

令和 2 年 7 月 10 日現在

機関番号：13101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K14960

研究課題名(和文) GluK3含有カイニン酸受容体による不安行動制御の解明

研究課題名(英文) The role of ionotropic glutamate receptor subunits GluK3 in anxiety-like behavior

研究代表者

飯田 和泉(渡辺和泉)(Iida, Izumi)

新潟大学・医歯学系・助教

研究者番号：80751031

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、新規不安調節分子のカイニン酸型グルタミン酸受容体GluK3サブユニットの特徴を明らかにした。GluK3はマウスにおいて発達期から成体にかけて、嗅球や前頭前皮質に多く発現し、神経細胞において興奮と抑制刺激両方で制御されていた。さらにGluK3が欠損したマウスの前頭前皮質では、興奮性と抑制性シナプス分子の発現バランスが崩れていることが明らかとなった。また、GluK3を介した不安制御機構を薬理的に誘導することが困難であることが明らかとなった。今後は、GluK3を介した脳内における神経回路の可視化と、GluK3アンタゴニストによる薬剤により不安制御を可能とするために方法を開発したい。

研究成果の学術的意義や社会的意義

イオン透過型グルタミン酸受容体は脳全体への有害作用が懸念され、現在までこれを標的とした抗精神病薬の開発には至っていない。GluK3は大脳皮質や大脳辺縁系の一部の神経細胞に選択的に多く発現することから、これまで不可能であったイオン透過性グルタミン酸受容体を標的とした抗不安薬の創薬が可能となる重要な分子であり、本研究ではGluK3の特徴を始めて明らかにすることができた。本研究が進み、カイニン酸型受容体の生理機能の一端が明らかになれば、長年に渡り定着している「グルタミン酸受容体の記憶学習への役割」に加えて、情動の発現にも重要であるという新たな定説を組み込むことができる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we identified the character of kainate-type glutamate receptor subunit GluK3 which is the novel molecule being associated with anxiety behavior. GluK3 has expressed all developmental stages in the mouse brain and highly expressed in the olfactory bulb and prefrontal cortex in the adult mice. And GluK3 was regulated by both excitatory and inhibitory stimuli. Furthermore, the balance of expression of the excitatory and inhibitory synaptic molecules was changed in GluK3 deficient mice. Because it was difficult to induce anxiety behavior with a GluK1/GluK3 antagonist, we have to try alternative drug inducible anxiety behavior by a GluK3 antagonist. In the future, we would like to visualize the neural circuit via GluK3 in the mouse brain to understand the association of GluK3 and anxiety behavior.

研究分野：神経化学

キーワード：GluK3 カイニン酸型グルタミン酸受容体 不安 行動解析

1. 研究開始当初の背景

恐怖や不安を認識し、捕食者からの逃亡や危機回避などは、生物の生存に必要な生体システムである。一方、強い恐怖経験により惹起される PTSD (心的外傷後ストレス障害) や、不安障害から誘導されるうつ病は、大きな社会問題となっている。近年、神経科学分野における光遺伝学の発展により、扁桃体から前頭前野、海馬、分界条床核、側坐核などへと不安神経回路が形成されていることが明らかとなってきた。なかでも、扁桃体と前頭前野の神経接続は、不安と抗不安の双方の神経応答を担う (Heidbreder CA & Groenewegen HJ, *Neurosci. Biobehav. Rev.*, 2003)。扁桃体の興奮性神経細胞には、イオン透過型グルタミン酸受容体ファミリーの AMPA 型、NMDA 型、カイニン酸型グルタミン酸受容体 (カイニン酸型受容体) が各々発現し、それぞれ恐怖記憶学習に関与する報告があるが、不安との関連については未だ明らかとなっていない。

AMPA 型と NMDA 型受容体は興奮性シナプス伝達に直接的に寄与することから注目され、記憶学習の本体であることが明らかとなった。一方のカイニン酸型受容体は、プレとポストシナプスの両方に局在するが、シナプス伝達への寄与は少ないと考えられてきた。1980 年代に統合失調症患者死後脳の前頭前野に 3H 標識カイニン酸が顕著に結合する報告はあったものの (Nishikawa T, et al, *Neuroscience Letters*, 1983) 近年になり、徐々にカイニン酸型受容体と精神疾患との関連性がヒトで報告され始め (Lerma J and Marques JM, *Neuron*, 2013; Mattheisen M, et al., *Mol Psychiatry*, 2015) カイニン酸型受容体の重要性や精神疾患への関与が見直されてきた。しかしながら、カイニン酸型受容体の機能解析を行った研究は少なく、遺伝子改変マウスを用いて情動などの精神状態を調べた研究もほとんどなかった。

カイニン酸型受容体は、5 種類のサブユニット GluK1-5 の 4 量体で構成されている。そこで申請者はカイニン酸型受容体の機能を解明するための第一歩として、海馬および小脳におけるカイニン酸型受容体のサブユニット構成を明らかにすることを試みた。申請者は定量的ウェスタンブロット法を新規開発し、カイニン酸型受容体サブユニット量を比較した(右図参照)。その結果、カイニン酸型受容体は両領域において、GluK2 と GluK3 から構成される受容体が主であることが明らかになった (Watanabe-Iida I. et al., *Journal of Neurochem.*, 2016)。さらに申請者は、カイニン酸型受容体サブユニットの個々の機能を調べるために、5 つあるカイニン酸型受容体のサブユニット全ての個別ノックアウト (GluK1-5KO) マウスを作製し、行動解析を行った。その結果、GluK3KO マウスでのみ、不安の減少つまりは抗不安行動が認められた。

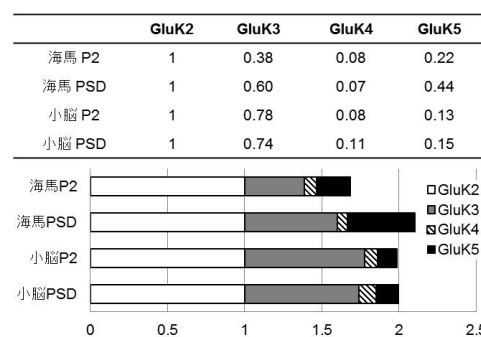
不安障害の治療に用いられる抗不安薬では、ベンゾジアゼピン系薬とセロトニン受容体作動薬や SSRI がよく知られている。これらの抗不安薬の作用機序から、不安には GABA 受容体とセロトニン受容体が重要だと考えられている。一方、グルタミン酸受容体はこれまで抗精神病薬の標的の 1 つとして考えられてきたが不安との関連について詳細に解析されていない。さらにイオン透過型グルタミン酸受容体は脳全体への有害作用が懸念され、現在までこれを標的とした抗精神病薬の開発には至っていない。GluK3 は大脳皮質や大脳辺縁系の一部の神経細胞に選択的に多く発現することから、これまで不可能であったイオン透過性グルタミン酸受容体を標的とした抗不安薬の創薬が可能となる重要な分子と考え、申請者は GluK3 に注目した。

2. 研究の目的

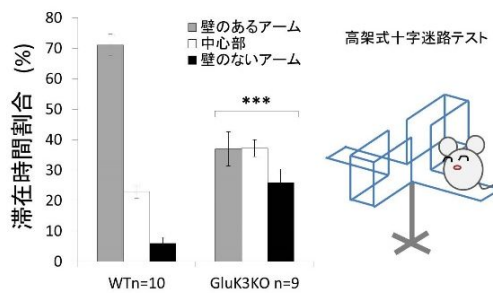
本研究では、カイニン酸型グルタミン酸受容体に注目し、GluK3 を介し抗不安行動がどのようにして起こるのかを解析し、GluK3 を起因とした新たな不安障害発症メカニズムの提唱を目指す。

そこで、カイニン酸型グルタミン酸受容体がどのような分子機序で、不安に関連する神経回路の調節を行い、不安行動を惹起するのかを明らかにする。そのためには、GluK3 の機能の詳細を理解しなければならない。カイニン酸型受容体のなかでも GluK3 は特に解析が進んでいないサブユニットである。そこで GluK3 の脳内における役割を明らかにするために、生化学的、細胞生物学的手法を用いて、マウス脳およびラット培養神経細胞における GluK3 の機能の特徴を調べることから本研究を始めた。

KA受容体サブユニット発現量の割合



GluK3KO マウスの抗不安行動



### 3. 研究の方法

以下の方法や顕微鏡を用いた。(1) マウス脳の発現タンパク質解析、(2) ラット大脳皮質由来神経細胞培養、(3) 培養神経細胞の蛍光染色、(4) 共焦点顕微鏡観察、(5) ビオチン化膜表面タンパク質の精製、(6) マウスの行動解析、(7) 薬理実験

### 4. 研究成果

#### (1) GluK3 の発現領域と発現時期の同定

初めに、GluK3 が脳内のどの領域に多く発現するのか明らかにするために、これまで行った *in situ* ハイブリダイゼーションと GluK3 抗体による免疫染色に加えて、マウス脳の各領域を分離し、ウェスタンブロットにより発現量を確認した。生後 8 週齢マウス脳から、嗅球、前頭前皮質 (PFC)、大脳皮質、海馬、線条体、視床、視床下部、小脳を分離し、可溶化したサンプルの GluK3 発現量を調べた(図 1A)。マウス生後 0 日齢、3 日齢、70 日齢、2 週齢、4 週齢、8 週齢、3 か月齢、6 か月齢の前脳における GluK3 発現量を定量した(図 1B)。その結果、GluK3 は嗅球や前頭前皮質、大脳皮質に高発現することがわかった。加えて海馬、線条体、視床、視床下部、小脳での発現量は低いことが分かった。また、生後脳における GluK3 の発達依存的発現変化を確認したところ、生後 1 週間にかけて発現量がやや高い傾向となったが、生後から成体にかけて、一貫して GluK3 は発現していることが示された。

#### (2) GluK3 は興奮性と抑制性シナプス両方に発現する

成体マウスの大脳皮質に GluK3 が強く発現していたことから、ラット大脳皮質由来神経細胞を作製し GluK3 の機能を解析することにした。そこで GluK3 が神経細胞のどのような場所に発現しているのか明らかにするために、蛍光細胞免疫染色を行った。ラット大脳皮質由来神経細胞は、培養 7 日から 14 日の間に固定した。神経細胞における興奮性プレシナプスマーカー分子として、小胞型グルタミン酸トランスポーターの VGLUT1 抗体及び VGLUT2 抗体を用いた。また興奮性ポストシナプスマーカーとして広く知られている PSD-95 を用いた。これらのマーカー分子を用いて、共免疫染色を行った(図 2A)。GluK3 は神経細胞の細胞体や樹状突起上に粒上に発現していることが確認できた。また、VGLUT1、VGLUT2、PSD95 とそれぞれ共局在することから興奮性シナプス膜上に発現していることが明らかとなった。一方、抑制性プレシナプスマーカー分子として、GABA 合成酵素の GAD65/67 抗体を用いた。また興奮性ポストシナプスマーカーとして GABA<sub>A</sub> 受容体 $\alpha$ 1 サブユニットと抑制性シナプス足場タンパクの Gephyrin 抗体を用いて、共免疫染色を行った(図 3)。意外なことに、GluK3 はこれらのマーカー分子とそれぞれ共局在することが明らかとなった。この結果はカイニン酸型グルタミン酸受容体が GABA 作動性シナプスに発現する可能性を示している。

#### (3) GluK3 の興奮性と抑制性刺激による細胞膜発現変化

ラット大脳皮質由来神経細胞の蛍光免疫染色において、GluK3 は神経細胞の興奮性と抑制性シナプスの両方ともに局在することが示されたことから、カイニン酸型グルタミン酸受容体は興奮性または抑制性のどちらの刺激によって細胞膜上での機能が調節されるのか調べることにした。そこでラット大脳皮質由来神経細胞を用いて、グルタミン酸と GABA で刺激されたときの GluK3 の細胞膜表面での発現変化について、細胞膜表面タンパク質のビオチン化により解析した。20  $\mu$ M グルタミン酸及び 100  $\mu$ M GABA を添加し 1 時間 37 °C でインキュベートした培養神経細胞とコントロールの培養神経細胞のそれぞれをビオチン溶液と反応させ、膜表面に発現しているタンパク質をビオチン標識させた。この培養神経細胞を回収し、ビオチン標識されたタンパク質中に含まれる GluK3 の割合を定量した。

その結果、グルタミン酸刺激により細胞膜表面の GluK3 が有意に減少していることが明らかとなった(図 4A)。これに対して、GABA 刺激では、細胞膜表面の GluK3 発現は増加することが明らかとなった(図 4B)。また、セロトニン受容体とドーパミン受容体アンタゴニストのリスペリドンで刺激した培養神経細胞の細胞膜表面の GluK3 発現量に変化は見られなかった。これらの結果から、GluK3 は、セロトニンやドーパミンではなく、グルタミン酸と GABA の両方で制御されることから、興奮と抑制の状況に応じて GluK3 の機能的役割があることが示唆された。

#### (4) GluK3KO マウスの前頭前皮質におけるシナプス分子の発現変化

扁桃体から前頭前野、海馬、分界条床核、側坐核へと不安神経回路が形成されており、なかでも扁桃体と前頭前野の神経接続は、不安と抗不安の双方の神経応答を担う。GluK3 は前頭前皮質に強く発現していることから、前頭前皮質に注目しシナプスタンパク質に変化が見られるのかを確認した(図 5)。その結果、カイニン酸型受容体 GluK2 と GluK5 の発現量に変化は見られなかったのに対し、NMDA 型グルタミン酸受容体サブユニットの GluN1 は減少していた。また、抑制性シナプス分子の Gephyrin と GAD65/57 は増加傾向を示した。このことから GluK3 欠損によって、興奮性と抑制性シナプス分子の発現割合を変化させることが示唆された。



### (5) GluK3 アンタゴニスト UBP-310 投与実験

最後に、GluK3 の治療標的としての妥当性を検証するために、野生型(WT)マウスにおいて薬理的に GluK3 を不活性化すると不安行動を減少させることが出来るのかを、GluK3 アンタゴニストの UBP-310 をマウスに腹腔内投与し行動解析を行った。

オープンフィールドテストは中心部での滞在時間の増加により不安行動を評価するが、UBP310 投与マウスでは有意な変化は見られなかった。一方、高架式十字迷路テストは、壁のあるアームでの滞在時間の増加と壁のないアームでの滞在時間の減少により不安行動を評価するが、UBP310 投与マウスでは、抗不安行動よりもむしろ不安行動をとる傾向が観察された。したがって、薬剤で抗不安行動を誘導することは出来なかった。

UBP310 は GluK3 だけではなく、カイニン酸型受容体サブユニットの GluK1 のアンタゴニストでもあることから、UBP310 投与は GluK1 に効果が出ている可能性が考えられた。

### まとめ

本研究では、新規不安調節分子のカイニン酸型グルタミン酸受容体 GluK3 サブユニットの特徴を明らかにした。研究開始当初に研究室を異動し、新たに細胞生物学的解析を取り入れたことで解析の幅が広がった。その結果として、神経細胞での GluK3 の動態を明らかにすることができた。一方で、薬理的に GluK3 活性を抑えることで不安行動を調節しようと試みたが、GluK1 との競合作用により評価できなかった。今後はこれを遺伝学的操作で克服していきたい。さらに、生体マウス脳への薬剤投与や遺伝学的操作により、GluK3 を介した神経活動を制御し、不安行動に変化がみられるのかどうかを解析していく。

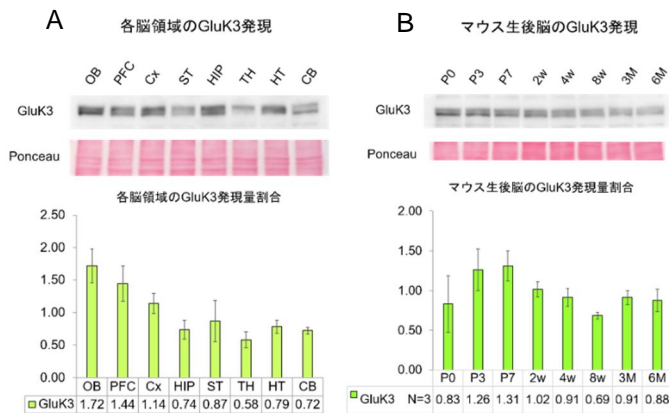


図1 (A)各脳領域における GluK3 発現とその割合をウェスタンブロットにより定量した。(OB:嗅球, PFC: 前頭前皮質, Cx:大脳皮質, ST:線条体, HIP:海馬, TH:視床, HT:視床下部, CB:小脳) 下グラフは、全脳領域の GluK3 発現量の平均を 1.0 にした時の、各脳領域の発現割合を示している。(B)マウス生後脳の GluK3 発現変化。(P0: 生後0日齢、P3:3日齢、P7:7日齢、2w:2週齢、4w:4週齢、8w:8週齢、3M:3か月齢、6M:6か月齢) 下のグラフは、全発達期の GluK3 発現量の平均を 1.0 にした時の、各発達期の発現割合を示している。

### GluK3は興奮性シナプスに局在する

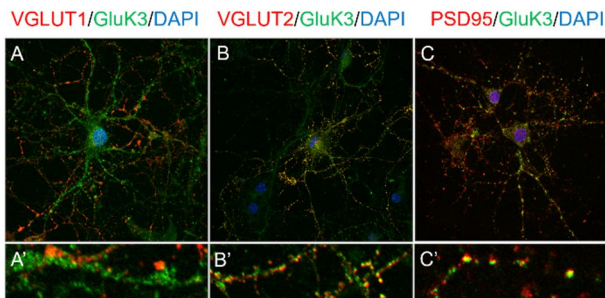


図2 ラット大脳皮質由来神経細胞の蛍光免疫染色 (A, A')赤:VGLUT1 ( B, B') 赤:VGLUT2、(C, C')赤:PSD95、(A-C)緑:GluK3 (A-C)共焦点レーザー顕微鏡 63 倍率で撮影した画像 (A'-C')拡大画像

### GluK3は抑制性シナプスに局在する

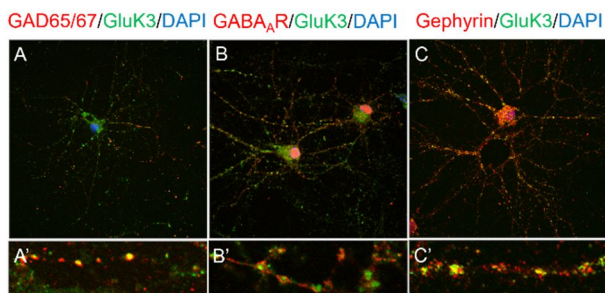


図3 ラット大脳皮質由来神経細胞の蛍光免疫染色 (A, A')赤:GAD65/67 ( B, B') 赤:GABA<sub>A</sub>R a1、(C, C')赤:Gephyrin、(A-C)緑:GluK3 (A-C)共焦点レーザー顕微鏡 63 倍率で撮影した画像 (A'-C')拡大画像

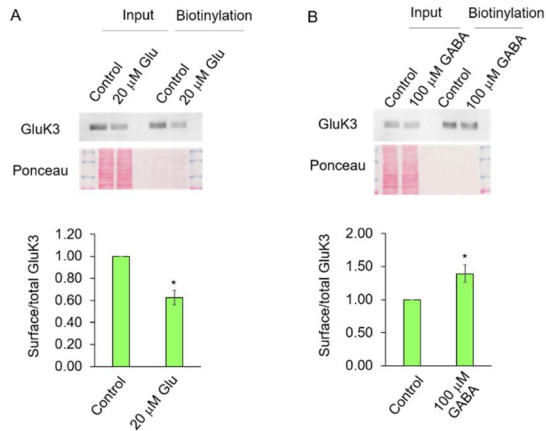


図4 ラット大脳皮質由来神経細胞のビオチン化 GluK3 の定量

ラット 18 日胚大脳皮質初代培養細胞培養 7 - 14 日を溶媒処理(control)と、20 μM グルタミン酸処理(n=3) (A)、100 μM GABA 処理(n=3) (B) を 1 時間行った。この培養細胞の細胞膜上に発現するタンパク質のみをビオチン化し、control と薬理処理した時の細胞膜上での GluK3 の発現量変化をウェスタンプロットで定量し確認した。Control を 1.0 とし、各ビオチン化 GluK3 の割合を求めた。エラーバーは標準偏差、\* < 0.05

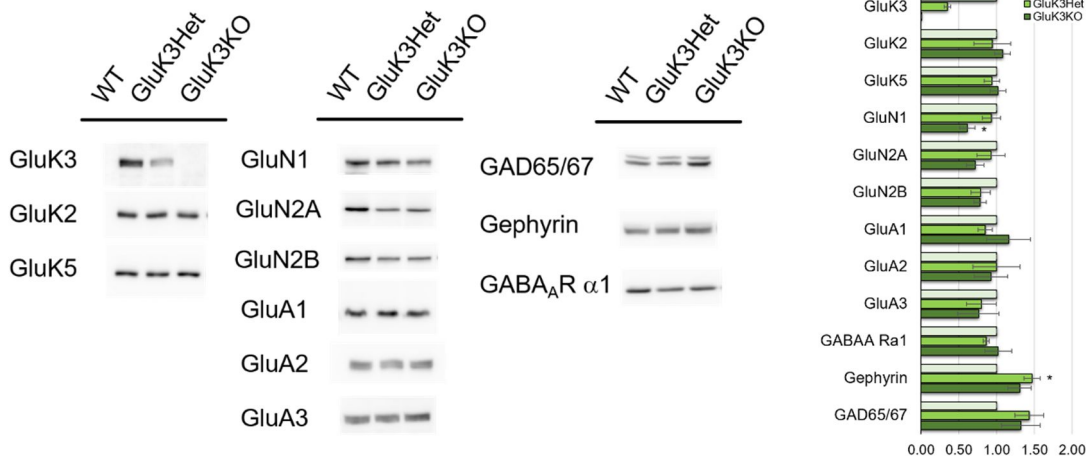


図5 GuK3KO マウス前頭前皮質におけるシナプス分子発現変化

8 - 12 週齢のマウス(WT, Het, KO)から前頭前皮質領域を採取し、ウェスタンプロットを行った。カイン酸型グルタミン酸受容体サブユニットの発現量の変化は GluK3, GluK2, GluK5 抗体を用いて解析した。興奮性シナプス分子について、NMDA 型グルタミン酸受容体サブユニットの GluN1, GluN2A, GluN2B 抗体、AMPA 型グルタミン酸受容体サブユニットの GluA1, GluA2, GluA3 抗体を用いて検出した。抑制性シナプス分子について、GABA<sub>A</sub> 受容体の α1 サブユニットと Gephyrin, GAD65/67 抗体を用いて解析を行った。Control を 1.0 とし、各ビオチン化 GluK3 の割合を求めた。エラーバーは標準偏差、\* < 0.05

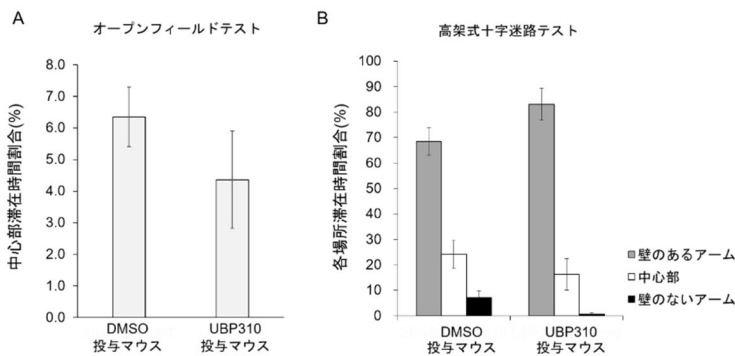


図6 UBP310 投与マウスの行動解析

8 - 13 週齢の雄マウスに 10 mg/kg UBP310 を腹腔内投与し、1 時間後、オープンフィールドテスト(A)と高架式十字迷路テスト(B)を行った。(DMSO 投与マウス: n=10, UBP310 投与マウス: n=6) エラーバーは標準偏差

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Izumi Iida
2. 発表標題 The role of ionotropic glutamate receptor subunit GluK3 in anxiety-like behavior
3. 学会等名 International Niigata-Taiwan Universities Collaborative Dental Research Symposium (国際学会)
4. 発表年 2019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
--	---------------------------	-----------------------	----