

令和 4 年 5 月 26 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19H03321

研究課題名（和文）細胞内カルシウム動態調節によるシナプス可塑性のシナプス部位特異的制御機構の解明

研究課題名（英文）Elucidation of mechanisms for synapse site-specific regulation of synaptic plasticity by intracellular calcium dynamics

研究代表者

真鍋 俊也（Manabe, Toshiya）

東京大学・医科学研究所・教授

研究者番号：70251212

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,300,000円

研究成果の概要（和文）：中枢神経系のシナプス前終末およびシナプス後細胞におけるカルシウムストアからのカルシウムイオンの放出に關与すると考えられる機能分子Xの役割を解明するために、シナプス前終末およびシナプス後細胞特異的に分子Xを欠損する遺伝子改変マウスを作出し、急性海馬スライス標本作製して、電気生理学的解析を行った。その結果、シナプス前終末特異的変異マウスでは、海馬CA1領域において、低頻度持続刺激に対する興奮性シナプス応答に変化がみられ、シナプス小胞のリサイクリング動態に異常があることがわかった。また、シナプス後細胞特異的変異マウスでは、長期増強が減弱することを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

小胞体からのカルシウムの放出がシナプス伝達やシナプス可塑性にどのように關与するかという報告はこれまでにあまりなかったが、シナプス部位特異的変異マウスを作製して電気生理学的な解析を進めることで、その重要性の一端を解明することができた。また、細胞内でのカルシウム放出の異常がハンチントン病やアルツハイマー病、パーキンソン病に關与するとされているが、この成果はこれらの精神神経疾患の病因解明のための基礎データを提供できるものと考えられる。

研究成果の概要（英文）：To elucidate the role of the functional molecule X in the regulation of calcium dynamics in the presynaptic terminal and postsynaptic cell in the central nervous system, we generated the gene-targeted mice lacking the molecule X specifically in the presynaptic terminal or postsynaptic cell and performed electrophysiological analyses using their acute hippocampal slices. We found the impairments in the excitatory synaptic responses to low-frequency stimulation in mutant mice lacking the molecule X presynaptically, suggesting the abnormality in recycling of synaptic vesicles, and in long-term potentiation of excitatory synaptic transmission in mutant mice lacking the molecule X postsynaptically.

研究分野：神経生理学

キーワード：カルシウム シナプス伝達 長期増強 海馬 遺伝子改変マウス

1. 研究開始当初の背景

興奮性シナプスのシナプス前終末とシナプス後ニューロン間ではグルタミン酸により情報が伝達される。シナプス前終末に活動電位が到達するとカルシウムチャネルが活性化され、細胞内にカルシウムイオンが流入することにより、シナプス小胞がシナプス前膜と融合する。シナプス間隙に放出されたグルタミン酸が、シナプス後ニューロンのスパイン上に存在するグルタミン酸受容体に結合することにより、シナプス後ニューロンに情報が伝達される。

記憶形成に重要な役割を果たすと考えられている興奮性シナプスの長期増強 (LTP) では、通常のシナプス伝達を担うシナプス後細胞に存在する AMPA 受容体が可塑的修飾を受けることで伝達効率が長期的に増加する。一方、シナプス伝達の出発点であるシナプス前終末からのグルタミン酸放出機構については、それ自体も不明の点が多いが、放出機構の可塑性についてはほとんど知見がない。シナプス伝達という意味では、シナプス後細胞の修飾よりも、そのもととなるシナプス前終末での可塑性のほうがシナプス機能に与える影響は大きいと考えられるため、その機構を解明することは、脳の機能を理解するためには必須であるといえる。

グルタミン酸は、前述のように、カルシウムチャネルからカルシウムが流入することで放出されるが、このような直接的な放出機構だけでなく、シナプス前終末には小胞体などのカルシウムストアがあり、ここから放出されるカルシウムによっても修飾を受けると想定されているが、その実体についてはほとんど明らかになっていない。また、シナプス後部では、やはりグルタミン酸受容体の NMDA 受容体を介して流入するカルシウムにより LTP などのシナプス可塑性が誘導されるが、ここでも細胞内カルシウムストアの役割についての報告は少ない。

2. 研究の目的

これまでのシナプス可塑性に関する研究で、現在までに明らかにされているのは、ほとんどの場合、最も中心的で、直接的に強力な影響をもたらすシグナル伝達経路だけであり、シナプス可塑性を細胞内カルシウム放出によってさらに繊細に調節する機構についてはほとんど手つかずの状況である。生体におけるシナプスは、多くの脳部位から入力を受けており、時々刻々微調節されており、それに細胞内カルシウム放出が関与している可能性が高い。神経伝達物質放出やシナプス後細胞での可塑性の小さな変化の積み重ねによるシナプス機能の調節機構を解明することは、高次脳機能の本質を理解することにつながり、シナプス伝達研究分野を飛躍的に発展させることは間違いない。本研究計画の核心をなす学術的「問い」は、このような主要経路を適切に微調節するという、脳機能にとって、ある意味で最も重要な機構が、細胞内カルシウム放出による制御機構によりどのように実現されているかという点である。

本研究計画では、小胞体からのカルシウム放出に関与すると考えられる機能分子 X のシナプス伝達修飾機構における役割を解明することを目的とした。シナプス前終末からの神経伝達物質の放出過程における細胞内カルシウム動態やシナプス後細胞における基本的なシナプス伝達や LTP などのシナプス可塑性における分子 X の役割を明らかにすることを目指した。

3. 研究の方法

シナプス前終末特異的、および、シナプス後細胞特異的な分子 X の役割を明らかにするために、それぞれのシナプス部位特異的に分子 X を欠損する遺伝子改変マウスを作製した。シナプス前終末特異的なノックアウトマウスの作製では、東京大学大学院医学系研究科の三品研究室と新潟大学脳研究所の崎村研究室で開発された海馬 CA3 錐体細胞特異的に Cre を発現するトランスジェニックマウスと分子 X の loxP マウスを掛け合わせて作製した。この変異マウスでは、海馬 CA1 シナプスではシナプス前細胞だけで分子 X が欠損するため、CA1 シナプスで解析を行う場合にはシナプス前終末特異的なノックアウトマウスとみなせる。

一方、CaMKII のプロモータにより CA1 錐体細胞特異的に Cre を発現するマウスを当研究室で所有しているため、このトランスジェニックマウスと分子 X の loxP マウスを掛け合わせて、CA1 錐体細胞だけで分子 X を欠損する変異マウスを作製した。この変異マウスは、CA1 シナプスではシナプス後細胞特異的な分子 X 欠損マウスとみなせる。実際に、タンパク発現解析により、期待通りのノックアウトが実現されていることが確認できた。

これらの変異マウスから海馬スライス標本を作製して、電気生理学的解析を進めた。海馬 CA1 領域で、細胞外電位記録法により興奮性シナプス応答を記録した。

4. 研究成果

形態学的解析で分子 X が海馬に存在することを確認した。また、この分子がシナプス前タンパクと同じ分画に存在することを生化学的に確認した。分子 X のシナプス前終末特異的なノックアウトマウスでは、組織学的解析により分子 X がシナプス前細胞のみで欠損していることが確認できた。この変異マウスでは、神経伝達物質の放出確率に依存するパラメータである 2 発刺激促進 (paired-pulse facilitation : PPF) に遺伝子型間で違いがみられなかったため、分子 X が欠損しても放出確率は変化しないことがわかった。しかし、5 Hz の低頻度持続刺激により誘導さ

れる短期的なシナプス可塑性が増大し、その後に観察される持続刺激中のシナプス抑制が減弱することを見出した。このことから、分子 X が神経伝達物質放出の可塑性を制御していることが明らかとなった。今後は、パッチクランプ法を用いて、20Hz の持続刺激を与えて、シナプス小胞の供給速度とシナプス前終末内に蓄積されている小胞数を評価するための実験を進め、シナプス小胞動態に異常があるかどうかを確認する予定である。

一方、分子 X がシナプス後細胞に存在することを形態学的解析と生化学的解析により確認した。分子 X をシナプス後細胞特異的にノックアウトしたマウスでは、組織学的解析により分子 X がシナプス後細胞のみで欠損していることが確認できた。また、この変異マウスでは、入出力関係に異常がないことを確認した。すなわち、細胞外電位記録における刺激強度に対するシナプス応答(興奮性シナプス後電位のスロープ値)の關係に遺伝子型間で違いが観察されなかったことと PPF に違いがみられなかったことから、シナプス後部での AMPA 受容体の感受性にも変化がないことがわかった。これに対して、100 Hz 1 秒の高頻度刺激により誘導される LTP が減弱することを見出した。したがって、分子 X は通常のシナプス伝達には影響を与えないが、シナプス後細胞におけるシナプス可塑性の誘導・発現を調節していることが明らかになった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 10件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 10件）

1. 著者名 Arima-Yoshida et al.	4. 巻 10
2. 論文標題 Impairment of spatial memory accuracy improved by Cbr1 copy number resumption and GABAB receptor-dependent enhancement of synaptic inhibition in Down syndrome model mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 14187
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-020-71085-9	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 -
1. 著者名 Takahashi et al.	4. 巻 10
2. 論文標題 Hyperactive and impulsive behaviors of LMTK1 knockout mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 15461
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-020-72304-z	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 -
1. 著者名 Shirane et al.	4. 巻 13
2. 論文標題 Protrudin-deficient mice manifest depression-like behavior with abnormalities in activity, attention, and cued fear-conditioning	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Molecular Brain	6. 最初と最後の頁 146
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s13041-020-00693-3	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 -
1. 著者名 Ohnishi et al.	4. 巻 -
2. 論文標題 Cooperation of LIM domain binding 2 (LDB2) with EGR in the pathogenesis of schizophrenia	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 EMBO Molecular Medicine	6. 最初と最後の頁 e12574
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.15252/emmm.202012574	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 -

1. 著者名 Montrose et al.	4. 巻 414
2. 論文標題 Lmtk3-K0 mice display a range of behavioral abnormalities and have an impairment in GluA1 trafficking	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Neuroscience	6. 最初と最後の頁 154-167
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.neuroscience.2019.06.033	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 -

1. 著者名 Terumitsu-Tsujita et al.	4. 巻 -
2. 論文標題 Glial pathology in a novel spontaneous mutant mouse of the Eif2b5 gene: a vanishing white matter disease model	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Neurochemistry	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/jnc.14887	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 -

1. 著者名 Usui et al.	4. 巻 9
2. 論文標題 GPR40 activation initiates store operated Ca ²⁺ entry and potentiates insulin secretion via the IP3R1/STIM1/Orai1 pathway in pancreatic beta-cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 15562
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-52048-1	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 -

1. 著者名 Goto et al.	4. 巻 27
2. 論文標題 Gastrin-releasing peptide regulates fear learning under stressed conditions via activation of the amygdalostriatal transition area	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Molecular Psychiatry	6. 最初と最後の頁 1694-1703
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41380-021-01408-3	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 -

1. 著者名 Matsuura et al.	4. 巻 42
2. 論文標題 SIPA1L1/SPAR1 interacts with the neurabin family of proteins and is involved in GPCR signaling	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Neuroscience	6. 最初と最後の頁 2448-2473
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1523/JNEUROSCI.0569-21.2022	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 -

1. 著者名 Mori et al.	4. 巻 15
2. 論文標題 Loss of calsynenin paralogs disrupts interneuron stability and mouse behavior	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Molecular Brain	6. 最初と最後の頁 23
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s13041-022-00909-8	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4件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 Usui, R., Yabe, D., Fauzi, M., Goto, H., Botagarova, A., Tokumoto, S., Tatsuoka, H., Tahara, Y., Kobayashi, S., Manabe, T., Baba, Y., Kurosaki, T., Herrera, P., Ogura, M., Nagashima, K. and Inagaki, N.
2. 発表標題 GPR40 activation initiates store operated Ca ²⁺ entry and potentiates insulin secretion via the IP3R1/STIM1/Orai1 pathway in pancreatic beta-cells
3. 学会等名 American Diabetes Association (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Chimura, T., Kiyama, Y., Ogawa, I. and Manabe, T.
2. 発表標題 Identification and characterization of the novel synaptic protein UF1
3. 学会等名 Japan Neuroscience Society, Annual Meeting
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Kiyama, Y., Ohnishi, T., Arima-Yoshida, F., Kadota, M., Bito, H., Kuraku, S., Yoshikawa, T., Manabe, T. and Okuno, H.
2. 発表標題 Ldb2 modulates neuronal activities and fear learning by regulating Arc expression in the lateral nucleus of the amygdala
3. 学会等名 Japan Neuroscience Society, Annual Meeting
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Goto, F., Kiyama, Y., Ogawa, I., Okuno, H., Yoshida, N., Bito, H. and Manabe, T.
2. 発表標題 Gastrin-releasing peptide regulates fear learning under stressed conditions via activation of the amygdalostriatal transition area
3. 学会等名 Japan Neuroscience Society, Annual Meeting
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 真鍋 俊也	4. 発行年 2022年
2. 出版社 丸善出版	5. 総ページ数 910
3. 書名 ギャノン生理学 原書第26版 4章 興奮性組織：神経	

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>東京大学 医科学研究所 基礎医科学部門 神経ネットワーク分野 https://www.ims.u-tokyo.ac.jp/NeuronalNetwork/Neuronal_Network/Index_japanese.htm</p>
--

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
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------