

平成22年 5 月 13 日現在

研究種目：若手研究 (B)  
 研究期間：2008～2009  
 課題番号：20790202  
 研究課題名 (和文) 小脳バークマングリアの機能維持におけるイノシトール 1,4,5-三リン酸の役割  
 研究課題名 (英文) Role of inositol 1,4,5-trisphosphate in the maintenance of the function of cerebellar Bergmann glia  
 研究代表者  
 大久保 洋平 (OKUBO YOHEI)  
 東京大学・大学院医学系研究科・助教  
 研究者番号：40422282

研究成果の概要 (和文)：シナプスは神経同士の接点である。シナプス機能を維持することは、脳における安定な情報処理に不可欠である。バークマングリアはグルタミン酸トランスポーターを発現し、グルタミン酸を迅速に取り込むことで、シナプス伝達の正確性を保障している。我々は、イノシトール 1,4,5-三リン酸がグルタミン酸トランスポーターの発現量を維持し、グルタミン酸取り込み能を保つことを発見した。よってイノシトール 1,4,5-三リン酸はシナプス機能維持に不可欠である。

研究成果の概要 (英文)：Synapse is a connecting point between neurons. The maintenance of synaptic functions is essential for stable neuronal information processing in the adult brain. Bergmann glial cells express glutamate transporters that rapidly remove glutamate from the extracellular space, and play a critical role in the precise operation of synaptic transmission in the cerebellum. We found that a signaling cascade comprising inositol 1,4,5-trisphosphate is involved in glutamate transporter expression to maintain the capacity of glutamate clearance. Thus, inositol 1,4,5-trisphosphate is essential for the maintenance of synaptic function.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2009 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：神経科学

科研費の分科・細目：基礎医学・薬理学一般

キーワード：中枢・末梢神経、脳・神経、プルキンエ細胞、バークマングリア、カルシウム、IP3

## 1. 研究開始当初の背景

中枢神経系における代表的なグリア細胞であるアストロサイトは、正常な興奮性シナプス伝達に必須の存在である。小脳に存在するバグマングリアはアストロサイトの典型例としてよく研究されており、プルキンエ細胞の興奮性シナプスを取り巻くように突起を伸ばすことで、平行線維および登上線維終末から放出されたグルタミン酸がシナプス外へ漏れ出すのを防いでいる。加えて突起には数多くのグルタミン酸トランスポーターが発現し、シナプス間隙のグルタミン酸の除去を行っている。つまりバグマングリアはその形態的機能的特長により、シナプスの独立性および急峻なシナプス伝達に寄与しており、小脳におけるシナプス伝達に重要な機能を果たしている。しかしながらその機能を維持するための、バグマングリア細胞内シグナルは十分明らかになっていなかった。

## 2. 研究の目的

バグマングリアには多種類の受容体が発現し、神経伝達物質に反応して細胞内イノシトール 1,4,5-三リン酸 (IP<sub>3</sub>) シグナルが惹起されることが知られていた。そこで本研究では、生理的条件下での持続的 IP<sub>3</sub> シグナルが小脳バグマングリアのグルタミン酸除去機能の維持に関与することを、独自に開発した IP<sub>3</sub> シグナル抑制法により示すこととした。

