

平成 26 年 6 月 10 日現在

機関番号：63905

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23500457

研究課題名(和文)ニューロン型グルタミン酸輸送体の生理的役割：拡散依存性シナプス調節の制御

研究課題名(英文)Physiological role of neuronal glutamate transporters: control of extrasynaptic glutamate diffusion-mediated modification of synaptic transmission

研究代表者

佐竹 伸一郎(SATAKE, Shin'Ichiro)

生理学研究所・生体情報研究系・助教

研究者番号：30360340

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：小脳皮質における拡散性異種シナプス抑制が、エタノール(EtOH)によって用量依存的(25-50 mM：酩酊～泥酔時の血中濃度に相当)に阻害されることを発見した。EtOHの阻害作用は、プルキンエ細胞に発現するグルタミン酸輸送体EAAT4の特異的阻害薬により著しく減弱した。またEtOHの作用は、プロテインキナーゼC(PKC)ならびにPI3キナーゼ(PI3K)の阻害薬により完全に消失した。こうした結果に基づきEtOHには、PKC/PI3Kが担うタンパク質リン酸化カスケードを介してEAAT4の機能を亢進させることにより、神経伝達物質グルタミン酸のシナプス外拡散を減弱させる作用があると結論した。

研究成果の概要(英文)：In response to repetitive activation of the climbing fibers (CFs), GABA release at basket cell (BC)-Purkinje cell (PC) synapses in the cerebellar cortex is suppressed through extrasynaptic diffusion of the CF transmitter glutamate and following activation of AMPA receptors that expressed on BC axon terminals. We found that the CF-induced presynaptic inhibition of cerebellar GABAergic transmission is suppressed by ethanol (EtOH) at a clinically relevant concentration (25-50 mM). Pharmacological blockade of the neuronal glutamate transporter EAAT4 not only augmented the CF-induced inhibition of GABAergic transmission but also abolished the suppressive action of EtOH on the CF-induced inhibition. This EtOH action was diminished by inhibitors for protein kinase C (PKC) and phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K). These results suggest that EtOH acutely potentiates EAAT4-mediated glutamate uptake in PCs through PKC/PI3K-mediated protein phosphorylation.

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：エタノール グルタミン酸輸送体 小脳 プルキンエ細胞 登上線維 籠細胞

1. 研究開始当初の背景

脳幹(下オリーブ核)から小脳皮質のプルキンエ細胞に投射する登上線維の神経終末から放出された興奮性伝達物質グルタミン酸(Glu)は、プルキンエ細胞に強力な興奮を誘発させると同時にシナプス外領域にも拡散する。拡散したGluは、籠細胞(分子層の介在ニューロン)軸索終末のAMPA受容体を活性化することにより、籠細胞-プルキンエ細胞間GABA作動性伝達のシナプス前抑制を引き起こす(図1)(拡散依存性異種シナプス抑制: Satake S. et al., *Nat. Neurosci.* 3, 551-558. 2000; *Eur. J. Neurosci.* 19, 2464-2474. 2004)。

Gluのシナプス外拡散はグルタミン酸輸送体を中核とするGlu回収機構によって厳密に制御されている(Takayasu Y. et al., *J. Neurosci.* 25, 8788-8793. 2005; *J. Neurosci.* 26, 6563-6572. 2006; Takatsuru Y. et al., *Neurosci. Res.* 54, 140-148. 2006)。しかし、グルタミン酸輸送体(excitatory amino acid transporter, EAAT)の阻害薬やシナプス外拡散の阻害薬を用いた実験の結果(Satake S. et al., *J. Neurosci.* 26, 2278-2289. 2006)は、高頻度活動に伴い登上線維Gluは、回収機構の働きを超えて籠細胞軸索終末のAMPA受容体に到達できることを示唆していた(図1)。

EAATが属するSLC1ファミリーには、5種のグルタミン酸輸送体ならびに2種の中性アミノ酸輸送体が分類されている。サブタイプの一つEAAT4は、プルキンエ細胞に特異的に発現し、小脳虫部矢状断方向にzebrin-II(aldolase C)と重複する様式で帯状に分布している(Dehnes, Y. et al., *J. Neurosci.* 18, 3606-3619. 1998; Welsh, J. P. et al., *Adv. Neurol.* 89, 331-359. 2002; Wadiche J. I. and Jahr C. E., *Nat. Neurosci.* 8, 1329-1334. 2005)。この性質を利用して異種シナプス抑制とEAAT4発現量の関係について検討を行い、EAAT4発現が低い領域(第III小葉)では容易に異種シナプス抑制を誘発できるが、高発現領域(第X小葉)では誘発できないことを見出した(Satake S. et al., *Eur. J. Neurosci.* 32, 1843-1853. 2010)。

ニューロンとグリア細胞では、異なるサブタイプのEAATが発現している(図1)。グリア型輸送体は、シナプスから放出されたGluを回収して伝達物質としての再利用を仲介するとともに、過剰Gluの細胞毒性からニューロンを保護する役割があると考えられている(Danbolt N. C., *Prog. Neurobiol.* 65, 1-105. 2001; Kanai Y. et al., *Mol. Asp. Med.* 34, 108-120. 2013)。しかし、ニューロン型輸送体はGABA作動性ニューロン(例えば、小脳ではプルキンエ細胞)のシナプス後部外周に集積する特徴があるなど、Glu再利用の仲介のみではその生理的役割を説明することはできなかった。

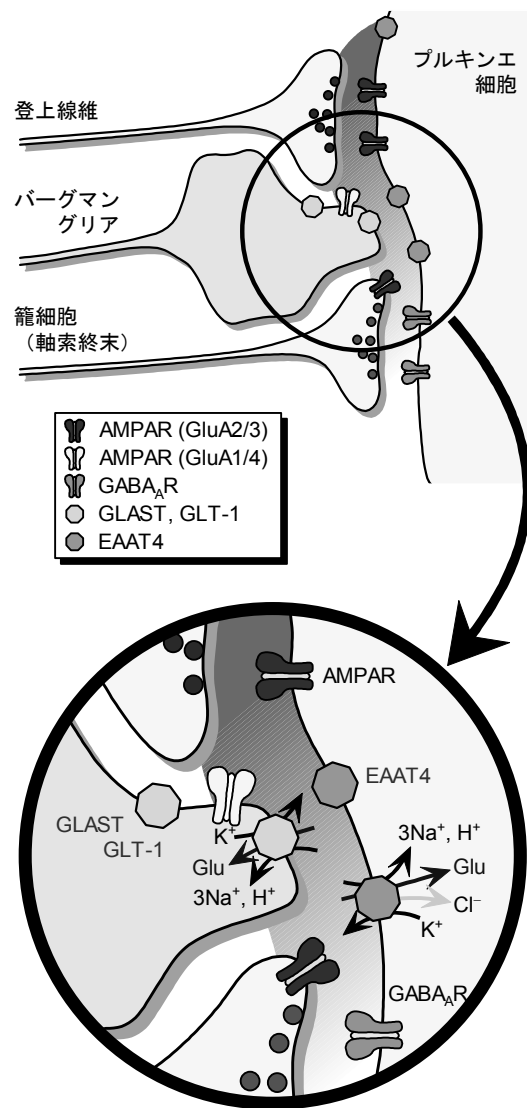


図1: 拡散を介した小脳異種シナプス抑制  
シナプス間隙から拡散した登上線維伝達物質Gluは、籠細胞軸索終末に局在するAMPA受容体(GluA2/3)に作用して、シナプス前抑制(GABA放出の抑制)を引き起こす。シナプス放出された登上線維Gluは、グリア型(GLAST/GLT-1)ならびにニューロン型(EAAT4)グルタミン酸輸送体の働きにより回収される。EAAT4は、小脳の領域により発現量が異なる性質やシナプス活動に依存して輸送能を増強させる特性があり、Gluのシナプス外拡散に重要な影響をおよぼす。佐竹ら, *脳* 21 14, 320-325. 2011.より改変。

2. 研究の目的

拡散性伝達(拡散性シナプス調節)の分子細胞基盤を検討する過程で、小脳異種シナプス抑制がエタノール(EtOH)によって阻害されることを発見した。EtOHの阻害作用はEAAT4の阻害薬によって消失したことから、EtOHにはEAAT4のGlu回収能を亢進することにより、登上線維Gluのシナプス外拡散

を減弱させる作用があると推定した。また、EAAT4 の Glu 輸送能は、登上線維のシナプス活動を反映して長期増強を示すことが知られている (Shen Y. and Linden D. J., *Neuron* 46, 715–722. 2005)。これまでに、登上線維を頻回刺激することによりプルキンエ細胞で誘発した EAAT4 長期増強は、登上線維 - 籠細胞間の拡散性異種シナプス抑制を有意に減弱させることを報告している (Satake et al., 2010)。こうした背景から、ニューロン型 EAAT は、シナプス活動や飲酒といった様々な外的要因を反映して、その発現量や Glu 輸送機能をダイナミックに変えることにより、『Glu のシナプス外拡散により惹起されるシナプス調節 (登上線維 - 籠細胞間クロストーク、平行線維 - プルキンエ細胞間長期抑圧など)』をコントロールする、フィードフォワード制御因子として働くのではないかと推定した。

アルコールにより引き起こされる小脳機能失調の分子的基盤は現在までほとんど明らかにされておらず、飲酒に伴う様々な社会的弊害と考え併せると、そのメカニズムを解き明かすことは喫緊の課題である。本研究では、EtOH による小脳異種シナプス抑制阻害を優れた実験モデルと考え、薬理的解析によりニューロン型輸送体 EAAT4 の機能制御メカニズムを明らかにすることを目指した。また、EAAT の Glu 輸送能を評価するため、caged 化合物から光遊離させた Glu によりニューロンならびにグリア細胞に EAAT 電流を誘発する方法の構築を試みた。

### 3. 研究の方法

本研究では、自然科学研究機構・動物実験センターの指針に従い動物実験を実施した。当機構の動物実験委員会において書類審査を受けた後、許可された計画に基づいて研究を遂行した。また、実験動物に苦痛を与えないよう、麻酔ならびに安楽死処置には十分な注意を払った。実験には、幼若ラット (Wistar 種、出生後 2–3 週齢) を用いた。小脳スライスパッチクランプ法 (Satake et al., 2000; 2004) に薬理学的手法を適用することにより、EtOH が EAAT4 機能を亢進させるメカニズムを追究した。

### 4. 研究成果

#### (1) EtOH の小脳異種シナプス間拡散性クロストーク阻害作用

小脳異種シナプス抑制 (Satake et al., 2000) が、EtOH によって用量依存的 (25–50 mM : 酩酊～泥酔時の血中濃度に相当) に阻害されることを発見した。EtOH (50 mM) の阻害作用は、プルキンエ細胞に豊富に存在するグルタミン酸輸送体 EAAT4 の特異的阻害薬 T3MG (*threo*-3-methylglutamic acid,

30  $\mu$ M) により有意に減弱した。一方、シナプスを被覆するアストロサイトの一種バグマングリアに発現するグルタミン酸輸送体 GLAST と GLT-1 の阻害薬 (PMB-TBOA, 0.1  $\mu$ M ならびに dihydrokainate, 300  $\mu$ M) は、EtOH の異種シナプス抑制阻害作用に無効であった。また EtOH の阻害作用は、プロテインキナーゼ C (protein kinase C, PKC; EC 2.7.11.13) 阻害薬 GF109203X (1  $\mu$ M) およびホスファチジルイノシトール-3 キナーゼ (phosphatidylinositol-3 kinase, PI3K; EC 2.7.1.137) 阻害薬 wortmannin (5  $\mu$ M) により完全に消失した。

EtOH の作用機構をさらに追究するため、登上線維からシナプス外に拡散した Glu の動態を観察した。Glu 動態の観察には、登上線維の刺激によりプルキンエ細胞に誘発したシナプス性輸送体電流 (synaptic transporter current, STC; Wadiche J. I. et al., *Neuron* 15, 721–728. 1995) を用いた。EtOH (50 mM) は、STC の振幅を不可逆的に減少させた。この結果は、シナプス外への登上線維 Glu の拡散が EtOH により減弱していることを示唆している。また、この EtOH が STC の振幅を減少させる作用も PKC 阻害薬 GF109203X (1  $\mu$ M) の先行投与により有意に阻害された。

こうした結果に基づき、EtOH が異種シナプス抑制を阻害する作用には、① PKC/PI3K を介したタンパク質リン酸化カスケードと② EAAT4 の機能亢進に伴う登上線維 Glu のシナプス外拡散の減弱という 2 つのプロセスが関与していると結論した。この作用機序は、*Xenopus* 卵母細胞に発現させた EAAT3 ならびに EAAT4 の Glu 輸送機能が EtOH により亢進することを生化学実験により証明した先行研究の結果 (Kim J.-H. et al., *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 27, 1548–1553. 2003; Park H.-K. et al., *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 32, 348–354. 2008) とよく一致している。

#### (2) Caged 化合物から光遊離させた Glu によりニューロンならびにグリア細胞に誘発した EAAT 電流の測定

EAAT は、1 分子の Glu を輸送するにあたり、3 つの Na<sup>+</sup> と 1 つの H<sup>+</sup> を共輸送するとともに 1 つの K<sup>+</sup> を逆輸送する (図 1)。このため EAAT は、Glu 輸送と共役して特異的な起電性を示す (Danbolt, 2001; Kanai et al., 2013)。これまでに、シナプス放出された Glu によって誘発される EAAT 電流 (即ち、STC) を記録する方法を確立し、シナプス外 Glu の動態解析に利用してきた (Satake et al., 2010)。しかし、この方法で観察できるのは、シナプス近傍に局在する EAAT に由来する一部の電流に限られており、1 個の細胞が担う Glu 回収の総量を検討することなどは不可能であった。

この問題を解決するため、caged Glu を用

いた EAAT 電流誘発・記録システムの構築を試みた (図 2)。幼若ラットから小脳スライスを作成し、Glu/GABA 受容体阻害薬 (NBQX, 100  $\mu$ M; AIDA, 100  $\mu$ M; bicuculline, 10

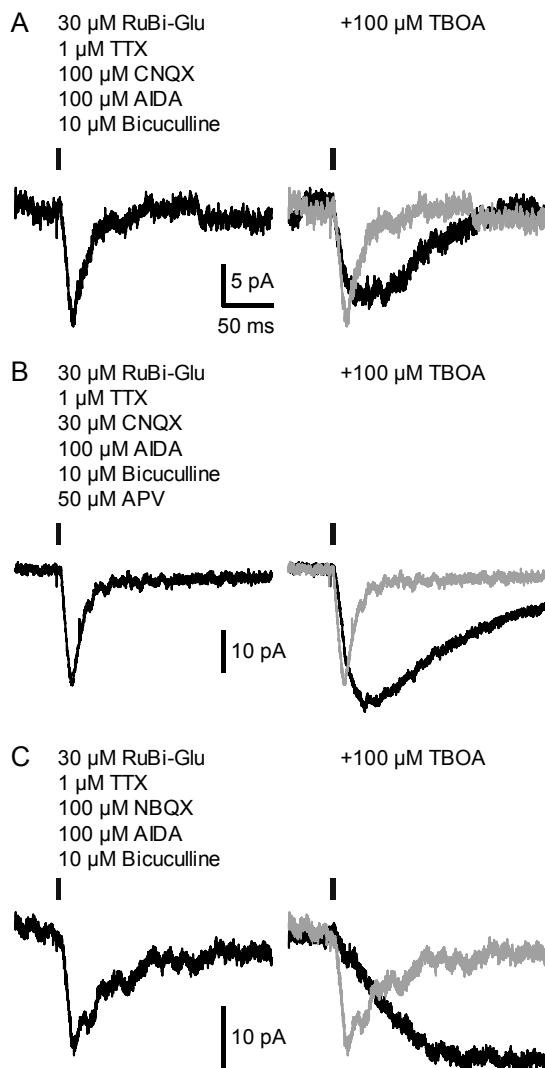


図 2 : Caged 化合物 RuBi-glutamate によりプルキンエ細胞に誘発した EAAT 電流

(A) 光照射に伴いプルキンエ細胞より記録された内向き電流 (左)。この内向き電流は EAAT 阻害薬 TBOA により減弱した (ピーク部分)。しかし、時間経過の遅い TBOA 誘発性電流が新たに生じるため (Brasnjo G. and Otis T. S., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101, 6273–6278. 2004)、EAAT 電流のみを区別して解析することはできなかった [右 : TBOA 投与前の内向き電流を重ねて表示 (灰色トレース)]。(B) TBOA 誘発性電流は NMDA 受容体阻害薬 APV の影響を受けなかった。この電流成分に NMDA 受容体が関与する可能性は否定される。(C) AMPA/kainate 受容体阻害薬 NBQX 存在下で記録した TBOA 誘発性電流は、CNQX (パネル A 参照) や kynurenate (データ示さず) といった他の Glu 受容体阻害薬の存在下で記録された電流よりも時間経過が遅く、内向き電流との区別が容易となった。

$\mu$ M) ならびに  $\text{Na}^+$  チャンネル阻害薬 TTX (tetrodotoxin, 1  $\mu$ M) とともに caged Glu (RuBi-glutamate, 30–50  $\mu$ M) を灌流投与した。可視光パルス (430 nm, 5 ms) を照射して Glu を遊離させることにより、電位固定したプルキンエ細胞 ( $V_H = -60$  mV) から内向き電流を記録することに成功した (図 2)。この内向き電流は、EAAT 阻害薬 TBOA (*threo*- $\beta$ -benzyloxyaspartic acid, 100  $\mu$ M) により著しく減弱したことから、EAAT 電流が誘発・記録できたと結論した (図 2)。また、同じ方法により、バグマングリアからも EAAT 電流が観察できることを確認した。

RuBi-glutamate は、低濃度での投与でも十分な作用を示すとともに、可視光線によって Glu の遊離が引き起こせることに特徴がある (Fino E. et al., *Front. Neural Circuits* 3, 2. 2009)。そのため RuBi-glutamate は、従来型の紫外線作動性 caged 化合物 (MNI-glutamate など) と比べて細胞毒性や作用の交雑性が低く、長時間に渡って安定かつ特異的な EAAT 電流を誘発させることができると期待される (Fino et al., 2009)。今後は、この方法に細胞内 (細胞外) モジュレータ試薬を併用するなどにより、ニューロンやグリア細胞において Glu 輸送・回収系が担う生理的役割ならびにその分子細胞基盤を追究したいと考えている。

プルキンエ細胞は小脳皮質で唯一の出力ニューロンであることから、ニューロン型輸送体 EAAT4 が拡散依存性異種シナプス間クロストークを制御するメカニズムを理解することは、小脳皮質の情報処理機構を分子レベルで解き明かしていく有力な道筋の一つになると期待できる。将来的には、Glu/GABA/モノアミンといった神経伝達物質/神経調節因子の除去・回収を担う輸送体 (群) が、脳・中枢神経系の情報処理過程において担う役割を包括的に理解することを目標に研究を進展させていきたい。

## 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 3 件)

- ① Keiko Ikeda, Shin'Ichiro Satake, Tatsushi Onaka, Hiroki Sugimoto, Naoki Takeda, Keiji Imoto, Kiyoshi Kawakami (2013) Enhanced inhibitory neurotransmission in the cerebellar cortex of *Atp1a3*-deficient heterozygous mice. *Journal of Physiology* 591, 3433–3449. (査読あり)  
DOI: 10.1113/jphysiol.2012.247817
- ② Shin'Ichiro Satake, Tsuyoshi Inoue, Keiji Imoto (2012) Paired-pulse facilitation of multivesicular release and

intersynaptic spillover of glutamate at rat cerebellar granule cell-interneuron synapses. *Journal of Physiology* 590, 5653-5675. (査読あり)  
DOI: 10.1113/jphysiol.2012.234070

- ③ 佐竹 伸一郎、小西 史朗、井本 敬二 (2011) ニューロン型グルタミン酸トランスポーターが制御する異種シナプス間クロストーク. *脳* 21 14, 320-325. (査読なし)

[学会発表] (計 7 件)

- ① 井本 敬二、佐竹 伸一郎「3次元拡散モデルを用いた  $Ca^{2+}$ チャネル - 開口放出センサー間距離の推測」第 91 回日本生理学会大会. 鹿児島大学 (鹿児島市) 2014 年 3 月 16 日 - 2014 年 3 月 18 日.
- ② Keiko Ikeda, Shin'Ichiro Satake, Kiyoshi Kawakami「Increased inhibitory neurotransmission in the cerebellum of the *Atp1a3*-deficient heterozygous mice」Second Symposium on ATP1A3 in Disease: Genotype/Phenotype Correlations, Modelling and Identification of Potential Targets for Treatment. Catholic University School of Medicine (Rome, Italy) 2013 年 9 月 23 日 - 2013 年 9 月 24 日.
- ③ 佐竹 伸一郎、池田 啓子、川上 潔、井本 敬二「*Atp1a3*<sup>+/+</sup>マウス小脳皮質において登上線維伝達物質のシナプス外拡散は強く抑制されている」Neuro2013 (第 36 回日本神経科学大会・第 56 回日本神経化学学会大会・第 23 回日本神経回路学会大会合同大会). 国立京都国際会館 (京都市) 2013 年 6 月 20 日 - 2013 年 6 月 23 日.
- ④ 佐竹 伸一郎、井本 敬二「小脳顆粒細胞のシナプス小胞多重性放出における  $Ca_v2.1$  チャネルの役割」Neuroscience 2012 (第 35 回日本神経科学大会). 名古屋国際会議場 (名古屋市) 2012 年 9 月 18 日 - 2012 年 9 月 21 日.
- ⑤ 池田 啓子、佐竹 伸一郎、尾仲 達史、竹田 直樹、井本 敬二、川上 潔「DYT12 モデルマウスの小脳抑制系神経伝達の変化」Neuroscience 2012 (第 35 回日本神経科学大会). 名古屋国際会議場 (名古屋市) 2012 年 9 月 18 日 - 2012 年 9 月 21 日.
- ⑥ 佐竹 伸一郎、井本 敬二「ラット小脳皮質において  $G_{i/o}$  共役型受容体が仲介するシナプス前抑制における多様性」(社)

日本動物学会第 82 回大会. 大雪アリーナ (旭川市) 2011 年 9 月 21 日 - 2011 年 9 月 23 日.

- ⑦ 佐竹 伸一郎、井本 敬二「小脳顆粒細胞 - 分子層介在ニューロン間興奮性伝達のシナプス前性増強における多様性」Neuroscience 2011 (第 34 回日本神経科学大会). パシフィコ横浜 (横浜市) 2011 年 9 月 14 日 - 2011 年 9 月 17 日.

[図書] (計 1 件)

- ① Shiro Konishi, Shin'Ichiro Satake (2013) Physiological interactions between neurons and glia: roles of transporters in the control of inter-synaptic crosstalk. In *Glial Cells: Embryonic Development, Types/Functions and Role in Disease*. (Eds. Charanjit Kaur and Eng-Ang Ling) New York: Nova Science Publishers, 177-192. (査読なし)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

佐竹 伸一郎 (SATAKE Shin'Ichiro)  
生理学研究所・生体情報研究系・助教  
研究者番号: 30360340