパインの大きさが増加することが知られているが、小脳プルキンエ細胞では LTD に伴い、スパインの大きさは変化しないことが報告されており、機能変化に対応する構造変化が全く知られていなかった。

2. 研究の目的

(1) 学習活動に伴うアンパ受容体細胞内プールの動態の解明： スパイン内での受容体プールの動態を画像解析するためには、スパイン全体とアンパ受容体を別の色の蛍光蛋白質でラベルし、生きた状態で LTD 誘発刺激を与え、結果をタイムラプスモードで観察する必要がある。本研究では培養小脳プルキンエ細胞を用い、緑色蛍光蛋白質 (GFP) を細胞質に発現させ、一方、赤色蛍光蛋白質 mCherry で標識したアンパ受容体も同時に発現させ、化学的 LTD 刺激によって、スパイン形態の変化とアンパ受容体のスパイン内プールにどのような変化が生じるか、共焦点顕微鏡により画像解析することを第一の目的とした。

(2) アンパ受容体細胞内プールの制御因子の解明： LTD の誘導には代謝型グルタミン酸受容体の活性化、蛋白質キナーゼ C の活性化等が必要である。どのような物質による刺激がアンパ受容体のスパイン内プールの移動を惹き起こすか、を明らかにし、アンパ受容体細胞内プールのトランスロケーションを制御する細胞内情報伝達系を明らかにし、LTD 誘導とアンパ受容体細胞内プールのトランスロケーションの因果関係を明らかにすることを第 2 の目的とした。

3. 研究の方法

(1) プルキンエ細胞の培養： 培養したラットのプルキンエ細胞を用いて、共焦点顕微鏡によるタイムラプス観察を行った。培養プルキンエ細胞が生体内と同様のスパインを持つように、底部の素材、基質、培地、表面積/体積比等の培養条件を最適地になるように調整した。

(2) ウイルスベクターと蛍光蛋白質の選択： 当初は赤色蛍光蛋白質 (単量体 DsRed) をレンチウイルスベクターを用いて細胞全体に発現させることを試みたが、発現効率が極めて低いため、緑色蛍光蛋白質 GFP をレンチウイルスベクターを用いて培養神経細胞に発現させた。一方、プルキンエ細胞で発現しているアンパ受容体のサブタイプ、GluR2 を別の赤色蛍光色素 mCherry によってラベルした。これはシンドビスウイルスベクターを用いてプルキンエ細胞に感染させ、発現させた。

(3) 共焦点顕微鏡によるタイムラプス観察：

スパイン内のアンパ受容体プールの動態を観察するために、共焦点顕微鏡 (オリンパス FV1000) に 100 倍の対物レンズを装着して観察した。まず、10 分間、バックグラウンドの観察を行い、ついで高 K イオン濃度のグルタミン酸溶液を加え、30 分間、タイムラプス方で画像を記録した。その後、スパイン密度、形状、mCherry/GFP の比率等のパラメータについて画像解析を行った。

4. 研究成果

(1) アンパ受容体細胞内プールのトランスロケーション： 通常、アンパ受容体はスパイン表面、スパイン内、および樹状突起シャフト内に分布していた。GFP でラベルされたスパインは運動をしており、向きを変えたり、多少の太さ、長さの変化は見られた。しかし、LTD 刺激の前後で、スパイン密度、長さ、太さに有意な差は認められなかった。これに対して、化学的 LTD 刺激により、スパイン部の mCherry/GFP の輝度比は有意に低下した。これはアンパ受容体の細胞内プールが、LTD 刺激により、スパインから樹状突起シャフト部にトランスロケートしたことを示している。このことは機能的には細胞内 GluR2 のエクソサイトーシスを介したシナプス膜への挿入速度が LTD に伴い、遅くなっていることを予想させた。そこで電気生理学的に調べたところ、挿入速度の遅延が確認された。

(2) アンパ受容体細胞内プールのトランスロケーション調節因子： アンパ受容体細胞内プールのトランスロケーションには代謝型グルタミン酸受容体の活性化、蛋白質キナーゼ C (PKC) の活性化等が必要であった。これらは LTD の誘導に必要な情報伝達系と同一であり、「アンパ受容体細胞内プールのトランスロケーションが LTD の原因である」という仮説と矛盾しない。一方、アクチン脱重合阻害剤はアンパ受容体細胞内プールのトランスロケーションを阻害した。LTD をアクチン脱重合阻害剤が阻害するか否か、報告はなかったが、生理実験の結果、LTD 誘導にはアクチン脱重合が必要であることが示された。

以上の結果は、アンパ受容体細胞内プールのトランスロケーションが LTD の原因の、少なくとも一部である、と言う仮説を支持している。すなわち、LTD ではアンパ受容体の細胞内プールがスパインからシャフトにトランスロケートすることで、エクソサイトーシスを介したアンパ受容体のシナプス膜への挿入が低下し、平衡がエンドサイトーシスによる受容体除去の側にシフトする結果、シナプス膜表面の受容体密度が減少し、LTD が生じたと考えられる。

また、この現象は、小脳プルキンエ細胞において、初めて学習活動に伴い、構造変化が

生じたことを捉えたものであり、さらにこの現象の解析から、より長期の運動学習記憶の固定化の仕組みを明らかにすることができると考えられる。

本研究により、アクチン脱重合が運動学習過程に必要なことが示されたが、運動障害後のリハビリテーションの促進等に、アクチン系を制御する薬剤が効果をもたらす可能性が示唆され、臨床応用への展望が開かれるかもしれない。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 5 件)

- ① Yamashita N, Mosinger B, Roy A, Miyazaki M, Ugajin K, Nakamura F, Sasaki Y, Yamaguchi K, Kolattukudy P, Goshima Y. CRMP5 (Collapsin Response Mediator Protein 5) regulates dendritic development and synaptic plasticity in the cerebellar Purkinje cell. *J. Neurosci.* 31: 1773-1779 (2011) 査読有
- ② Shiina N, Yamaguchi K and Tokunaga M. RNG105 deficiency impairs the dendritic localization of mRNAs for Na⁺/K⁺ ATPase subunit isoforms and leads to the degeneration of neuronal networks. *J. Neurosci.* 30: 12816-12830 (2010) 査読有
- ③ Endo, S., Shuto, F., Le, D.T., Okamoto, T., Ikeda, T., Suzuki, M., Kawahara, S., Yanagihara, D., Sato, Y., Yamada, K., Sakamoto, T., Kirino, Y., Hartell, N.A., Yamaguchi, K., Itohara, S., Naim, A., Greengard, P., Nagao, S., Ito, M. Dual involvement of G-substrate in motor learning revealed by gene deletion. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 106: 3525-3530 (2009) 査読有
- ④ Tanaka M, Yamaguchi K, Tatsukawa T, Theis M, Willecke K, Itohara S. Connexin43 and

Bergmann glial gap junctions in cerebellar function. *Front Neurosci.*, 2 (2): 225-233 (2008) 査読有

- ⑤ Tanaka, M., Yamaguchi, K., Tatsukawa, T., Nishioka, C., Nishiyama, H., Theis, M., Willecke K., Itohara, S. Lack of connexin43-mediated Bergmann glial gap junctional coupling does not affect cerebellar long-term depression, motor coordination or eyeblink conditioning. *Front. Behav. Neurosci.* 2: 1-14 (2008) 査読有

[学会発表] (計 20 件)

- ① 山口和彦、清水知佳、中澤敬信、伊藤正男 小脳プルキンエ細胞 GluR2 細胞内プールの樹状突起スパインからシャフトへの活動依存性移動の蛍光蛋白質 2 重発現法による解析 第 87 回日本生理学会大会 2010 年 5 月 19 日 盛岡
- ② Yamaguchi, K. AMPA-receptor trafficking in cerebellar Purkinje cell: A kinetic analysis using a whole-cell recording technique. IBRO School of Neuroscience Chinese University of Hong Kong, 2010 年 6 月 2 日 Hong Kong
- ③ 山口和彦、達吉郎、永雄総一、伊藤正男 ケージドペプチドを用いた小脳平行線維プルキンエ細胞間シナプスにおける AMPA 受容体トラフィックの速度定数の計測. 第 33 回日本神経科学大会 2010 年 9 月 2 日 神戸
- ④ Tatsukawa T, Nagao S, Yamaguchi K. Involvement of actin-myosin interaction in cerebellar long-term depression The 40th annual meeting of the Society for Neuroscience 2010 年 11 月 14 日 San Diego USA.
- ④ Lai SK, Shum DKY, Yung WH, Yamaguchi

- K. Chan YS. Perinatal perturbation of NMDA receptor in the vestibular nucleus attenuates cerebellar function. The 40th annual meeting of the Society for Neuroscience 2010年11月17日 San Diego USA.
- ⑤ Yamaguchi, K. AMPA-receptor trafficking in cerebellar Purkinje cell: A kinetic analysis. Symposium "Neural circuit: Develop and Plasticity" 5th Congress of FAONS and XXVIII Annual Meeting of IAN. 2010年11月27日 Lucknow India
- ⑥ Lai SK, Yamaguchi K. Yung WH, Chan YS. Attenuation of cerebellar plasticity after neonatal perturbation of NMDA receptors in the vestibular nucleus Poster 5th Congress of FAONS and XXVIII Annual Meeting of IAN. 2010年11月26日 Lucknow India
- ⑦ Yamaguchi K. Nagao S. Effects of LTD-Inducing Stimulation on Endocytic Rate-Constant of AMPA-Receptor Trafficking at Parallel Fiber-Purkinje Cell Synapse in Cerebellum 生理学研究所研究会 "記憶学習行動の基盤としてのシナプス可塑性" 2010年11月26日 岡崎
- ⑧ 山口和彦、小脳プルキンエ細胞における GluR2 細胞内プールの活動依存性トランスロケーションとシナプス可塑性：蛍光蛋白質 2 重発現法による解析 生理学研究所研究会 "シナプス伝達のご概念志向型研究" 2010年12月8日 岡崎
- ⑨ 山口和彦 AMPA 受容体トラフィックキングのキネティックとシナプス可塑性 神経組織の成長・再生・移植研究会題 24 回 学術集会 2009年6月21日 伊香保
- ⑩ Yamaguchi K. An integrative kinetic model of AMPA-receptors constitutive trafficking and LTD/LTP in cerebellar Purkinje cell 36th International Congress of Physiological Sciences 2009年7月28日 京都
- ⑪ 山口和彦 プルキンエ細胞樹状突起スパインにおける GluR2 細胞内プールの活動依存性移動への PKC の関与 第 32 回日本神経科学大会 2009年9月16日 名古屋
- ⑫ Yamaguchi K. Shimizu C, Sato Y, Furuichi T, Ito M. Translocation of GluR2 pool in the dendritic spine of cerebellar Purkinje cells under long-term depression. The 39th annual meeting of the Society for Neuroscience 2009年10月19日 Chicago USA
- ⑬ Yamaguchi K. Roles of actin in constitutive and activity-dependent trafficking of AMPA-receptors in the cerebellar Purkinje cell. US-Japan Brain Research Collaborative Program. Workshop on Receptor Trafficking and Cell Biology of Neurons: Physiology and Disease. 2008年2月26日 Pacific Grove USA
- ⑭ 山口和彦、清水知佳、佐藤友美、古市貞一、伊藤正男 小脳プルキンエ細胞樹状突起におけるグルタミン酸受容体の活動依存性分布変化 第 85 回日本生理学会大会 2008年3月26日東京
- ⑮ 山口和彦、清水知佳、佐藤友美、古市貞一、伊藤正男 小脳プルキンエ細胞樹状突起スパインにおけるアンパ受容体分布変化と長期抑圧 第 31 回日本神経科学大会 2008年7月10日東京
- ⑯ 濱裕、安藤亮子、山口和彦、宮脇敦史. アラキドン酸はアストロサイトの接触によって誘発されるシナプス形成のカギをにぎる. 第 31 回日本神経科学大会 2008年7月11日 東京

⑰ 山口和彦 プルキンエ細胞における
AMPA 受容体双方向性トラフィック
とモデルによる考察 生理学研究所研
究会 “新たなコンセプトでシナプス伝達を
考える” 2008年9月18日 岡崎

⑱ 山口和彦 小脳プルキンエ細胞における
AMPA受容体トラフィックの速度
論的解析と LTP/LTD のメカニズム 生理
学研究所研究会 シナプス研究会 ”シナ
プス成熟と可塑性のダイナミクス”
2008年12月4日 岡崎

⑲ 守村直子、山口和彦、安田浩樹、片山圭一、
原直子、太田摩耶、神谷明子、有賀純 LRR
膜貫通分子 Lrfr2/SALM1 は海馬興奮性シ
ナプスの形態や機能調節および可塑性に
関与する 第31回日本分子生物学会年
会・第81回日本生化学会大会 合同大会
2008年12月10日 神戸

⑳ Shiina N, Yamaguchi K, Tokunaga M.
RNG105 deficiency impairs the dendritic
transport on Na⁺/K⁺-ATPase subunit isoform
mRNA and the formation of synapses and
neuronal networks. 第31回日本分子生物学
学会年会・第81回日本生化学会大会 合同
大会 2008年12月11日 神戸

[図書] (計 1件)

① 山口和彦 東京大学出版会 分子・細
胞・シナプス, 2008、pp.55-90.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山口 和彦 (YAMAGUCHI KAZUHIKO)
独立行政法人理化学研究所・運動学習制御
研究チーム・副チームリーダー
研究者番号：00191221

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者
()

研究者番号：