

平成 21 年 3 月 31 日現在

研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19700315
 研究課題名（和文） 抑制性ニューロンに発現する NMDA 受容体の局在・機能に関する分子解剖学的研究
 研究課題名（英文） Molecular anatomical studies on the localization and functions of NMDA receptors in inhibitory neurons
 研究代表者
 深谷 昌弘（FUKAYA MASAHIRO）
 北海道大学・大学院医学研究科・助教
 研究者番号：10360900

研究成果の概要：

本研究課題では、抑制性ニューロンにおいて発現する NMDA 受容体の調節サブユニットである NR2D および NR3A サブユニットに着目し、その発現細胞と細胞内局在、それらを介する神経回路、シナプス可塑性への関与の有無を明らかにすることを目的として研究を行った。まず、マウス大脳皮質および海馬での抑制性ニューロンにおける NMDA 受容体 NR2D サブユニットに対する特異抗体を用いた局在解析を蛍光多重免疫染色法や免疫電子顕微鏡法を用いて行った。その結果、大脳皮質の NR2D サブユニットは、parvalbumin 陽性介在抑制性ニューロンの非対称性シナプスの後シナプス部位に局在していた。また、これらの前シナプスは VGluT1, VGluT2 陽性であることから大脳皮質-大脳皮質間と視床-大脳皮質間のシナプス両方に発現することが明らかとなった。さらに、海馬においても parvalbumin 陽性介在抑制性ニューロンに発現していた。これらの結果から、NR2D サブユニットは一部の介在ニューロンの興奮性シナプス後部で機能していることが示唆された。一方、小脳における NR3A サブユニットに対する特異抗体を用いた局在解析を行ったところ、小脳分子層の介在抑制性ニューロンである Stellate 細胞および Basket 細胞に発現し、免疫電子顕微鏡解析から登上線維終末に接する介在ニューロンの樹上突起に局在することが明らかとなった。また、この部分は興奮性シナプスの構造は認められず対称性シナプス様の構造を有していたが、シナプス前終末での active zone に見られるシナプス小胞の集積が認められず、シナプス結合ではないと考えられた。さらに大脳皮質や海馬においても同様の局在が介在ニューロンで認められた。このような結合領域に NMDA 受容体が局在することはこれまでに報告がなく、NMDA 受容体が全く新しい機能を有する可能性が示唆された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,000,000	0	2,000,000
2008 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	390,000	3,690,000

研究分野：神経解剖学・神経生理学

科研費の分科・細目：神経科学・神経科学一般

キーワード：NMDA 受容体, 抑制性ニューロン, NR2D, NR3A, 大脳皮質, 海馬, 小脳, 免疫電子顕微鏡法

1. 研究開始当初の背景

脊椎動物の中樞神経系において NMDA 型グルタミン酸受容体 (NMDA 受容体) は、シナプス可塑性の誘発、神経活動依存的なシナプス回路の発達、記憶や学習の基盤分子として重要な役割を果たしていることが知られている。これらの NMDA 受容体の重要な役割は、興奮性ニューロンの興奮入力シナプスにおける NMDA 受容体の機能を基盤としたものである。一方で、抑制性ニューロンにおいても NMDA 受容体は発現しており、抑制性ニューロンのシナプス可塑性、発達に関与することが予想されるが、その発現サブユニットの構成や機能、どのような神経回路のシナプス伝達に寄与しているかについてはほとんど明らかにされていない。

2. 研究の目的

本研究課題では、抑制性ニューロンにおいて NMDA 受容体の必須サブユニットである NR1、調節サブユニットで抑制性ニューロンに発現する NR2D および NR3A サブユニットに着目し、その発現細胞種と細胞内局在、関与する神経回路網、シナプス可塑性への関与の有無を明らかにし、抑制性ニューロンにおける NMDA 受容体の果たす役割を解明することを目的とする。

3. 研究の方法

まず、NMDA 受容体 NR2D および NR3A サブユニットに対する特異抗体を作製し、これらの抗体を用いて、マウス大脳皮質、海馬、小脳での発現細胞種の同定、細胞内局在解析を様々な分子マーカーとの多重染色 (共焦点レーザー顕微鏡) や免疫電子顕微鏡レベル (pre-embedding, post-embedding 法) で行い、どのようなシナプス (対称性, 非対称性シナプス) に局在するかを解析し、それぞれの分子が関与するシナプス回路を同定する。このシナプス回路を同定することにより、サブユニットの電気生理学的な特性と比較し、シナプス回路の特性を把握する。さらに、シナプス前終末から放出される伝達物質を、各種伝達物質もしくは小胞性トランスポーターの特異抗体を用いた免疫電子顕微鏡解析によって同定する。

4. 研究成果

マウス大脳皮質および海馬での抑制制ニ

ューロンにおける NMDA 受容体 NR2D サブユニットに対する特異抗体を用いた局在解析を蛍光多重免疫染色法や免疫電子顕微鏡法を用いて行った結果、大脳皮質の NR2D サブユニットは、parvalbumin 陽性介在抑制性ニューロンの非対称性シナプスの後シナプス部位に局在していた。また、これらの前シナプスは VGluT1, VGluT2 陽性であることから大脳皮質-大脳皮質間と視床-大脳皮質間のシナプス両方に発現することが明らかとなった。さらに、海馬においても parvalbumin 陽性介在抑制性ニューロンに発現していた。これらの結果から、NR2D サブユニットは一部の介在ニューロンの興奮性シナプス後部で機能していることが示唆された。一方、小脳における NR3A サブユニットに対する特異抗体を用いた局在解析を行ったところ、小脳分子層の介在抑制性ニューロンである Stellate 細胞および Basket 細胞に発現し、免疫電子顕微鏡解析から登上線維終末に接する介在ニューロンの樹上突起に局在することが明らかとなった。また、この部分は興奮性シナプスの構造は認められず対称性シナプス様の構造を有していたが、シナプス前終末での active zone に見られるシナプス小胞の集積が認められず、シナプス結合ではないと考えられた。さらに大脳皮質や海馬においても同様の局在が介在ニューロンで認められた。このような結合領域に NMDA 受容体が局在することはこれまでに報告がなく、NMDA 受容体が全く新しい機能を有する可能性が示唆された。

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20件)

1. Ablation of NMDA Receptors Enhances the Excitability of Hippocampal CA3 Neurons. Fukushima F, Nakao K, Shinoe T, Fukaya M, Muramatsu S, Sakimura K, Kataoka H, Mori H, Watanabe M, Manabe T, Masayoshi M. **PLoS ONE** 4(1): e3993. (2009) 査読有り

2. Diacylglycerol kinase beta accumulates on the perisynaptic site of medium spiny neurons in the striatum. Hozumi Y, Fukaya M, Adachi N, Saito N, Otani K, Kondo H, Watanabe M, Goto K. **Eur J Neurosci** 28(12):2409-2422. (2008) 査読有り

3.Expression and possible role of creatine transporter in the brain and at the blood-cerebrospinal fluid barrier as a transporting protein of guanidinoacetate, an endogenous convulsant. Tachikawa M, Fujinawa J, Takahashi M, Kasai Y, Fukaya M, Sakai K, Yamazaki M, Tomi M, Watanabe M, Sakimura K, Terasaki T, Hosoya K. **J Neurochem** 107(3):768-778. (2008) 査読有り

4.Synapse formation and clustering of neuroligin-2 in the absence of GABAA receptors. Patrizi A, Scelfo B, Viltono L, Briatore F, Fukaya M, Watanabe M, Strata P, Varoqueaux F, Brose N, Fritschy JM, Sassoè-Pognetto M. **Proc Natl Acad Sci U S A** 105(35): 13151-13156. (2008) 査読有り

5.Predominant expression of phospholipase C β 1 in telencephalic principal neurons and cerebellar interneurons, and its close allocation with related signaling molecules in somatodendritic neuronal elements. Fukaya M, Uchigashima M, Nomura S, Hasegawa U, Kikuchi H, Watanabe M. **Eur J Neurosci** 28(9):1744-1759. (2008) 査読有り

6.Enhancement of both long-term depression induction and optokinetic response adaptation in mice lacking delphinin. Takeuchi T, Ohtsuki G, Yoshida T, Fukaya M, Wainai T, Yamashita M, Yamazaki Y, Mori H, Sakimura K, Kawamoto S, Watanabe M, Hirano T, Mishina M **PLoS ONE** 3(5): e2297. (2008) 査読有り

7.Use-dependent amplification of presynaptic Ca²⁺ signaling by axonal ryanodine receptors at the hippocampal mossy fiber synapse. Shimizu H, Fukaya M, Yamasaki M, Watanabe M, Manabe T, Kamiya H. **Proc Natl Acad Sci U S A** 105(33): 11998-12003. (2008) 査読有り

8.Cloning and characterization of E-dlg, a novel splice variant of mouse SAP97 binds preferentially to SAP102. Mao P, Tao Y, Fukaya M, Li D, Tao F, Levine CF, Watanabe M, Johns RA. **IUBMB Life** 60(10):684-692. (2008) 査読有り

9.Glutamate transporters regulate lesion-induced plasticity in the developing somatosensory cortex. Takasaki C, Okada R,

