

機関番号：13101

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21700348

研究課題名 (和文) シナプス構成細胞選択的ノックアウトによる小脳皮質シナプス機能制御の分子機構解析

研究課題名 (英文) Analysis of the molecular mechanism regulating synaptic functions in the mouse cerebellar cortex using a system for conditional knockout in the cells constituting synapses.

研究代表者

阿部 学 (ABE MANABU)

新潟大学・脳研究所・助教

研究者番号：10334674

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 (GluR) 複合体の分子動態と小脳皮質シナプス機能制御との関連を明らかにすることである。そのため、シナプスを構成する主要な細胞で選択的にノックアウトできるシステムを開発した。作製された細胞種特異的ノックアウトマウスの解析から、プルキンエ細胞の GluR 活性が登上線維及び並行線維の前シナプス機能を調節している可能性や、バーグマングリアに発現する β -catenin が小脳層構造形成に必須の役割を果たしている可能性を見出すことができた。

研究成果の概要 (英文)：The aim of this study was to reveal the relationship between molecular dynamics of glutamate receptor complex and regulation of synaptic function in cerebellar cortex. We first developed a system for conditional knockout in the cells constituting synapses. By analyzing the cell type-selective knockout mice, we found that the activity of glutamate receptors in Purkinje cells may regulate the presynaptic function at climbing and parallel fiber synapses and that β -catenin expressed in Bergmann glia may play an indispensable role in the formation of the laminar structure of cerebellum.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2010 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：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、グルタミン酸受容体

1. 研究開始当初の背景

(1) 小脳は厳密にプログラムされた回路発達を経て整然とした神経回路網を構築し、その機能は生体の運動制御に深く関わることから、小脳皮質シナプスは中枢神経シナプス機能解析の最も良いモデルの一つである。研究代表者は Cre-loxP 組換え系を用い、時期

及び部位特異的な (コンディショナル) ノックアウト (KO) マウスを作製、解析することでシナプス機能制御機構の分子基盤の解明を目指している。これまでに小脳皮質における GluR タンパク動態の解析を行い、NMDA 型受容体のシナプス局在と複合体安定化には GluR ϵ サブユニットが必須であることを証明

した (Abe M. et al., J. Neurosci. (2004) 24: 7292-304)。

(2) これらの研究をさらに発展させるためには脳神経研究に適した C57BL/6 系統の遺伝子改変マウスの作製法を整備することが必要不可欠であると考え、研究代表者として科学研究費 (若手研究 (B) H19~H20、C57BL/6 マウスにおけるシナプス機能分子の系統的遺伝子改変システムの開発) を受け、AMPA 型グルタミン酸受容体 (AMPA) に着目してコンディショナル KO マウスを作製してきた。

(3) 作製したマウスの 1 系統である、プルキンエ細胞 (PC) 選択的 GluR α 2 (GluA2) KO マウスは、明らかな運動失調症状を呈した。また、登上線維 (CF)-PC 間シナプスの電気生理学的解析から、CF の前シナプスの機能が低下し、CF による多重支配が残存している可能性が示唆された。この結果は AMPAR 活性に依存した逆行性シグナルを介した前シナプス機能の調節機構が存在することを示唆する。PC-GluR α 2 KO マウス小脳を生化学的に検索し、前述の逆行性シグナル分子の同定を最初の目的とする。並行して、PC シナプスの機能制御に関連する分子を標的とした KO マウスを作製し、解析する。PC-GluR α 2 KO マウスと同様に解析して比較することで、PC シナプスの機能制御の分子機序がより明確になることが期待された。

2. 研究の目的

本研究の目的は GluR 複合体の分子動態と小脳皮質シナプス機能制御との関連を明らかにすることである。

(1) 小脳プルキンエ細胞シナプスをモデルとして、前シナプス、後シナプス、グリアの三要素、すなわち小脳顆粒細胞 (平行線維 (PF))、下オリーブ核神経細胞 (CF)、プルキンエ細胞 (PC)、バークマングリア (BG) においてそれぞれで異なった遺伝子発現制御を行うことのできるシステムを開発する。シナプスという微細構造中の独立した三部位におけるタンパクの機能を、それぞれ別個に、生体内および個体レベルで検証できることが本研究の独創的な点であり、シナプス機能制御の分子機構を解明とすために非常に有用なシステムとなることが期待された。

(2) AMPAR の構成サブユニットを、小脳顆粒細胞、下オリーブ核神経細胞、PC、BG のそれぞれで選択的に KO したマウスを作製し、生理機能解析を行うことで、PC シナプスにおいて GluR 活性依存的にシナプス機能を制御する因子を同定し、シナプス機能制御と AMPAR サブユニット構成の機能的関連を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 細胞種特異的に発現する遺伝子にノックイン (KI) 法を用いて Cre リコンビナーゼ遺伝子を導入した遺伝子改変マウスを作製する。PC-Cre 発現マウス、小脳顆粒細胞-Cre 発現マウスについては既に樹立し、Cre 活性を検証済みであった。Cre 活性を下オリーブ核細胞、BG に限局させるための候補とした遺伝子は、下オリーブ核については Htr5b 遺伝子、BG については Cacng5 遺伝子であり、それぞれ improved Cre (iCre) 遺伝子の KI マウスを作製する。

(2) 作製した細胞種選択的 KO マウスの解析
①形態学的解析: GluR の各サブユニットや関連分子 (裏打ちタンパク (MAGUKs) や補助サブユニット (TARPs))、細胞接着関連分子の発現量、局在について検証する。また、CF によるプルキンエ細胞の神経支配の様式や、シナプスの形態、密度、シナプス小胞数などを調べる。

②行動学的解析: これら KO マウスの運動機能を詳細に評価するための行動解析を行う。

③電気生理学的解析: 小脳皮質シナプス機能 (振幅、kinetics、神経伝達物質の放出量等) の比較や、CF-PC の神経支配の様式を調べる。

④生化学的解析による逆行性シグナル分子の検索: 小脳から細胞分画法を用いてタンパクを抽出し、逆行性シグナル分子の候補となるタンパク質をイムノプロット法により定量化する。良質の抗体が得られない場合や、対象の分子が未知のものである可能性も考慮し、2次元電気泳動を用いたプロテオーム解析による検索も行う。対照マウス群と KO マウス群間で発現量、細胞内局在、翻訳後修飾様式に変化のあった分子が同定された場合、それを逆行性シグナル分子の候補タンパク質とする。

(3) GluR 複合体を構成するタンパクの一つとして知られている β -catenin の細胞種選択的 KO マウスを作製し、(2) と同様の解析を行う。

(4) 本研究においては多数の遺伝子改変マウスを作製する必要があるため、研究代表者が開発した技術である、ES 細胞における相同組換え効率の上昇法を用いてマウスを作製する。

4. 研究成果

(1) CF シナプスおよび BG 特異的 KO を可能とするために、Htr5b 遺伝子、Cacng5 遺伝子への Cre の KI マウスを作製した。これら KI マウスの Cre 活性については概ね予想通りの活性を示すことが示唆されたが、Cre 活性や Cre 発現細胞種の特定など更に詳細な検証を行

ったところ、Cacng5-iCre KI マウスでは BG 以外の細胞での Cre 活性が高いように思われた。より BG 選択性の高い Cre マウスを樹立するため、S100b 遺伝子を標的とした iCre KI マウスを作製することができた。現在は Cre 活性について検証中である。



図 1. Htr5b-iCre KI マウスの Cre 活性。下オリーブ核に青色で示される Cre 活性が検出された。

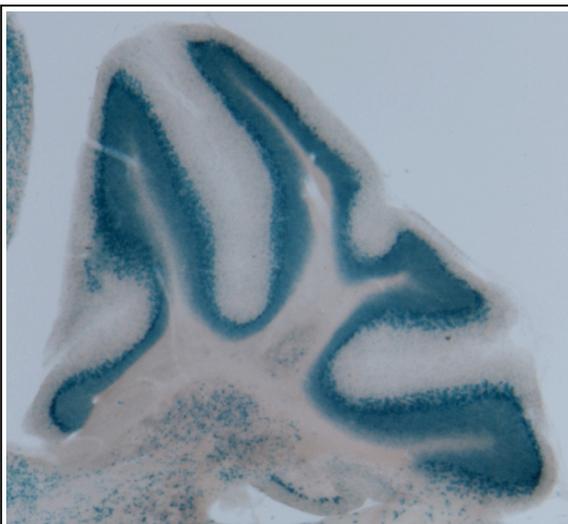


図 2. Cacng5-iCre KI マウスの Cre 活性。BG の存在する PC 層に Cre 活性が認められるが、他の領域にも活性が検出された。

(2) PC-GluR α 2 KO マウスについて、各種の解析を行った。

①形態学的解析により、このマウスでは小脳分子層において同じ AMPAR を構成する GluR α 3 の発現が著しく減少していることと、CF による PC の多重支配生じていることが示された。しかし調べた限りでは他の関連分子の発現量や局在に関しては変化が無く、シナプスの形態等にも異常は見出されなかった。これらの解析結果は宮崎太輔助教（北海道大・院・医）の協力により得られたものである。

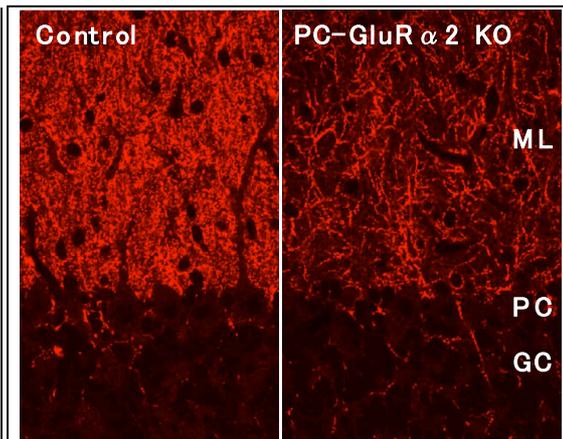


図 3. PC-GluR α 2 KO マウス小脳の GluR α 3 抗体による免疫染色像。対照マウス (Control) と比較して、PC-GluR α 2 KO マウスでは分子層 (ML) の GluR α 3 の発現量が減少していた。

②主に運動能力と運動学習を評価するロータロードテスト、運動能力と平衡感覚を評価するバランスビームにより、このマウスでは運動能力に著しい障害を受けていることが示された。

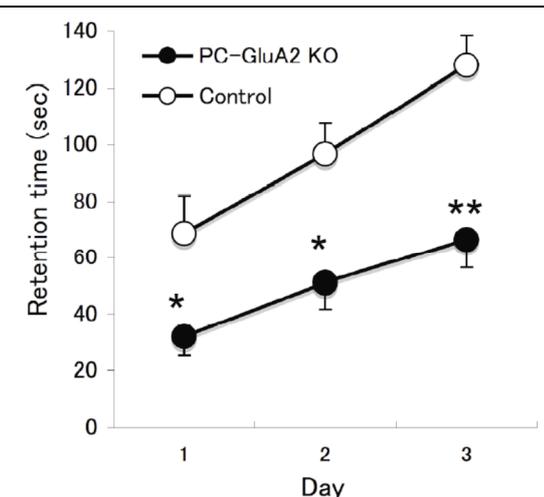


図 4. ロータロードテストによる歩行運動能力の評価。PC-GluR α 2 (GluA2) KO マウスは歩行運動障害を示した。

③電気生理学的解析により、このマウスの CF 応答は非常に振幅が小さく強い内向き整流特性を示すこと、Paired-pulse depression が起こりやすい傾向、定常的に AMPA 受容体が desensitize している可能性、CF による PC の多重支配が若干多い傾向、PF 応答で Paired-pulse facilitation が起こりやすい傾向などが示された。これらの解析結果は橋本浩一准教授（東京大・院・医）（当時）の協力により得られたものである。

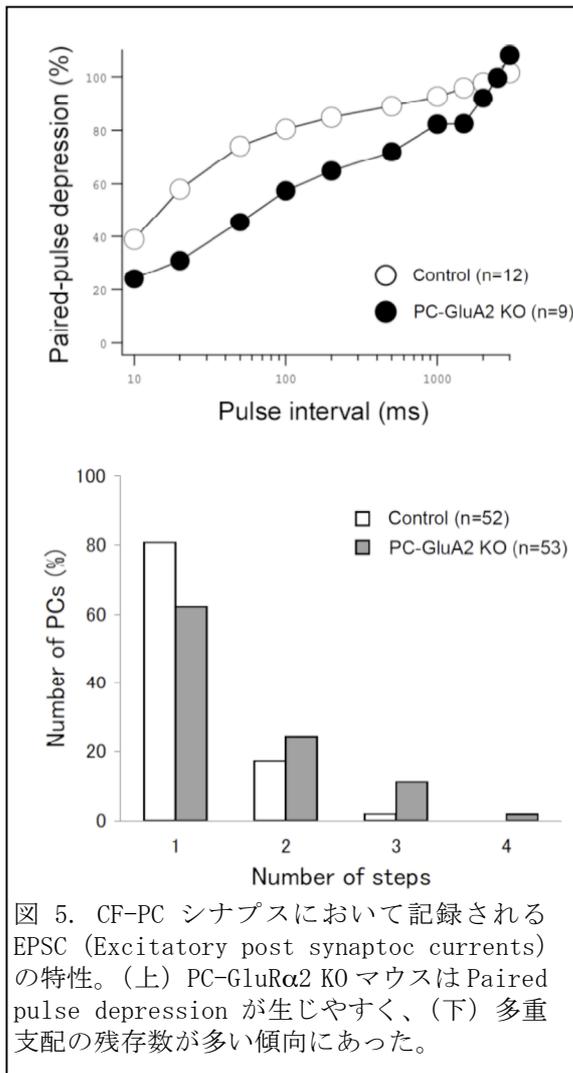


図 5. CF-PC シナプスにおいて記録される EPSC (Excitatory post synaptic currents) の特性。(上) PC-Glu α 2 KO マウスは Paired pulse depression が生じやすく、(下) 多重支配の残存数が多い傾向にあった。

④イムノブロット法を用いた生化学的解析により、このマウスでは小脳の Glu α 3 タンパクの発現量が減少していることが示された。しかし、他の抗体を用いたイムノブロットや 2 次元電気泳動により調べた限りでは、他の関連分子の発現量に関して変化を見出すことはできなかった。

以上の結果から、Glu α 2 と Glu α 3 のヘテロ複合体が小脳プルキンエ細胞において主要な AMPAR を構成して興奮性シナプス伝達を担っており、この AMPAR 活性は小脳発達と運動制御に重要な役割を果すことを明らかにすることができた。この活性が逆行性シグナルを介して前シナプスの機能制御を行っていることが示唆されたが、本研究期間内にはその分子の実態を解明するまでには至らなかった。

これらの成果については 2009 年北米神経科学会と 2010 年日本神経科学会においてポスター発表を行った。

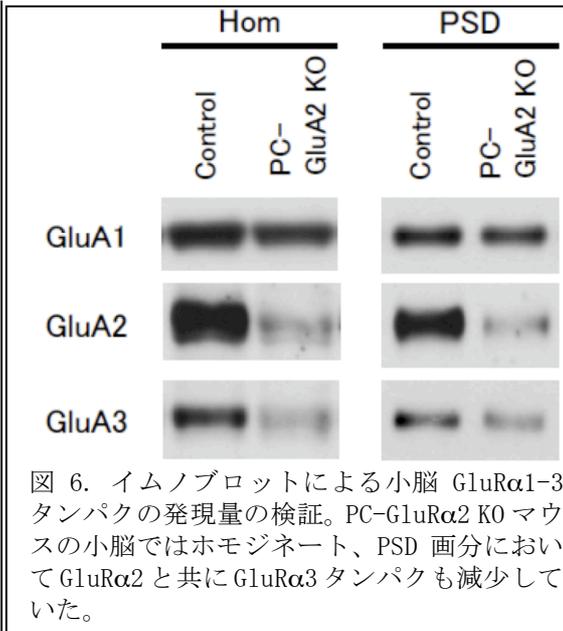


図 6. イムノブロットによる小脳 Glu α 1-3 タンパクの発現量の検証。PC-Glu α 2 KO マウスの小脳ではホモジネート、PSD 画分において Glu α 2 と共に Glu α 3 タンパクも減少していた。

(3) Cacng5-iCre KI マウスを用いて、BG- β -catenin KO マウスを作製した。このマウスは生後 2 週齢から激しい運動障害を示し、離乳直後に死亡することが明らかとなった。離乳直前での小脳を形態学的に解析したところ、小脳全体の萎縮、小葉形成の異常、皮質層構造の乱れ、BG の形態異常などが観察された。Cacng5-iCre KI マウスでは PC、小脳顆粒細胞にも弱く Cre 活性が認められたが、PC- β -catenin KO マウスおよび小脳顆粒細胞- β -catenin KO マウスでは異常は見出されなかったため、Cacng5-iCre KI マウスにより小脳に現れた表現型は BG に発現する β -catenin の欠損が原因であることが強く示唆される。

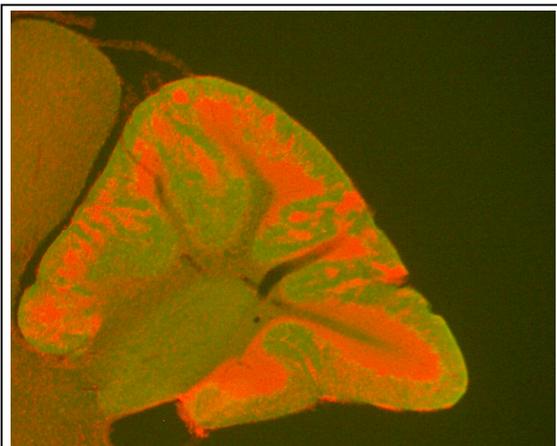


図 7. BG- β -catenin KO マウス小脳の GFAP 抗体による免疫染色像。赤 (Propidium Iodido) で示される顆粒細胞が通常では存在しない分子層 (GFAP の染色 (緑) で示される) に存在し、異常な層構造となっていた。

ごく最近、Wnt シグナルを介して β -catenin の分解を促進する APC が BG の発達に重要で

あることが報告された。以上の結果から、BGにおけるWntシグナル-β-catenin経路が正常な小脳発達、層構造形成に必須の役割を果たしている可能性が見出された。

(4) 多数の遺伝子改変マウス作製のために開発した技術である、ES細胞における相同組換え効率の上昇法については、知的財産として成果を社会へ還元する目的で、本研究期間中に特許出願を行った(特願2010-228524)。

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7件)

①山崎美和子、宮崎太輔、畦地裕統、阿部学、他6名、Glutamate receptor dr δ2 is essential for input pathway-dependent regulation of synaptic AMPAR contents in cerebellar Purkinje cells. *Journal of Neuroscience* 31: 3362-74 (2011)、査読有り

②秦勝志、阿部学、他7名、Calpain 8/nCL-2 and calpain 9/nCL-4 constitute an active protease complex, G-calpain, involved in gastric mucosal defense. *PLoS Genetics* 6: e1001040 (2010)、査読有り

③谷村あさみ、山崎真弥、橋本谷祐輝、内ヶ島基政、川田慎也、阿部学、他6名、The endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol produced by diacylglycerol lipase alpha mediates retrograde suppression of synaptic transmission. *Neuron* 65: 320-27 (2010)、査読有り

[学会発表] (計17件)

①阿部学、プルキンエ細胞選択的ノックアウトを用いた小脳AMPA受容体サブユニットの生理機能解析、第33回日本神経科学大会、2010年9月3日、兵庫県神戸市

②阿部学、ES細胞における相同組換え効率上昇法の開発、第57回日本実験動物学会総会、2010年5月12日、京都府京都市

③阿部学、Analysis of the physiological function of cerebellar AMPA receptor subunits using Purkinje cell-specific gene targeting system. 第39回北米神経科学学会大会、2009年10月18日、アメリカ・シカゴ

[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:国立大学法人 新潟大学

種類:特許

番号:特願2010-228524

出願年月日:2010年10月8日

国内外の別:国内

[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

阿部学 (ABE MANABU)

新潟大学・脳研究所・助教

研究者番号:10334674

(2)研究分担者

()

研究者番号:

(3)連携研究者

()

研究者番号: