

令和 5 年 5 月 15 日現在

機関番号：63905

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K06882

研究課題名(和文) ナトリウムポンプとグルタミン酸輸送体の機能連関：その生理的役割と制御機構

研究課題名(英文) Functional coupling between sodium pumps and glutamate transporters: its physiological role and regulatory mechanism

研究代表者

佐竹 伸一郎 (Satake, Shin'Ichiro)

生理学研究所・助教

研究者番号：30360340

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)：興奮性アミノ酸輸送体(excitatory amino acid transporter, EAAT)は、シナプス前終末から放出された興奮性伝達物質グルタミン酸(Glu)の回収を担い、神経伝達を速やかに終結させるとともに、過剰なGluの興奮毒性から神経細胞を保護する役割を持つ。エタノールがEAATのGlu輸送機能を促進することを発見し、その作用にNaポンプ(Na,K-ATPase)が関与することを示唆する結果を得た。また、抗がん剤候補物質 roscovitine (Cdk 1, 2, 5阻害薬)がシナプス種特異的な様式でシナプス小胞体の多重性開口放出を促進する作用の分子基盤を追究した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

神経細胞に発現するEAATは、シナプス伝達の終結や神経を保護する役割のみならず、Glu輸送速度(ターンオーバー)を変化させることにより、Gluの細胞外動態に影響を与えること、その結果としてGluのシナプス外拡散を介した神経情報処理を制御する役割を担っていることを見出した。またroscovitineを用いることにより、小脳興奮性シナプスにおいて多重性開口放出をコントロールすることが可能になった。Roscovitineは、シナプス間隙に放出されたGluの量的変化がEAATの機能におよぼす影響を検討する優れた実験モデルを提供すると期待される。

研究成果の概要(英文)：Excitatory amino acid transporters (EAATs) remove the excitatory neurotransmitter glutamate released at excitatory synapses as a function of the plasma membrane Na/K gradient generated by the sodium pump (Na,K-ATPase) and are responsible for terminating excitatory neurotransmission and protecting neurons from the excitotoxicity of excess glutamate. We found that ethanol increases EAAT activity in rat cerebellar Purkinje cells via a Na-pump (Na,K-ATPase)-dependent mechanism. We also investigated how roscovitine, a Cdk 1, 2, and 5 inhibitor, increases multivesicular release of synaptic vesicles in cerebellar glutamatergic synapses.

研究分野：神経生理学

キーワード：小脳 グルタミン酸輸送体 登上線維 プルキンエ細胞 籠細胞

1. 研究開始当初の背景

脳幹の下オリーブ核から小脳プルキンエ細胞に投射する登上線維から放出された興奮性伝達物質グルタミン酸 (L-glutamate, Glu) は、プルキンエ細胞を強力に脱分極させるのみならず、シナプス外にも拡散する。拡散した Glu は、分子層介在神経(籠細胞) 軸索終末に発現する AMPA 受容体 (GluA2/3) に作用することにより、介在神経-プルキンエ細胞間の GABA 作動性伝達にシナプス前抑制を引き起こす (異種シナプス抑制; Satake et al., 2000, 2006)。

Glu が登上線維終末から介在神経終末に拡散する過程は、グルタミン酸輸送体 (興奮性アミノ酸輸送体 excitatory amino acid transporter, EAAT) を中核とする Glu 回収機構によって制御されている (Satake et al., 2010)。EAAT は、細胞の種類によって発現するサブタイプが異なり、小脳プルキンエ細胞では EAAT4 が、バークマングリア (Bergmann glia, 小脳の主要なグリア細胞でアストロサイトの一種) では GLAST/EAAT1 と GLT-1/EAAT2 が発現している。遺伝子改変マウスを用いた研究から、これら異なるサブタイプの EAAT は、それぞれが Glu の回収過程において独立した役割を担っていると考えられている (Takayasu et al., 2009)。

こうした例として私たちは、プルキンエ細胞特異的に発現する EAAT4 が異種シナプス抑制 (登上線維由来の Glu がシナプス外に拡散していく過程) に強い影響を与えることを報告している (Satake et al., 2010)。しかし、EAAT の機能制御に関わる分子の基盤はこれまで明らかにされておらず、詳しく検討する必要があると考えた。

2. 研究の目的

EAAT は、ナトリウムポンプ (sodium pump, Na,K-ATPase) が作り出す細胞膜間 Na^+/K^+ 勾配を利用して、神経細胞から放出された興奮性伝達物質 Glu の回収を担い、神経伝達を速やかに終結させるとともに、過剰な Glu の興奮毒性から神経細胞を保護する役割を持つ。細胞膜上において、Na ポンプと EAAT が近接しており、両者が協働的な関係にあることは古くから指摘されてきた。しかしながら、両タンパク質の生物物理学的な特性ならびにその機能相関の生理学的な意義は解き明かされていなかった。本研究では、Na ポンプ-EAAT 機能連関を介した Glu 回収系の制御機構に焦点を当て、EAAT が脳・中枢神経系の情報処理システムにおいて中核的な役割を果たす可能性を検討することを目的とした。

3. 研究の方法

自然科学研究機構・動物資源共同利用研究センターの指針に従い、動物実験を遂行した。当機構の動物実験委員会において実験計画書の審査を受けた後、承認された方法により研究を行った。実験動物に過剰な苦痛を与えることのないよう、麻酔ならびに安楽死の処置には十分な注意を払った。実験には、出生後 2-3 週齢の Wistar ラットを用いた。小脳よりスライス標本 (傍矢状断, 250 μm) を作製し、電気生理学的手法 (全細胞パッチクランプ法) を適用した (Satake et al., 2000, 2006)。

EAAT は、1 分子の Glu⁻ を細胞内へ輸送する過程において、3 つの Na^+ と 1 つの H^+ を共輸送するとともに 1 つの K^+ を逆輸送する。このため EAAT は、細胞外から細胞内への Glu 輸送に伴い内向き電流を発生させる (即ち、EAAT の Glu 輸送は起電性を示す)。これまでに、プルキンエ細胞に電位固定法を適用して、登上線維終末から放出された Glu によって誘発される EAAT 電流 (シナプス性輸送体電流 synaptic transporter current, STC) を記録する方法を確立し、細胞外 Glu の動態解析に用いてきた (Satake et al., 2010)。しかし、この方法により記録されるのは、シナプス近傍に局在する EAAT に由来する一部の電流のみであり、1 個の細胞が担う Glu 回収の総量を解析することはできなかった。この問題を解決するため、Brasnjo and Otis (2004) の方法を参考にして、光解除性 Glu を用いた EAAT 電流誘発・記録システムを構築した。さらに光の照射範囲を記録細胞の樹状突起 (dendritic arbor) を包含するよう調整し、細胞毒性を避けるため可視光線 (430 nm) のパルス照射により Glu を遊離する光解除性物質 Ru-Bi-glutamate を適用するシステムに改良した。

この方法を用いて、神経細胞やグリア細胞の Glu 回収能を直接記録するとともに、薬理学実験と組み合わせることにより、EAAT の Glu 輸送行程 (ターンオーバー) やその制御機構 (分子機構) を検討した。光解除誘発性輸送体電流 (photo-uncaging evoked transporter currents, PTC) 減衰相のキネティクス解析には、二重指数関数 (double-exponential fitting procedure) を適用した (Satake et al., 2012)。受容体や輸送体の作動薬/阻害薬ならびに細胞内シグナル伝達に関わる各種モジュレータ試薬の影響は、脳スライス標本に灌流液 (人工脳髄液) を介して投与することにより観察した。

4. 研究成果

(1) エタノールの EAAT 機能亢進作用：分子的基盤の追究

小脳プルキンエ細胞の EAAT は、生理的濃度 (25–100 mM) のエタノールによりその Glu 輸送機能が亢進し、登上線維伝達物質 Glu のシナプス外拡散を抑制することを発見した。光感受性 RuBi-Glu の光遊離 (光照射時間: 500 ms) に伴い記録される EAAT 電流 (PTC; Bergles et al., 1997) と EAAT の Glu 輸送モデル (代替アクセスモデル) に基づき、プルキンエ細胞の Glu 輸送行程を評価した。この実験条件において誘発した PTC は、一過性成分 (PTC_{transient}) と持続性成分 (PTC_{steady}) の二つに分けることができ、エタノール (50 mM) は PTC_{steady} の振幅を選択的に増大させることを見出した (PTC_{transient} には無効)。エタノールには、EAAT のターンオーバー (Glu 輸送行程の回転速度) を亢進させる作用があると結論した。この作用は、アルコール摂取に伴う小脳機能障害に関与する分子細胞基盤の一つであると考えられる。

エタノールが EAAT の機能を亢進するメカニズムを明らかにするため、Na ポンプ (Na,K-ATPase) に焦点を当て、薬理学的手法による検討を行った。Na ポンプ阻害薬 ouabain (0.2 μM) は、PTC_{steady} の振幅を減弱させた (PTC_{transient} には無効)。また、エタノールの PTC_{steady} 増強作用も ouabain により消失した。これらの結果は、EAAT のターンオーバーが Na ポンプによる制御を受けていること、エタノールの EAAT 機能増強作用が Na ポンプを介して引き起こされていることを示唆している。Na ポンプ (ouabain の作用濃度から α3 サブユニットを含む複合体と推定) は、EAAT4 との物理的結合 (Rose et al., 2009) を介して、Glu 輸送に伴う細胞膜間 Na⁺/K⁺濃度勾配の減少を直ちに感知し、その減少を速やかに回復させることにより、『Glu 輸送ダイナミクスを制御する役割』を担っていると考えられる。

エタノールの EAAT 増強作用は、タンパク質キナーゼ C (protein kinase C, PKC) 阻害薬 GF109203X ならびに PI3 キナーゼ (phosphatidylinositol 3-kinase) 阻害薬 wortmannin により消失した。一方、PKC 作動薬ホルボルエステル PDBu (phorbol 12,13-dibutyrate) や PMA (phorbol 12-myristate 13-acetate) に EAAT 増強作用は認められなかった。エタノールが EAAT の Glu 輸送機能を促進する作用には PKC の活性が必要であるものの、PKC の機能を促進してもエタノールの作用は再現できないことを示している。PKC は、EAAT の機能を制御するメカニズムの維持に関わるなど、補助的な位置付けにあると推定される。

(2) EAAT による細胞外 Glu の動態制御

プルキンエ細胞が登上線維 Glu を回収する過程を解析するため、登上線維の電気刺激に伴いプルキンエ細胞において誘発される、シナプス性輸送体電流 (STC) を観察した。Dextran (40 kDa, 5%; D-glucose の重合多糖類) は、STC の振幅を可逆的に増大させた。この STC 増大は、登上線維 Glu がシナプス間隙から拡散していく過程が dextran によって物理的に阻害されたことに伴い、シナプス近傍に滞留した Glu がより多くの EAAT 分子によって回収されている様子を反映している。

一方、エタノール (50 mM) は、登上線維 プルキンエ細胞間 STC の振幅を有意に減弱させた (減衰時間 τ_{decay} には無効)。エタノールは、EAAT のターンオーバーを促進する作用を介して、シナプス近傍の Glu 量を恒常的に減少させているため、登上線維終末から放出された Glu の回収に関わった EAAT 分子の数も併せて減少したと考えられる。神経細胞の EAAT は、シナプス伝達の終結や神経を保護する役割のみならず、Glu 輸送活性をダイナミックに変化させることにより、Glu の細胞外動態に影響を与えること、その結果として Glu のシナプス外拡散を介した神経情報処理 (hetero-/intersynaptic modulation) を制御する機能素子としての役割も担っていることを示唆している。

(3) Roscovitine がシナプス小胞体の多重性放出を亢進する作用の分子的基盤

抗がん剤候補物質 roscovitine (seliciclib, CYC202; cyclin-dependent kinase, Cdk 1, 2, 5 阻害薬) には、小脳顆粒細胞 分子層介在神経間 Glu 作動性シナプスならびに小脳顆粒細胞 プルキンエ細胞間 Glu 作動性シナプスにおいて、シナプス小胞体の多重性放出 (multivesicular release, MVR) を促進させる作用がある (Satake and Imoto, 2014; Satake and Konishi, 2020)。また roscovitine は、小脳分子層介在神経 プルキンエ細胞間 GABA 作動性シナプスにおいて記録した、抑制性シナプス後電流 (inhibitory postsynaptic current, IPSC) の振幅と減衰時間 (τ_{decay}) を同じく MVR の亢進により増大させることができる (Satake and Konishi, 2020)。

