

令和 2 年 5 月 21 日現在

機関番号：63905

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K07117

研究課題名(和文) シナプス外グルタミン酸の恒常性維持機構：ニューロン-グリア相補作用の分子的基盤

研究課題名(英文) Homeostatic control of extrasynaptic glutamate: molecular mechanisms underlying neuron-glia interactions

研究代表者

佐竹 伸一郎 (Satake, Shin'Ichiro)

生理学研究所・助教

研究者番号：30360340

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：グルタミン酸輸送体(興奮性アミノ酸輸送体 excitatory amino acid transporter, EAAT)は、シナプス間隙に放出された興奮性神経伝達物質グルタミン酸(glutamate, Glu)を細胞に回収することにより、神経伝達を速やかに終了させるとともに、過剰Gluによる神経毒性からニューロン(神経細胞)を保護する役割を持つ。ニューロンとグリア細胞に発現する異なるEAATサブタイプが協調して担う、細胞外Gluの恒常性維持機構の存在を明らかにし、その分子的基盤と生理的役割を追究した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

急速発症性ジストニアパーキンソンニズム(RDP)/小児交互性片麻痺(AHC)/CAPOS症候群の病態モデル動物(Na, K-ATPase 3サブユニット遺伝子ヘテロ欠損マウス)の小脳において、ニューロン(プルキンエ細胞)のEAAT電流(Glu回収能)が著しく減少していることを発見した。一方、グリア細胞(バークマングリア)のEAAT電流は有意に増大していた。脳・中枢神経系のGlu回収システム(細胞外Glu制御機構)にニューロン-グリア補完作用が存在することを示唆している。こうした変異は、これら神経疾患の分子細胞基盤の一つと考えられ、病態の解明や新たな治療法の開発に繋がることが期待される。

研究成果の概要(英文)：Excitatory amino acid transporters (EAATs) serve as the primary mechanism for limiting the action of the excitatory neurotransmitter glutamate in the central nervous system. In the brain, EAATs remove glutamate from the synaptic cleft and extracellular region by mediating glutamate uptake into neurons and glial cells. In this study, we compared physiological roles of neuronal and glial EAATs in the control of extrasynaptic diffusion of glutamate in rat and mouse cerebellar slice preparations.

研究分野：神経生理学

キーワード：小脳 グルタミン酸輸送体 プルキンエ細胞 バークマングリア

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

脳幹の下オリブ核から小脳プルキンエ細胞 (Purkinje cell) に投射する登上線維 (climbing fiber) から放出された興奮性伝達物質グルタミン酸 (L-glutamate, Glu) は、プルキンエ細胞を強力に興奮させるのみならず、シナプス外にも拡散する (Satake et al., 2000)。拡散した Glu は、分子層介在神経 (molecular layer interneuron) の軸索終末に発現する AMPA 受容体 (GluA2/3) に作用することにより、介在神経-プルキンエ細胞間の GABA 作動性伝達にシナプス前抑制を引き起こす (異種シナプス抑制 heterosynaptic inhibition; Satake et al., 2006)。登上線維から介在神経への Glu の拡散は、グルタミン酸輸送体 (興奮性アミノ酸輸送体 excitatory amino acid transporter, EAAT) を中核とする Glu 回収機構によって制御されている (Satake et al., 2010)。

EAAT は細胞の種類により発現するサブタイプが異なり、小脳プルキンエ細胞では EAAT4 が、バークマングリア (Bergmann glia; 小脳の主要なグリア細胞でアストロサイトの一種) では EAAT1 (GLAST) と EAAT2 (GLT-1) が発現している。遺伝子改変マウスを用いた研究から、これら異なるサブタイプの EAAT は、それぞれが Glu の回収過程において独立した役割を担っていると考えられている (Takayasu et al., 2009)。

こうした例として、プルキンエ細胞特異的に発現する EAAT4 が、その発現量の違いや Glu 輸送能を可逆的に変化させることなどにより、異種シナプス抑制 (Glu がシナプス外に拡散していく過程) に著しい影響をおよぼすことを報告した (Satake et al., 2010)。しかしながら、ニューロン型 (神経細胞型) EAAT とグリア型 EAAT の間に見られる機能分担の生理的意義や両者間に機能補完作用が存在する可能性は詳しく検討されていない。一方、細胞外 Glu 濃度の上昇が興奮毒性や神経細胞死を伴う神経変性疾患の原因の一つであることが指摘されている (Malik and Willnow, 2019)。EAAT の機能制御機構ならびにその生理的意義を追究していくことは、こうした脳神経疾患の病態解明にも繋がると考えた。

### 2. 研究の目的

EAAT による基質輸送の駆動力となる、形質膜内外の  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  電気化学勾配は、Na ポンプ (細胞内の  $\text{Na}^+$  ならびに  $\text{K}^+$  の濃度を調節する能動輸送酵素;  $\text{Na}, \text{K}-\text{ATPase}$ ) によって維持されている (Vandenberg and Ryan, 2013; O'Donovan et al., 2017)。Na ポンプは機能サブユニット  $\alpha$  と調節サブユニット  $\beta$  の 2 つのサブユニットから構成され、哺乳類の脳では 3 種類の  $\alpha$  サブユニット ( $\alpha 1-3$ ) が発現している。小脳では、 $\alpha 3$  サブユニットがプルキンエ細胞や分子層介在神経 (籠細胞、星状細胞) に豊富に存在する (Ikeda et al., 2013)。こうした背景に基づき、Na ポンプと EAAT の機能的連関ならびにその小脳異種シナプス抑制における生理的役割について検討を行い、低濃度 ouabain ( $0.2 \mu\text{M}$ ) により  $\alpha 3$  サブユニットの機能を阻害した条件下では、異種シナプス抑制が著しく増強することを発見した (Satake et al., 未発表)。

この結果から、 $\alpha 3$  サブユニット遺伝子ヘテロ欠失マウス  $Atp1a3^{+/-}$  では、Na ポンプの発現量減少に伴う EAAT4 の機能減弱により、登上線維 Glu のシナプス外拡散と異種シナプス抑制が亢進していると予想した。しかし予想に反して、 $Atp1a3^{+/-}$  において異種シナプス抑制は有意に減弱しており、ouabain の増強作用も失われていた。これらの結果は、ouabain による  $\alpha 3$  サブユニット急性阻害の場合とは異なり、 $Atp1a3^{+/-}$  では EAAT4 の機能を補完する『シナプス外 Glu の恒常性維持機構』が働いていることを意味している。一方、 $Atp1a3^{+/-}$  の異種シナプス抑制は、EAAT1 阻害薬 PMB-TBOA により回復した (EAAT4 阻害薬 T3MG は無効)。  $Atp1a3^{+/-}$  では、減弱した EAAT4 の機能を補完するため、グリア細胞の輸送体 EAAT1 の機能が過剰に亢進していることを示唆している。

こうした推定に基づき本研究では、EAAT4 の機能と密接な関係にある  $\alpha 3$  サブユニットの遺伝子ヘテロ欠損マウス  $Atp1a3^{+/-}$  に電気生理学的手法を適用して、EAAT4 の機能減弱がシナプス外 Glu の拡散動態や EAAT1 の機能におよぼす影響を検討した。また新たに確立した、光解除性 Glu を適用した EAAT 機能評価系を用いて、ニューロン型輸送体とグリア型輸送体が協調して担う『シナプス外 Glu の恒常性維持機構』を解き明かすことを目指した。

### 3. 研究の方法

自然科学研究機構・動物資源共同利用研究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実験計画書の審査を受けた後、承認された方法により研究を遂行した。実験動物に苦痛を与えることのないよう、麻酔ならびに安楽死の処置には十分な注意を払った。

実験には、出生後 2-3 週齢の Wistar ラットならびに C57BL/6 系統の遺伝子改変マウス (Ikeda et al., 2013) を用いた。小脳よりスライス標本 (傍矢状断) を作製し、電気生理学的手法 (パッチクランプ法) を適用した (Satake et al., 2000)。EAAT 電流減衰相のキネティクス解析には、二重指数関数 (double-exponential fitting procedure) を用いた (Satake et al.,

2012)。受容体や輸送体の作用薬/阻害薬ならびに細胞内シグナル伝達に関わる各種モジュレータ試薬の影響は、スライス標本に灌流液(人工脳髄液)を介して投与することにより観察した。

#### 4. 研究成果

##### (1) 光解除性化合物を用いた EAAT 機能評価系の開発

EAATは、1分子のGluを細胞内へ輸送する過程において、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。このためEAATは、Glu輸送と共役した起電性(内向き電流)を示す。これまでに、シナプスに放出されたGluにより誘発されるEAAT電流(シナプス性輸送体電流 synaptic transporter current)を記録する方法を確立し、シナプス近傍におけるGluの動態解析に使用してきた(Satake et al., 2010)。しかし、この方法で記録できるのは、シナプス近傍に局在するEAATに由来する一部の電流のみであり、1個の細胞が担うGlu回収の総量を測定することはできなかった。

この問題を解決するため、Brasnjo and Otis(2004)の方法を参考にして、光解除性Glu(caged Glu)を用いたEAAT電流誘発・記録システムを構築した。さらに光照射の範囲を記録細胞と一致するよう調整し、細胞毒性を避けるため可視光線(430 nm)の照射により遊離される光解除性Glu(RuBi-glutamate)を適用するシステムに改良した。この方法を用いて、ニューロンやグリア細胞のGlu回収能を直接記録するとともに、薬理学実験と組み合わせることにより、EAATの機能制御機構を追究した。

##### (2) *Atp1a3*<sup>+/−</sup>の病態解析: EAAT 機能のニューロン グリア補完機構

上記EAAT機能評価系を急速発症性ジストニアパーキンソン症候群(RDP)/小児交互性片麻痺(AHC)/CAPOS症候群の病態モデルマウス(Na,K-ATPase α3サブユニット遺伝子ヘテロ欠損マウス) *Atp1a3*<sup>+/−</sup>より作製した小脳スライス標本に適用し、プルキンエ細胞において光解除性Gluの光遊離により誘発したEAAT電流(photo-uncaging evoked transporter current, PTC)の振幅が野生型の約1/2に減弱していること、逆に、パーグマングリアのPTCは振幅が約2倍に増強していることを発見した。*Atp1a3*<sup>+/−</sup>では、プルキンエ細胞のGlu回収能が減弱しており、その減弱分をグリア細胞が補完していると考えられる。

このニューロン グリア補完機構の分子的基盤を追究するため、小脳細胞膜画分におけるEAATタンパク質含有量を免疫ブロット法により検討した。*Atp1a3*<sup>+/−</sup>では、プルキンエ細胞に特異的に発現する輸送体サブタイプEAAT4のタンパク質含有量が野生型の約1/2に減少していた。一方、EAAT1(グリア特異的サブタイプ)の含有量は野生型の約2倍に増えていた。*Atp1a3*<sup>+/−</sup>において観察された、プルキンエ細胞のPTC減弱とグリア細胞のPTC増大は、それぞれEAAT4タンパク質の含有量減少とEAAT1タンパク質の含有量増大に起因すると結論した。

##### (3) *Atp1a3*<sup>+/−</sup>における小脳長期抑圧の消失

小脳平行線維(parallel fiber) プルキンエ細胞間のGlu作動性シナプスでは、平行線維と登上線維の同時反復刺激(1 Hz, 5 min)により、長時間に渡る伝達効率の低下が惹起される(長期抑圧 long-term depression, LTD)。登上線維入力、プルキンエ細胞の樹状突起に強い脱分極と電位依存性Ca<sup>2+</sup>チャネルを介したCa<sup>2+</sup>流入を発生させる。一方、平行線維入力反復刺激に伴い、プルキンエ細胞のグループI代謝型グルタミン酸受容体(mGluR1)を活性化し、細胞体からのCa<sup>2+</sup>放出を促す。こうした複数の経路を介した細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度の上昇に伴い、AMPA受容体のエンドサイトーシスが促進されるため、興奮性シナプス伝達が選択的に減弱する(後シナプス性LTD)。

mGluR1はプルキンエ細胞樹状突起のシナプス周囲部に集積しており、その活性化には平行線維伝達物質Gluのシナプス外流出が必須である。*Atp1a3*<sup>+/−</sup>のシナプス特性を検討する過程で、小脳LTDが消失していることを発見した。消失したLTDは、EAAT阻害薬TBOAならびにEAAT1選択的阻害薬UCPH101、mGluR1作用薬DHPGの投与により回復した。項目(2)に詳述の通り *Atp1a3*<sup>+/−</sup>では、Naポンプα3サブユニットタンパク質発現量の減少に伴いプルキンエ細胞において減弱した、EAAT4の機能をグリア細胞のEAAT1が補完していると考えられる。グリア型EAATの補完作用により、平行線維Gluのシナプス外拡散とmGluR1の活性化が過剰に抑制されたため、*Atp1a3*<sup>+/−</sup>ではLTDが誘発されなくなったと推定される。

##### (4) エタノールのEAAT機能亢進作用: 分子的基盤の検討

これまでに、小脳プルキンエ細胞のEAATは、生理的濃度(25–50 mM)のエタノールによりそのGlu輸送機能が亢進し、登上線維伝達物質Gluのシナプス外拡散を抑制することを示唆する結果を得ている(Satake et al., 未発表)。RuBi-Gluの光遊離(光照射時間: 500<sup>ms</sup>/秒)により惹起されたPTCとEAATのGlu輸送モデル(代替アクセスモデル)に基づき、その細胞のGlu

輸送行程を評価することができる (Vandenberg and Ryan, 2013)。この実験条件にて誘発した PTCは、一過性成分と持続性成分の二つに分けることができ、エタノール (50 mM) は持続性 PTCの振幅を選択的に増大させることを発見した (一過性PTCには無効)。エタノールには EAATのターンオーバー (Glu輸送行程の回転速度) を亢進させる作用があると考えられる。

エタノールのEAAT機能亢進作用の分子的基盤を明らかにするため、Naポンプに焦点を当てて薬理学的手法による検討を行った。Naポンプ阻害薬 ouabainは持続性PTCの振幅を減弱させた (一過性PTCには無効)。また、エタノールの持続性PTC増強作用もouabainにより消失した。これらの結果は、EAATのターンオーバーがNaポンプによる制御を受けていること、エタノールのEAAT機能増強作用がNaポンプを介して引き起こされていることを示唆している。また、エタノールのEAAT機能増強作用はタンパク質キナーゼC (PKC) 阻害薬GF109203Xにより消失した。一方、PKC作用薬 (ホルボールエステル) PMAにEAATの機能増強作用は認められなかった。エタノールがEAAT機能を増強する作用にPKC活性は必要であるものの、十分な要素ではないと結論した。PKCは、エタノールからEAATに至る機能制御カスケードの維持に関わるなど、補助的な位置付けにあると推定して引き続きメカニズムの追究を進めている。

#### (5) Roscovitineのシナプス前促進作用

抗がん剤候補物質 roscovitine (Cdk5阻害薬、Ca<sub>v</sub>2チャンネル作用薬) には、小脳分子層介在神経プルキンエ細胞間GABA作動性シナプスにおいて記録した、抑制性シナプス後電流 (inhibitory postsynaptic current, IPSC) の振幅と減衰時間 ( $\tau_{decay}$ ) をシナプス前性機構により増大させる作用があることを発見した。この作用に、シナプス小胞体の多重性放出と伝達物質GABAのシナプス外拡散が関与している可能性を薬理学的に検討した。高速解離性のGABA<sub>A</sub>受容体競合阻害薬 TPMPA (100  $\mu$ M) によるIPSC振幅阻害作用は、roscovitine (30  $\mu$ M) の先行投与により著しく減弱した。また、roscovitineのIPSC減衰時間延長作用もTPMPAとdextran (40 kDa, 5% w/v) により強く阻害された。これらの結果は、roscovitineの作用により促進した、GABA含有シナプス小胞体の多重性放出に伴い、シナプス間隙のGABA濃度が高まり、IPSCの振幅が増大したこと、シナプス間隙から拡散したGABAが低濃度でシナプス外GABA<sub>A</sub>受容体を活性化することにより、IPSCの減衰時間が延長したことを示唆している (Satake and Konishi, 2020)。

#### < 引用文献 >

- Brasnjo G., Otis T. S. (2004) Isolation of glutamate transport-coupled charge flux and estimation of glutamate uptake at the climbing fiber-Purkinje cell synapse. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101, 6273–6278.
- Ikeda K, Satake S, Onaka T, Sugimoto H, Takeda N, Imoto K, Kawakami K (2013) Enhanced inhibitory neurotransmission in the cerebellar cortex of *Atp1a3*-deficient heterozygous mice. *J. Physiol.* 591, 3433–3449.
- Malik A. R., Willnow T. E. (2019) Excitatory amino acid transporters in physiology and disorders of the central nervous system. *Int. J. Mol. Sci.* 20, 5671.
- O'Donovan S. M., Sullivan C. R., McCullumsmith R. E. (2017) The role of glutamate transporters in the pathophysiology of neuropsychiatric disorders. *Schizophrenia* 3, 32.
- Satake S., Saitow F., Yamada J., Konishi S. (2000) Synaptic activation of AMPA receptors inhibits GABA release from cerebellar interneurons. *Nat. Neurosci.* 3, 551–558.
- Satake S., Song S.-Y., Cao Q., Satoh H., Rusakov D. A., Yanagawa Y., Ling E.-A., Imoto K., Konishi S. (2006) Characterization of AMPA receptors targeted by the climbing fiber transmitter mediating presynaptic inhibition of GABAergic transmission at cerebellar interneuron-Purkinje cell synapses. *J. Neurosci.* 26, 2278–2289.
- Satake S., Song S.-Y., Konishi S., Imoto K. (2010) Glutamate transporter EAAT4 in Purkinje cells controls intersynaptic diffusion of climbing fiber transmitter mediating inhibition of GABA release from interneurons. *Eur. J. Neurosci.* 32, 1843–1853.
- Satake S., Inoue T., Imoto K. (2012) Paired-pulse facilitation of multivesicular release and intersynaptic spillover of glutamate at rat cerebellar granule cell-interneurone synapses. *J. Physiol.* 590, 5653–5675.
- Satake S., Konishi S. (2020) Roscovitine differentially facilitates cerebellar glutamatergic and GABAergic neurotransmission by enhancing Ca<sub>v</sub>2.1 channel-mediated multivesicular release. *Eur. J. Neurosci.* (in press)
- Takayasu Y., Iino M., Takatsuru Y., Tanaka K., Ozawa S. (2009) Functions of glutamate transporters in cerebellar Purkinje cell synapses. *Acta Physiol.* 197, 1–12.
- Vandenberg R. J., Ryan R. M. (2013) Mechanisms of glutamate transport. *Physiol. Rev.* 93, 1621–1657.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Satake S., Konishi S.	4. 巻 -
2. 論文標題 Roscovitine differentially facilitates cerebellar glutamatergic and GABAergic neurotransmission by enhancing Cav2.1 channel-mediated multivesicular release	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 European Journal of Neuroscience	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/ejn.14771	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 1件/うち国際学会 3件）

1. 発表者名 池田啓子、佐竹伸一郎、川上 潔
2. 発表標題 Atp1a3遺伝子欠損マウス小脳プルキンエ細胞におけるグルタミン酸取り込み活性の低下：グリアによる代償機構と長期抑圧への影響
3. 学会等名 第97回日本生理学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Kawakami K., Satake S., Ikeda K.
2. 発表標題 Weakened glutamate uptake in cerebellar Purkinje cells in Atp1a3 heterozygous knockout mice: glial compensation and its impacts on long-term depression
3. 学会等名 8th Annual Symposium on ATP1A3 in Disease（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 佐竹伸一郎、川上 潔、池田啓子
2. 発表標題 Atp1a3のハプロ不全は小脳プルキンエ細胞にグルタミン酸取り込み能の減弱を引き起こす：グリア細胞による補償とその影響
3. 学会等名 NEURO2019（第42回日本神経科学大会、第62回日本神経化学学会大会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 佐竹伸一郎、井本敬二
2. 発表標題 エタノールが小脳プルキンエ細胞のグルタミン酸輸送体電流におよぼす影響
3. 学会等名 第41回日本神経科学大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 池田啓子、佐竹伸一郎、南部 篤、知見聡美、川上 潔
2. 発表標題 Naポンプ遺伝子異常を原因とするジストニアの病態生理 モデル動物の解析から
3. 学会等名 第33回日本大脳基底核研究会シンポジウム『ジストニア、ジストニア？、ジストニア！：基礎と臨床からみた病態と治療』
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Ikeda K., Satake S., Onimaru H., Kawakami K., Imoto K.
2. 発表標題 Sodium pump and secondary active transporters
3. 学会等名 7th Symposium on ATP1A3 in Disease (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 佐竹伸一郎、川上 潔、井本敬二、池田啓子
2. 発表標題 Atp1a3ハプロ不全に伴うニューロン型グルタミン酸輸送体の機能減弱：グリア細胞による補償とその生理的影響
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会ワークショップ『Naポンプ遺伝子変異を原因とする神経疾患の病態生理の理解を目指して』（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Satake S., Kawakami K., Imoto K., Ikeda K.
2. 発表標題 Impaired cerebellar long-term depression (LTD) in dystonia-model mice Atp1a3(+/-)
3. 学会等名 第49回生理研国際シンポジウム『Ion channels: looking back, seeing ahead』(国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 佐竹 伸一郎、川上 潔、井本 敬二、池田 啓子
2. 発表標題 Naポンプ 3サブユニット遺伝子ヘテロ欠損マウスにおける小脳長期抑圧の消失
3. 学会等名 第40回日本神経科学大会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----