Mitani A, Fukaya M, Yamasaki M, Fujihara Y, Shirawawa T, Tanaka K, Watanabe M. **J Neurosci** 28(19): 4995-5006. (2008) 査読有り

10.Functional contributions of synaptically localized NR2B subunits of the NMDA receptor to synaptic transmission and long-term potentiation in the adult mouse CNS. Miwa H, Fukaya M, Watabe AM, Watanabe M, Manabe T. **J Physiol** 586(10): 2539-2550. (2008) 査読有り

11.Effects of FAK ablation on cerebellar foliation, Bergmann glia positioning and climbing fiber territory on Purkinje cells. Watanabe F, Miyazaki T, Takeuchi T, Fukaya M, Nomura T, Noguchi S, Mori H, Sakimura K, Watanabe M, Mishina M. **Eur J Neurosci** 27(4):836-854. (2008) 査読有り

12.IQ-ArfGEF/BRAG1 is a guanine nucleotide exchange factor for Arf6 that interacts with PSD-95 at postsynaptic density of excitatory synapses. Sakagami H, Sanda M, Fukaya M, Miyazaki T, Sukegawa J, Yanagisawa T, Suzuki T, Fukunaga K, Watanabe M, Kondo H. **Neurosci Res** 60(2): 199-212. (2008) 査読有り

13.Axonal motility and its modulation by activity are branch-type specific in the intact adult cerebellum. Nishiyama H, Fukaya M, Watanabe M, Linden D. **Neuron** 56(3):472-487. (2007) 査読有り

14.Genetic ablation of NMDA receptor subunit NR3B in mouse reveals motoneuronal and non-motoneuronal phenotypes. Niemann S, Kanki H, Fukui Y, Takao K, Fukaya M, Hynynen MN, Churchill MJ, Shefner JM, Bronson RT, Watanabe M, Brown RHJr, Miyakawa T, Itohara S, Hayashi Y. **Eur J Neurosci** 26(6):1407-1420. (2007) 査読有り

15.Evidence against GABA release from glutamatergic mossy fiber terminals in the developing hippocampus. Uchigashima M, Fukaya M, Watanabe M, Kamiya H. **J Neurosci** 27(30):8088-8100. (2007) 査読有り

16.Subcellular arrangement of molecules for 2-arachidonoyl-glycerol-mediated

retrograde signaling and its physiological contribution to synaptic modulation in the striatum. Uchigashima M, Narushima M, Fukaya M, Katona I, Kano M, Watanabe M. **J Neurosci** 27(14): 3663-3676. (2007) 査読有り

17. Junctophilin-mediated channel crosstalk essential for cerebellar synaptic plasticity. Kakizawa S, Kishimoto Y, Hashimoto K, Miyazaki T, Furutani K, Shimizu H, Fukaya M, Nishi M, Sakagami H, Ikeda A, Kondo H, Kano M, Watanabe M, Iino M, Takeshima H. **EMBO J** 26(7): 1924-1933. (2007) 査読有り

18. Vesicular release of glutamate from unmyelinated axons in white matter. Ziskin J L, Nishiyama A, Rubio M, Fukaya M, Bergles D E. **Nat Neurosci** 10(3): 321-330. (2007) 査読有り

19. Phospholipase C β 3 is distributed in both somatodendritic and axonal compartments and localized around perisynapse and smooth endoplasmic reticulum in mouse Purkinje cell subsets. Nomura S, Fukaya M, Tsujioka T, Wu D, Watanabe M. **Eur J Neurosci** 25(3): 659-672. (2007) 査読有り

20. Tonic enhancement of endocannabinoid-mediated retrograde suppression of inhibition by cholinergic interneuron activity in the striatum. Narushima M, Uchigashima M, Fukaya M, Matsui M, Manabe T, Hashimoto K, Watanabe M, Kano M. **J Neurosci** 27: 496-506. (2007) 査読有り

〔学会発表〕 (計 3 件)

2. Masahiro Fukaya, Masahiko Watanabe Selective localization of NR3A subunit at climbing fiber-interneuron synapses in the cerebellum. Society for Neuroscience 37th Annual Meeting, San Diego, 2007.11.3-7

1. 深谷昌弘、渡辺雅彦 The mode of AMPA-type glutamate receptor trafficking in Bergmann glia. 第30回日本神経科学大会. 横浜 2007. 9. 10-12

3. 深谷昌弘、渡辺雅彦 小脳における登上線維-介在ニューロン間シナプス選択的に発現するNMDA受容体NR3Aサブユニットの分子解剖

学的解析. 日本解剖学会第53回東北・北海道連合支部学術集会. 札幌. 2007. 9. 29-30

6. 研究組織

(1) 研究代表者

深谷 昌弘 (FUKAYA MASAHIRO)

北海道大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号 : 10360900

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし