

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 16 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009 年～2011 年

課題番号：21300118

研究課題名（和文） 脳の機能と疾患におけるグルタミン酸受容体の動態

研究課題名（英文） Glutamate receptor dynamism in the brain functions and diseases

研究代表者 崎村 建司(SAKIMURA KENJI)

(新潟大学・脳研究所・教授)

研究者番号：40162325

研究成果の概要（和文）：本研究の目的は、グルタミン酸受容体の発現と安定性、さらにシナプスへの移行と除去が細胞の種類や脳部位により異なった様式で調節され、このことが単純な入力を多様な出力に変換し、複雑な神経機能発現の基礎課程となるという作業仮説を証明することである。この解析ために、4 種類の AMPA 型グルタミン酸受容体、4 種類の NMDA 型受容体はじめとして複数の floxed 型標的マウスを樹立した。また、GAD67-Cre マウスなど幾つかの Cre ドライバーマウスを樹立した。これらのマウスを交配させ解析した結果、海馬 CA3 では、GluN2B がシナプスでの NMDA 型受容体の機能発現に必須であることを明らかにした。また、小脳 TARP γ -2 と γ -7 が AMPA 型受容体の発現に必須であることを見出した。さらに発達期のシナプスにおいて、GluN2A と GluN2B が異なった様式で AMPA 型受容体を抑制することを単一神経細胞でのノックアウトを用いて示した。

研究成果の概要（英文）：The objective of this study is to verify a working hypothesis that the expression and stability of glutamate receptors, including (further) transition to synapses and removal, are responsible for (are involved in) different modes of neuronal regulation depending on each kind of brain cells and regions, which transforms simple inputs into various types of outputs, thus underlying complex neuronal expressions. For this purpose, we established floxed mice of 4 AMPA-type- and 4 NMDA-type-glutamate receptors, as well as several kinds of synaptic functional molecules floxed mice. We also generated Cre-driver mice such as GAD67-Cre mouse. By inter-crossing these mice, we have clarified that a GluN2B subunit is crucial for synaptic functional expression of NMDA-type receptors in a CA3 area of hippocampus, and that TARP γ -2 and γ -7 are essential for the expression of AMPA type receptors in cerebellum. We have also shown that at developing synapses GluN2A and GluN2B suppress AMPA receptors in their own mode, by using a single-cell NMDA receptor subunit deleted mouse.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	4,700,000	1,410,000	6,110,000
2010 年度	4,900,000	1,470,000	6,370,000
2011 年度	4,900,000	1,470,000	6,370,000
年度			
年度			
総計	14,500,000	4,350,000	18,850,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：神経科学・神経科学一般

キーワード：分子・細胞神経科学

1. 研究開始当初の背景

申請者等は、脳機能の分子の基盤を理解する端緒として主要な興奮性シナプス伝達を担うグルタミン酸受容体チャンネルに着目し、その分子動態と脳機能の関連を広範に解析してきた。NMDA 型受容体サブユニット GluR ϵ 1/NR2A 及び GluR ϵ 2/NR2B のノックアウトマウスの解析は、これら受容体が脳機能に果たす役割の一端を明らかにしたが、一方通常のノックアウト法そのものの限界をも示した(Sakimura et al. Nature 1995, Kutsuwada et al. Neuron 1996)。そこで申請者は、脳機能の分子レベルでの解明には、発生段階での致死や発達異常が避けられる、脳の部位と時期選択的に遺伝子改変ができるコンディショナルノックアウト法が必須であると考え、Cre/loxP 組換え系を用いた変異マウスの開発を進めてきた(Kitayama et al. BBRC 2000, Takeuchi et al. J Neurosci 2005)。また、脳機能解析で問題とされる遺伝子背景の問題を解決するために、脳機能解析に適した近交系マウス C57BL/6 系統より独自に ES 細胞株 RENKA を樹立し、129 系統由来 ES 細胞株と変わらない効率で遺伝子改変マウスを作製できる方法を実用化することに成功した(Mishina & Sakimura, Neurosci Res 2007)。

また申請者等は、当初 AMPA 型受容体の膜表面への発現とシナプスへの移送に関与すると報告された stargazin が(Bredt & Nicoll, Neuron 2003)、AMPA 型受容体と直接会合しそのチャンネル活性を上昇させる補助的なサブユニットであることを最初に見出した(Yamazaki et al. Neurosci Res. 2004)。stargazin ファミリータンパクは TARPs (transmembrane AMPA receptor regulatory proteins)と命名され、AMPA 型受容体の補助的サブユニットと定義されるようになった。

申請者等は、これらの成果を基に TARP ファミリーを含め AMPA 型及び NMDA 型グルタミン酸受容体を構成する全てのサブユニットをコンディショナルに欠損できる floxed マウスを樹立し、解析を始めた。その結果グルタミン酸受容体チャ

ネルの安定性と発現メカニズム、さらに活性調節機序の様式は細胞種(脳部位)により異なっている、という作業仮説を持つに至った。

2. 研究の目的

本研究の目的は、グルタミン酸受容体の発現と安定性、さらにシナプスへの移行と除去が細胞の種類や脳部位により異なった様式で調節され、このことが単純な入力を多様な出力に変換し、複雑な神経機能発現の基礎課程となるという作業仮説を証明することである。

3. 研究の方法

本研究では、我々が開発した C57BL/6 系統由来 ES 細胞株 RENKA を用いて各種の遺伝子改変マウスを作製して解析をおこなった。まず、グルタミン酸受容体の各種サブユニット及びシナプス伝達調節に関わる分子群を標的とする floxed 型マウスを樹立し、発生初期に全身で Cre を発現するマウスと交配させて全身で遺伝子欠損を起こした null ノックアウトマウスを作出した。また、特定の脳部位あるいは神経細胞で Cre を発現するドライバーマウスと floxed 型マウスを交配させ、部位選択的なノックアウトを作出した。これらの変異マウスを形態学、電気生理学、生化学等の手法を駆使して解析をおこなった。

4. 研究成果

本研究では、まずグルタミン酸受容体の各サブユニットの floxed 型標的マウスを作成した。4 種類の AMPA 型受容体サブユニット GluA1-4)、4 種類の NMDA 型受容体サブユニット (GluN1, GluN2A, B, D)、2 種類のカイニン酸型サブユニット (GluK2, 5)、6 種類の TARP 分子群 (g2-7) の他、シナプス伝達に関わる P/Q タイプカルシウムチャンネル分子等の floxed 型マウスも樹立した。また、ドライバーマウスとして、海馬 CA1 錐体細胞の CP14、CA3 錐体

細胞の GRg1CreN、抑制性神経細胞の GAD67Cre など、それぞれの細胞に選択性高く組換えを惹起できるマウスを樹立した。さらに、ドーパミン受容体 D1R 及び D2R 遺伝子のプロモーターで駆動する Cre マウスもそれぞれ樹立した。これらのマウスを交配させて各種のコンディショナルノックアウトマウスを作出して解析をおこない次のような成果を得た。

NMDA 型受容体 GluN2B サブユニットを海馬 CA3 興奮性細胞で選択的にノックアウトするマウスを作出して解析をおこなった。その結果、GluN2B 海馬 CA3 欠損マウスでは、GluN2A と GluN1 がシナプスに存在するにもかかわらず CA3 に入力する NMDA 受容体応答が消失していた。しかし、シナプス外では活性を持つ受容体が存在することが明らかになった。このことは GluN2B が NMDA 型受容体の活性化に必須であり、かつシナプスにおける NMDA 受容体自身の安定化とシナプス後肥厚(PSD)の分子複合体の維持に関与していることが示唆された。さらに NMDA 受容体のシグナルがアクチンを介して PSD 蛋白質の複合体の集積と安定性に関与する知見を得た。一方、小脳顆粒細胞シナプスでは GluN2B が存在しなくともシナプスで NMDA 型受容体の活性は認められることから、NMDA 型の受容体のシナプスへの移行と活性調節は細胞により異なっていることが示唆された。さらに、発達期シナプスにおいて単一神経細胞で GluN2A と GluN2B を欠損させると、AMPA 型受容体が異なった様式で活性調節されることが明らかになった。

グルタミン酸受容体の活性調節の機序を知るために、この受容体を構成する各サブユニットの定量をおこなった。最初にそれぞれの特異抗体の力価を決定した。この値を用いて、定量的ウエスタンブロット法により各サブユニットの量を測定した。海馬では GluA1 と GluA2 が豊富に発現しているのに対して、大脳皮質では GluA1 に代わり GluA3 が高い発現をしていた。一方、小脳では GluA1-4 おおのこの量がほぼ同じであった。また、カイン酸型受容体量は AMPA 型受容体よりも相当に低いことが明らかになった。一方、NMDA 型受容体は部位にもよるが、AMPA 型受容体よりやや少ない程度であった。一方、小脳プルキンエ細胞に

特異的だと考えられてきた GluD2 サブユニットが、カイン酸受容体と同程度に海馬や大脳皮質にも存在することが明らかになった。

小脳プルキンエ細胞選択的に GluA1 サブユニットを欠損したマウスでは、GluD2 の量が減少し、GluA2 を欠損したマウスでは GluD2 の量が増加することが明らかになった。このことは、GluD2 が AMPA 型受容体の活性を何らかの形で調節していることを示唆しており、更なる解析を進める。

TARP γ -8 欠損マウスが示す AD/HD 様多動の原因として、線条体でのドーパミン量が上昇していることが明らかになった。また、その責任領域は、大脳皮質である可能性が高いことが、コンディショナルノックアウトの解析から明らかになった。

ヒト神経脊髄炎の中に NMDA 型受容体サブユニットに対する自己抗体が原因であるものが存在することを新たなスクリーニング法により見出した。

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 31 件)

1. Chang Y, She ZG, Sakimura K, (他 3 名) Stallcup WB. : Ablation of NG2 Proteoglycan Leads to Deficits in Brown Fat Function and to Adult Onset Obesity. *PLoS One*. (査読有) 2012;7(1):e30637.
2. Miyazaki T, (他 3 名) Yamazaki M, Abe M, Kano M, Sakimura K, Watanabe M. : Cav2.1 in Cerebellar Purkinje Cells Regulates Competitive Excitatory Synaptic Wiring, Cell Survival, and Cerebellar Biochemical Compartmentalization. *J Neurosci*. (査読有) 2012 32(4):1311-1328.
3. Gray JA, (他 3 名) Sakimura K, Nicoll RA. : Distinct Modes of AMPA Receptor Suppression at Developing Synapses by GluN2A and GluN2B: Single-Cell NMDA Receptor Subunit Deletion In Vivo. *Neuron*. (査読有) 2011 71(6):1085-101.
4. Hashimoto K, (他 3 名) Yamazaki M, Shin HS, Watanabe M, Sakimura K, Kano M. : Postsynaptic P/Q-type Ca²⁺ channel in Purkinje cell mediates synaptic competition and elimination in developing cerebellum. *Proc Natl Acad Sci U S A*. (査読有) 2011

5. Uchigashima M, Yamazaki M, (他 2 名) Sakimura K, Kano M, Watanabe M. : Molecular and morphological configuration for 2-arachidonoylglycerol-mediated retrograde signaling at mossy cell-granule cell synapses in the dentate gyrus. *J Neurosci.* (査読有) 2011 31(21):7700-14.
6. Wu S, (他 9 名) Sakimura K, Kaneko T, Tamamaki N. : Tangential migration and proliferation of intermediate progenitors of GABAergic neurons in the mouse telencephalon. *Development.* (査読有) 2011 138(12):2499-509.
7. Yamasaki M, , Abe M, Natsume R, (他 4 名) Mishina M, Sakimura K, Watanabe M. : Glutamate receptor $\delta 2$ is essential for input pathway-dependent regulation of synaptic AMPAR contents in cerebellar purkinje cells. *J Neurosci.* (査読有) 2011 31(9)3362-3374
8. Hill RA, Natsume R, Sakimura K, Nishiyama A. : NG2 cells are uniformly distributed and NG2 is not required for barrel formation in the somatosensory cortex. *Mol Cell Neurosci.* (査読有) 2011 46(4):689-98.
9. Yoshida T, (他 3 名) Yamazaki M, Sakimura K, Kano M, Yoshioka M, Watanabe M. : Unique inhibitory synapse with particularly rich endocannabinoid signaling machinery on pyramidal neurons in basal amygdaloid nucleus. *Proc Natl Acad Sci U S A* (査読有) 2011 108(7):3059-64.
10. Miyazaki T, (他 2 名) Sakimura K, Mishina M, Watanabe M. : Ablation of Glutamate Receptor GluR $\delta 2$ in Adult Purkinje Cells Causes Multiple Innervation of Climbing Fibers by Inducing Aberrant Invasion to Parallel Fiber Innervation Territory. *J Neurosci.* (査読有) 2010 30(45):15196-15209.
11. Uemura T, (他 6 名) Sakimura K, Mishina M. : Trans-Synaptic Interaction of GluR $\delta 2$ and Neurexin through Cbln1 Mediates Synapse Formation in the Cerebellum. *Cell.* (査読有) 2010 141(6):1068-79.
12. Yamazaki M, (他 5 名) Abe M, Natsume R, Takahashi M, Kano M, Sakimura K, Watanabe M. : TARPs $\gamma 2$ and $\gamma 7$ are essential for AMPA receptor expression in the cerebellum. *Eur J Neurosci.* (査読有) 2010 31(12):2204-20.
13. Tanimura A, Yamazaki M, (他 3 名) Abe M, Kita Y, Hashimoto K, Shimizu T, Watanabe M, Sakimura K, Kano M. : The endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol produced by diacylglycerol lipase α mediates retrograde suppression of synaptic transmission. *Neuron.* (査読有) 2010 65(3):320-327.
14. Petrenko AB, (他 2 名) Sakimura K, Baba H. : Reduced immobilizing properties of isoflurane and nitrous oxide in mutant mice lacking the N-methyl-D-aspartate receptor GluR $\epsilon 1$ subunit are caused by the secondary effects of gene knockout. *Anesth Analg.* (査読有) 110(2):461-5. 2009
15. Higo S, Akashi K, Sakimura K, and Tamamaki N. : Subtypes of GABAergic neurons project axons in the neocortex. *Frontiers in Neuroanatomy* (査読有) 2009 3(25)
16. Akashi K, (他 4 名) Abe M, Natsume R, Watanabe M, Sakimura K. : NMDA receptor GluN2B (GluR $\epsilon 2$ /NR2B) subunit is crucial for channel function, postsynaptic macromolecular organization, and actin cytoskeleton at hippocampal CA3 synapses. *J Neurosci.* (査読有) 2009 29(35):10869-82.
- [学会発表] (計 93 件)
1. Kenji Sakimura : Systematic generation of gene manipulated mice using C57BL/6 ES cell RENKA. 第 42 回生理研国際シンポジウム 2012/3/6 愛知県岡崎市生理学研究所
2. 渡辺和泉 : カイニン酸受容体の定量的解析 Quantitative analysis of kainate receptor subunits in the mouse brain 第 34 回日本神経科学大会 2011/9/17 神奈川県横浜市
3. Sakimura K. : Quantitative analysis of Glutamate receptor subunits in the mouse brain. ISN(国際神経化学会) 23rd. Biennial Meeting 2011/8/30 ギリシャ・アテネ
4. Yamazaki M. : Transmembrane AMPA receptor regulatory protein $g-8$ is involved with the regulation of spontaneous activity and mental condition. 第 8 回 IBRO 2011/7/17 イタリア・フィレンツェ
5. K. Akashi : NMDA receptor GluN2B subunit

is crucial for channel function, postsynaptic macromolecular organization, and regulation of actin cytoskeleton at hippocampal CA3 synapses. NEUROSCIENCE2010 2010/11/16 アメリカ・サンディエゴ

6. M.Yamazaki : Loss of cerebellar granule cell AMPA receptors contributes to ataxia in stargazer mice. NEUROSCIENCE2010 2010/11/14 アメリカ・サンディエゴ

7. 山崎真弥 : TARP γ 2、 γ 7 は小脳AMPA型グルタミン酸受容体の機能的構成成分である TARPs γ -2 and γ -7 are functional components of cerebellar AMPA receptor. 第33回日本神経科学大会 第53回日本神経化学会大会 合同大会NEURO2010 2010/9/3 兵庫県神戸市

8. Yamazaki M. : Transmembrane AMPA receptor regulatory protein gamma-2 and gamma-7 are essential for AMPA receptor complex. FENS Forum2010 2010/7/6 オランダ・アムステルダム

9. M.Abe: Analysis of the physiological function of cerebellar AMPA receptor subunits using Purkinje cell-specific gene targeting system. NEUROSCIENCE2009 2009/10/17 アメリカシカゴ

10. H.Azechi: Composition of AMPA receptor subunits in the mouse brain; Quantitative analysis of AMPA receptor subunits. NEUROSCIENCE2009 2009/10/17 アメリカシカゴ

11. Sakimura, K.: MADA receptor GluR2B subunit is crucial for channel function and postsynaptic molecular organization at Hippocampal Ca³ synapses. ISN(国際神経化学会)22rd. Biennial Meeting 2009/8/25 韓国プサン市

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計1件)

名称: ES細胞における相同組換え効率を改善する方法

発明者: 崎村建司、阿部学、八矢幸大

権利者: 新潟大学

種類: 国内特許

番号: 特願 2010-228524

出願年月日: 平成22年8月10日

国内外の別: 国内

○取得状況(計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.bri.niigata-u.ac.jp/~cellular/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

崎村 建司 (Sakimura Kenji) 教授

新潟大学 脳研究所

研究者番号: 40162325

(2) 研究分担者

夏目 里恵 (Natsume Rie)

新潟大学 脳研究所 技術職員

研究者番号: 60467082

(3) 連携研究者

阿部 学 (Abe Manabu)

新潟大学 脳研究所 准教授

研究者番号: 10334674

山崎 真弥 (Yamazaki Maya)

新潟大学 脳研究所 助教

研究者番号: 70401768

渡辺 雅彦 (Watanabe Masahiko)

北海道大学大学院 医学研究科 教授

研究者番号: 70210945

(4) 研究協力者

狩野 方伸 (Kano Masanobu)

東京大学大学院 医学系研究科 教授

研究者番号: 40185963