

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 5 日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25430071

研究課題名(和文) NMDA受容体の構成的活性の検出と解析

研究課題名(英文) Constitutive activity of NMDA receptors

研究代表者

岡田 大助 (Okada, Daisuke)

北里大学・医学部・講師

研究者番号：10211806

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：持続的長期増強成立時のPSD再構成に関わる新規合成蛋白質Homer1aの樹状突起からスパイン内への輸送を解析し輸送系を二つ見出した。活動依存性経路はNMDA受容体チャネル活性とPKG依存的にHomer1aを輸送したがEGFPの輸送には関与しなかった。一方、D-セリン経路は、活動依存的経路の阻害下でもD-セリンによりEGFPとHomer1aの輸送を起こした。D-セリン拮抗薬やケタミンが阻害したがD-セリンがこれらによる阻害を解除した。NMDA受容体とスパイン内輸送系に関わるタンパク質がD-セリン依存的に結合することでスパイン内タンパク質輸送を可能にしていると考えられた。

研究成果の概要(英文)：Newly synthesized proteins are thought to reconstitute PSD by substituting PSD components during establishment of sustained synaptic plasticity. We investigated transport from dendrites into spines of synaptic protein involved in the PSD reconstitution such as Homer1-a, and found 2 pathways. NMDA receptor-dependent Ca<sup>2+</sup> influx triggered the synaptic activity-dependent transport, which depended on protein kinase G and was available for Homer1-a, but not for EGFP. The other is the D-serine pathway. D-serine activated transport of both EGFP and Homer1-a even when activity-dependent transport was inhibited. It was blocked by D-serine site antagonists and ketamine, which was respectively restored by application of D-serine. We conclude that NMDA receptor has a constitutive activity by which D-serine regulates protein transport in spines, and suggested that D-serine regulates protein-protein interaction between NMDA receptor and intraspinal protein transport components.

研究分野：シナプス可塑性の分子機構

キーワード：NMDA受容体 スパイン タンパク質輸送 D-セリン ケタミン FRAP

1. 研究開始当初の背景

(1) 日常の経験等の記憶(エピソード記憶)は海馬の活動により獲得され、固定化プロセスによって長時間経過後にも想起できる海馬依存的長期記憶になる。エピソード記憶獲得の細胞レベルの実体として、シナプス可塑性(長期増強や長期抑圧)によりそのエピソードに応答する神経回路が形成されることが注目される。この可塑性は既存機能分子の翻訳後修飾による一過性機能変化であるため記憶も短期である。一方、記憶固定化に対応するのは持続的なシナプス可塑性の成立である。記憶固定化と持続的可塑性は共に新規遺伝子発現の誘導に依存している。持続的な長期増強は、強く反復的なシナプス活動が惹き起す。この時、遺伝子発現が誘導されシナプスタンパク質が新規合成される。この新規タンパク質は強い活動を経験したシナプスでのみ機能する(シナプス特異性)ため、そのシナプスを含む神経回路の活動性が持続することになる。そもそも、一つの中枢神経系細胞には数万の異なる要素によって興奮した軸索がシナプスを作るので、記憶固定化においては多数のシナプスの中で強い活動をしたものだけで可塑的变化を持続させる仕組みが働くことになる。これは、経験から時間が経つと詳細については思いさせず印象に残った要素だけを思い出すことに対応しており、記憶の固定化は、経験の中から後に思い出すべき要素を選択して長期記憶を形作るのである。持続的シナプス可塑性のシナプス特異性がその仕組みであり、記憶という高次脳機能にあって何を覚えるかという中核的な機能と考えられる。その細胞レベルの仕組みの一つは、細胞体で合成されるタンパク質を活動シナプス特異的に機能させるシナプスタグである。研究代表者らは、樹状突起輸送中の Homer1a タンパク質をスパイン内に取り込む輸送が NMDA 受容体依存性  $Ca^{2+}$  流入により活性化されることを発見し、これがシナプスタグの一形態であることを示した (Okada *et al.* Science 324, 904, 2009)。

(2) 一過的だった可塑性を持続的なものに変えるためには、増加した表面発現 GluA 受容体を安定的にシナプス伝達に寄与させる改変が必要である。そのためには新たに配送されてくる scaffolding タンパク質などの構成要素を用いて PSD を再編成することが必要になる。Homer1a は持続的可塑性成立時に最初期遺伝子として一過性に発現し、PSD を解離させるので、この PSD 再編成のきっかけになるタンパク質である (Inoue Y, *et al.* Neurosci. 150, 841, 2007)。数百種類あるとされる記憶固定化で新規合成されるシナプスタンパク質を当該シナプスに配送・局在させる仕組みが、長期記憶に関わる神経回路形成のキーとなると考えられる。この仕組みに異常がある場合は、シナプス後部スパインの物質構成が破綻し、記憶の経験に基づいた獲得・保持の困難や、記憶内容の間違った関連

付け等、種々の精神疾患や発達障害に見られる症状と関連した表現形が予想される。そのような疾病の診断や治療の確実な方法を開発するためにも、シナプス後部の構成要素をスパインに配送する仕組みの詳細を解明することは大変重要な課題である。

(3) そこで研究代表者らは先行研究(科学研究費補助金 23220009、平成 23 27 年度、論文作成中)において、Homer1a タンパク質の樹状突起からスパインへの移動を直接測定するために、FRAP (Fluorescence Recovery After Photobleaching) 法を初代培養ラット海馬神経細胞の単一スパインに適用する方法を開発した。Homer1a-EGFP 融合タンパク質(HE)の樹状突起からスパインへの移動のうちシナプス活動依存成分の細胞内シグナル伝達を探索した。高密度培養神経細胞はランダムなシナプス結合を形成し、自発発火により常にシナプス活動が起きている。シナプスタグ機構はシナプス活動依存性 NMDA 受容体依存性  $Ca^{2+}$  流入とその下流のリン酸化等の反応で活性化されると予想されるため (Frey & Morris, Nature385, 533, 1997)、シナプス活動の阻害によりシナプスタグを抑制するには、長時間(既存活性によるリン酸化の影響が消えるまで)の阻害が必要であると考えられる。実際、Tetrodotoxin (TTX)、2-Amino-5-phosphono valerate (APV)、細胞外 EGFP、BAPTA、NO 合成酵素阻害剤 L-NAME、PKG 阻害剤 Rp-8Bromo-PET-cyclic GMPS (Rp-cGMPS) などによりシナプス活動依存性 NMDA 受容体依存性  $Ca^{2+}$  流入を短時間止めた状態での FRAP は通常通り起きた。一方、L-NAME を与え始めてからの FRAP の経時変化測定から、この阻害は 90 分程度から顕著になることが分かった。そこで、上記各阻害剤を 2 時間与えたところ、FRAP が阻害された。L-NAME 2 時間での FRAP 抑制を確認した後、L-NAME 存在下で PKG 活性化剤 8Bromo-cyclic GMP (以後 BrcG) を与えると FRAP が観測された。活動依存的に HE のスパインへの移動を起こす成分は PKG 活性化が必要十分であると考えられた (図 1)。

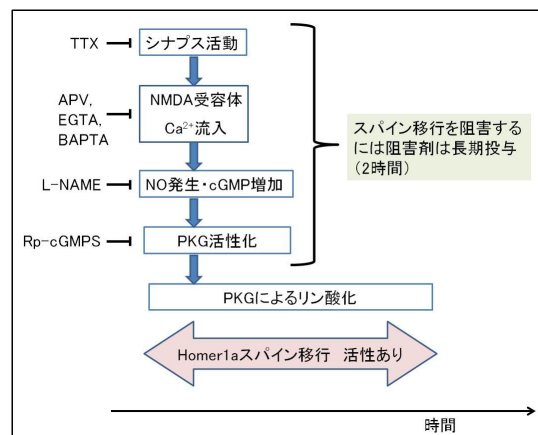


図 1 . Homer1a のスパイン移行のシナプスタグ経路

(4) NMDA 受容体には数々のアロステリック部位がある。先行研究では FRAP に対するこれらのリガンド結合部位の応答も調べた。ポリアミン部位、亜鉛部位に関しては特段の効果はなかったが、D-セリン拮抗薬と開口チャンネルブロッカー MK801 は短期投与でも FRAP を阻害した。PKG 依存的 FRAP はシナプス活動依存的 FRAP の必要十分条件だったことを勘案すると、シナプス活動に依存しないがリガンドの有無により変化する NMDA 受容体の機能(構成的活性)があり、PSD 構成タンパク質のスパインへの配送に何らかの役割を持つと考えられた。

## 2. 研究の目的

本研究では、NMDA 受容体のタンパク質間相互作用が構成的活性としてタンパク質のスパイン移行に欠かせないものであり、D-セリンがこれを調節するという仮説を検証する。

## 3. 研究の方法

全ての実験は北里大学動物実験と組換え DNA 実験の規定に準じて行った。

(1) 培養細胞: Wistar ラット E17 胎児の海馬神経細胞をカバーガラス上で高密度初代培養した。Lipofection 法により Homer1a-EGFP 融合タンパク質(HE)を発現させた。HE は均一に細胞体、樹状突起、軸索に発現し、自発発火のためスパイン内にも存在した。シナプス形成後(DIV18-24)、カバーガラスを倒立型蛍光顕微鏡(Zeiss observer A1)の電動精密 XY ステージステージ(Ludl 社)に置き、細胞外液(nACSF (mM) = NaCl 150, KCl 5, CaCl<sub>2</sub> 2.5, MgCl<sub>2</sub> 1.5, NaH<sub>2</sub>PO<sub>3</sub> 1, NaHCO<sub>3</sub> 25, glucose 10, D-Mannitol 10, 5% CO<sub>2</sub> 95% O<sub>2</sub>)を室温で常時灌流した。前処理は培養条件下で各薬剤を加え、2 時間経過後顕微鏡に移し同濃度の薬剤を加えた nACSF で灌流した。

(2) 画像取得: 励起フィルター 460-480 nm、蛍光フィルター 505-530 nm、対物レンズ 63 倍(NA1.40)または 100 倍(NA1.30)で蛍光観察し、Hamamatsu EMCCD カメラ(C9100)で画像取得した。観察する細胞は、HE を細胞全体に発現し、錐体細胞様の形態でスパインが密なものを選んだ。FRAP を観察するスパインは、mushroom 型でネックが細く、樹状突起から離れ、ヘッドが大きくないものを

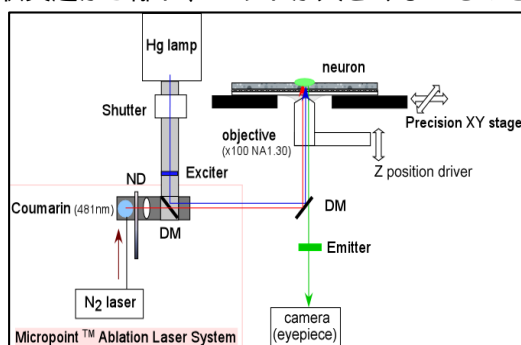


図2 画像取得装置の概略

選んだ。stubby スパインやヘッドが大きい mushroom スパインでは樹状突起からスパインへの HE 輸送はシナプス活動に全く依存しない。電動 z 軸モーター(Ludl 社)を用いてスパインの深さ方向を変え、全体を 5-10 枚の画像として取得し、その 3D スタック画像の蛍光強度集積値を当該スパインの総蛍光強度とした。顕微鏡ステージ類とカメラの制御と画像計測は Metamorph ソフトにより行った。

(3) FRAP 計測: Micropoint Ablation System では、窒素レーザーでクマリン色素を励起して発生した 460nm の蛍光を観察と同じ高 NA 対物レンズで集光すると焦点面で 1 μm 以内の径に集光できる(図 2, 3)。消光前のスパインの総蛍光強度値を 5 分おきに 3 回測定したのち、この蛍光ビームをスパイン中央に固定し 5 照射 @ 3Hz を 1 セットとし 20 秒おきに 4 セット、ND フィルタを介して照射することで単一スパインの蛍光タンパク質を消光した。最後の消光セットの 1 分後にスパイン画像を取得し、消光率(消光後の総強度/消光前の平均総強度、%)を取得した。80% より大きい場合は位置を補正し再度消光した。その後 60 分まで数回画像を取得し蛍光回復率を観察した。スパイン形態が変化した場合、対照に選んだ同視野内の別スパインの蛍光強度に変化が起きた場合は、データから除外した。



図3 単スパイン消光用蛍光ビーム(赤表示)

## 4. 研究成果

### (1) 研究の主な成果

NMDA 受容体イオンチャンネル活性下流にある活動依存的 FRAP(シナプスタグ)は NMDA 受容体拮抗薬 APV(GluN2), Ro256981(GluN2B)の短期間投与で阻害されなかった。これに対し、NMDA 受容体チャンネルポアに作用し開口チャンネルをブロックする解離性麻酔薬 MK801(ジゾシルピン)とケタミン、および GluN1 サブユニットの D-セリン部位特異的拮抗薬 Dichlorokininurenic acid(DCKA)と CGP78608 は、短期間投与で FRAP を阻害した。シナプスタグとは違うメカニズムによる



FRAP の存在を確認した。GluN3 を含む NMDA 受容体の拮抗薬 TK30 (Kvist *et al.*, *Neuropharmacol.* 75, 324, 2013) は FRAP を抑制しなかった。D-セリンは小脳では 2 受容体に結合するが、海馬における主要 D-セリン結合分子は GluN1 であると考えられる。

シナプスタグによる FRAP は、シナプス活動から PKG までのシグナルを阻害した状態でも、BrcGMP で PKG を直接活性化することで起きた。一方で、DCKA やケタミンによって阻害されている場合は BrcGMP による FRAP が起きなかった。

長期投与 TTX や L-NAME はシナプスタグによる Homer1a の FRAP を阻害したが、EGFP の FRAP は阻害しなかった。このことは、HE と EGFP とではスパインと樹状突起の間の活動依存的輸送機構が異なることを示唆する。シナプスタグ経路は HE タンパク質の Homer1a を認識して樹状突起輸送部位からスパイン内輸送部位へ移動させる調節と思われる。一方、DCKA やケタミンは EGFP の FRAP も阻害したので Homer1a 特異的な部分がなく輸送一般に関わる機能を阻害したと考えられる。DCKA やケタミンが阻害するのはスパイン内輸送モーター活性や輸送経路の構築 (F-アクチンレールを PSD に結合させる等) に関与した部分の可能性がある。ミオシン阻害剤を数種類試したがいずれもスパイン形態が著しく変形したので FRAP は測定できなかった。

DCKA 存在下で大過剰の D-セリンを与えると FRAP が観察された。D-セリンが NMDA 受容体 D-セリン結合部位に作用し両者が拮抗したことを示している。次に、L-NAME または Rp-cGMPS と DCKA を共に 2 時間投与した後それらの存在下で D-セリンを与えると FRAP が起きた。PKG 依存性 FRAP が起きない条件でも D-セリンが FRAP を起こすと言える。一方、ケタミンによる FRAP の阻害も、D-セリンを同時に与えると解消され FRAP が観察された。D-セリンがなぜケタミンの作用と拮抗するのかは今後さらなる研究が必要である。

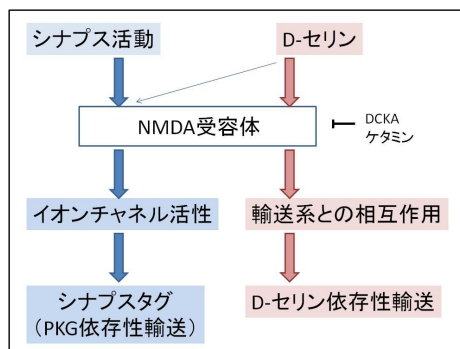


図 4 二つのタンパク質スパイン輸送機構

## (2) 得られた成果の国内外における位置づけとインパクト

Homer1a の樹状突起からスパイン内への輸送には、NMDA 受容体依存性  $Ca^{2+}$  流入

により始まり PKG 活性化により必要十分に駆動されるシナプス活動依存性の輸送と、解離性麻酔薬類や D-セリン部位拮抗薬で阻害され、D-セリンで阻害が解除され、PKG に依存しない輸送があることが分かった。D-セリン経路は Homer1a だけでなく EGFP の移動にも必要であった。タンパク質の種類によらずスパイン内の輸送に必須な仕組みを D-セリンが調節していると結論される。

D-セリン依存性 FRAP 成分は NMDA 受容体を利用して起きると思われる一方で、シナプス活動依存的成分とは異なった仕組みであり、NMDA 受容体の構成的活性と考えられた。

スパインの分子構成と精神疾患の関係はいくつかの例が報告され、PSD 再構築のメカニズム解明が精神疾患の原因解明に寄与する可能性があるため、世界的にも注目されている。本研究の知見は低分子による調節という点でユニークである。D-セリンは統合失調との関連が報告されており (西川、生化学 80, 267, 2008) 本研究の知見は D-セリンの低下が PSD 構成成分の異常に関与する可能性を示唆している。一方、ケタミンやその代謝産物はうつ病の症状を改善することから注目されている。うつ病に対するケタミン作用は長期増強への作用が考えられており (Autry *et al.*, *Nature*, 475, 91, 2011) 本研究の結果との関連を解明することは重要な論点となると思われる。このような低分子がシナプス後部の分子環境に対し配送の調節という形で関与していることはこれまで考えられてこなかった発見であり、大きなインパクトを持つと思われる。

## (3) 今後の展望

本研究ではスパイン内機能分子の配送という基本的な細胞生物学的活性の詳細な仕組みを解析して、新たな重要な知見を得たが、未解決な部分も多く更なる研究が必要である。以下に示す 3 点などの未解決問題の検討により可塑性に関わるシナプスタンパク質のスパイン輸送の仕組みの全体像を解明することで精神疾患におけるシナプスの実体の理解に貢献することができると期待される。

- NMDA 受容体の構成的活性の実体 (結合タンパク質の同定と D-セリンによる調節機序) の解明
- D-セリンやケタミンの作用機序の解明 (標的分子の同定、動態や代謝の解析)
- シナプス活動依存性輸送機構との関係の解明 (独立なのか、PKG 作用が D-セリン経路を駆動する)

## 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)

〔学会発表〕(計 3件)

(1) Daisuke Okada

"Two distinct NMDA-receptor contributions in synaptic tagging of Homer-1a proteins" 第39回日本神経科学大会、2016年7月21日、パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

(2) Okada D.

"Synaptic tag: Molecular mechanisms and implications in memory consolidation."

KAIST-KUGSMS Biomedical Joint Symposium. Nov 11, 2014. Daejeon, (Korea). (Invited)

(3) 岡田大助

「細胞体で新規合成されたシナプスタンパク質のシナプス局在におけるNO-PKGの役割」第14回日本NO学会学術集会 2014年5月17日、ホテルニューオータニ佐賀(佐賀県佐賀市)

〔図書〕(計 2件)

(1) 岡田大助

日経サイエンス社 別冊日経サイエンス「生命解読2」中西真人 編、「生理活性物質としての一酸化窒素」2016 74-83 頁(翻訳)

(2) Okada D, Inokuchi K,

Springer, NY. Synaptic tagging and capture. Sajikumar SR ed. "Activity-dependent protein transport as a synaptic tag." 2014 pp79-98. (専門書共同執筆)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 1件)

名称: 超解像顕微鏡

発明者: 池滝慶記 熊谷寛 岡田大助

権利者: 北里研究所、株式会社オリンパス

種類: 発明

番号: 特願2015-221995

出願年月日: 2015年11月12日

国内外の別: 国内及び外国 PCT 出願

## 6. 研究組織

(1)研究代表者

岡田 大助 (OKADA, Daisuke)

北里大学・医学部・講師

研究者番号: 10211806

(3)連携研究者

小寺 義男 (KOTERA, Yoshio)

北里大学・理学部・准教授

研究者番号: 60265733

山森 早織 (YAMAMORI, Saori)

北里大学・医学部・講師

研究者番号: 30464803

(4)研究協力者

永田 悦子 (NAGATA, Etsuko)

北里大学・医学部・技術員

菅谷 津貴子 (SUGAYA, Tsukiko)

北里大学・医学部・技術員