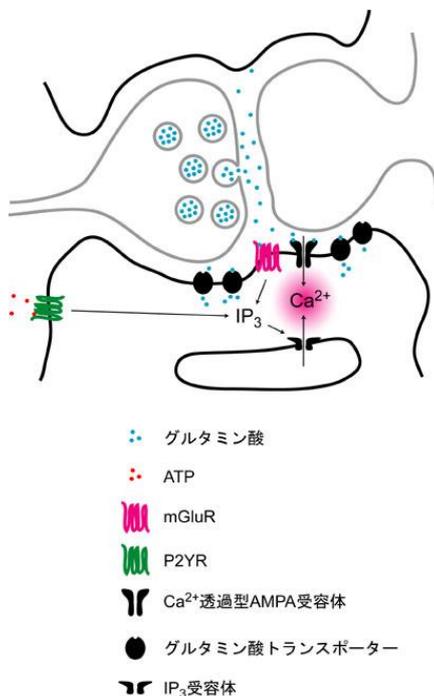


図1 バグマングリア内シグナル系

## 3. 研究の方法

これまでの研究で IP<sub>3</sub> の分解酵素である IP<sub>3</sub>-5-ホスファターゼ (5ppase) を発現させることで、IP<sub>3</sub> 濃度上昇を特異的にかつ長期間安定に抑えるという独創的な方法を確立した。またアデノウイルスベクターを用いることでバグマングリア選択的に高い感染効率で 5ppase を発現させることに成功している。具体的には 5ppase と感染マーカーである緑色蛍光タンパク質 (GFP) の cDNA をコードするアデノウイルスベクターをマウス小脳に注入し、約 48 時間後そのマウスを解剖し小脳スライスを作製する。注入部位周辺のバグマングリアが高い確率で感染し GFP の蛍光が観察される。コントロールには、GFP のみあるいは酵素活性が極めて弱い 5ppase 変異体を発現するウイルスベクターを用いる。まず、5ppase 発現バグマングリアに接するプルキンエ細胞で EPSC を測定することで、バグマングリアの機能面での変化を解析する。これには AMPA 受容体の脱感作阻害剤である cyclothiazide (CTZ) 存在下に、AMPA 受容体依存性 EPSC を測定することで、シナプス周辺におけるグルタミン酸滞留時間を推定する。

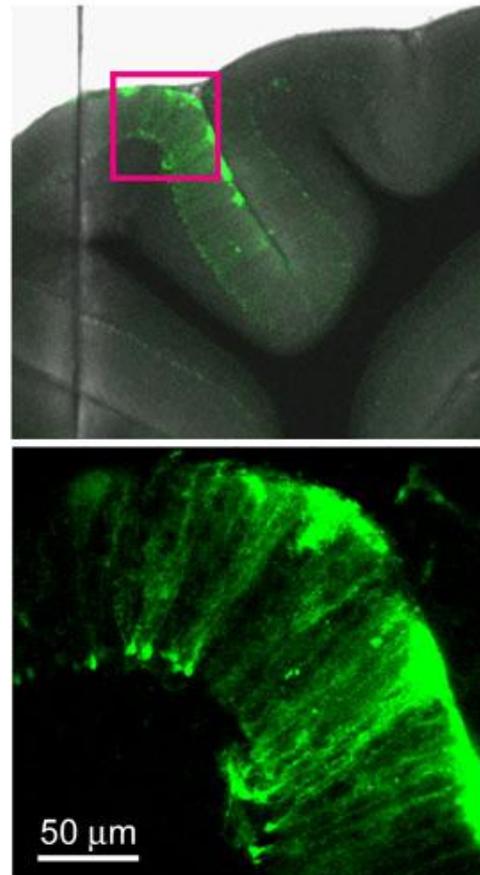
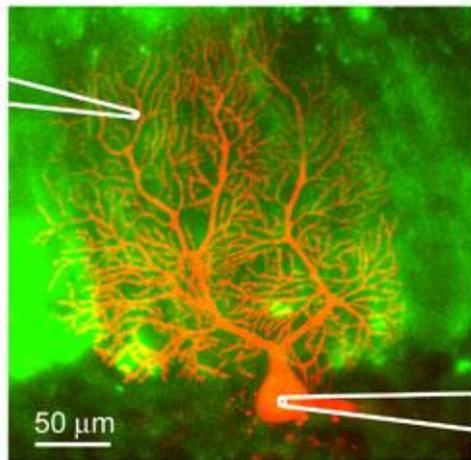


図2 5ppase 発現バグマングリア

#### 4. 研究成果

5ppase 発現バグマングリア周辺の平行線維シナプスについて、CTZ 存在下に、AMPA 受容体依存性 EPSC が顕著に延長することを観察した。これはシナプス周辺におけるグルタミン酸滞留時間の延長を示すものであり、バグマングリアのグルタミン酸除去機能が低下したことが示唆される。



