

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 20 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2011～2013

課題番号：23689012

研究課題名(和文)新規D-セリンシグナリングを介したシナプス可塑性および記憶・学習制御機構の解明

研究課題名(英文) Analysis of a novel D-Serine signaling underlying synaptic plasticity and motor learning

研究代表者

掛川 渉 (KAKEGAWA, WATARU)

慶應義塾大学・医学部・講師

研究者番号：70383718

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 20,000,000円、(間接経費) 6,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、発達期小脳に豊富に存在するD-セリンの生理的役割について追究した。その結果、D-セリンは神経活動依存的にグリア細胞から放出され、神経細胞に発現するデルタ2型グルタミン酸受容体と結合することにより、記憶・学習の分子基盤とされるシナプス可塑性を制御することがわかった。興味深いことに、デルタ2受容体は細胞内最C末端領域で結合するチロシン脱リン酸化酵素PTPMEGを介してシナプス可塑性を調節していることが示唆された。したがって、本研究で見出された新規D-セリンシグナリングは、グリア-ニューロン相互作用の理解を深める上で有益な知見を与えうるものと期待される。

研究成果の概要(英文)：In this study, we examined the functional role of a D-serine highly existing in the developing cerebellum. D-Serine in the cerebellum, which was released from glial cells in a neuronal activity-dependent manner, bound to the postsynaptically-expressing delta2-type ionotropic glutamate receptors (delta2 receptors) to regulate synaptic plasticity, a molecular basis of learning and memory. Interestingly, we revealed that delta2 receptor controlled the synaptic plasticity by binding to the tyrosine phosphatase PTPMEG via its intracellular C-terminus. Thus, D-serine-delta2 signaling is a unique D-serine signaling, which may gain new insights into the glia-neuron interaction.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・生理学一般

キーワード：神経科学 生理学 生体分子 アミノ酸 シナプス

1. 研究開始当初の背景

アミノ酸は、DNA・タンパク質と共に根元的に生命活動を担うきわめて重要な分子である。アミノ酸には、光学活性の違いから L 体と D 体が存在し、我々の生体を構成するアミノ酸のほとんどが L 体として機能している。しかし、近年の計測分析技術の進展に伴い、D 体も生体内に存在することが実証され、その中でも、脳内に豊富に存在する D-アミノ酸として D-セリンが確認されて以来、脳機能における D-セリンの役割に関して精力的な研究がなされつつある。

これまで D-セリンは、イオンチャネル型グルタミン酸受容体 (ionotropic Glutamate Receptor; iGluR) ファミリーに属する NMDA 型グルタミン酸受容体 (NMDA 受容体) のコアゴニストとして働き、共役するチャネルからの Ca^{2+} 流入を引き金に、記憶・学習の分子基盤とされるシナプス可塑性を誘発することが報告されている。これに対し、我々は近年、発達期にきわめて高い濃度を示す小脳での D-セリンが、iGluR メンバーであるものの、これまでリガンドも脳内での活動様式も知られていなかったデルタ 2 型グルタミン酸受容体 (デルタ 2 受容体) に結合し、シナプス可塑性および小脳依存的な運動記憶・学習を制御するという、まったく新しい D-セリンシグナリングを見出した (D-セリン デルタ 2 受容体シグナリング)。この D-セリン デルタ 2 受容体を介する新規シグナル機構の解明は、「記憶・学習形成における D-セリンの役割」の理解を深めるべく、重要な課題であると考えられる。

2. 研究の目的

デルタ 2 受容体は、小脳神経回路網の要衝を担う平行線維 - ブルキンエ細胞間シナプス (以下、平行線維シナプスと略す) に選択的に発現し (Kurihara et al., J Neurosci, '97)、(1)シナプス形成、(2)シナプス可塑性

のひとつである長期抑圧 (小脳 LTD; シナプス伝達効率の長期的低下)、および(3)運動記憶・学習を制御していることが、遺伝子欠損マウス (以下、デルタ 2 欠損マウスと示す) の解析により示めされている (Kashiwabuchi et al., Cell, '95)。しかし、リガンドとなりうる分子がこれまで未同定であったことから、脳内においてデルタ 2 受容体がどのような機能様式をもとに働いているかは明確にされていなかった。そこで本研究では、D-セリン結合に伴うデルタ 2 受容体の活性化機構について追究することにした。

3. 研究の方法

デルタ 2 受容体に関するこれまでの研究により、デルタ 2 受容体は一生涯にわたり恒常的に発現し、発達期だけでなく成熟期においても、その細胞内最 C 末端領域を介したシグナル伝達系の駆動により小脳 LTD を制御していることが分かっている。そこで本研究では、デルタ 2 受容体最 C 末端領域と結合しうる分子群に着目し、小脳 LTD を支える新規 D-セリン デルタ 2 受容体シグナリングの分子機構の解明をめざした。

4. 研究成果

まず、D-セリン デルタ 2 受容体シグナリングに関わる反応経路を明らかにするため、デルタ 2 受容体の細胞内最 C 末端領域に結合するチロシン脱リン酸化酵素 PTPMEG の遺伝子欠損動物を用い、D-セリン依存性 LTD 記録を行った。すると、デルタ 2 欠損マウスと同様、このマウスにおいても、LTD は認められなかった。そこで、次に、PTPMEG の基質について生化学的に解析を行った結果、シナプス伝達機能に参与するいくつかのタンパク質を同定することに成功した。その中の 1 分子として、シナプス可塑性の実行系に働く AMPA 型グルタミン酸受容体 (AMPA 受容体) が同

定された。また、驚くべきことに、PTPMEG による AMPA 受容体の脱リン酸化修飾を阻害すると、野生型マウス標本においても小脳 LTD が顕著に阻害された。上記の所見より、デルタ 2 受容体は PTPMEG の活性/局在を制御することで小脳 LTD 誘導を促す、いわゆる「ゲートキーパー」として働いていることが示唆された (Kohda*, Kakegawa* *et al.*, PNAS, 2013; *共同筆頭著者)。

次に、LTD 誘導に伴う AMPA 受容体の動態変化を詳細に追究したところ、AMPA 受容体は、細胞内タンパク質である Stargazin とアダプタープロテイン (AP2 or AP3) と神経活動依存的に 3 者複合体を形成し、この結合様式の制御が LTD に必要な挙動変化をもたらすことを明らかにした (Matsuda, Kakegawa *et al.*, Nat Commun, 2014; Unoki*, Matsuda*, Kakegawa* *et al.*, Neuron, 2011; *共同筆頭著者)。現在、上記 AMPA 受容体の動態様式およびその制御機構が D-セリンによってどのように調節されるかについて解析を進めている。

最近、デルタ 2 受容体は小脳以外の脳領域にも発現し、また、デルタ 2 受容体と同族分子であるデルタ 1 受容体も脳全域に広く発現していることが分かってきた (投稿準備中)。興味深いことに、デルタ 1 受容体も D-セリンと結合しうることも報告されている (Yadav *et al.*, Brain Res, 2011)。したがって、D-セリン - デルタ受容体シグナリングは、小脳 LTD だけでなく、脳全域で観察されるシナプス可塑性機構を制御している可能性も十分に考えられる。今後、本研究で得られた知見が、シナプス可塑性機構の普遍的原理の理解に少しでも貢献されることを期待する。

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 2 件)

1: Ito-Ishida A, Kakegawa W, Kohda K, Miura E, Okabe S, Yuzaki M. Cbln1 downregulates the formation and function of inhibitory synapses in mouse cerebellar Purkinje cells. *Eur J Neurosci*. 査読有 39, (2014) 1268-1280. doi: 10.1111/ejn.12487.

2: Kohda K, Kakegawa W, Yuzaki M. Unlocking the secrets of the δ 2 glutamate receptor: A gatekeeper for synaptic plasticity in the cerebellum. *Commun Integr Biol*. 査読有 6, (2013) e26466. doi: 10.4161/cib.26466.

3: Emi K, Kakegawa W, Miura E, Ito-Ishida A, Kohda K, Yuzaki M. Reevaluation of the role of parallel fiber synapses in delay eyeblink conditioning in mice using Cbln1 as a tool. *Front Neural Circuits*. 査読有 7, (2013) 180 (eCollection). doi: 10.3389/fncir.2013.00180.

4: Matsuda S, Kakegawa W, Budisantoso T, Nomura T, Kohda K, Yuzaki M. Stargazin regulates AMPA receptor trafficking through adaptor protein complexes during long-term depression. *Nat Commun*. 査読有 4, (2013) 2759. doi: 10.1038/ncomms3759.

5: Sadakata T, Kakegawa W, Shinoda Y, Hosono M, Katoh-Semba R, Sekine Y, Sato Y, Tanaka M, Iwasato T, Itohara S, Furuyama K, Kawaguchi Y, Ishizaki Y, Yuzaki M, Furuichi T. CAPS1 deficiency perturbs dense-core vesicle trafficking and Golgi structure and reduces presynaptic release probability in the mouse brain. *J Neurosci*.

査読有 33, (2013) 17326-17334. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2777-13.2013.

6: Hills LB, Masri A, Konno K, Kakegawa W, Lam AT, Lim-Melia E, Chandy N, Hill RS, Partlow JN, Al-Saffar M, Nasir R, Stoler JM, Barkovich AJ, Watanabe M, Yuzaki M, Mochida GH. Deletions in GRID2 lead to a recessive syndrome of cerebellar ataxia and tonic upgaze in humans. *Neurology*. 査読有 81, (2013) 1378-1386. doi: 10.1212/WNL.0b013e3182a841a3.

7: Kohda K*, Kakegawa W* (* co-first authors), Matsuda S, Yamamoto T, Hirano H, Yuzaki M. The $\alpha 2$ glutamate receptor gates long-term depression by coordinating interactions between two AMPA receptor phosphorylation sites. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 査読有 110, (2013) E948-957. doi: 10.1073/pnas.1218380110.

8: Nishiyama J, Hayashi Y, Nomura T, Miura E, Kakegawa W, Yuzaki M. Selective and regulated gene expression in murine Purkinje cells by in utero electroporation. *Eur J Neurosci*. 査読有 36, (2012) 2867-2876. doi: 10.1111/j.1460-9568.2012.08203.x.

9: Unoki T*, Matsuda S*, Kakegawa W* (co-first authors), Van NT, Kohda K, Suzuki A, Funakoshi Y, Hasegawa H, Yuzaki M, Kanaho Y. NMDA receptor-mediated PIP5K activation to produce PI(4,5)P₂ is essential for AMPA receptor endocytosis during LTD. *Neuron*. 査読有 73, (2012) 135-148. doi: 10.1016/j.neuron.2011.09.034.

10: Nomura T, Kakegawa W, Matsuda S, Kohda K, Nishiyama J, Takahashi T, Yuzaki M. Cerebellar long-term depression requires dephosphorylation of TARP in Purkinje cells. *Eur J Neurosci*. 査読有 35, (2012) 402-410. doi: 10.1111/j.1460-9568.2011.07963.x.

11: Kakegawa W, Miyoshi Y, Hamase K, Matsuda S, Matsuda K, Kohda K, Emi K, Motohashi J, Konno R, Zaitzu K, Yuzaki M. D-serine regulates cerebellar LTD and motor coordination through the $\alpha 2$ glutamate receptor. *Nat Neurosci*. 査読有 14, (2011) 603-611. doi: 10.1038/nn.2791.

12: Emi K, Kohda K, Kakegawa W, Narumi S, Yuzaki M. A new rapid protocol for eyeblink conditioning to assess cerebellar motor learning. *Neurochem Res*. 査読有 36, (2011) 1314-1322. doi: 10.1007/s11064-010-0392-z.

〔学会発表〕(計 4 件)

1: 掛川 渉, 柚崎通介: The C1q complement family complements glutamatergic synapses on cerebellar Purkinje cells. (補体 C1q ファミリー分子による小脳プルキンエ細胞グルタミン酸シナプスの形成機能制御). 第 9 1 回 日本生理学会大会 2014 年 3 月 16 日 (鹿児島).

2: 掛川 渉: 記憶をささえる脳内アミノ酸の機能と制御. 資生堂 - ヒューマンメタボロームテクノロジー社 共催セミナー 2014 年 2 月 19 日 (東京).

3: 掛川 渉: 発達期におけるシナプスの形態と機能を制御する新しい分子機構. 第 4 5 回 慶應ニューロサイエンス研究会 2013

年 1 月 26 日 (東京).

4: 掛川 渉: シナプス可塑性を支えるニューロン - グリア - 糖鎖相互作用. 第 9 回 日本糖鎖科学コンソーシアムシンポジウム 2011 年 11 月 4 日 (名古屋).

〔図書〕(計 3 件)

1: 掛川 渉, 幸田和久, 柚崎通介: 金芳堂 (脳 2 1 特集)、シナプスを形成するばかりじゃない 2 型グルタミン酸受容体と Cbln1 による新しいシナプス可塑性機構 2013 年 261-269.

2: 掛川 渉, 柚崎通介: 学研メディカル秀潤社 (細胞工学)、HOT PRESS - シナプス可塑性と運動学習を制御する D-セリン - 2 受容体シグナリング 2011 年 1072-1073.

3: 掛川 渉: 化学同人 (月刊化学)、運動や楽器の技能習得にかかわる特別なアミノ酸. 2011 年 66-67.

〔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

柚崎研究室 HP

(<http://www.yuzaki-lab.org/>)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

掛川 渉 (KAKEGAWA WATARU)

慶應義塾大学・医学部・講師

研究者番号: 70383718

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし