

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 3 月 31 日現在

機関番号：13101

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22700394

研究課題名（和文）神経細胞に共通な GluN2B による NMDA 受容体活性調節機構の解明

研究課題名（英文）Research on regulatory systems of NMDA receptor activity by GluN2B in neurons

研究代表者 明石 馨（AKASHI KAORI）

新潟大学・脳研究所・特任助教

研究者番号：30374713

研究成果の概要（和文）：

本研究の目的は、NMDA 受容体サブユニット GluN2B(NR2B/GluR ϵ 2)を発現する神経細胞における当該分子に関わる分子群の動態を調べることで、NMDA 受容体の活性調節機構を明らかにすることである。この目的のために、申請者等が見いだした「海馬 CA3 シナプスでは GluN2B が NMDA 受容体の活性化に必須な分子である」ことが、性質の異なる扁桃体の抑制性神経細胞や大脳皮質興奮性神経細胞においても成立するか否かを、細胞特異的 GluN2B 遺伝子欠損マウスを用いて検証した。まず抑制性神経細胞特異的に Cre を発現する GAD67-Cre マウスを作製し、GluN2B サブユニット flox マウスと交配させ、抑制性神経細胞特異的 GluN2B 遺伝子欠損マウスを作出した。さらに、前脳興奮性神経細胞で選択的に Cre を発現する Emx1-Cre マウス、海馬 CA1 領域に選択性高く Cre を発現する CP14 マウスそれぞれと GluN2B サブユニット flox マウスを交配させて 2 種類の興奮細胞選択的 GluN2B 遺伝子欠損マウスを作出した。これらのマウスの表現型を解析したところ、抑制性神経細胞特異的 GluN2B 遺伝子欠損マウスは、発育が悪く下肢反射異常が見られた。また、小脳において登上線維終末の分布に異常が認められた。一方、大脳皮質興奮性神経細胞で GluN2B サブユニットを欠失したマウスは、生後 2 週間ほどしか生きなかったが、海馬 CA1 で欠失したマウスは成体まで生存した。この変異マウスの CA1 錐体細胞では NMDA 受容体を介する電気応答は減少していたが、CA3 錐体細胞で GluN2B サブユニットを欠失した個体のように全ての NMDA 電流が消失しているのとは異なっていた。このことは、NMDA 受容体の活性調節の機序は海馬興奮細胞においても細胞ごとに異なっていることを示唆するものであった。

研究成果の概要（英文）：

The aim of this research is to clear the regulatory system of NMDA receptor activity in neurons expressing GluN2B (NR2B/GluR ϵ 2). Based on our findings, we established the hypothesis that GluN2B is crucial for NMDA receptor activity in neurons expressing GluN2B, and verified it. We generated the inhibitory neuron-specific GluN2B-KO, excitatory neuron-specific GluN2B-KO in forebrain, and CA1 pyramidal cell selective GluN2B-KO mice. Inhibitory neuron-specific GluN2B-KO mice showed developmental defect, abnormal hind-limb reflex, and abnormal projection of climbing fiber in cerebellum. Forebrain-specific GluN2B-KO mice died within 2 weeks after birth. Even through NMDA receptor-mediated synaptic currents were diminished, they were detected in CA1 pyramidal cell selective GluN2B-KO mice. The result was different from that of CA3 pyramidal cell-specific GluN2B-KO. These results suggest that the regulation of NMDA receptor activity depends on the type of neurons. Meanwhile, we generated a KO mouse of CaMKII β subunit that is involved with synaptic plasticity, and obtained a new finding. We observed that Arc/Arg3.1 was bound to the CaMKII β in an activity dependent manner and regulated the surface GluA1 levels in individual synapses. Our findings suggest that a novel

Arc/Arg3.1- CaMKII β interaction, which is strengthened by inactivity, acts as an “inverse” synaptic tagging and capture, mediating specific resetting of the surface AMPA-R levels at inactive synapses of previously potentiated neurons, based on the history of synaptic activity and inactivity in individual synapses.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：脳神経科学 神経化学・神経薬理学

キーワード：脳・神経、NMDA 受容体

1. 研究開始当初の背景

申請者は、NMDA型グルタミン酸受容体のシナプス局在と機能との関連についての研究の過程で、海馬 CA3 錐体細胞には GluN2A(NR2A/GluR ϵ 1), GluR2B, GluN1(NR1/GluR ζ 1)のNMDA受容体サブユニットが発現しているが、LTP誘導時に機能している GluN2サブユニットの種類が異なることを見いだした。GluN2の使い分けをより理解する目的で、海馬CA3領域にてGluN2Bを遺伝子欠損させたマウス(CA3-GluN2B-KO)を作製し解析した結果、次のようなことが明らかになった。(1)CA3-GluN2B-KOマウスでは、シナプス部位にNMDA受容体(GluN2A/GluN1)が存在するにも関わらず、全てのシナプスでNMDA受容体応答が消失する。それに対しCA3のシナプス外領域では、NMDA受容体(GluN2A/GluN1)応答が検出される。(2)GluN2Bを含むNMDA受容体がPSD蛋白複合体の集積・安定性を調節すると同時に、この安定性がNMDA受容体自身の活性調節にも関与する可能性が示唆された。つまり『GluN2BがNMDA受容体活性を持つ上で必須な分子である』ことが分かった(J.Neurosci29(35),10869-10882,2009)。申請者は、このGluN2BによるNMDA受容体の活性調節メカニズムの背景は、『シナプス部位の蛋白群の違いによりGluN2のそれぞれが異なる修飾を受ける』ことであると考え、異なる神経

細胞においても『GluN2Bを発現する神経細胞のシナプス部位のNMDA受容体の活性調節機構は共通』であると予想した。

2. 研究の目的

本研究の目的は、NMDA 受容体サブユニット GluN2B を発現する神経細胞に共通な分子背景を調べる事で、GluN2B による NMDA 受容体の活性調節機構を明らかにすることである。

3. 研究の方法

まず抑制性神経細胞特異的に Cre を発現する GAD67-Cre マウスを作製し、GluN2B サブユニット flox マウスと交配させ、抑制性神経細胞特異的 GluN2B 遺伝子欠損マウスを作出した。さらに、前脳興奮性神経細胞で選択的に Cre を発現する Emx1-Cre マウス、海馬 CA1 領域に選択性高く Cre を発現する CP14 マウスそれぞれと GluN2B サブユニット flox マウスを交配させて 2 種類の興奮細胞選択的 GluN2B 遺伝子欠損マウスを作出した。神経細胞特異的に Cre を発現するマウスを使い GluN2B 欠損をしたマウスを作製し、CA3 錐体細胞と同様に GluN2A, GluN2B, GluN1 を発現する神経細胞の NMDA 受容体活性調節に関わると考えられる分子の変化を調べ、この仮説の妥当性を検証した。

4. 研究成果

GAD67-Cre マウスと、NMDA 受容体 GluN2B サブユニットの flox マウスを作製して交配させ抑制性神経細胞特異的 GluN2B 遺伝子欠損マウスを作出した。この抑制性神経細胞特異的 GluN2B 遺伝子欠損マウスは、発育が悪く下肢反射異常が見られた。また、小脳において登上線維終末の分布に異常が認められた。前脳興奮性神経細胞で選択的に Cre を発現する Emx1-Cre マウスとの交配で得られた、GluN2B コンディショナルノックアウトマウスは、生後 2 週間ほどしか生存出来なかった。一方、海馬 CA1 領域に選択性高く Cre を発現する CP14 マウスとの交配で得られた興奮細胞選択的 GluN2B 遺伝子欠損マウスは、成体まで生存し解析が可能であった。この変異マウスの CA1 錐体細胞では NMDA 受容体を介する電気応答は減少していたが、CA3 錐体細胞で GluN2B サブユニットを欠失した個体のように全ての NMDA 電流が消失しているのとは異なっていた。このことは、NMDA 受容体の活性調節の機序は海馬興奮細胞においても細胞ごとに異なっていることを示唆するものである。

これとは別に、シナプス伝達可塑性に関連する分子として作製した CaMKII 分子のノックアウトマウスの解析から新たな知見が得られた。海馬神経細胞の樹状突起では、CaMKII 分子と Ark/Arg3.1 が共局在をしているが、不活性型の CaMKII が Ark/Arg3.1 との親和性が高く、活性型の CaMKII は親和性が低かった。強く活性化された後不活性になったシナプスでは、Ark/Arg3.1 が集積し、このことによりシナプス膜の GluA1 のレベルが低下する。この過程は CaMKII ノックアウトでは出現しないことから、Ark/Arg3.1 と CaMKII の相互作用は、シナプス活動を記憶して不活性化するメカニズムを担っていることが示唆された。なお、この知見は 2012 年 5 月の Cell に掲載された。

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 2 件)

1. Okuno H, Akashi K, (他10名), Sakimura K,

Worley P.F, and Bito H :Inverse synaptic tagging of inactive synapses via dynamic interaction of Arc/Arg3.1 with CaMKII β . *Cell* 149 2012

2. Wu S, (他 8 名) Akashi K, Sakimura K, Kaneko T, Tamamaki N. :Tangential migration and proliferation of intermediate progenitors of GABAergic neurons in the mouse telencephalon. *Development*. 138(12):2499-509 2011

[学会発表](計 7 件)

1. S. Ninomiya, : GABAergic neuron production induced by epilepsy in the adult mouse neocortex. NEUROSCIENCE2011 2011/11/12
アメリカ・ワシントン DC

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 23rd. Biennial Meeting 2011/8/30 ギリシャ・アテネ

4. M. Yamazaki, : Transmembrane AMPA Receptor regulatory protein γ -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. 足澤悦子, : マウス海馬におけるカイニン酸受容体サブユニット GluK2/3 (GluR6/7) および GluK5 (KA2) の局在解析 Immunohistochemical localization of kainate receptors, GluK2/3 (GluR6/7) and GluK5 (KA2), in the mouse hippocampus. 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

7. 玉巻伸章: 神経前駆細胞は終脳胞内で接線方向に移動する能力を持つ Neurogenic

intermediate progenitors migrate
tangentially in the telencephalon.
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

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

明石 馨 (Akashi Kaori)
新潟大学 脳研究所 特任助教
研究者番号：30374713

(2) 研究分担者 なし
()

研究者番号：

(3) 連携研究者 なし
()

研究者番号：

(4) 研究協力者

崎村建司 (Sakimura Kenji)
新潟大学 脳研究所 教授
研究者番号：40162325