Green: 5ppase-IRES-GFP  
Red: Alexa594

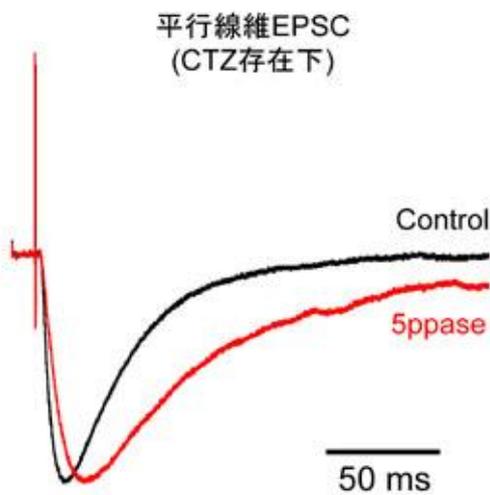


図3 5ppase 発現による、バグマングリアのグルタミン酸除去機能低下

そこでバグマングリアに発現するグルタミン酸トランスポーターの発現量を免疫染色法で解析したところ、GLAST の発現量が顕著に低下していることを発見した。さらにバグマングリアにおいて IP3 シグナルを惹起する P2Y レセプターのアнтаゴニストを慢性投与したところ、上記と同様の結果が得られた。以上のことから、成体脳内のバグマングリアにおける持続的な IP3 シグナルが、

GLAST の発現量維持を担い、結果としてシナプス機能を維持していることが明らかになった。以上の成果をもとに論文を執筆し投稿中である。またグルタミン酸の滞留時間を直接観察するための方法として、新たに蛍光グルタミン酸指示分子を開発した。これを用いシナプス外グルタミン酸イメージング法を確立し、その成果を論文として発表した。

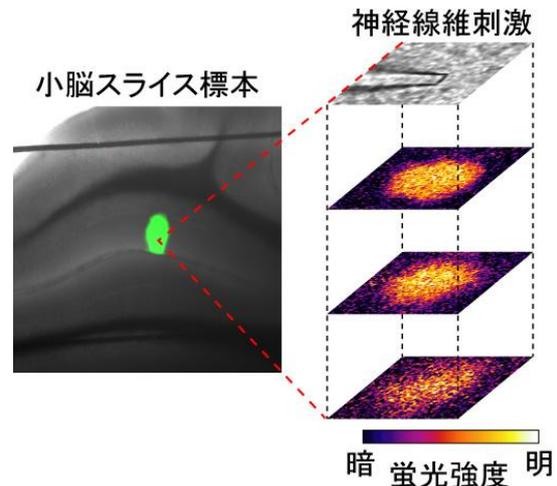


図4 シナプス外グルタミン酸イメージング

#### 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2件)

- ① Yohei Okubo, Hiroshi Sekiya, Shigeyuki Namiki, Hirokazu Sakamoto, Sho Inuma, Miwako Yamasaki, Masahiko Watanabe, Kenzo Hirose, and Masamitsu Iino. Imaging extrasynaptic glutamate dynamics in the brain. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 査読有 107:6526-6531 (2010)
- ② Naotoshi Nakamura, Toshiko Yamazawa, Yohei Okubo and Masamitsu Iino. Temporal switching and cell-to-cell variability in  $Ca^{2+}$  release activity in mammalian cells. Molecular Systems Biology 査読有 5: Article number 247 (online journal) (2009)

〔学会発表〕（計7件）

- ① 大久保洋平、グルタミン酸スピルオーバーの時空間動態、第83回日本薬理学会年会、2010年3月18日、大阪府大阪市、大阪国際会議場
- ② 大久保洋平、シナプス外グルタミン酸動態の可視化解析、シナプス研究会「シナプス機能と病態」、2009年12月15日、愛知県岡崎市、生理学研究所
- ③ 大久保洋平、シナプス外グルタミン酸動態の可視化解析、第37回薬物活性シンポジウム、2009年10月10日、宮城県仙台市、東北薬科大学
- ④ 大久保洋平、シナプス外グルタミン酸動態の可視化、第32回日本神経科学大会、2009年9月17日、愛知県名古屋市、名古屋国際会議場
- ⑤ 大久保洋平、シナプス外グルタミン酸動態の可視化解析、第120回日本薬理学会関東部会、2009年7月11日、東京都文京区、東京医科歯科大学
- ⑥ 大久保洋平、蛍光グルタミン酸指示分子を用いたシナプス間隙からのグルタミン酸漏出の可視化、第82回日本薬理学会年会、2009年3月18日、神奈川県横浜市、パシフィコ横浜
- ⑦ 大久保洋平、蛍光グルタミン酸指示分子を用いたシナプス間隙からのグルタミン酸漏出の可視化、第31回日本神経科学大会、2008年7月9日、東京都千代田区、東京国際フォーラム

〔その他〕

ホームページ等

<http://calcium.cmp.m.u-tokyo.ac.jp/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

大久保 洋平 (OKUBO YOHEI)

東京大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：40422282

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし