

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 4 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25640005

研究課題名(和文)D-セリンの放出機構およびシナプス内外のNMDA受容体活性調節機構の解明

研究課題名(英文)Elucidation of the mechanisms of the release of D-serine and the regulation of the activity of synaptic and extrasynaptic NMDA receptors

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) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：中枢神経系のNMDA受容体は、シナプス伝達の可塑的調節に関与し、個体レベルでは、記憶・学習のような高次脳機能の制御だけでなく、種々の精神神経疾患にも関与する。その活性化には、グルタミン酸と同時にコアゴニストであるD-セリンの結合が必須である。本研究計画では、マウス海馬スライス標本のCA1領域の錐体細胞において、シナプス内外でNMDA受容体に対するD-セリンの効果が異なることを確認した。また、D-セリン合成酵素であるセリンラセマーゼのノックアウトマウスにおけるシナプス可塑性の異常を示唆する予備的なデータを得た。

研究成果の概要(英文)：The NMDA receptor is associated with the modulation of synaptic transmission in the central nervous system and is related not only to the regulation of higher brain functions such as learning and memory but also to the etiology of various psychiatric and neurological disorders at the level of the whole animal. The activation of NMDA receptors requires the binding of glutamate as well as the coagonist D-serine. In this project, we have found that the effects of D-serine on NMDA receptors in the CA1 region of the mouse hippocampal slice are different between synaptic and extrasynaptic NMDA receptors. Furthermore, we have obtained preliminary data suggesting the possibility that there is some abnormality in synaptic plasticity in the knockout mouse lacking serine racemase that produces D-serine in the brain.

研究分野：神経科学

キーワード：神経科学 脳・神経 遺伝子 神経伝達物質受容体 シナプス伝達

1. 研究開始当初の背景

中枢神経系に存在するイオン透過型グルタミン酸受容体の一種である NMDA (N-methyl-D-aspartate) 受容体は、神経系の発生・発達やシナプス可塑性、および、神経細胞死などに関与する重要な分子である。NMDA 受容体チャネルが開くためには、GluN2 サブユニットに、その神経伝達物質であるグルタミン酸が結合するだけではなく、GluN1 サブユニットにコアゴニストが結合する必要がある。これまでは、アミノ酸のグリシンが唯一のコアゴニストであると考えられてきた。しかし、比較的最近になって、生体には存在しないとされてきた D 体のアミノ酸である D - セリンが脳内に多量に存在し (Hashimoto et al., FEBS Lett, 1992) より強力なコアゴニストとして作用することが明らかになった (Mothet et al., PNAS, 2000)。D - セリンは、おもにグリア細胞でセリンラセマーゼ (serine racemase : SR) により合成されるとされてきたが、最近の研究では、ニューロンで産生されるものが多いと考えられるようになりつつあるが、実際にどの部位からどのような機構で放出されるかについては不明である。また、D - セリンは、シナプス間隙とシナプス外では、その濃度や動態などが異なると予想されるが、それに関する基礎データもほとんど存在しないというのが現状である。さらに、これらの特性がシナプス伝達やシナプス可塑性に与える影響もほとんど明らかになっていない。一方、D - セリンは、統合失調症や神経変性疾患、脳虚血などの精神神経疾患で、その脳内濃度や動態に異常がみられたり、D - セリンやその類似物質により一部の症状が改善したりするということが明らかになりつつあり、それらの疾患の病因との関連が注目されているが、その機構についてもほとんど明らかになっていない。そこで、これらの点について、その詳細を明らかにすることを旨として本研究計画を立案した。

2. 研究の目的

D - セリンがシナプス後細胞、あるいは、シナプス前終末、あるいはその両者のいずれから放出されているのか、および、D - セリンの放出に神経活動が関与するかどうかを明らかにするために、それぞれの細胞体が存在する脳部位特異的に D - セリン合成酵素である SR をノックアウトしたマウスを作製し、その海馬スライス標本を用いて電気生理学的なシナプス機能の解析を行う。比較対象として、脳全体で SR を欠損するコンベンショナル・ノックアウトマウスも解析する。また、シナプス内とシナプス外の NMDA 受容体に対する D - セリンの作用の違いについても、薬理学的手法と電気生理学的手法を組み合わせて明らかにする。さらに、D - セリンの特性の違いが、興奮性シナプス伝達の長期増強 (long-term potentiation : LTP) などのシ

