

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 6 年 5 月 28 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K06416

研究課題名（和文）細胞間相互作用を介したグルタミン酸トランスポーターのシナプス局在制御機構

研究課題名（英文）Mechanism of synaptic localization regulation of glutamate transporters via intercellular interactions

研究代表者

有村 奈利子 (Arimura, Nariko)

東北大学・薬学研究科・准教授

研究者番号：20420375

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：グルタミン酸は主要な神経伝達物質である。過剰なグルタミン酸は神経細胞死を引き起こしうるため、シナプス間隙のグルタミン酸濃度はグルタミン酸トランスポーターにより厳密に制御される必要がある。我々は、グリア細胞で発現しているグルタミン酸トランスポーター（GLAST）のシナプス間隙への局在が、神経細胞の細胞接着因子DSCAMにより制御されることを見出した。興味深いことに、Dscam機能欠損マウスでは、GLAST欠損マウスと同様に、登上線維のシナプスの形成障害がみられた。さらに、DSCAMはGLASTと相互作用し、シナプス間隙のグルタミン酸除去を制御することで、シナプス形成を促進することを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

GLAST研究については、脳機能におけるGLASTの重要性は国内外で数多く報告されている。しかし、そのシナプス間隙への局在機構については不明であり、本研究はこのミッシングリングを与える研究として位置付けられる。さらに重要なことに、シナプス形成におけるDSCAMの機能は、プレ、ポストシナプス間でのDSCAM同士のホモフィリック結合による接着安定化が重要であるとされてきた。しかし本研究課題により、DSCAMのシナプスにおける機能は、実は「グリア細胞のグルタミン酸トランスポーターを介して正常なグルタミン酸濃度を維持すること」であり、この機能を介して「シナプス形成を促進する」ことが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：Glutamate is a primary neurotransmitter essential for normal brain function. However, excessive levels of glutamate can lead to neuronal cell death, highlighting the necessity for precise regulation of its concentrations in the synaptic cleft. This regulation is primarily facilitated by glutamate transporters. Our research has identified that the synaptic localization of the glutamate transporter GLAST, which is expressed in glial cells, is controlled by the neuronal cell adhesion molecule DSCAM. Interestingly, in mice lacking functional DSCAM, we observed synaptic formation defects in ascending fibers, which were similar to those found in GLAST-deficient mice. Moreover, we demonstrated that DSCAM interacts with GLAST to regulate the clearance of glutamate from the synaptic cleft, thereby promoting synaptic formation and ensuring proper neural signaling. This discovery opens up potential avenues for targeting synaptic dysfunction in neurological disorders.

研究分野：神経科学

キーワード：小脳 シナプス DSCAM GLAST グルタミン酸トランスポーター 発生期

1. 研究開始当初の背景

- (1) グルタミン酸は、哺乳類の中樞神経系の主要な興奮性神経伝達物質であり、シナプス間隙へ放出され、急速な神経活動の伝達を仲介した後、グルタミン酸トランスポーターによって速やかに細胞内に回収される。GLAST は、シナプスを被覆するグリア細胞に発現する主要なグルタミン酸トランスポーターの一つであり、シナプス間隙のグルタミン酸を回収する機能を担う。近年、GLAST(slc1a3)の遺伝子変異が、統合失調症や強迫性障害などの様々な神経・精神疾患に関与することが明らかにされてきた。しかし、シナプスを被覆するグリア細胞膜上で GLAST が、どのような機構でシナプス間隙に局在化して機能するかについては不明であった。
- (2) 我々は、Down Syndrome Cell Adhesion Molecule (DSCAM)の発生期の神経細胞における機能を解析してきた。DSCAM は中脳や小脳の発生期に強く発現する細胞接着因子であるが、それら領域での機能は不明であった。最近我々は、DSCAM が中脳において、分化直後の神経細胞の N-cadherin の機能を抑制することで脳室面離脱を促進することを明らかにした(有村*ら、Science Advances, 2020、*筆頭著者兼共同責任著者)。Dscam をノックダウンすると、神経細胞は異常に長い終足(endfeet)を脳室面につけた状態で神経細胞移動を停止する。さらに神経細胞移動開始に伴う脳室面離脱には、その最初期に N-cadherin の機能低下が必須であり、この機能低下を DSCAM が RapGEF2/Rap1 を介して制御することを見出した。

2. 研究の目的

近年まで、DSCAM の小脳における機能は、依然として報告がなかった。そこで我々は、Dscam の機能欠損マウス(*Dscam^{del17/del17}* マウス)の小脳を解析した。そして、登上線維のシナプス形成が障害されていることを見出した。興味深いことに、この登上線維シナプス形成障害は、バグマングリア(登上線維シナプスを被覆しているグリア)細胞で発現しているグルタミン酸トランスポーターの GLAST の欠損マウスと同様の表現型であった。しかし、公共の小脳 single cell 解析のデータベースを探索すると、Dscam mRNA はバグマングリア細胞ではほとんど発現しておらず、プルキンエ細胞で顕著に発現していることが明らかとなった。いくつかの小脳の細胞種特異的なコンディショナルノックアウト(cKO)マウスを用いた実験から、登上線維シナプス形成障害は、プルキンエ細胞の DSCAM の欠損により引き起こされることを見出した。また、Dscam 機能欠損マウスにおける GLAST の局在を、免疫電子顕微鏡解析により解析すると、シナプス間隙での GLAST の局在が低下していることを見いだした。さらに、免疫沈降と質量分析によるプロテオミクス解析を行い、DSCAM 結合分子として GLAST と GLT-1(大脳アストロサイトに発現するグルタミン酸トランスポーター)を同定した。以上の学術的背景から、プルキンエ細胞膜上の DSCAM がシナプス間隙に局在し、シナプスを被覆しているバグマングリア細胞膜上の GLAST を、直接、もしくは間接的な相互作用によって、シナプス近傍に局在化させているのではないかと考えた。そして、この DSCAM による GLAST の局在化が、発生期の登上線維シナプスの形成に重要であると考え、本研究計画を立案した。

3. 研究の方法

そこで、我々は以下の研究計画を立案した。

ゲノム編集技術による内在性 DSCAM タンパク質のシナプス局在の解析

これまでの研究で既に Dscam mRNA がプルキンエ細胞で発現していることや、内在性 DSCAM タンパク質が生化学的に分画したシナプス画分に濃縮することを見出していた。しかし、現有の抗 DSCAM 抗体(計 8 種類)を用いた小脳における免疫組織染色では、全てバックグラウンドが高く、特異的な染色像が得られていない。そこで、内在性の Dscam にタグを挿入したノックイン(KI)マウスを、i-GONAD(経卵管ゲノム編集)法で作出し、タグ抗体で DSCAM の局在を検証する。良好な結果が得られない場合、他の tag(Flag, EGFP など)の KI マウスを作出し、内在性 DSCAM タンパク質のシナプス局在を検証する。

DSCAM と GLAST の結合による GLAST の局在制御解析

DSCAM と GLAST の結合は、1)マウス脳抽出液を用いた免疫沈降法&質量分析による解析と、2)培養細胞に過剰発現させた免疫沈降法により確認している。しかし、DSCAM が GLAST に結合することで GLAST の局在が変化するかは不明である。そこで、GLAST を発現している細胞に DSCAM タ

ンパク質をコートしたビーズを投与し、ビーズ周辺に GLAST が集積し局在が変化するか検討する。また、うまくいかない場合は胎生期 12.5 日目にマウス小脳にエレクトロポレーションしてプルキンエ細胞に DSCAM-GFP 遺伝子を過剰発現させ、成体マウスのバグマンガリアの GLAST の局在に変化を与えるか検討する。

電気生理学的手法を用いた GLAST によるグルタミン酸取り込み機能の解析

Dscam 機能欠損マウスにおける GLAST の局在を、免疫電子顕微鏡解析により解析すると、シナプス間隙での GLAST の局在が減少していることを見出している。そこで、この局在変化により GLAST の機能が低下しているかを電気生理学的手法にて検証する。Cyclothiazide (CTZ) 投与にてグルタミン酸受容体の脱感作を阻害し、グルタミン酸取り込み機能を観察できる条件で興奮性シナプス後電流 (EPSC) を観察すると、GLAST ノックアウト (KO) マウスでは、シナプス間隙のグルタミン酸濃度が低下せず、初期層の EPSC が増大する。そこで、Dscam 機能欠損マウスの小脳スライスを用いて、CTZ 投与後の初期層の EPSC を測定する。EPSC の増大が認められれば、Dscam 機能欠損マウスでも GLAST が脱局在により機能できていないことを証明できる。

GLAST 活性化剤を用いた Dscam 欠損マウスにおけるシナプス形成回復実験

Dscam 機能欠損マウスで見られる登上繊維シナプス形成障害が、GLAST のグルタミン酸取り込み能低下に起因するか検討する。Dscam 機能欠損マウスに GLAST の活性化剤リルゾールを投与し、シナプスにわずかに残っている GLAST を活性化することで、登上線維シナプス形成が回復するか検証する。回復が見られれば、Dscam の機能欠損による表現型はグルタミン酸トランスポーターの機能低下を介していることを示唆できる。

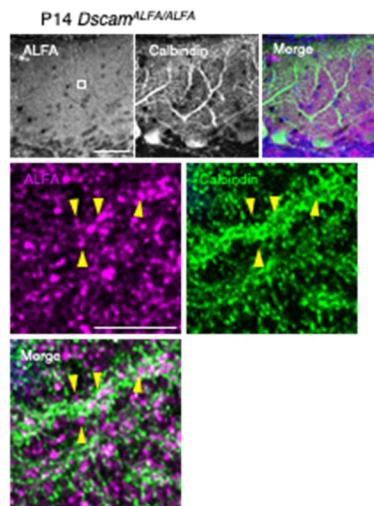
Dsam 機能欠損マウスで見られる登上繊維シナプス形成障害の生理的意義の検討

動物の周りの視野が動く際に網膜に写る像がブレないように (電車の中から外の物体を視認する時に) 眼が動く反射を視機性眼球反応 (OKR) と呼ぶ。この反応には、小脳の登上線維シナプスが関与していることが知られており、シナプス形成障害がある場合は反応性が低下する。そこで、Dscam 機能欠損マウスを用いて OKR の反応性を検証する。この研究により DSCAM が登上線維シナプス形成とマウスの小脳機能にとって重要な分子であることを明らかにする。

4. 研究成果

ゲノム編集技術による内在性 DSCAM タンパク質のシナプス局在の解析

内在性の Dscam に Ha tag を挿入したノックイン (KI) マウスを、i-GONAD (経卵管ゲノム編集) 法で作出し、HA tag 抗体で DSCAM-HA の局在を検証した。このマウスから得た初代海馬神経細胞はポストシナプスにおける DSCAM-HA の局在を明らかにした。残念ながら、小脳スライスにおける組織染色は不可能であった。そこで、高感度エピトープタグである ALFA tag の KI マウスを作出した。抗体として nanobody を用いたところ、共焦点レーザー顕微鏡を用いて、DSCAM-ALFA の場所を確認することができた (右図、Calbindin はプルキンエ細胞のマーカー、DSCAM-ALFA はマゼンダ色で表示)。DSCAM-ALFA は、プルキンエ細胞や、シナプス後部のマーカーとそれぞれ共局在していた。この研究により内在性 DSCAM タンパク質のシナプス局在を実証できた。



DSCAM と GLAST の結合による GLAST の局在制御解析

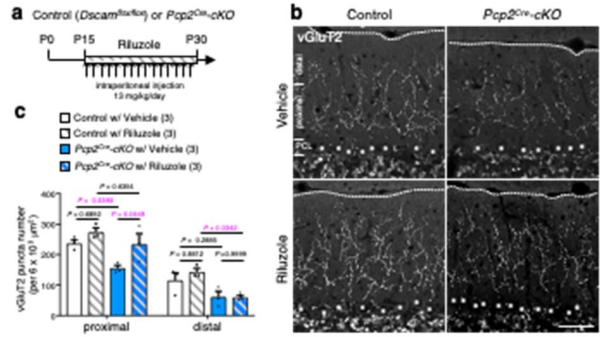
GLAST を発現している培養細胞に DSCAM タンパク質をコートしたビーズを投与し、ビーズ周辺に GLAST が集積し局在が変化するか検討した。GLAST 抗体として、FACS などにも用いられる ACSA-1 を用いて、細胞表面の GLAST 選択的にラベルする方法を開発し、DSCAM の細胞外ドメインに Fc を融合したタンパク質を磁気ビーズに固定してから、培養細胞に投与した。その結果、ビーズの下面に GLAST が集積する様子を見出すことができた。この結果は、DSCAM との相互作用が GLAST の局在に変化を与えることを示している (投稿準備中)。

電気生理学的手法を用いた GLAST によるグルタミン酸取り込み機能の解析

Cyclothiazide (CTZ) 投与にてグルタミン酸受容体の脱感作を阻害し、グルタミン酸取り込み機能を観察できる条件で興奮性シナプス後電流 (EPSC) を観察すると、GLAST ノックアウト (KO) マウスでは、シナプス間隙のグルタミン酸濃度が低下せず、初期層の EPSC が増大する。そこで、Dscam 機能欠損マウスの小脳スライスを用いて、CTZ 投与後の初期層の EPSC を測定した。その結果、EPSC の増大が認められ、Dscam 機能欠損マウスでも GLAST が脱局在により機能できていないことを示した。

GLAST 活性化剤を用いた Dscam 欠損マウスにおけるシナプス形成回復実験

Dscam 機能欠損マウスに GLAST の活性化剤 Riluzole を投与し、シナプスにわずかに残っている GLAST を活性化することで、登上線維シナプス形成が回復するか検証した。その結果、シナプス形成は Riluzole 投与により一部回復した(右図、青色の棒グラフはコンディショナルノックアウトマウスを示し、斜線は Riluzole 投与群を示す)。つまり、Dscam の機能欠損による表現型はグルタミン酸トランスポーターの機能低下を介していることを示唆した。



Dsam 機能欠損マウスで見られる登上線維シナプス形成障害の生理的意義の検討

Dscam 機能欠損マウスを用いて視機能性眼球反応(OKR)の反応性を検証した。具体的には、Purkinje 細胞においてのみ、DSCAM を発現しないコンディショナルノックアウトマウスにおいて、シナプス形成の回復が見られた。この研究により DSCAM が登上線維シナプス形成とマウスの小脳機能にとって重要な分子であることが示された。

上述の結果は以下の論文にまとめ公刊した。(* 責任筆者)

KI.Dewa, N.Arimura*, W.Kakegawa, M.Ito, S.Miyashita, S.Taya, T.Miyazaki, C.Usui, S.Tatsumoto, A.Tsuzuki, H.Uetake, K.Sakai, Y.Inoue, K.Yamakawa, M.Sone, T.Inoue, Y.Go, N.Ichinohe, K.Kaibuchi, M.Watanabe, S.Koizumi, M.Yuzaki, M.Hoshino*, Neuronal DSCAM regulates the peri-synaptic localization of GLAST in Bergmann Glia for the functional synapse formation. Nature Commun 2024; 15: 458.

また、研究成果について総説を依頼され、以下のように公刊した。(* 責任筆者)

KI.Dewa, N.Arimura*, Neuronal and astrocytic protein connections and associated adhesion molecules, Neurosc Res 2023, 187, 14-20

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Dewa K, Arimura N.	4. 巻 187
2. 論文標題 Neuronal and astrocytic protein connections and associated adhesion molecules	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Neuroscience Research	6. 最初と最後の頁 14-20
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.neures.2022.09.014.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Dewa KI, Arimura N, Kakegawa W, Itoh M, Adachi T, Miyashita S, Inoue YU, Hizawa K, Hori K, Honjo N, Yagishita H, Taya S, Miyazaki T, Usui C, Tatsumoto S, Tsuzuki A, Uetake H, Sakai K, Yamakawa K, Sasaki T, Nagai J, Kawaguchi Y, Sone M, Inoue T, Go Y, Ichinohe N, Kaibuchi K, Watanabe M, Koizumi S, Yuzaki M, Hoshino M	4. 巻 15
2. 論文標題 Neuronal DSCAM regulates the peri-synaptic localization of GLAST in Bergmann glia for functional synapse formation.	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Nature Communication	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-023-44579-z	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Hizawa K, Sasaki T, Arimura N.	4. 巻 -
2. 論文標題 A comparative overview of DSCAM and its multifunctional roles in Drosophila and vertebrates.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Neuroscience Research	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.neures.2023.12.005	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Wang H, Fukunaga K, Cheng A, Wang Y, Arimura N, Yoshino H, Sasaki T, Kawahata I	4. 巻 152
2. 論文標題 Novel FABP3 ligand, HY-11-9, ameliorates neuropathological deficits in MPTP-induced Parkinsonism in mice.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Pharmacological Science	6. 最初と最後の頁 30-38
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jphs.2023.02.008	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 有村 奈利子
2. 発表標題 ダウン症関連因子DSCAMの小脳シナプスにおける機能解析
3. 学会等名 第95回日本生化学会大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 有村 奈利子
2. 発表標題 認知症を引き起こす新たな血液由来成分の探索
3. 学会等名 第7回医薬品開発研究センターシンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 有村 奈利子
2. 発表標題 神経接着分子DSCAMによるグリア細胞膜分子GLASTの機能制御
3. 学会等名 第128回日本解剖学会総会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 有村 奈利子
2. 発表標題 アストロサイトとプルキンエ細胞の分子間相互作用：GLASTのシナプス局在化とシナプス形成の制御
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 有村 奈利子
2. 発表標題 小脳プルキンエ細胞上のDSCAM によるグリア細胞上のGLASTの局在とシナプス形成制御
3. 学会等名 第43回神経組織培養研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 有村 奈利子
2. 発表標題 神経膜分子DSCAMによるグルタミン酸除去制御
3. 学会等名 第94回日本生化学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 有村 奈利子
2. 発表標題 プルキンエ細胞のDSCAMはバーグマングリアのGLASTのシナプス局在と小脳シナプス発生を制御する。
3. 学会等名 第64回日本神経化学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 有村 奈利子
2. 発表標題 ダウン症関連因子DSCAMの小脳シナプス形成における機能解析
3. 学会等名 第44回日本神経科学学会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 飛澤健斗、有村奈利子	4. 発行年 2023年
2. 出版社 DSCAM タンパク質	5. 総ページ数 2
3. 書名 臨床精神薬理	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------