様式Ｃ－１９

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２５年　５月　１５日現在

機関番号：３２６６５
研究種目：基盤研究（C）
研究期間：2010～2012
課題番号：２２５００３６７
研究課題名（和文）　グリオトランスミッターの機能解析

研究課題名（英文）　Functional analysis of gliotransmitters

研究代表者
五味　浩司（GOMI HIROSHI）
日本大学・生物資源科学部・准教授
研究者番号：90293240

研究成果の概要（和文）：神経細胞の機能を支える細胞であるアストログリアから放出されるグリオトランスミッターの分泌に関わっているグリア細胞内のカルシウム濃度を可変的に調節できるトランスジェニックマウス系統について、電子顕微鏡解析により、海馬のトリパータイトシナプスの微細構造がカルシウム濃度を抑制させることよって変化することを見出した。これらの結果は、グリオトランスミッターの放出を誘導するカルシウム濃度の上昇がトリパータイトシナプスの構造制御に関わっていることを示す最初の発見である。

研究成果の概要（英文）：We analyzed an inducible transgenic mouse model in which the expression of an inositol 1,4,5-trisphosphate absorbent “IP_3-sponge” attenuated astrocytic Ca^{2+} signaling. In electron microscopy, the morphology of tripartite synapses was changed and the attenuated Ca^{2+} activity correlated with reduced astrocytic coverage of synapses in hippocampal CA1 in these animals. This finding suggests that astrocytic Ca^{2+} signaling that induces gliotransmitter secretion has a critical role in forming functional tripartite synapses.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合　計
２０１０年度	1,200,000	360,000	1,560,000
２０１１年度	1,100,000	330,000	1,430,000
２０１２年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総　計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：総合領域
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・グリオトランスミッター

１．研究開始当初の背景

（１）神経組織を構成する細胞群にはニューロンの他にグリア細胞があり、高等動物では、数的にはニューロンよりも多い。アストログリア（星状膠）はグリア細胞の主体をなし、古くから、血液脳関門の維持、結合組織を持たない脳の構造的支持、各種物質の吸収と緩衝作用、損傷後の瘢痕形成などに働いていることが明らかにされている。最近の研究から、トリパータイトシナプスとよばれるニューロンとの相互作用を産む構造的概念とグリオトランスミッターとよばれる物質分泌によってアストログリアがシナプス活性の修飾を行っているということが注目されている。

（２）トリパータイトシナプスは、プレおよびポストシナプティックな要素からなるシナ

プスの周囲をアストログリアの足突起がエンベロップする構造を示すものである。プレシナプティックに放出されたニューロトランスミッターがポストシナプティックに作用するのみならず、トリパータイトシナプスにおいてアストロサイトにも作用し、アストログリア内のカルシウム濃度上昇が引き金となってグリオトランスミッターが分泌されると考えられている。グリオトランスミッターとしては、グルタメート、D-セリン、S100β、ATP などが知られている。

（３）これまでの報告では、グリオトランスミッターによるシナプス活性の修飾作用に関する知見の多くは、培養系で再構築したニューロン-アストログリアプレパレーションや急性スライスあるいは長期培養スライスを用いて得られたものである。

２．研究の目的

本研究では、アストログリアの細胞内カルシウム濃度の上昇が引き金となって分泌が誘導されると考えられているグリオトランスミッターの放出を阻害するトランスジェニックマウスを用い、トリパータイトシナプスの構造にどのような変化が起こるのか、グリオトランスミッターによるシナプス伝達のモデュレーションが生じるのか、また生ずるとすれば脳機能にどのような影響を及ぼすのかについて解析を行なう。

３．研究の方法

グリオトタンスミッターの放出を引き起こすための細胞内情報伝達過程の基礎的な変化である細胞内カルシウム濃度の上昇をアストログリアで特異的にモデュレートするトランスジェニックマウス系統(IP3-sponge Tg)を解析する。本研究で使用したマウス系統は、理化学研究所脳科学研究センター行動遺伝学研究チームによって作製された系統であり、アストログリアで特異的にイノシトール３リン酸(IP_3)の吸着ペプチド、IP_3-Sponge(Uchiyama *et al*, JBC,277,10,8106-8113, 2002)を発現させることで細胞内カルシウムストアからのカルシウムの放出を抑制することができる。

（１）作製されたマウス系統の光学顕微鏡レベルの形態解析によって、IP3-sponge の発現様式、細胞特異性などについて明らかにする。

（２）電子顕微鏡レベルの形態解析によって、特に代表的部位として海馬 CA1 領域に注目し、アストログリアの足突起がシナプスを取り囲むトリパータイトシナプスの微細構造を調べる。

（３）生化学的解析によって、導入遺伝子 IP3-sponge の発現量について解析を行う。発現は、薬剤誘導によってどのように変化しうるのかについても解析する。

４．研究成果

（１）光学顕微鏡レベルの形態解析

① アストログリアにおける導入遺伝子の発現パターンを解析し、大脳皮質体性感覚野、海馬(CA1 領域)および扁桃体のアストロサイトでにおいて、ほぼ 100％(一部、海馬 DG 領域では 92％)の割合で導入遺伝子である IP3-sponge が発現していた。

Table 1 Cell count of LacZ and S100B-positive cells

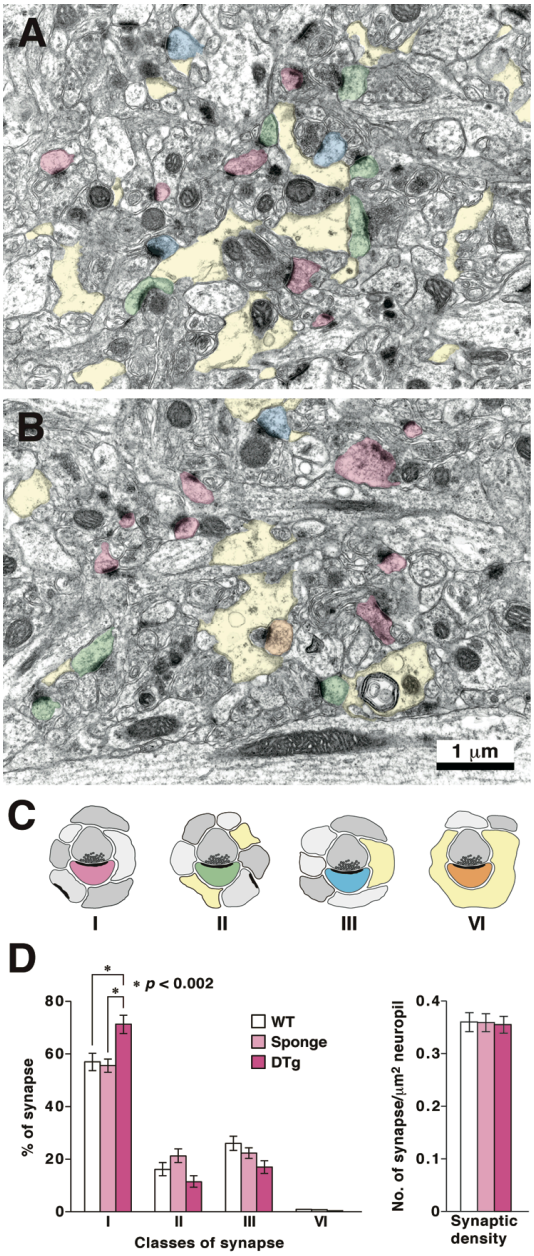
Area/subarea	β-gal positive cells vs.						S100 positive cells vs.			Cell component ratio (%)		
	β-gal	S100	(%)	β-gal	NeuN	(%)	S100	β-gal	(%)	Astroglia	Neuron	Unknown
Somatosensory cortex	1371	1371	100.0				1876	1526	80.8	100.0	0	0
surface layer (I-III)	472	472	100.0				614	548	89.3	100.0	0	0
intermediate layer (III-IV)	529	529	100.0				692	583	84.2	100.0	0	0
deep layer (V-VI)	370	370	100.0				570	395	69.3	100.0	0	0
Hippocampus CA1	2044	2034	99.5	457	0	0	2351	2110	89.7	99.5	0	0.5
basal layer	548	539	98.4				701	595	84.9	98.8	0	1.2
pyramidal cell layer	196	196	100.0				223	205	91.9	100.0	0	0
apical layer	1300	1300	100.0				1427	1310	91.8	100.0	0	0
Hippocampus DG	1654	1518	91.8	1537	17	1.1	1585	1386	87.4	91.8	1.1	7.1
melecirar layer	894	881	98.5	812	4	0.5	997	866	86.9	98.5	0.5	1.0
granule cell layer	198	170	85.9	244	5	2.0	187	166	88.8	85.9	2.0	12.1
polymorphic layer	562	467	83.1	481	6	1.7	401	354	88.3	83.1	1.7	15.2
Amygdala	2339	2338	99.9	543	0	0	2691	2503	93.0	99.9	0	0.1
basolateral anterior nu.	411	411	100.0				500	471	94.2	100.0	0	0
basolateral posterior nu.	448	448	100.0				541	489	90.4	100.0	0	0
lateral dorsal nu.	462	462	100.0				513	480	93.6	100.0	0	0
lateral ventral nu.	482	482	100.0				517	490	94.8	100.0	0	0
central nu.	536	535	99.8	543	0	0.0	620	573	92.4	99.9	0	0.1

② IP3-sponge Tg マウスのアストログリアに発現するマーカータンパク質、グリア線維性酸性蛋白質（GFAP）の発現を蛍光抗体法によって解析し、海馬領域で発現が低下していることを見出した。

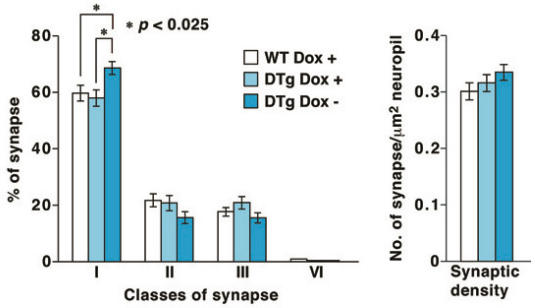
③ 本トランスジェニックマウス系統では、アストログリアでの発現特異性の賦与をグルタメートトランスポーター（GLP-1）遺伝子のプロモーター活性によって行なっている。そこで、GLP-1 の発現を別のマーカータンパク質である S-100β との二重染色によって調べ、その発現には異常がないことを確認した。

（２）電子顕微鏡レベルの形態解析

① 海馬 CA1 領域において、アストログリアの足突起がシナプスを取り囲むトリパータイトシナプスの微細構造を電顕レベルで解析し、形成パターンを4タイプに分類して評価した。アストロサイトのカルシウム濃度の上昇が十分でない IP3-sponge Tg マウス系統では、アストログリアの足突起と接しないタイプのシナプスの形成頻度が有為に増加していることを明らかにした。



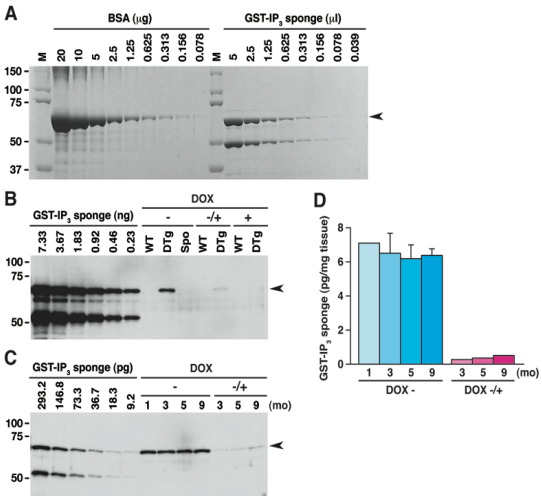
② トリパータイトシナプスの微細構造は、生後１ヵ月齢後からドキシサイクリンを投与することによって IP3-sponge の発現を抑制すると、薬剤投与開始から 10 ヵ月後の時点において野生型マウス系統と同等の性状に保持されていることが分った。



③ Tg マウスで観察されたアストログリア細胞骨格タンパク質の GFAP の発現低下がトリパータイトシナプスの微細構造の変化に関与しているのかどうかについて調べるため、GFAP 遺伝子欠損マウスにおいても同様に解析し、GFAP 欠損下では微細構造上の変化が起きていないことを明らかにした。

（３）生化学的解析

導入遺伝子 IP3-sponge の発現量の解析を行い、前脳全体で発現する GST-IP3-sponge 量を組織重量1mg 当たりおよそ 6.5pg であることを明らかにした。組織比重および体積当たり存在する細胞数から換算して、IP3-sponge の発現によるアストログリア１細胞当たりの分子数を 3100-4400 の間であると算出した。



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３件）

① Mika Tanaka, Pei-Yu Shih, Hiroshi Gomi, Takamasa Yoshida, Junichi Nakai, Reiko Ando, Teiichi Furuichi, Katsuhiko Mikoshiba, Alexey Semyanov, Shigeyoshi Itohara, Astrocyte Ca^{2+} signals are required for the functional integrity of

tripartite synapses, Molecular Brain,査読有, vol.6, 2013, pp.1-13, http://www.molecularbrain.com/content/6/1/6
② Hiroshi Gomi, Chisato Kubota-Murata, Tadashi Yasui, Azuma Tsukise, Seiji Torii, Immunohistochemical analysis of IA-2 family of protein tyrosine phosphatases in rat gastrointestinal endocrine cells, Journal of Histochemistry & Cytochemistry, 査読有, vol.61, 2013, pp.156-168, http://jhc.sagepub.com/content/61/2/156.long
③ Hiroshi Gomi, Takayuki Sassa, Richard F. Thompson, Shigeyoshi Itohara, Involvement of cyclin-dependent kinase-like 2 in cognitive function required for contextual and spatial learning in mice, Frontiers in Behavioral Neuroscience,査読有, vol.4, 2013, pp.1-14, http://www.frontiersin.org/Behavioral_Neuroscience/10.3389/fnbeh.2010.00017/full

〔学会発表〕(計３件)
① Mika Tanaka, Astrocyte Ca^{2+} signals are required for the functional integrity of tripartite synapses, XI Europearn Meeting on Glial Cells in Health and Disease, July 3-6, 2013, Berlin, Germany
② Mika Tanaka, Astrocyte Ca^{2+} signals are required for the functional integrity of tripartite synapses, Gordon Research Conferences, Glial Biology: Functional Interactions among Glia & Neurons, March 3-8, 2013, Ventura, CA, U.S.A.
③ Mika Tanaka, Astrocytic calcium signals are required for the functional integrity of tripartite synapses, The 40th Society for Neuroscience annual meeting, November 13-17, 2010, San Diego, CA, U.S.A.

〔図書〕(計０件)

〔産業財産権〕
○出願状況（計０件）

○取得状況（計０件）

〔その他〕
ホームページ等

６．研究組織
(1)研究代表者
五味　浩司　(GOMI HIROSHI)
日本大学・生物資源科学部・准教授
研究者番号：90293240

(2)研究分担者
(　　)

研究者番号：

(3)連携研究者
糸原　重美　(ITOHARA SHIGEYOSHI)
理化学研究所脳科学総合研究センター・シニアチームリーダー
研究者番号：60252524