

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 26 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23500399

研究課題名(和文) Cbln - デルタ1グルタミン酸受容体系のシナプス可塑性における機能解明と精神疾患

研究課題名(英文) The functional analyses of Cbln-GluD1 signaling

研究代表者

幸田 和久 (Kohda, Kazuhisa)

慶應義塾大学・医学部・准教授

研究者番号：40334388

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：小脳平行線維 - プルキンエ細胞シナプスの研究から、デルタ2グルタミン酸受容体(GluD2)がCbln1と結合して、シナプス形成・維持と可塑性に関与することが解明された。しかし、GluD1に機能については不明である。本研究では、GluD1欠損マウスの海馬CA1ニューロンの透明分子層における嗅内皮質からの投射線維とのシナプスの電気生理学的解析から、GluD1は本シナプスにおけるNMDA受容体の反応の増大及びシナプス可塑性の閾値の決定に関与しており、本回路が関与することが知られている遅延恐怖条件付にも異常が見られた。本研究はシナプス可塑性におけるGluD1の機能を初めて示したものとして特筆される。

研究成果の概要(英文)：Although it was demonstrated that the delta2 glutamate receptor (GluD2) played crucial roles in synapse formation/maintenance and synaptic plasticity through interactions with Cbln1, function of GluD1 remains still elusive. Using GluD1-null mice, we investigated electrophysiological characteristics of the hippocampal CA1 neuron synapses in stratum lacunosum-moleculare where the entorhinal cortical neurons directly project. We found that GluD1 was critically involved in tuning NMDA/AMPA ratio and the threshold of synaptic plasticity. Furthermore, GluD1-null mice showed impairment in trace fear conditioning in which synaptic transmission in the stratum lacunosum-moleculare of the CA1 region is essential. It should be noted that this study, for the first time, revealed biological function of GluD1 in synaptic plasticity.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：脳神経科学・神経科学一般

キーワード：デルタ型グルタミン酸受容体 Cbln AMPA受容体 海馬 小脳

1. 研究開始当初の背景

申請者は、小脳顆粒細胞から分泌される **Cbln1** と小脳プルキンエ細胞に特異的に発現している $\delta 2$ グルタミン酸受容体(**GluD2**)の研究から、**Cbln1** が **GluD2** のリガンドであり、**Cbln1-GluD2** 系が、顆粒細胞の軸索である平行線維-プルキンエ細胞間シナプスの形成・維持と可塑性の双方を担っている重要なシステムであることを、明らかにしてきた。**GluD2** には同属の $\delta 1$ 受容体(**GluD1**)が、また **Cbln1** には **Cbln2~4** が類縁分子として存在し、それらは脳の様々な部位に発現していることから、**Cbln** ファミリー-GluD 系が小脳のみではなく、脳全体における普遍的なシステムであろうと想定された。**GluD1** は **GluD2** 同様、グルタミン酸及びその類似アミノ酸でイオンチャネル活性を示さず、その生理的機能は不明であったが、**Cbln1-GluD2** の機能的連関からの予測通り、*in vitro* の系において **GluD1** には **Cbln1** 依存的なシナプス誘導能があることが報告されたものの、**GluD1** のシナプス可塑性への寄与、その細胞内シグナルについては明らかになっていない。また、疾患関連遺伝子の探索研究から、**GluD1** が統合失調症及び自閉症と連鎖もしくは関連していることが報告されている。そこで申請者は、脳全般に広く発現している **Cbln-GluD1** 系のシナプス可塑性及び細胞内シグナルの解明とその異常がもたらす行動への影響を解析することは、回路形成や長期記憶の新たな普遍的分子機構の解明だけでなく、上記機能性精神疾患の新たな病因・病態の発見に繋がると着想するに至った。

2. 研究の目的

申請者らが **GluD2** 及び **Cbln1** に関する研究において培った経験と技術を駆使して、**GluD1** と **Cbln** ファミリー分子のシナプス可塑性における機能及び駆動される細胞内シグナル伝達の機構を、各種ノックアウト・マウスを用いつつ、分子レベルから行動レベルまで、統合的に解明する。また、

Cbln-GluD1 系の遺伝子レベルの変異を、患者ゲノムを用いて探索する。変異を検索するに当たり、遺伝子のエクソン内の変異を中心に解析を進める。有意と考えられる変異が発見された場合は、上記の表現型回復実験の手法により、そのヒト型変異の意義を電気生理学的、形態学的、行動学的に解析し、疾患との関連性を追及する。

3. 研究の方法

(1) **GluD1** 欠損マウスを用いた電気生理学的解析

GluD1 欠損マウスの海馬急性スライスを作製し、ホールセル・パッチクランプ法により、海馬 **CA1** ニューロンの透明分子層におけるシナプス伝達及びその可塑性を解析した。

(2) 行動学的解析

生後 12 週の **GluD1** 欠損マウスを用いて以下の行動学的解析を行った。

- open field test
- paired-pulse inhibition
- 強制水泳
- tail suspension test
- social interaction test
- 八方放射迷路
- T 字迷路
- 恐怖条件付け

(3) ゲノム解析

GluD1 エクソンに対するプライマーを作製し、統合失調症患者及び正常者のゲノムサンプルを用いて、シーケンシングを行った。

4. 研究成果

(1) **GluD1** 欠損マウスを用いたシナプス可塑性の解析

GluD1 は海馬 **CA1** において、透明分子層に限局して発現し、同部位に投射する嗅内皮質ニューロンには **Cbln1** 及び **Cbln4** が発現している。そこで、**GluD1** 欠損マウスを用いて、本シナプスの電気生理学的解析とシナプス可塑性の解析を行った。その結果、

AMPA受容体の反応に対するNMDA受容体の反応の比が大きくなっており、LTP及びLTDは誘導されたが、可塑的変化の閾値を詳細に検討したところ、LTPの閾値が低下している（つまり、LTPが起きやすく、LTDが起きにくい）ことが判明した。この結果は、GluD1がシナプス伝達及び可塑性に関与することを初めて示した成果である。GluD1欠損との因果関係をさらに明確にするために、現在、ウイルスベクターを用いてGluD1マウスにGluD1を発現させ、異常表現型は回復させる実験を行っているところである。

(2) GluD1欠損マウスを用いた行動解析

GluD1欠損マウスの行動異常を探索したところ、paired-pulse inhibition (PPI)の異常や強制水泳における無動時間の延長が見られた。前者は統合失調症において見られる感覚運動フィルタリングに関係する障害を反映すると考えられ、また後者は抑うつ傾向を示すとされている。従って、GluD1はこれらの機能性精神疾患の症状形成に関与することが示唆される。さらに、上記の嗅内皮質-透明分子層シナプスが関与すると報告された遅延恐怖条件付にも障害が見られた。この結果は、本シナプスの電気生理学的異常とも合致する所見であり、GluD1の行動レベルでの機能的意義を初めて明らかにするものである。本所見についても、表現型回復実験を行いGluD1欠損との因果関係を確認中である。open field test、social interaction test、方放射迷路、T字迷路においては、有意な差は見られなかった。

(3) 統合失調症患者サンプルを用いた

GluD1遺伝子エクソン内の変異の探索

統合失調症患者のゲノムにおけるGluD1エクソン内の変異を探索したところ、アミノ酸変異を伴うSNPとして、L313F、A832T、を見出した。特に前者は今まで正常群のSNPとしても報告のない変異であり、GluD1のCbln1の結合部位内の変異である。この変異に注目してCbln1への結合能、変異

GluD1の細胞表面発現、シナプス形成能を培養細胞系で解析したところ、野生型GluD1との間に有意差は見いだせなかった。引き続き、自閉症患者サンプルでGluD1変異の探索を進めるとともに、Cbln1ファミリータンパクの変異の探索も行っている。

(4) GluD2のシグナル伝達の解析

GluD1の細胞内シグナル伝達を明らかにする途上、同族分子であるGluD2のそれに関する有力なデータが得られたため、未解明であったGluD2の情報伝達系の解析を進めた。GluD2欠損マウスの小脳プルキンエ細胞では、野生型に比べて、2型AMPA受容体(GluA2)のY876のリン酸化が有意に増えていた。また化学的LTD刺激を小脳急性スライスに与えると、野生型ではS880のリン酸化が亢進し、Y876のそれは低下したが、GluD2欠損マウスにおいては、双方ともに有意な変化が見られなかった。LTDの分子の実体であるGluA2のエンドサイトーシスにはS880のリン酸化が必須であることが知られていたが、Y876の役割に関しては未解明である。しかし、上記の所見は、LTDにY876の脱リン酸化が必要であることを示唆している。GluD2の細胞内領域にはチロシン脱リン酸化酵素であるPTPMEGが結合していることが知られているが、申請者はGluA2のY876がこの基質となっていることを明らかにし、さらにin vitroの系においてY876のリン酸化はS880のリン酸化を阻害すること、さらにLTDが障害されることが知られているPTPMEG欠損マウスにおいても、Y876のリン酸化の所見がGluD2欠損マウスと一致することが分かった。そしてY876がリン酸化されない変異GluA2Y876FをGluD2欠損マウスに導入すると、LTDが回復することを示し、Y876の脱リン酸化がLTDを回復させるのに十分であることを明らかにした。これらの結果は、今まで未解明であったGluD2の細胞内シグナリングを初めて明らかにしたものであり、論文として報告した。

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 5 件)

1. 幸田和久、柚崎通介 神経機能回復の基礎過程としてのシナプス可塑性 総合リハビリテーション 特集 脳科学の進歩—最近のトピックス (査読無し) 42(1): 19-25, 2014
2. Kohda K, Kakegawa W, and Yuzaki M. Unlocking the secrets of the $\delta 2$ glutamate receptor: a gatekeeper for synaptic plasticity in the cerebellum *Commun Integr Biol* (査読有り) 6(6):e26466, 2013 doi: 10.4161/cib.26466. (an invited review)
3. Kohda K, Kakegawa W, Matsuda S, Yamamoto T, Hirano H, and Yuzaki M. Gating of LTD by $\delta 2$ glutamate receptors—a new mechanism by coordinated interaction between two AMPA receptor phosphorylation sites *PNAS* (査読有り) 110(10): E948-E957, 2013 doi: 10.1073/pnas.1218380110.

[学会発表] (計 3 件)

1. 幸田和久、掛川渉、松田信爾、山本雅、平野久、柚崎通介 デルタ 2 グルタミン酸受容体は AMPA 受容体のセリンおよびチロシンのリン酸化を制御することによって小脳長期抑圧の誘導に寄与する 第 36 回日本神経科学大会 (Neuro2013) 京都 2013 年 6 月 21 日
2. 岩室賢治、掛川渉、幸田和久、柚崎通介 Cbln1-GluD1 シグナリングは海馬 CA1 錐体細胞で長期シナプス可塑性を調整する 第 36 回日本神経科学大会 (Neuro2013) 京都 2013 年 6 月 21 日
3. 幸田和久、掛川渉、松田信爾、柚崎通介 デルタ 2 グルタミン酸受容体は如何に LTD を制御しているか? 第 90 回日本生

理学会大会シンポジウム 東京、2013 年

3 月 27 日

[図書] (計 1 件)

1. Kohda K, Kakegawa W, Yuzaki M. Delta Glutamate Receptor. In: *Encyclopedia of Signaling Molecules* (Choi S. eds.), Springer, New York, 514-518, 2012 (http://link.springer.com/referenceworkentry/10.1007/978-1-4419-0461-4_642/fulltext.html)

[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]

1. “記憶・学習のメカニズムを分子レベルで明らかに”
http://kompas.hosp.keio.ac.jp/content/s/medical_info/science/201404.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

幸田 和久 (KOHDA, Kazuhisa)
慶應義塾大学・医学部・准教授
研究者番号：40334388

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

佐々木 司 (SASAKI Tsukasa)
東京大学・大学院教育学研究科・教授
研究者番号：50235256