

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 5月31日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22500369

研究課題名（和文） アストロサイト内カルシウムイオン濃度変動の高次脳機能における役割の解明

研究課題名（英文） Investigation of the role of astrocytic Ca²⁺ signaling in higher brain functions

研究代表者

田中 三佳 (TANAKA MIKA) 研究者番号：70311347

独立行政法人理化学研究所・行動遺伝学技術開発チーム・専門職研究員

研究成果の概要（和文）：本研究では、アストロサイト内 Ca²⁺ 濃度変動が高次脳機能において担う役割を調べるために申請者が開発した「アストロサイト内 Ca²⁺ 濃度変動抑制マウス」の電気生理学解析を行った。このマウスでは海馬においてシナプスを取り囲むアストロサイトの突起が減少していることが確認されていたが、本研究によりその異常はシナプス間隙のグルタミン酸のスピルオーバーを引き起こし、記憶学習に影響を及ぼしていることが明らかになった。

研究成果の概要（英文）：To examine the role of astrocytic Ca²⁺ signaling in higher brain functions, we generated an inducible transgenic mouse model in which astrocytic Ca²⁺ signaling is attenuated. Attenuated Ca²⁺ activity correlated with reduced astrocytic coverage of asymmetric synapses in the hippocampal CA1 region in these animals. The decreased astrocytic ‘protection’ of the synapses facilitated glutamate ‘spillover’, and these mice exhibited behavioral impairments in which hippocampal circuits are involved.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	0	0	0
2009年度	0	0	0
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2012年度	1,100,000	330,000	1,430,000
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：脳神経科学・融合基盤脳科学

キーワード：アストロサイト、カルシウムイオン、トリパータイトシナプス

1. 研究開始当初の背景

アストロサイトは多方向性に突起を伸ばし、それらが個々のシナプスを覆うような構造をつくっている。近年の *in vitro* あるいは *in situ* の実験からは、アストロサイトが自発的あるいはシナプスより放出される神経

伝達物質に応答した細胞内 Ca²⁺濃度の上昇を起こし、グルタメート、ATP、D-セリンなどのグリオトランスミッターを放出してシナプス伝達の効率を調節する機能を持つことが示唆されていた。アストロサイトにおける自発的あるいは神経伝達物質に応答した細

胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇は *in vivo* でも観察されていたが、アストロサイト内 Ca^{2+} 濃度変動を介した神経細胞-アストロサイト間相互作用の脳機能における意義は未だ明らかにされていなかった。自発的あるいは神経伝達物質に応答したアストロサイト内 Ca^{2+} 濃度の上昇には、 IP_3 レセプターを介した細胞内 Ca^{2+} ストアからの Ca^{2+} リリースが寄与することが知られている。そこで申請者は、細胞内で産生された IP_3 を吸収する機能を持つ IP_3 sponge というタンパク質を、テトラサイクリン依存的に遺伝子発現を制御する Tet-Off システムを用いてアストロサイト特異的に発現させることにより、「アストロサイト内 Ca^{2+} 濃度変動を *in vivo* で可逆的に阻害するトランスジェニックマウスシステム」を構築した。続いて、このシステムを用いて作製した「アストロサイト内 Ca^{2+} 濃度変動抑制マウス」の行動学・組織学的な解析から、海馬の機能異常を示唆する行動異常と、海馬のシナプスに対するアストロサイトの突起の接触の減少（トリパータイトシナプスの形成不全）を見いだした。これらの結果は、アストロサイトの突起がシナプスを取り囲む構造を取る上でアストロサイト内 Ca^{2+} 濃度変動が重要な役割を果たしていることを示唆していた。

2. 研究の目的

我々が作製した「アストロサイト内 Ca^{2+} 濃度変動抑制マウス」でこれまでに観察されている行動異常、形態異常を関連づけて理解するために、本研究期間の前半には海馬を対象としてシナプス伝達効率、シナプス可塑性などに関する電気生理学的解析を行い、*in vivo* におけるアストロサイト内 Ca^{2+} 濃度変動の抑制がどのような電気生理学的異常をもたらすのかを明らかにする。後半には、アストロサイトの突起がシナプスを取り囲む過程において、アストロサイト内 Ca^{2+} 濃度変動の下流でどのような分子が作用しているのかを明らかにするために、「アストロサイト内 Ca^{2+} 濃度変動抑制マウス」で IP_3 sponge の発現に伴って発現が変化している遺伝子の網羅的解析を行う。また、アストロサイト-シナプス間相互作用に関係することが報告されているいくつかのタンパク質候補について、発現量やリン酸化、重合などの動態に変化がないかどうかを調べる。これらの結果が得られれば、アストロサイト内 Ca^{2+} 濃度変動が高次脳機能において果たす役割の統合的理解が可能となる。

3. 研究の方法

(1) *in vitro* 多点平面電極 (マルチエレクトロードアレイ) システム (MED64 システ

ム:アルファメッドサイエンス) を使用して、急性スライスを用いて海馬の *stratum radiatum* における細胞外電位を記録し、出入力関係、2発刺激増強について解析し、シナプス伝達効率の基本的特性とシナプス短期可塑性について「アストロサイト内 Ca^{2+} 濃度変動抑制マウス」と野生型マウスの間で違いがないかを調べる。続いて、長期増強 (LTP) と長期抑制 (LTD) について同様に調べる。

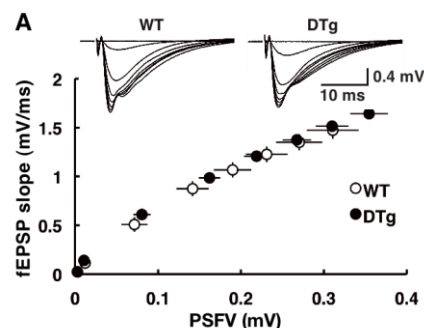
(2) 「アストロサイト内 Ca^{2+} 濃度変動抑制マウス」で観察されている海馬のシナプスに対するアストロサイトの突起の接触の減少は、シナプス間隙のグルタメートのアストロサイトによる取り込みを抑制し、グルタメートのスピルオーバーを誘発する可能性がある。これを検証するため、海馬スライスを用いてアストロサイトのグルタメートトランスポーター電流を調べる。

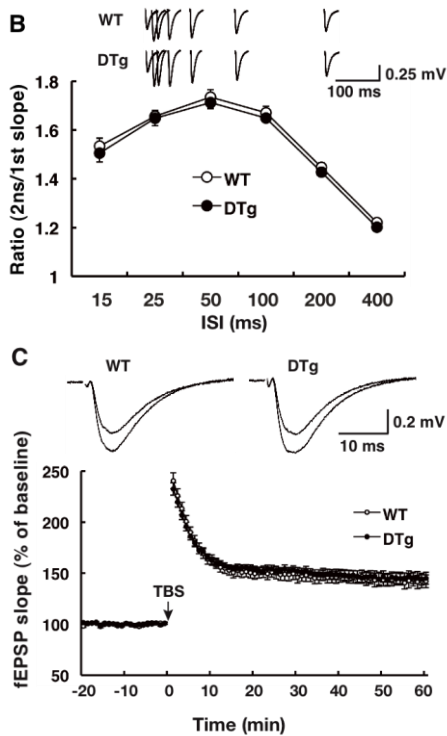
(3) シナプス間隙のグルタメートのスピルオーバーについて神経細胞側から検証するため、海馬スライスを用いて CA1 の錐体細胞の NMDA 電流を調べる。

(4) G-CaMP2 を用いたカルシウムイメージングにより、「アストロサイト内 Ca^{2+} 濃度変動抑制マウス」の海馬スライスにおいて、神経伝達物質に反応したアストロサイト内 Ca^{2+} 濃度変化が抑制されていることを確認する。

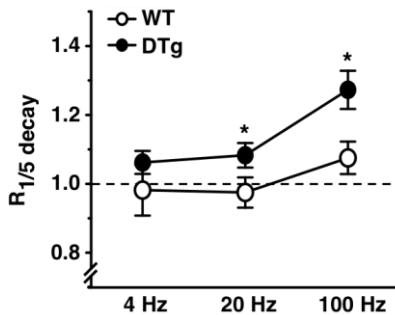
4. 研究成果

(1) MED64 システムを用いた解析から、出入力関係 (図 A)、2発刺激増強 (図 B)、LTP (図 C)、LTD には「アストロサイト内 Ca^{2+} 濃度変動抑制マウス」 (DTg) と野生型マウス (WT) の間で差がないことが分かった。

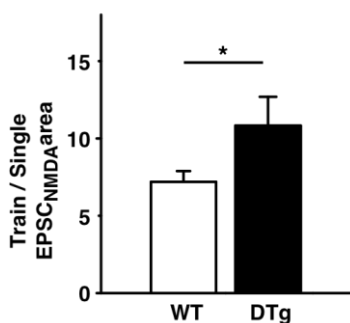




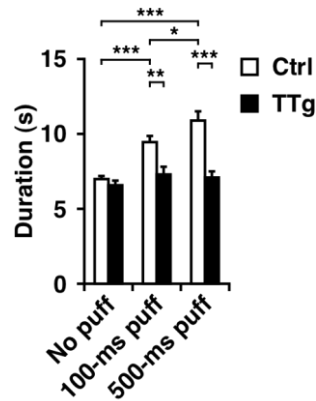
(2) 「アストロサイト内 Ca^{2+} 濃度変動抑制マウス」の海馬 CA1 領域のアストロサイトでは、高頻度刺激時にグルタミンートランスポーター電流の decay time の増加が見られた (下の図)。この結果はシナプス間隙でグルタミンートのスピルオーバーが起こっていることを示唆している。



(3) 「アストロサイト内 Ca^{2+} 濃度変動抑制マウス」の海馬 CA1 領域の錐体細胞では、高頻度刺激時に NMDA 電流の増加が見られた (下の図)。この結果は、シナプス間隙でのグルタミンートのスピルオーバーを示唆している。



(4) G-CaMP2 を用いたカルシウムイメージングにより、「アストロサイト内 Ca^{2+} 濃度変動抑制マウス」の海馬 CA1 領域のアストロサイト (TTg) では、コントロール群 (Ctrl) と比べて神経伝達物質の刺激に反応した細胞内 Ca^{2+} 濃度変動が抑制されていることが確認された。



(5) 今回の研究により、アストロサイト内 Ca^{2+} 濃度変動がトリパータイトシナプスの形成に重要であり、記憶学習という高次脳機能において役割を果たすことが、世界に先駆けて明らかになった。今後の展望としては、以下の二つが考えられる。

- ① 「アストロサイト内 Ca^{2+} 濃度変動抑制マウス」でシナプス間隙のグルタミンートのスピルオーバーが起こっているということを利用して、「アルツハイマー病に付随する記憶学習の低下はアストロサイトによるグルタミンートの取り込みが過剰になっているためではないか」という仮説が検証できるのではないか。具体的には、アルツハイマー病のモデルマウスと「アストロサイト内 Ca^{2+} 濃度変動抑制マウス」を交配した際に、アルツハイマー病のモデルマウスの記憶学習の異常が改善されるかどうかを検討してみたい。
- ② 「アストロサイト内 Ca^{2+} 濃度変動抑制マウス」で損傷に対するアストロサイトの反応 (グリオシス) がどうなるかを調べることにより、グリオシスにおけるアストロサイト内 Ca^{2+} の役割について明らかにできるのではないか。

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 1 件)

Tanaka M, Shih PY, Gomi H, Yoshida T, Nakai J, Ando R, Furuichi T, Mikoshiba K, Semianov A, Itohara S. Astrocytic Ca^{2+} signals are required for the functional

integrity of tripartite synapses.
Molecular Brain. 査読有.-.2013.6:6
doi:10.1186/1756-6606-6-6

〔学会発表〕(計3件)

①田中三佳、Astrocytic calcium signals are required for the functional integrity of tripartite synapses、Gordon Research Conference; Glial Biology、2013年3月6-7日、Ventula, USA

②田中三佳、Astrocytic calcium signals are required for the functional integrity of tripartite synapses、Neuroscience 2010、2010年11月15日、San Diego, USA

③田中三佳、Astrocytic IP₃-mediated Ca²⁺ signaling is required for functional integrity of tripartite synapses、日本神経科学大会、2010年9月3日、神戸市

〔その他〕

ホームページ等

<http://bgshige.brain.riken.jp/indexj.htm>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田中 三佳 (TANAKA MIKA)

独立行政法人理化学研究所・行動遺伝学技術開発チーム・専門職研究員

研究者番号：70311347

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者

(4) 研究協力者

①Alexey Semyanov

独立行政法人理化学研究所・シナプス外シグナル伝達研究ユニット・ユニットリーダー

②Pei-Yu Shih

独立行政法人理化学研究所・セミアノフリサーチユニット・リサーチアソシエイト

③吉田崇将

独立行政法人理化学研究所・行動遺伝学技術開発チーム・研究員