

## 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15日現在

機関番号：12301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22700431

研究課題名（和文）小脳発達期における神経-グリア相互作用 Ca透過型AMPA受容体の役割

研究課題名（英文） Neuron-glia interaction during cerebellar development The role of Ca-permeable AMPA receptors

研究代表者

細井 延武 (HOSOI NOBUTAKE)

群馬大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：90543570

研究成果の概要（和文）：

小脳のグリア細胞は、Caを透過する特殊なAMPA型受容体を持ち、Caを介した神経-グリア相互作用を通して、神経回路の形成と発達に関与している可能性がある。その機能的役割を調べるため、小脳のグリア細胞に選択的にGluR2（編集型GluR2）サブユニットを発現させて、もともとCa透過型の性質からCa非透過型にAMPA受容体の性質を変化させる実験手法の確立を試みた。レンチウイルスベクターを用い、GFAPプロモーターのサイズ減らして、グリア選択性を保ったまま遺伝子を効率的に発現させる事に成功した。

研究成果の概要（英文）：

Cerebellar Bergmann glial cells have Ca-permeable AMPA receptors and can be involved in formation and development of neuronal circuit via neuron-glia interactions mediated by Ca. To elucidate the functional role of Ca-permeable AMPA receptors in cerebellar glial cells, I attempted to develop a method in which glial Ca-permeable AMPA receptors are turned Ca-impermeable during cerebellar development. Using lentiviral vectors with truncated GFAP promoters, I succeeded in expressing a GluR2 gene in glial cells effectively, with no change in tropism.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,500,000	750,000	3,250,000
2011年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：神経科学

科研費の分科・細目：脳神経科学・融合基盤脳科学

キーワード：ニューロングリア相互作用、小脳、Ca透過型AMPA受容体、バーグマングリア、GluR2、プルキンエ細胞

## 1. 研究開始当初の背景

神経細胞は、一般的に、GluR2 サブユニットを含む AMPA 受容体を発現しており、Ca 非透過型の性質をもつ。その一方、小脳の主要なグリア細胞であるバークマングリアには GluR2 は発現しておらず、そのため、Ca 透過型の性質をもつ特徴的な AMPA 受容体をもっている。2001 年に Iino たちは、アデノウイルスベクターを用いた遺伝子導入の技術によって、このバークマングリアの Ca 透過型 AMPA 受容体の機能的な役割について検討することに成功した (Iino et al., 2001)。バークマングリア選択的に GluR2 (編集型 GluR2) を発現させ、AMPA 受容体のサブユニット構成が GluR2 を含むようにし、Ca 透過型から Ca 非透過型に性質を変化させると、プルキンエ細胞のシナプスを取り囲んでいるバークマングリアの突起が萎縮してしまい、プルキンエ細胞のシナプス応答が正常よりも長引くようになる現象が明らかにされた。また、正常では 1 つのプルキンエ細胞に対して 1 つの登上線維が神経支配しているところ、複数の登上線維が神経支配してしまう神経回路異常も確認された。これらの結果から、バークマングリアの Ca 透過型 AMPA 受容体は、Ca を介した神経-グリア相互作用を通して、小脳神経回路を適切に維持している働きがあると推察される。

上述した Iino たちの研究では、小脳神経回路がほぼ完成した若年期のラット (生後 22-24 日) を用いているので、上記の実験結果は、神経回路が完成した後でのバークマングリアの Ca 透過型 AMPA 受容体が担っている役割を示している。しかしながら、バークマングリアは、胎性期のラジアルグリア由来の細胞であり、小脳発達期において、外顆粒層から内顆粒層に顆粒細胞が移動する際のガイドをする働きがあることが判明しており、またプルキンエ細胞の樹状突起が伸張する際の足場にもなり、神経-グリア相互作用を通して、小脳神経回路の形成・発達に重要な役割を果たしていると考えられている (Yamada and Watanabe, 2002; Bellamy, 2006)。そのため、バークマングリアの Ca 透過型 AMPA 受容体が、神経-グリア相互作用のシグナル伝達系の一翼を担い、発達期の小脳神経回路の形成に対しても重要な役割を果たす可能性が十分考えられるが (Ozawa, 2002; Watanabe, 2002)、その可能性については未だ検討がなされていない。その主な理由としては、数週間にわたる小脳発達期において、細胞に障害を与えることなく、安定して外来遺伝子をグリア細胞選択的に安定して発現させる技術が未だ確立されていないことに起因する。上述の Iino たちは、アデノウイ

ルスベクターを用いたが、この方法だとグリア選択的ではあるものの、細胞毒性があるため、数週間ものの長期にわたる安定した発現は難しい。

## 2. 研究の目的

小脳神経回路形成期において、バークマングリアの Ca 透過型 AMPA 受容体がどのような役割をもっているかを明らかにすることが最終目標である。そのためには、毒性が少なく、小脳発達期の数週間安定して、しかもグリア細胞選択的に外来遺伝子 (GluR2) を発現させて、AMPA 受容体の性質を Ca 透過型から Ca 非透過型に変化させることが必須である。したがって、小脳グリア細胞選択的に外来遺伝子を導入する実験手法を確立することを第一の目的とした。

## 3. 研究の方法

細胞毒性が少なく、長期間にわたり外来遺伝子の発現が可能なレンチウイルスベクターを遺伝子発現ベクターとして用いた (平井, 2008)。グリア細胞特異的に GluR2 を発現させるため、マウス由来のグリア細胞特異的なプロモーターである Gfa2 (GFAP) プロモーターの制御下で、外来遺伝子を発現させた。レポーター遺伝子として GFP を使用し、GluR2 を発現させる場合には、GFP 遺伝子と GluR2 の間に自己切断配列 P2A を挿入し、リボソームスキップにより、個別のタンパク質として共発現させた。

外来遺伝子発現の評価は、*in vivo* の系と小脳初代培養系を適宜用いた。*In vivo* の系では、生後 5-8 日の幼若マウスにイソフルランで麻酔し、脳定位固定装置に固定後、小脳表面にウイルス溶液 (5-10  $\mu$ l) をマイクロポンプを使用して接種した。接種から 2-3 週間後に灌流固定を行い、小脳での遺伝子発現を評価した。小脳初代培養系では、生後 0-1 日の幼若マウスから小脳を摘出し、タンパク質分解酵素のパパインを用いて細胞を単離し、分散培養を行った。培養開始後、1-5 日後に培養液中にウイルス溶液を加えて遺伝子を導入した。

## 4. 研究成果

まず最初に、小脳のグリア細胞に導入する GluR2 (編集型 GluR2) の遺伝子が機能的であるかどうかを確認するため、HEK293T の発現

系とパッチクランプ法を組み合わせる実験を行った。

培養した HEK293T にリポフェクション法で、GluR1 と GFP (または tdTomato) の遺伝子を導入した。GFP (または tdTomato) の蛍光で遺伝子導入が確認された細胞に対して、パッチクランプ法を適用し、AMPA 受容体のアゴニストである RS-AMPA (100 $\mu$ M) を投与して、AMPA 応答を記録した (図 1)。AMPA 受容体は、4 つの GluR サブユニットから形成されることが知られているが、GluR1 サブユニットはそれだけで 4 量体を形成し、機能的 AMPA 受容体をつくることのできる (ホモメリック AMPA 受容体)。この場合、GluR2 が欠如した AMPA 受容体構成のため、Ca 透過型であり、AMPA 応答の電流-電圧特性は Ca 透過型に特徴的な強い内向き整流性を示した (図 1B)。

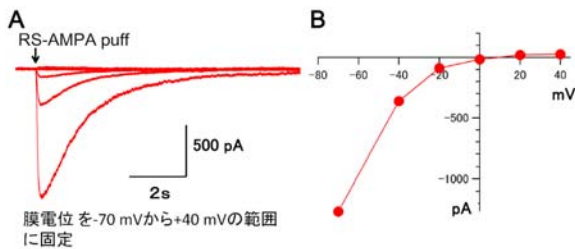


図1 GluR1のみを発現させたHEK293TのAMPA応答

次に、GluR1 とレポーター遺伝子 (GFP または tdTomato) だけでなく、GluR2 (編集型 GluR2) 遺伝子も同時に遺伝子導入して、AMPA 応答を記録した。この場合、AMPA 受容体構成は、GluR1 だけでなく GluR2 も含むヘテロメリック AMPA 受容体となると考えられる。その結果、AMPA 応答の電流-電圧特性は、ほぼ直線となり、Ca 非透過型に特徴的な電流-電圧特性となった。したがって、本研究で用いた GluR2 (編集型 GluR2) 遺伝子は、Ca 透過型 AMPA 受容体の性質を Ca 非透過型に変化させることが確認できた。

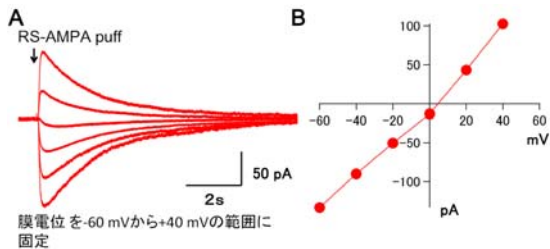


図2 GluR1とGluR2を共発現させたHEK293TのAMPA応答

当初、幼若マウスの *in vivo* の系において、GFAP プロモーターの制御下で GluR2 をグリア細胞選択的に発現させようと試みた。レポーター遺伝子である GFP のみであれば、*in vivo*

の系で効率よく発現させることに成功した (図 3)。しかしながら、GFP と GluR2 (編集型 GluR2) を共発現させようとするとう発現効率が極端に悪くなり、実験遂行が困難になった。導入する遺伝子のサイズが大きくなったため、発現効率が悪くなったと考えられる。

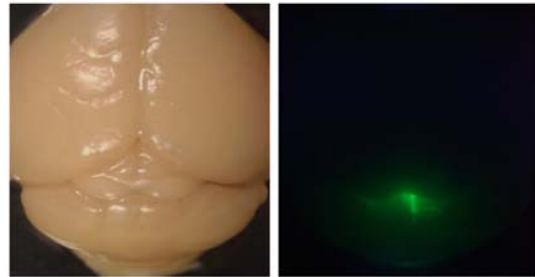


図3 小脳の実体顕微鏡像(左)とGFP蛍光像(右)

そこで、発現効率を高めるため、グリア選択性を出来るだけ保ったまま、GFAP プロモーター (約 2kbp) のサイズを減らす工夫を試みた。それと同時に、レンチウイルスによる遺伝子導入効率をより高めるため、*in vivo* の系ではなく、新生仔マウス小脳からグリア細胞と神経細胞と一緒に分散培養する小脳初代培養系の実験系を用いることにした。

GFAP プロモーターのサイズを、300・600・1040 まで削ったコンストラクトを作成し、まずは GFP のみを発現させる実験を行った。300 まで削っても、グリア細胞への選択性は比較的保たれていたが、発現量は 300 ではかなり弱くなるようであった。それに比べて、600 までのサイズであれば、グリア細胞への選択性と発現量も共に比較的良好であった (図 4・5)。

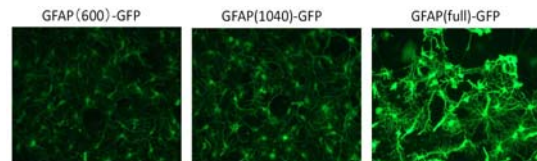


図4 小脳初代培養系でのレンチウイルスによるGFPの発現

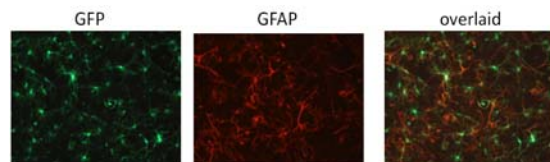


図5 GFAPプロモーターのサイズを600に削ったものでGFPを発現させた(GFAP(600)-GFPコンストラクト)。GFPとGFAPの二重染色を行った。

次に、これらの改変コンストラクトを用いて GluR2 を発現させるウイルスベクターを製作し、小脳初代培養系に感染させたところ、十分な発現が確認され (図 6)、神経回路形成に

対する影響を検討しているところである。また、これらの改変コンストラクトが *in vivo* の系でも効率よく GluR2 を発現することが可能かどうかを確認中である。もし、可能であるならば、*in vivo* での小脳神経回路発達における影響を詳細に検討する予定である。

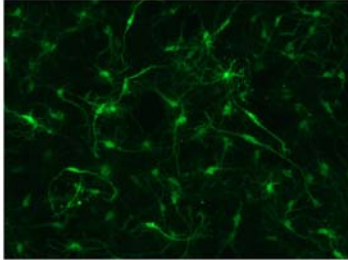


図6 小脳初代培養系にGFAP(600) GFP-P2A-GluR2コンストラクトをレンチウイルスによって発現させた

#### 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1件)

- ① Kazuhiro Mitsumura, Nobutake Hosoi, Nobuhiko Furuya and Hirokazu Hirai

Disruption of metabotropic glutamate receptor signalling is a major defect at cerebellar parallel fibre-Purkinje cell synapses in *staggerer* mutant mice

The Journal of Physiology, 査読有, 589 (13), 2011, pp3191-3209

[学会発表] (計2件)

- ① 細井延武、三ツ村一浩、平井宏和  
Disruption of mGluR-mediated signalling at cerebellar parallel fiber-Purkinje cell synapses in *staggerer* mutant mice  
第4回国際小脳学会、2011.9.18、東京大学山上会館 (東京都)
- ② 細井延武、三ツ村一浩、平井宏和  
Staggerer 小脳変性マウスにおける代謝型グルタミン酸受容体を介するシナプス伝達の異常  
第34回日本神経科学学会、2011.9.16、パシフィコ横浜 (神奈川県)

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

細井 延武 (HOSOI NOBUTAKE)  
群馬大学・大学院医学系研究科・助教  
研究者番号：90543570

##### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

##### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：