ナプス可塑性に対してどのような影響を与えるかを検討する。また、D - セリンの個体レベルにおける役割をマウス個体を用いて行動学的に解析して明らかにすることを試みる。一方、神経変性疾患や脳虚血などでみられる神経細胞死における D - セリンの役割やシナプス内外の NMDA 受容体の寄与の程度の違いを、スライス標本を用いて明らかにする。これらの研究を通じて、これまであまり検討されてこなかった D - セリンの放出機構や D - セリンによるシナプス伝達の修飾機構、さらには、個体レベルでの D - セリンの役割の詳細を明らかにできるものと考えられる。そのためにこれまでまったく報告がない脳部位特異的な遺伝子改変マウスの作製と機能解析を進める点はきわめて特徴的である。また、NMDA 受容体がシナプス内外で神経細胞死における役割が異なるのではないかという、まだ確定されていない仮説を証明できる点も独創的である。さらに、D - セリンの放出機構やシナプス可塑性の調節機構などがわかれば、精神神経疾患の病因解明や新たな治療法開発にもつながり得ると思われる。

3. 研究の方法

D - セリンによる NMDA 受容体の機能調節を介した神経機能発現における D - セリンの役割を明らかにするために、正常マウス、および、遺伝子改変マウスの脳スライス標本やマウス個体を用いて、電気生理学的、薬理的、および、行動学的手法により、以下のような研究を進める。

(1) シナプス内外の NMDA 受容体の間で D - セリンに対する感受性が異なるかどうかを薬理学的手法と電気生理学的手法を組み合わせる解析する。

(2) 神経細胞死にシナプス内外の NMDA 受容体がどのように関与するかを薬理的、および、細胞生物学的に検討する。

(3) 脳部位特異的な SR ノックアウトマウスを作製し、D - セリンの放出部位や放出様式、さらには、シナプス可塑性に対する作用などを電気生理学的に解析する。

(4) 脳部位特異的な SR ノックアウトマウスを用いて行動実験を行い、D - セリンの高次脳機能における脳部位特異的な役割を明らかにする。

4. 研究成果

D - セリンの放出機構、および、シナプス内外の NMDA 受容体活性調節機構の解明を究極の目的として、以下のような研究を進めた。NMDA 受容体は、同じイオン透過型である AMPA 受容体とは異なり、1 価の陽イオンだけでなく、2 価のカルシウムイオンも透過するという特性を有している。シナプスが高頻度で活性化すると、細胞内のカルシウムイオン濃度が大きく上昇し、種々のカルシウム依存性の生化学過程を調節する。その代表的な

例として、シナプス伝達の LTP が挙げられる。また、個体レベルでは、記憶・学習のような高次脳機能だけでなく、種々の精神神経疾患に NMDA 受容体が関与していることも明らかになりつつある。その中でも、グルタミン酸と同時に NMDA 受容体に対してコアゴニストとして作用する D-セリンが、統合失調症や不安障害に関与する可能性が示唆されている。本研究計画では、正常マウスや D-セリンの制御に関与する分子の遺伝子改変マウスを用いて、分子レベル、細胞・ネットワークレベル、さらには、個体レベルで D-セリンの生理機能を明らかにすることを目指し、以下のような成果を得た。マウス海馬スライス標本の CA1 領域において、錐体細胞よりホールセル・パッチクランプ記録を行い、NMDA 受容体に対する D-セリンの効果薬理的、および、電気生理学的に検討したところ、シナプス内外で NMDA 受容体に対する効果が大きく異なることを確認した。この結果は、最近、Cell 誌に報告されたものと根本的に異なるため、世界的にも大きなインパクトが得られるものと思われる。また、関連分子の脳部位特異的遺伝子改変マウスの作製のための具体的な準備を進め、それらの変異マウスについても同様の解析を予定している。さらに、D-セリン合成酵素であるセリンラセマーゼのノックアウトマウスの興奮性シナプスにおけるシナプス可塑性の異常の有無を電気生理学的に検討し、それに異常のある可能性を示唆する予備的なデータを得た。今後は、さらにこれらの点について詳細な解析を進める予定である。ここで得られた遺伝子改変マウスを使用し、これまでの電気生理学的、および、行動学的解析をさらに進展させるとともに、脳部位特異的遺伝子改変マウスの解析も進め、研究の更なる大きな発展を目指す。これらのモデルマウスは、本研究計画以外の別のプロジェクトにおいても使用可能な重要な研究ツールになり得るものと思われる。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計4件)

Wakabayashi, C., Numakawa, T., Kiyama, Y., Manabe, T., Kunugi, H. and Iwakura, Y. (2015). IL-1 receptor-antagonist (IL-1Ra) knockout mice show anxiety-like behavior by aging. *Neurosci. Lett.* (In press). 査読有
Inoue, T., Hoshina, N., Nakazawa, T., Kiyama, Y., Kobayashi, S., Abe, T., Yamamoto, T., Manabe, T. and Yamamoto, T. (2014). Lemur kinase 3 deficiency causes pronounced locomotor hyperactivity and impairs endocytic trafficking. *J. Neurosci.* 34:5927-5937. DOI:10.1523/JNEUROSCI.1621-13.2014 査読有
Hamada, S., Ogawa, I., Yamasaki, M., Kiyama, Y., Watabe, A. M., Kassai, H.,

Nakano, K., Aiba, A., Watanabe, M. and Manabe, T. (2014). The glutamate receptor GluN2 subunit regulates synaptic trafficking of AMPA receptors in the neonatal mouse brain. *Eur. J. Neurosci.* 40:3136-3146. doi:10.1111/ejn.12682 査読有
Watanabe, Y., Katayama, N., Takeuchi, K., Togano, T., Itoh, R., Sato, M., Yamazaki, M., Abe, M., Sato, T., Oda, K., Yokoyama, M., Takao, K., Fukaya, M., Miyakawa, T., Watanabe, M., Sakimura, K., Manabe, T. and Igarashi, M. (2013). Point mutation in syntaxin-1A causes abnormal vesicle recycling, behaviors, and short-term plasticity. *J. Biol. Chem.* 288:34906-34919. DOI: 10.1074/jbc.M113.504050 査読有

〔学会発表〕(計5件)

Watanabe, Y., Katayama, N., Takeuchi, K., Sakimura, K., Manabe, T. and Igarashi, M. Presynaptic Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II (CaMKII) regulates short-term plasticity through the interaction with syntaxin-1A. (*Japan Neuroscience Society, Annual Meeting in Kyoto, Japan; June 22, 2013*)
Okuda, K., Watanabe, A., Kobayashi, S., Manabe, T., Takao, K., Miyakawa, T., Fukaya, M., Sakagami, H., Nishioka, T., Amano, M., Kaibuchi, K., Mizuguchi, M. and Tanaka, T. Functional studies of the CDKL5, a causative gene for neurodevelopmental disorders, by interactome screening and loss-of-function analyses. (*Japan Neuroscience Society, Annual Meeting in Kyoto, Japan; June 22, 2013*)
Matsuda, N., Ogawa, I., Hamada, S. and Manabe, T. Live imaging of BDNF secretion using a small peptide-based fluorescent tag. (*Japan Neuroscience Society, Annual Meeting in Kyoto, Japan; June 21, 2013*)
Katayama, N., Yamamori, S., Fukaya, M., Watanabe, M., Takahashi, M. and Manabe, T. Roles of SNAP-25 phosphorylation in presynaptic short-term plasticity. (*Japan Neuroscience Society, Annual Meeting in Kyoto, Japan; June 21, 2013*)
Tanaka, T., Okuda, K., Watanabe, N., Kobayashi, S., Manabe, T., Takao, K., Miyakawa, T., Fukaya, M., Sakagami, H. and Mizuguchi, T. Elucidation of the molecular functions and LOF of the CDKL5, a causative gene for neurodevelopmental disorders. (*The Japanese Society of Neuropathology, Annual Meeting in Tokyo; April 24-26, 2013*)

〔図書〕(計3件)

真鍋 俊也 (2014). 興奮性組織：神経「ギャノン」生理学」第24版 第編 医科生理学の細胞および分子的基礎 5章

pp.97-113. (McGraw-Hill) (翻訳 : 丸善)
監訳 : 岡田 泰伸
真鍋 俊也 (2014). 興奮の伝達 : シナプス
伝達の調節、中枢神経におけるシナプス伝
達「標準生理学」第8版 第2編 神経と筋
第6章 pp.154-166. (医学書院) 監修 : 小
澤 滯司、福田 康一郎
小林 静香、真鍋 俊也 (2013). シナプス可
塑性 - 長期増強 : LTP/長期抑圧 : LTD 脳
神経科学イラストレイテッド 改訂第3版
pp.177-184. (羊土社) 編集 : 真鍋 俊也、
森 寿、渡辺 雅彦、岡野 栄之、宮川 剛

〔その他〕

ホームページ等

[http://www.ims.u-tokyo.ac.jp/NeuronalNetwork/
Neuronal_Network/Index_japanese.htm](http://www.ims.u-tokyo.ac.jp/NeuronalNetwork/Neuronal_Network/Index_japanese.htm)

6 . 研究組織

(1)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