Roscovitine の作用機序を電位依存性カルシウムチャネル (Ca_v) 集合体と開口放出 Ca^{2+} センサーの位置関係に焦点を当てて検討した。細胞膜透過型の緩徐結合性 Ca^{2+} キレート薬 EGTA-AM (100 μM) を小脳スライス標本に先行投与することにより、roscovitine (30 μM) の興奮性シナプス後電流 (excitatory postsynaptic current, EPSC) 増大作用は著しく減弱した。一方、roscovitine による IPSC 増大は、急速結合性 Ca^{2+} キレート薬 BAPTA-AM (100 μM) により強く阻害された (EGTA-AM は無効)。これらの結果は、roscovitine の MVR 亢進作用は興奮性シナプスと抑制性シナプスでは発現機構が異なること、特に興奮性ニューロン顆粒細胞の軸索終

末において 内在性 Ca^{2+} 緩衝機構 (Ca^{2+} buffer) と Ca^{2+} マイクロドメインシグナル機構 (即ち、 Ca_v チャンネル集合体から遠位にある開口放出 Ca^{2+} センサーの動員) が MVR の誘発に主要な役割を担っていることを示唆している (Satake and Konishi, 2021)。興奮性シナプスと抑制性シナプスにおける roscovitine の MVR 促進作用の違いは、シナプス前終末に局在する Ca^{2+} 結合タンパク質 (calretinin, parvalbumin) の性質の違いと関係があると推定し、引き続き詳細な解析を進めている。

Roscovitine には Cdk 阻害作用に併せて、 $\text{Ca}_v2.1$ チャンネルと $\text{Ca}_v2.2$ チャンネルの機能を直接的に促進する作用があることが報告されている (Yan et al., 2002)。Roscovitine の MVR 亢進作用にこうした効果が関与していた可能性を検討するため、roscovitine アナログ GV-58 (Cdk 阻害作用のみを欠損させた Ca_v2 チャンネル作動薬; Tarr et al., 2013) が小脳シナプス伝達におよぼす影響を観察した。GV-58 は、顆粒細胞-プルキンエ細胞間の Glu 作動性シナプス伝達ならびに介在神経-プルキンエ細胞間の GABA 作動性シナプス伝達のいずれに対しても有意な促進作用を示さなかった。この結果に基づき roscovitine は、 Ca_v2 チャンネル作動薬としてではなく、Cdk5 の阻害作用を介して MVR を誘発したと結論した。

このように roscovitine を用いることで、ラット小脳興奮性シナプスにおいて MVR をコントロールすることが可能になった。EAAT の Glu 輸送動態は細胞外に存在する Glu の量 (濃度) に依存して大きく変化することから、roscovitine はシナプス間隙に放出された Glu の量的変化が EAAT の Glu 輸送機能におよぼす影響を検討する優れた実験モデルになると期待される。

<参考文献>

- Bergles D. E., Dzubay J. A., Jahr C. E. (1997) Glutamate transporter currents in Bergmann glial cells follow the time course of extrasynaptic glutamate. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 14821–14825.
- Brasnjo G., Otis T. S. (2004) Isolation of glutamate transport-coupled charge flux and estimation of glutamate uptake at the climbing fiber-Purkinje cell synapse. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101, 6273–6278.
- Rose E. M., Koo J. C. P., Antflick J. E., Ahmed S. M., Angers S., Hampson D. R. (2009) Glutamate transporter coupling to Na,K-ATPase. *J. Neurosci.* 29, 8143–8155.
- Satake S., Saitow F., Yamada J., Konishi S. (2000) Synaptic activation of AMPA receptors inhibits GABA release from cerebellar interneurons. *Nat. Neurosci.* 3, 551–558.
- Satake S., Song S.-Y., Cao Q., Satoh H., Rusakov D. A., Yanagawa Y., Ling E.-A., Imoto K., Konishi S. (2006) Characterization of AMPA receptors targeted by the climbing fiber transmitter mediating presynaptic inhibition of GABAergic transmission at cerebellar interneuron-Purkinje cell synapses. *J. Neurosci.* 26, 2278–2289.
- Satake S., Song S.-Y., Konishi S., Imoto K. (2010) Glutamate transporter EAAT4 in Purkinje cells controls intersynaptic diffusion of climbing fiber transmitter mediating inhibition of GABA release from interneurons. *Eur. J. Neurosci.* 32, 1843–1853.
- Satake S., Inoue T., Imoto K. (2012) Paired-pulse facilitation of multivesicular release and intersynaptic spillover of glutamate at rat cerebellar granule cell-interneurone synapses. *J. Physiol.* 590, 5653–5675.
- Satake S., Imoto K. (2014) $\text{Ca}_v2.1$ channels control multivesicular release by relying on their distance from exocytotic Ca^{2+} sensors at rat cerebellar granule cells. *J. Neurosci.* 34, 1462–1474.
- Satake S., Konishi S. (2020) Roscovitine differentially facilitates cerebellar glutamatergic and GABAergic neurotransmission by enhancing $\text{Ca}_v2.1$ channel-mediated multivesicular release. *Eur. J. Neurosci.* 52, 3002–3021.
- Satake S., Konishi S. (2021) Topographical distance between presynaptic Ca^{2+} channels and exocytotic Ca^{2+} sensors contributes to differential facilitatory actions of roscovitine on neurotransmitter release at cerebellar glutamatergic and GABAergic synapses. *Eur. J. Neurosci.* 54, 7048–7062.
- Takayasu Y., Iino M., Takatsuru Y., Tanaka K., Ozawa S. (2009) Functions of glutamate transporters in cerebellar Purkinje cell synapses. *Acta Physiol.* 197, 1–12.
- Tarr T. B., Malick W., Liang M., Valdomir G., Frasso M., Lacomis D., Reddel S. W., Garcia-Ocano A., Wipf P., Meriney S. D. (2013) Evaluation of a novel calcium channel agonist for therapeutic potential in Lambert-Eaton myasthenic syndrome. *J. Neurosci.* 33, 10559–10567.
- Yan Z., Chi P., Bibb J. A., Ryan T. A., Greengard P. (2002) Roscovitine: a novel regulator of P/Q-type calcium channels and transmitter release in central neurons. *J. Physiol.* 540, 761–770.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Rey S., Maton G., Satake S., Llano I., Kang S., Surmeier D. J., Silverman R. B., Collin T.	4. 巻 155
2. 論文標題 Physiological involvement of presynaptic L-type voltage-dependent calcium channels in GABA release of cerebellar molecular layer interneurons	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Neurochemistry	6. 最初と最後の頁 390-402
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/jnc.15100	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Satake S., Konishi S.	4. 巻 54
2. 論文標題 Topographical distance between presynaptic Ca ²⁺ channels and exocytotic Ca ²⁺ sensors contributes to differential facilitatory actions of roscovitine on neurotransmitter release at cerebellar glutamatergic and GABAergic synapses	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 European Journal of Neuroscience	6. 最初と最後の頁 7048-7062
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/ejn.15487	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 佐竹伸一郎
2. 発表標題 エタノールの小脳プルキンエ細胞グルタミン酸輸送体促進作用：Naポンプの関与
3. 学会等名 第43回日本神経科学大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 佐竹伸一郎、池田啓子
2. 発表標題 Atp1a2遺伝子ヘテロ欠損マウス扁桃体における抑制性シナプス伝達の亢進
3. 学会等名 第44回日本神経科学大会、第1回CJK国際会議
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 池田啓子、佐竹伸一郎、知見聡美、南部 篤
2. 発表標題 Naポンプ 3サブユニット遺伝子関連神経疾患の病態基盤 - 病態モデル動物を使った解析から -
3. 学会等名 第64回日本小児神経学会学術集会・企画シンポジウム 『ATP1A3変異の多面性と病態 - AHC, CAPOS, RDP, DEE, PMG, etc. - 』（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 佐竹伸一郎
2. 発表標題 エタノールはラット小脳においてプルキンエ細胞のグルタミン酸回収機能を亢進することにより登上線維伝達物質のシナプス外拡散を阻害する
3. 学会等名 日本動物学会第93回大会
4. 発表年 2022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
---------------------------	-----------------------	----

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