

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 6月12日現在

機関番号：17601

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22300122

研究課題名（和文） シナプス可塑性の分子機構の解明とその疾患における意義

研究課題名（英文） Study of the molecular mechanisms of synaptic plasticity and its involvements in human diseases.

研究代表者

高宮 考悟（TAKAMIYA KOGO）

宮崎大学・医学部・教授

研究者番号：40283767

研究成果の概要（和文）：学習・記憶の基本となる神経機能であるシナプス可塑性の分子メカニズムの解析を行った。特にその中心となる AMPA 型グルタミン酸受容体の輸送に関わるとされる GRIP に関して、その役割を検討したところ GRIP は exocyst に局在することがわかり、シナプス可塑性において AMPA 型グルタミン酸受容体を細胞表面に輸送することに重要な役割を果たしている事が明らかとなった。さらに、シナプス可塑性の分子メカニズムを *in vivo* で観察するために海馬への正確な遺伝子導入法を確立した。

研究成果の概要（英文）：We studied the molecular mechanisms of synaptic plasticity in this project. In particular, we focused on the GRIP protein on AMPA receptor trafficking, which plays a key role in synaptic plasticity expression. It turned out that GRIP is located in exocyst and play an important function in AMPA receptor cell surface expression. In addition, we have established a system to accurately introduce exogenous gene into hippocampus to study synaptic plasticity *in vivo*.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	5,900,000	1,770,000	7,670,000
2011年度	4,100,000	1,230,000	5,330,000
2012年度	3,900,000	1,170,000	5,070,000
年度			
年度			
総計	13,900,000	4,170,000	18,070,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：神経化学・神経薬理学

キーワード：シナプス可塑性、グルタミン酸受容体、学習・記憶

1. 研究開始当初の背景

学習や記憶といった高次脳神経機能は、人間が人として存在するための根本的なものである。この学習や記憶は、その基本的なメカニズムとしてシナプス可塑性が提唱された。さらにこれを裏付け

るシナプス長期増強・長期抑圧現象が発見され、これらが学習・記憶の *in vitro* モデルとして長く用いられ、特にその分子機構の解明にむけてさかんに研究がなされてきた。この

10年の間、遺伝子・タンパク質レベルにおいて著しい進歩をとげ、シナプス可塑性において中心的役割を果たすグルタミン酸受容体とその分子修飾やそれらの機能を制御するさまざまな分子が発見されるとともに、シナプス可塑性の分子メカニズムの全貌が急激に明らかとなってきた。特に代表的なシナプス可塑性である海馬 CA1 におけるシナプス長期増強現象 (Long Term Potentiation: LTP) の分子機構は、その詳細がかなり明らかとなってきており、他の部位の可塑性を理解する上でモデルとなるものである。近年のシナプス可塑性の分子機構に関する急速な理解により、シナプス可塑性の本体として“シナプスにおける AMPA 型グルタミン酸受容体のシナプス内外への輸送”が考えられている。しかし、このシナプス可塑性の分子メカニズムの解明は最終局面にきているものの完全な理解には、未だ不明な部分もあり、さらに脳全体の中の神経ネットワークにおける働きを関連づけて明らかとすることが高次脳神経機能としての学習・記憶の形成メカニズムを理解する上で必須である。またこのシナプス可塑性は、近年学習・記憶だけでなく、うつ病や痛みのメカニズムなどの疾患の原因としても注目されており、この研究によりこれら疾患の理解が進むと考えられる。

2. 研究の目的

現在シナプス可塑性は、その発現を直接制御する AMPA 型グルタミン酸受容体が神経活動依存的にシナプス内外を移動することにより制御されていることがわかってきた。この AMPA 型グルタミン酸受容体のトラフィッキングにおいて重要な役割をしているのが細胞内ドメインカルボキシル末端に結合するタンパク質である GRIP1 や Pick1 である。これらタンパク質は、AMPA 型グルタミン酸受容体のうち GluA2,3,4 のトラフィッキングに関与していると考えられている。今回われわれは、これら結合タンパク質のうち GRIP1 の AMPA 型グルタミン酸受容体のトラフィッキングにおける役割を培養神経細胞を用いて解析を

行った。

また、海馬におけるシナプス可塑性の分子機構を *in vivo* レベルで解析するためマウスの海馬へウイルスを正確に導入する方法として、定位脳装置を用いて海馬で多く発現される脳波である θ 波をモニターしながらウイルスをインジェクションする方法を確立する。

3. 研究の方法

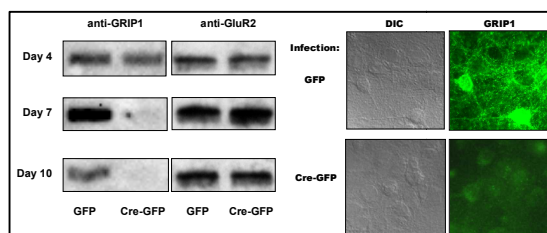
GRIP1 ノックアウトマウスは、出血をおこし胎生期に死亡する。そのためコンディショナルマウスを作成し、このマウス胎児より調整した初代神経細胞に Cre リコンビナーゼを発現するレンチウイルスを感染させることにより、GRIP1 タンパク質を欠損させた。さらに GRIP1 の homologous gene である GRIP2 とのノックアウトマウスと交配させることにより GRIP1flox/floxGRIP2^{-/-}マウスを作成し、このマウスからも同様に初代神経細胞を調整し、Cre リコンビナーゼを発現させることにより GRIP1 と GRIP2 の両者を欠損した神経細胞を作成して、これら神経細胞において AMPA 型グルタミン酸受容体のトラフィッキングを観察した。その観察方法としては、細胞表面のビオチン化による AMPA 型グルタミン酸受容体の定量化を行った。また通常の免疫染色に加え、pH 感受性 GFP を AMPA 型グルタミン酸受容体に融合させたコンストラクトを遺伝子導入し、NMDA 刺激を行った際、細胞内に取り込まれ、再び細胞表面に挿入されるまでの挙動を経時的に観察した。また、生化学的にエキソサイトシスに関与する exocyst を構成するタンパク質との相互作用を免疫沈降法等で検討した。

4. 研究成果

GRIP1flox/flox マウス E18.5 より調整した神

神経細胞に DIV7 において GFP, GFP-Cre を発現するレンチウイルスを感染させた。GRIP1 の発現量を感染後 4,7,10 日目にタンパク質を調整して抗 GRIP1 抗体を用いてウェスタン解析を行った。感染後 7 日目で GRIP1 のタンパク質の発現が消失している。それに対し、GFP を感染させた神経細胞における GRIP1 の発現や、両者における GluR2 の発現量に差をみとめなかった。

図 1. Cre リコンビナーゼによる GRIP1 コンディショナルマウス神経細胞における GRIP1 欠損



1) AMPA 型グルタミン酸受容体は GluA1-4 の 4 つのサブユニットから構成され、GRIP1 は、このうち GluA2,3,4 の細胞内ドメインカルボキシル末端と結合する。今回、これらのうち海馬において主に存在する GluA2 サブユニットについて観察を行った。GRIP1/GRIP2 の両者を欠損した神経細胞において通常の状態における細胞表面の GluA2 の発現量は、野生型と比較し差が無かった。しかし、NMDA を用いて、細胞表面の GluA2 が細胞内に取り込まれ 30 分程度で再度細胞表面に戻ってくる recycling 現象を観察したところ GRIP1/GRIP2 の両者を欠損した神経細胞では、NMDA 刺激後 30 分後において、より多くの GluA2 が細胞内に多く貯留していることがわかった。このことは、pH 感受性 GFP を AMPA 型グルタミン酸受容体に融合させたコンストラクトを GRIP1/GRIP2 を欠損した神経細胞に遺伝子導入し、その GFP のシグナルの経時的観察でも同様の現象が見られた。特に、一端内部に取り込まれた受容体が再度細胞膜に挿入する過程に遅延が見られた。以上より、GRIP1/GRIP2 は NMDA

などによる神経活動依存的に受容体がリサイクリングされる過程に重要であることが示唆された。

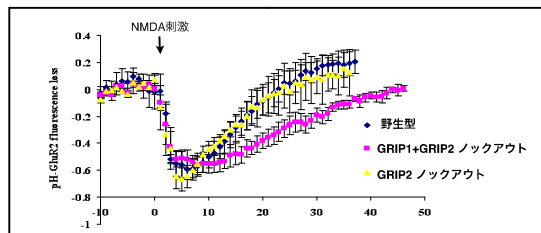


図 2. NMDA 刺激による pH 感受性 GFP-GluA2 融合受容体のリサイクリング解析

2) さらに GRIP1 は、recycling endosome に存在し、そこから細胞膜との融合に関与する exocytosis と呼ばれる顆粒の構成成分との相互作用を検討した。するとそのうち Sec8 と結合することが明らかとなり、GRIP1/2 は、exocyst において Sec8 と結合し神経活動依存的な AMPA 型グルタミン酸受容体の細胞膜へのトラフィックに関与していることが明らかとなった。

GRIP1 と exocyst 構成タンパク質である Sec8 との相互作用を免疫沈降法を用いて解析した。GRIP1 と Sec8 は、抗 GRIP1 抗体、抗 GluA2 抗体を用いた免疫沈降法にて共沈する。Sec8 との弱い相互作用もみとめらる。免疫染色にて GRIP1 と Sec8 との共局在も確認された。

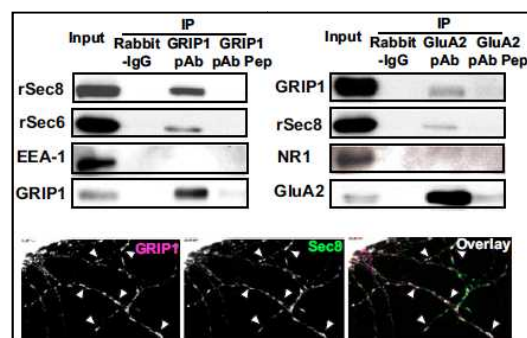


図 3. GRIP1, Sec8 の相互作用の解析

3) また近年培養神経細胞がさかんに研究に使用されているが、尚マウスを用いた

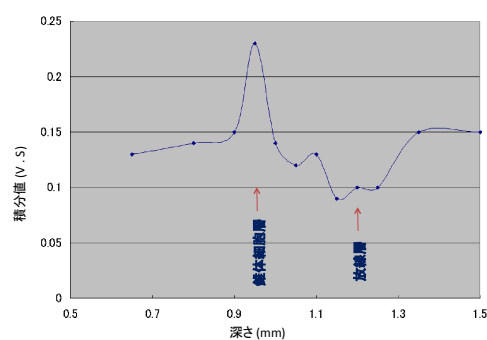
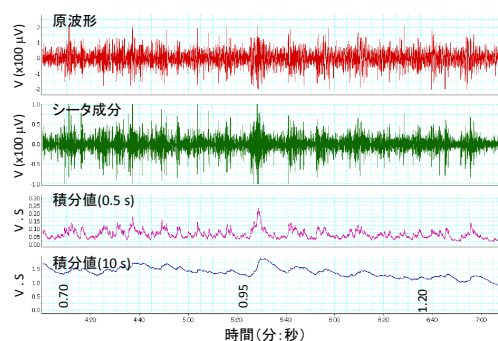
*in vivo*の研究は、多くの有用な情報をもたらす。さらに近年遺伝子操作マウスがさかんに作成され、それらに遺伝子導入が効率よく行うことが要求される。このために我々は、ウイルスベクターを注入するためのガラス管と脳波をモニターするための電極を組み合わせ、海馬で特徴的な脳波である θ 波を指標に、正確に海馬 CA1 錐体細胞層を同定し、ウイルスを用いて遺伝子導入する方法を確立した（論文投稿中）。

脳表の原点から大脳皮質内である 0.5mm まで針を降下させ、この間の脳波については評価しなかった。そして、それより深部において、0.05mm ごとに各深度で約 20 秒程度、脳波を観察・記録した。このときリアルタイムでデジタルフィルター処理を行い、シータ成分の波形のみを観察すると共に、全波整流を行った後に時定数 0.5 秒と 10 秒で積分を行った。その積分値をシータ成分の出現率や振幅の大きさに関する客観的な指標とし、各深度毎のシータ成分を解析した。

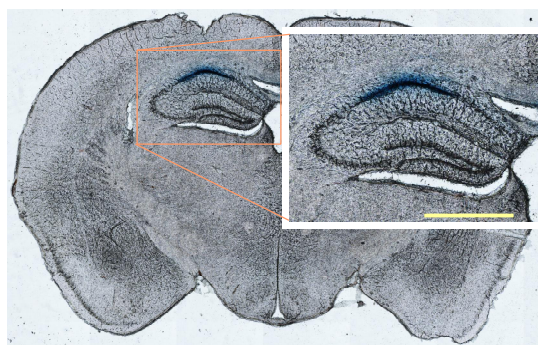
CA1 錐体細胞層より上部の大脳皮質もしくは側脳室周辺でもシータ成分が存在するものの、その積分値は CA1 錐体細胞層のそれより小さいことが確認できた。例として CA1 錐体細胞層付近（深さ 0.95mm）とその下にある放線層付近（深さ 1.20mm）のシータ成分とその積分値の変動を図に示した。上段から脳波の原波形、デジタルフィルターにより抽出したシータ成分、時定数 0.5 秒での積分値、および時定数 10 秒の積分値を示した。図に示すようにシータ成分は一定ではなく数秒から 10 秒程度の時間で増減を繰り返している。

この両者を含み全体で約 3 分間の連続したトレースを下図に示した。シータ波は定常的に出現しているものでなく増減を繰り返すが、その振幅は深さに対応した変化を示していることがデジタルフィルタ出力の振幅、および積分値の変化として確認することができた。図中に示す 0.95mm のシータ波のピークを示す地点が、CA1 錐体細胞層であ

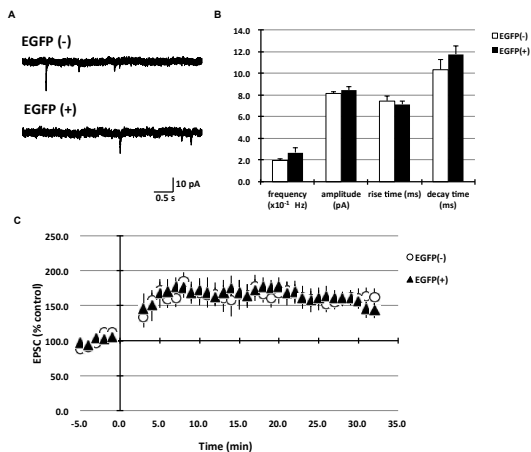
ることが示唆された。更に深部へ進むと一旦、積分値が低下した後に増大することが明らかとなった。



これら両者のピークから判断してこのマウス個体の場合、0.95mm の深さが CA1 錐体細胞層に最も近いと判断して色素を注入し正しく注入されていることを、脳切片を作成して確認した。



さらに、GFP を発現するレンチウイルスを注入し、感染神経細胞と非感染細胞の間において AMPA 型グルタミン酸受容体の電流 (miniEPSC、下図 A, B) や LTP (下図 C) の誘導に影響を与えない事を確認した。



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 7 件)

"Involvement of AMPA Receptor GluR2 and GluR3 Trafficking in Trigeminal Spinal Subnucleus Caudalis and C1/C2 Neurons in Acute-Facial Inflammatory Pain."

Miyamoto M, Tsuboi Y, Honda K, Kobayashi M, Takamiya K, Huganir RL, Kondo M, Shinoda M, Sessle BJ, Katagiri A, Kita D, Suzuki I, Oi Y, Iwata K. *PLoS One* (7) e44055, 2012 (査読有)

"[Molecular mechanisms of synaptic plasticity underlying learning and memory]." Takamiya K. *Seikagaku* (83) 1016-1026, 2011 (査読無し)

"Involvement of GluR2 and GluR3 subunit C-termini in the trigeminal spinal subnucleus caudalis and C1-C2 neurons in trigeminal neuropathic pain." Miyamoto M, Tsuboi Y, Takamiya K, Huganir RL, Kondo M, Shinoda M, Oi Y, Iwata K. *Neuroscience letters* (491) 8-12, 2011 (査読有)

"Enhanced synaptic plasticity in mice with phosphomimetic mutation of the GluA1 AMPA receptor." Makino Y, Johnson RC, Yu Y, Takamiya K, Huganir RL. *Proc Natl Acad Sci US A* (108) 8450-8455, 2011 (査読有)

"Phosphorylation of AMPA receptors is required for sensory deprivation-induced homeostatic synaptic plasticity." Goel A, Xu LW, Snyder KP, Song L, Goenaga-Vazquez Y, Megill A, Takamiya K, Huganir RL,

Lee HK. *PLoS One* (6) e18264, 2011 (査読有)

"Developmental regulation of protein interacting with C kinase 1 (PICK1) function in hippocampal synaptic plasticity and learning." Volk L, Kim CH, Takamiya K, Yu Y, Huganir RL. *Proc Natl Acad Sci US A* (107) 21784-21789, 2010 (査読有)

"GRIP1 and 2 regulate activity-dependent AMPA receptor recycling via exocyst complex interactions." Mao L, Takamiya K, Thomas G, Lin DT, Huganir RL. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* (107) 19038-19043, 2010 (査読有)

[学会発表] (計 2 件)

北米神経科学界 2012

H. Madhyastha, M. Maruyama, K. Takamiya Organic and inorganic arsenic impair synaptic potentials: Studies on GluA1 trafficking.

第 35 回日本神経科学大会

Y. Wakazono, J. Tsutajima, T. Kunitake, K. Takamiya

LTP 誘導機構解明のための海馬 CA1 領域選択的、外来遺伝子導入法の確立とその適用 Application of hippocampus CA1-selective gene transfer system for analyzing LTP expression mechanisms

[その他]

ホームページ等

<http://www.med.miyazaki-u.ac.jp/1physiol/default.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高宮 考悟 (TAKAMIYA KOGO)

宮崎大学・医学部・教授

研究者番号：40283767

(2) 研究分担者

なし

(3)連携研究者

若園 佳彦 (WAKAZONO YOSHIHIKO)

宮崎大学・医学部・助教

研究者番号：90377755