

令和元年6月3日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K15562

研究課題名(和文) 神経伝達の新しい制御機構：活動依存的な細胞外イオン濃度の変化による制御機構の解明

研究課題名(英文) The effect of extracellular Calcium dynamics on synaptic transmission

研究代表者

荒井 格 (Arai, Itaru)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・助教

研究者番号：00754631

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：小脳平行線維シナプスに発現する 2型グルタミン酸受容体 (GluD2) はDセリンと結合することで同シナプス伝達を長期にわたって抑制する機能を持つ (DセリンLTD) が、Dセリン結合領域にCa²⁺結合部位を持つ。本研究では神経活動依存的なCa²⁺濃度変化がDセリンLTDに及ぼす影響を検討した。

DセリンLTDは、誘発刺激を与える際の細胞外Ca²⁺濃度に依存して抑制された。一方、Ca²⁺結合能を阻害した変異型GluD2を持つノックインマウスではDセリンLTDは常に亢進していた。これらの結果から、GluD2の機能は神経活動に依存したCa²⁺濃度変化による制御を受けていることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

中枢神経系においてグルタミン酸によるシナプス伝達は神経活動依存的に様々な制御を受けて記憶・学習等の基盤となるが、その制御機構には未だ不明な点も多い。近年、グルタミン酸受容体の構造解析から細胞外領域にイオン結合部位が存在することが明らかになった。一方、シナプス近傍の細胞外イオン濃度は神経活動依存的に変化する。本研究は、小脳平行線維シナプスに局在するGluD2を用いて、細胞外イオン濃度の活動依存的変化がシナプス伝達を制御するという、これまで考えられてこなかった全く新しいシナプス制御機構の存在を示唆しており、得られた知見は他のグルタミン酸受容体を介したシナプス伝達の制御機構への応用も期待される。

研究成果の概要(英文)：Delta2 glutamate receptors (GluD2), which express in cerebellar parallel fiber - Purkinje cell synapses and induce long term depression by binding with D-serine (D-LTD), have Ca²⁺ binding sites at their ligand binding domain. In this study, I investigated how D-LTD is influenced by the extracellular Ca²⁺ concentration([Ca]_o) dynamics during synaptic activities.

When [Ca]_o was reduced during the LTD induction, D-LTD was facilitated. On the other hand, D-LTD was inhibited when [Ca]_o was elevated during its induction. Moreover, D-LTD was always facilitated when the similar experiments were performed by using knock in mice that have mutant GluD2 whose Ca²⁺ binding ability was disrupted. These results indicate that D-serine - GluD2 signaling is regulated by the [Ca]_o dynamics during synaptic activities.

研究分野：神経生理学

キーワード：小脳 長期可塑性 2型グルタミン酸受容体 Dセリン 細胞外Ca濃度

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 中枢神経系において、シナプスを介したグルタミン酸伝達は神経活動に応じて様々な制御を受け、記憶・学習の基盤となる。神経活動が亢進するとシナプス近傍の細胞外イオン濃度が一時的に変化することが古くから知られているが、これまでその機能的意義についてはよくわかっていなかった。近年、グルタミン酸受容体の構造が明らかとなり、細胞外領域にイオン結合部位が存在することが明らかになった。

(2) 2型グルタミン酸受容体 (GluD2) は小脳平行線維 プルキンエ細胞シナプス (PF シナプス) に局在しているが、そのリガンドは長らく不明であった。近年、GluD2 は、PF シナプスを覆い囲んでいるバグマングリアから放出される D セリンと結合することにより、シナプス後細胞で AMPA 型グルタミン酸受容体のエンドサイトーシスを引き起こし、PF シナプスで長期抑圧 (LTD) を誘発することが明らかとなった (D セリン LTD、Kakegawa et al., 2011)。更に近年、GluD2 の結晶構造が明らかとなり、リガンド結合領域 (LBD) の近傍に Ca^{2+} 結合部位が存在することが分かった (Hansen et al., 2009; Elegheert et al., 2016)。また、*in vitro* の実験から GluD2 の D セリンに対する親和性は LBD 近傍の Ca^{2+} 結合部位を介して細胞外 Ca^{2+} 濃度に応じて低下することが報告された (Hansen et al., 2009)。一方、平行線維シナプスでは、神経活動が亢進するとシナプス近傍の細胞外 Ca^{2+} 濃度 ($[Ca^{2+}]_o$) が低下することがすでに知られている。

(3) これらの知見から、PF シナプスの活動が亢進すると、バグマングリアが D セリンを放出すると同時に、PF シナプス近傍の $[Ca^{2+}]_o$ が一過的に低下していることが予想される。すなわち、D セリン-GluD2 シグナリングが、活動依存的に変化した $[Ca^{2+}]_o$ によって制御を受けている可能性が考えられる。

2. 研究の目的

本研究は D セリン GluD2 シグナリングをモデルとして、PF シナプスにおける LTD を指標に、神経活動によって変化する $[Ca^{2+}]_o$ がどのようにシナプス伝達を制御するのかを明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) GluD2 の Ca^{2+} 結合能は、GluD2 の LBD 近傍に点変異を導入することで操作できることが既に報告されている (Hansen et al., 2009)。本研究ではこれに倣い、変異型 GluD2 を持つ 2 種類のノックインマウス (KI マウス) を、文部科学省新学術領域研究の「先端モデル動物支援プラットフォーム」の支援を得て CRISPR/Cas9 技術を用いて作製した。すなわち、D782A の変異を導入して Ca^{2+} 結合能を欠落させた変異型 GluD2 を持つ KI マウスと、E531C 及び D782C の変異を導入して Ca^{2+} が常時結合した状態を模倣した変異型 GluD2 を持つ KI マウスを作製した。

(2) 野生型及び (1) で作製した KI マウスの小脳から急性スライス標本を作製して電気生理学的実験を行った。プルキンエ細胞にホールセルクランプ法を適用し、平行線維を電気刺激することで生じるシナプス電流応答 (PF-EPSC) を記録した。D セリン LTD は、小脳平行線維シナプスの活動亢進時に周囲を取り囲むバグマングリアから放出される D セリンが GluD2 に結合することで誘発される。本研究では D セリン LTD の誘発には、D セリンの細胞外投与、平行線維シナプスの高頻度刺激 (50 Hz で 10 回刺激を 0.1 Hz で 30 回繰り返し) の 2 種類の方法を使い分けて行った。

4. 研究成果

(1) 野生型マウスから小脳急性スライス標本を作製し、プルキンエ細胞にホールセルクランプ法を適用し、膜電位固定 (-70 mV に電位固定) した。刺激用電極を介して平行線維を 0.1 Hz で刺激し、PF-EPSC を記録した。PF-EPSC が安定したところで、D セリンを細胞外に投与すると PF-EPSC が 30 分以上に渡って減弱した (D セリン LTD)。D セリン投与時に $[Ca^{2+}]_o$ を通常の 2 mM から 0.5 mM に低下させて同様の実験を行ったところ、D セリン LTD は亢進した (図 1)。一方、D セリン投与時に

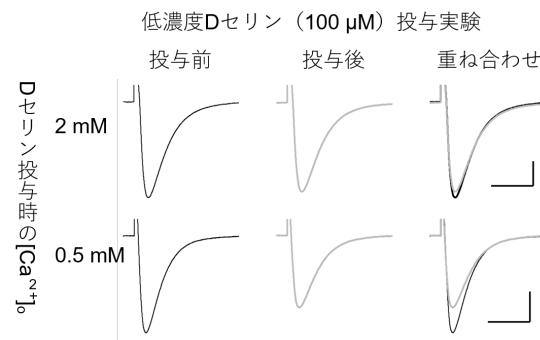


図 1 D セリン LTD は $[Ca^{2+}]_o$ に依存する (1)

100 μ M D セリンを投与すると通常 PF-EPSC は LTD をほとんど示さなかったが (上段)、D セリン投与時に $[Ca^{2+}]_o$ を 0.5 mM に下げると LTD の程度は亢進した (下段) (scale bar: 100 pA, 20 ms)

[Ca²⁺]_oを8 mMに上昇させると、DセリンLTDは抑制される傾向を示した(図2)。これらの結果から、DセリンLTDは[Ca²⁺]_oの影響を受ける([Ca²⁺]_oにしたがって抑制される)ことが示唆された。

(2) DセリンLTDの[Ca²⁺]_o依存性が、LBD近傍にあるCa²⁺結合部位へのCa²⁺結合に依るものかどうかを検討するため、変異型GluD2を発現するKIマウスを使って電気生理学的実験を行った。Ca²⁺結合能の欠落した変異GluD2を持つKIマウスから小脳急性スライス標本作製し、プルキンエ細胞からPF-EPSCを記録した。PF-EPSCが安定したところでDセリンを細胞外投与すると、DセリンLTDは、Dセリン投与時に[Ca²⁺]_oを低下させなくても亢進していることが示唆された。

以上の結果から、DセリンLTDは、GluD2のLBD近傍にあるCa²⁺結合部位にCa²⁺が結合することで制御されている可能性が示唆された。

KIマウスについては2点変異を加える困難さから作製に時間がかかり、本研究期間中に電気生理学的実験を遂行するまでには至らなかった。今後、KIマウスについても同様の電気生理学的実験を行い、細胞外Ca²⁺濃度に依存せず、DセリンLTDが抑制されるかどうかについて検討する必要がある。

(3) 次に、より生理的に近い条件下でもDセリンLTDが[Ca²⁺]_oの影響を受けるのかについて検討を行った。野生型マウスから小脳急性スライス標本作製し、プルキンエ細胞からPF-EPSCを記録した。Dセリンを細胞外投与する代わりに、平行線維に高頻度刺激(「3. 研究の方法」を参照)を与えてバグマングリアからの内因性Dセリンの放出を誘発させたところ、Kakegawa et al. (2011)と同様にPF-EPSCは長時間にわたって減弱した(内因性DセリンLTD)。次に、この内因性DセリンLTDがシナプス近傍の[Ca²⁺]_o変化に影響を受けているのかを検討するため、細胞外にCa²⁺緩衝剤BAPTAを投与して[Ca²⁺]_oの神経活動依存的な変化を固定して同様の実験を行った。その結果、BAPTA存在下では、DセリンLTDはBAPTA非存在下に比べて抑制される傾向を示した。これらの結果から、内因性DセリンLTDについても神経活動依存的な[Ca²⁺]_o変化の影響を受けていることが示唆された。

(4) 本研究によって、PFシナプスにおけるDセリン-GluD2シグナリングは、神経活動依存的に生じる[Ca²⁺]_o変化によって制御されている可能性が示唆された。[Ca²⁺]_oはシナプス前細胞からの伝達物質放出を制御することは古くから知られているが、シナプス後細胞に発現するグルタミン酸受容体に直接働きかけてその活性を制御する、という報告はこれまでにない。本研究は、シナプス近傍の[Ca²⁺]_oの活動依存的変化によるシナプス伝達制御という、これまでに考えられてこなかった全く新しいシナプス制御機構を明らかにした点に学術的な意義がある。今後は、作製した2種類のKIマウス等も使いながら、この新しいシナプス制御機構が神経回路レベルのシナプス伝達だけでなく、個体レベルの運動学習にも影響を及ぼすのかについても検討する必要がある。

また、イオン結合部位は、GluD2だけでなく他のグルタミン酸受容体にも存在することが近年の構造解析の進展から明らかになった。例えば、カニン酸受容体にはNa⁺やCl⁻の結合部位が、NMDA受容体にはCa²⁺結合部位が存在する。これらの受容体についても活動依存的な細胞外イオン濃度変化によってその機能が制御されている可能性がある。これらの可能性を検討することによって、シナプス伝達一般における制御機構の新しい概念の創出が期待される。

<引用文献>

Elegheert J, Kakegawa W, Clay JE, Shanks NF, Behiels E, Matsuda K, Kohda K, Miura E, Rossmann M, Mitakidis N, Motohashi J, Chang VT, Siebold C, Greger IH, Nakagawa T, Yuzaki M & Aricescu AR (2016)

“Structural basis for integration of GluD receptors within Synaptic organizer complexes” *Science*, **353**: 295-299

Hansen KB, Naur P, Kurtkaya NL, Kristensen AS, Gajhede M, Kastrup JS & Traynelis SF (2009)

“Modulation of the dimer interface at ionotropic glutamate-like receptor delta2 by

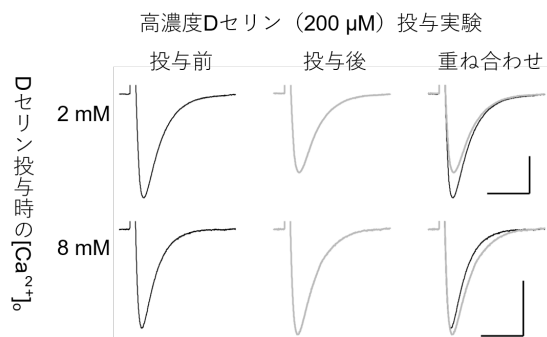


図2 DセリンLTDは[Ca²⁺]_oに依存する(2)

200 μM Dセリンを投与すると通常PF-EPSCはLTDを示すが(上段)、Dセリン投与時に[Ca²⁺]_oを8 mMに上げるとLTDの程度は減弱した(下段)。

(scale bar: 100 pA, 20 ms)

D-serine and extracellular calcium” *J Neurosci*, **29**: 907-917

Kakegawa W, Miyoshi Y, Hamase K, Matsuda S, Matsuda K, Kohda K, Emi K, Motohashi J, Konno R, Zaitzu K & Yuzaki M (2011)
“D-serine regulates cerebellar LTD and motor coordination through the $\alpha 2$ glutamate receptor” *Nat Neurosci*, **14**: 603-611

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計3件)

Sho Wakayama, Shigeki Kiyonaka, Itaru Arai, Wataru Kakegawa, Shinji Matsuda, Keiji Ibata, Yuri L. Nemoto, Akihiro Kusumi, Michisuke Yuzaki & Itaru Hamachi (2017)
“Chemical labeling for visualizing native AMPA receptors in live neurons”
Nature Communications, **8**: 14850 査読有り
DOI: <https://doi.org/10.1038/ncomms14850>

Misako Matsushita, Yuhki Nakatake, Itaru Arai, Keiji Ibata, Kazuhisa Kohda, Sravan Goparaju, Miyako Murakami, Miki Sakota, Nana Chikazawa-Nohtomi, Shigeru Ko, Takanori Kanai, Michisuke Yuzaki & Minoru S.H. Ko (2017)
“Neural differentiation of human embryonic stem cells induced by the transgene-mediated overexpression of single transcription factors”
Biochem Biophys Res Commun (BBRC), **490(2)**: 296-301 査読有り
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.06.039>

Gen Shiihashi, Daisuke Ito, Itaru Arai, Yuki Kobayashi, Kanehiro Hayashi, Shintaro Otsuka, Kazunori Nakajima, Michisuke Yuzaki, Shigeyoshi Itohara, Norihiro Suzuki (2017)
“Dendritic homeostasis disruption in a novel frontotemporal dementia mouse model expressing cytoplasmic fused in sarcoma”
EBioMedicine, **24**: 102-115 査読有り
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2017.09.005>

〔学会発表〕(計0件)

〔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

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

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名 :

ローマ字氏名 :

所属研究機関名 :

部局名 :

職名：

研究者番号（8桁）：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。