

平成 30 年 6 月 13 日現在

機関番号：12301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26430003

研究課題名(和文) 中枢ストレス反応におけるグルタミン酸トランスポーターの機能解析

研究課題名(英文) Involvement of glutamate transporters in central stress response

研究代表者

安田 浩樹 (Hiroki, Yasuda)

群馬大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号：60294071

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：海馬歯状回など気分を制御する領域においてストレスが興奮性を変化させて、うつや不安が誘発される。申請者は頻回水泳ストレスやリン酸化酵素 protein kinase N 1 (PKN1) ノックアウト(KO)によって、神経型グルタミン酸トランスポーター(EAAT3)の蛋白発現が低下し、代謝型グルタミン酸受容体(mGluR)が歯状回顆粒細胞において活性化されることを見いだした。一方で行動実験では頻回水泳やPKN1 KOが不安を軽減するので、歯状回におけるEAAT3発現低下によるmGluR活性上昇は、軽度ストレス時に不安を和らげる一種の「ストレス緩衝作用」を誘発している可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Functions of group 1 metabotropic glutamate receptors (mGluRs) should be restricted within normal range, otherwise brain disorders could develop. Here we report that neuronal protein kinase N1 (PKN1) normalizes excitability of dentate granule cells in the hippocampus through decreasing group 1 mGluR activity by upregulating neuronal glutamate transporters, and controls anxiety. Knocking out PKN1 in the mature dentate gyrus of the hippocampus induced group 1 mGluR-dependent hyperexcitability that was also observed in stressed dentate granule cells in the wild-type hippocampus. Inhibiting glutamate transporter by DL-TBOA elevated neuronal excitability in wild-type mice, but not in KO mice, suggesting that all the electrophysiological phenotypes in PKN1 KO mice were mimicked and occluded by inhibition of glutamate transporters. Thus, PKN1 is critical for regulating neuronal excitability through normalization of mGluR functions. We also present behavioral features in PKN1a KO mice.

研究分野：神経生理学

キーワード：repeated swim 海馬歯状回 顆粒細胞 神経型グルタミン酸トランスポーター protein kinase N 代謝型グルタミン酸受容体 ストレス

1. 研究開始当初の背景

ストレスは、カテコラミンやステロイドホルモン等の分泌を促進して学習障害や心身症、あるいはうつ、心的外傷後ストレス障害 (PTSD) 等の重大な精神疾患を誘発する原因である。うつは年間3万件弱発生している自殺の要因の一つで、国を挙げて自殺を防ぐ対策が行われているところであり、うつ病メカニズムやストレス反応の正しい理解と、これらの疾患に対する有効な治療の開発は緊急の課題である。

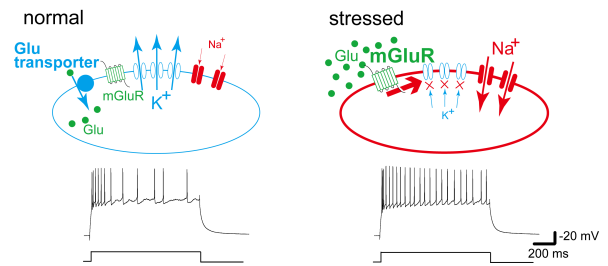
動物実験では急性あるいは慢性ストレス負荷によって、気分や意欲に係る前頭前野や側坐核において、神経細胞の興奮性が変化すること (Sun, et al., J. Neurosci., 2011, Wallace, et al., Nat. Neurosci., 2009)、さらに側坐核における興奮性低下は不安行動を惹起し、抗うつ剤によって興奮性低下が改善することが報告されている (Wallace, et al., Nat. Neurosci., 2009)。また側坐核に投射している、腹側被蓋野のドーパミン細胞にハロロドプシンを強制発現し、光刺激によって活動を抑制すると、うつ検査である尾懸垂試験において、うつ状態を示す無動になること、逆にうつ状態のマウスにチャンネルロドプシンを発現させてドーパミン細胞を興奮させると、逃避行動が復活することが明らかになっている (Tye, et al., Nature, 2013)。このように、ストレスによる興奮性の変化がうつ症状を発現させると考えられる。

ストレスに影響を受ける領域としては、海馬もその一つであり、ストレスによってシナプス長期増強が抑制され、長期抑圧が誘発されやすくなることが知られている。特に海馬歯状回は神経新生が起こる領域であり、抗うつ剤は歯状回神経新生を亢進すると考えられており、さらに歯状回新生神経細胞は視床下部-下垂体-副腎系を抑制して、うつ状態を防いでいる (Snyder, et al., Nature 2011)。このように海馬歯状回は気分の安定化に必須であり、その興奮性制御メカニズムは不安やうつの病態を知る上で重要である。

2. 研究の目的

申請者は予備実験によって、代謝型グルタミン酸受容体が海馬歯状回顆粒細胞の興奮

性を制御していることを見いだした。



(図 1)

正常な歯状回顆粒細胞 (左) と、頻回水泳あるいは PKN1 KO された細胞 (右) (Yasuda et al., 投稿中)

さらに、[1] 頻回水泳によって顆粒細胞興奮性が、代謝型グルタミン酸受容体依存性に亢進する、[2] 頻回水泳による興奮性亢進は、グルタミン酸トランスポーターの機能障害、あるいは蛋白リン酸化キナーゼ protein kinase N1 (PKN1) ノックアウトによって再現されることを世界で初めて明らかにした。これらは頻回水泳が顆粒細胞において、PKN1 を阻害してグルタミン酸トランスポーターを抑制し、細胞外に増加したグルタミン酸が代謝型グルタミン酸受容体を活性化して興奮性亢進させることを示唆しており、現在論文投稿中である (Yasuda, et al., Nat. Neurosci., revised)。そこで本研究課題ではまず、(1) 頻回水泳が PKN1 を介してグルタミン酸トランスポーターを抑制するメカニズムについて、電気生理学的実験だけではなく、生化学的に詳しく検討することにより、ストレス障害治療の可能性に迫る。

3. 研究の方法 生化学的実験

はじめに神経型グルタミン酸トランスポーター機能低下を起こすメカニズムを、生化学的に詳しく精査する。正常脳では PKN1 は主に神経細胞に発現している (Kawamata, et al., J. Neurosci., 1998)、神経型トランスポーター (EAAT3) について、タンパク合成量が減少しているか、生化学的に明らかにする。次に、エンドサイトーシス等トラフィックキングによって細胞表面の発現量が減少するか、野生型・PKN1 ノックアウト

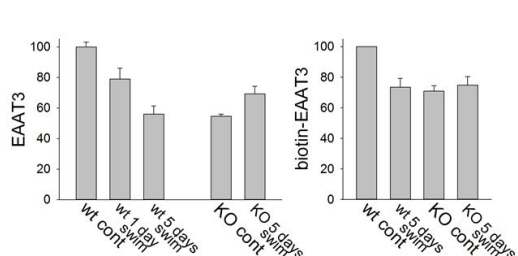
ト(KO)マウスから海馬培養細胞を作成後、表面蛋白をビオチニレーション化し、PKN1 KO 細胞では EAAT3 が細胞表面から消失しているか調べる。また PKN1 による直接リン酸化されるかを検討する。

マウス行動実験

次に、頻回水泳や PKN1 ノックアウトがマウスの不安やうつに影響を及ぼしているか、行動実験によって検討する。頻回水泳させた成熟野生型、あるいは成熟 PKN1 ノックアウトマウスに対して、不安を調べる検査として、オープンフィールドテスト、明暗テスト、高架式十字迷路を、うつを調べる検査として尾懸垂テスト、強制水泳テストを施行した。

4. 研究成果 EAAT3 発現について

頻回水泳と PKN1 ノックアウトによって海馬 EAAT3 発現量および細胞膜 EAAT3 蛋白が減少していることを見いだした(図 2)。

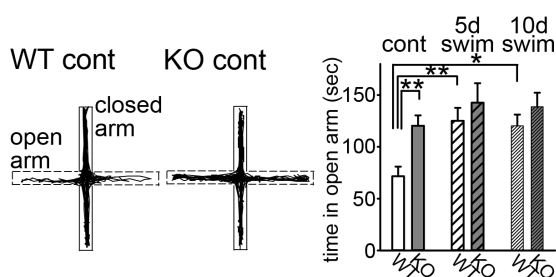


(図 2) 頻回水泳および PKN1 ノックアウトによる、海馬総 EAAT3 量(左)および膜 EAAT3 量の減少(右)

つまり、頻回水泳や PKN1 ノックアウトによって、神経細胞における EAAT3 発現が減少して、EAAT3 機能が低下することが示唆された。

不安・うつに対する影響

次に行動実験を行うことによって、頻回水泳、および PKN1 ノックアウトの不安に対する効果を行動実験で検証した。1) 頻回水泳は野生型マウスでは不安を惹起せず、高架式迷路では不安を軽減した。2) コントロール PKN1 KO マウスでは不安行動が減少していた(図 3)。



(図 3) PKN1 KO、および頻回水泳は、高架式迷路においてオープンアーム滞在時間を延長する。(Yasuda et al., 投稿中)

今後は、EAAT3 機能低下がどのような神経回路を通じて不安を減少させるか電気生理学的に検証する予定である。

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)

[雑誌論文](計 6 件)

Naoko Morimura, Hiroki Yasuda, (12 名省略), Takeo Yoshikawa, and Jun Aruga. Autism-like behaviors and enhanced memory formation and synaptic plasticity in Lrfn2/SALM1-deficient mice. *Nature Communications*, 2017, 8: 15800. (査読有り) doi: 10.1038/ncomms15800

Sally Danno,...(8 名省略), Hiroki Yasuda (9 番目), and Hideyuki Mukai (最終著者). PKN2 is essential for mouse embryonic development and proliferation of mouse fibroblasts. *Genes to Cell*, 2017, 22(2): 220-236. (査読有り) doi: 10.1111/gtc.12470

N. Kojima*, H. Yasuda*, K. Hanamura, Y. Ishizuka, Y. Sekino, T. Shirao (*: co-first authors) Drebrin A regulates hippocampal LTP and hippocampus-dependent fear learning in adult mice. *Neuroscience*, 2016, 324: 218-226. (査読有り) doi: 10.1016/j.neuroscience.2016.03.015

Taira Mayanagi, Hiroki Yasuda, and Kenji Sobue PSD-Zip70-deficiency causes prefrontal hypofunction associated with

glutamatergic synapse maturation defects by dysregulation of Rap2 activity. *Journal of Neuroscience*, 2015, 35(42): 14327-14340. (査読有り) doi:

10.1523/JNEUROSCI.2349-15.2015

Hiroki Yasuda# and Hideyuki Mukai (#: corresponding author) Turning off of GluN2B subunits and turning on of CICR in hippocampal LTD induction after developmental GluN2 subunit switch. *Hippocampus*, 2015, 25(11): 1274-1284. (査読有り) doi: 10.1002/hipo.22435

Naoko H. Tomioka, Hiroki Yasuda, (以下 16 名略), Jun Aruga. Elfn1 recruits presynaptic mGluR7 in trans and its loss results in seizures. *Nature Communications*, 2014, 5: 4501. (査読有り) doi: 10.1038/ncomms5501

[学会発表](計 14 件)

安田浩樹、児島伸彦、山崎博幸、花村健次、白尾智明 ドレブリンによる海馬シナプス長期抑圧誘発の制御 第95回日本生理学会 2018年

T. Shirao, K. Hanamura, H. Yasuda, Y. Sekino, N. Kojima. Drebrin plays a role in mGluR-dependent LTD in adult brain. *Neuroscience 2017 (47th Annual Meeting of the Society for Neuroscience)*, 2017

Yuko Sekino, Hiroki Yasuda, Nobuhiko Kojima and Tomoaki Shirao. Drebrin plays a role in LTP and LTD in the adult brain." Cellular dynamics: membrane-cytoskeleton interface" *Journal of Cell Science Meeting*, 2017

Naoko Morimura, Hiroki Yasuda, (以下 8 名略), Jun Aruga. Autism-like behaviors and enhanced memory formation and synaptic plasticity in Lrnf2/SALM1-deficient mice. 第 60 回日本神経化学学会大会 2017 年
児島伸彦、安田浩樹、崎村建司、白尾智明 ドレブリンは mGluR5 および NMDA 受容体依存性 LTD 誘導に関わる 第 40 回日本神経科学大会 2017 年

安田浩樹、メヘルバモナ、向井秀幸 PKN1 による海馬歯状回興奮性と不安の

制御 第 40 回日本神経科学大会 2017 年
花村健次、児島伸彦、安田浩樹、山崎博幸、白尾智明 発達期樹状突起スパインのアクチン細胞骨格成熟とその加齢依存的なシナプス可塑性における役割 第 93 回日本生理学会大会 公募シンポジウム 26, 2016 年

Noriko Koganezawa, Yuki Kajita, Hiroki Yasuda, Kenji Sakimura and Tomoaki Shirao. Primary cultured hippocampal neurons prepared from drebrin knockout mouse shows the less immunoreactivity of MAP2 in the dendrites. *Neuroscience 2015 (45th Annual Meeting of the Society for Neuroscience)*, 2015

Hiroki Yasuda, Nobuhiko Kojima, Tomoaki Shirao. Deletion of drebrin A impairs hippocampal synaptic plasticity and hippocampus-dependent fear learning in adulthood. 第 58 回日本神経化学学会大会 2015 年

Noriko Koganezawa, Yuki Kajita, Hiroki Yasuda, Kenji Sakimura and Tomoaki Shirao. Primary cultured hippocampal neurons prepared from drebrin knockout mouse shows the less immunoreactivity of MAP2 in the dendrites. 第 38 回日本神経科学大会 2015 年

真柳平、安田浩樹、祖父江憲治 PSD-Zip70 による Rap2 活性調節を介したシナプス形成制御 第 87 回日本生化学学会大会 2014 年

Tomoaki Shirao, Toshiyuki Mizui, Noriko Koganezawa, Hideo Shimizu, Hiroki Yasuda, Yuko Sekino. Myosin II ATPase activity mediates the biphasic movement of stable F-actin bound by drebrin A between dendritic spines and the parent dendrite in long-term potentiation. *Neuroscience 2014 (44th Annual Meeting of the Society for Neuroscience)*, 2014

J. Aruga, N. H. Tomioka, H. Yasuda, H. Miyamoto. Elfn1 recruits presynaptic mGluR7 in trans and its loss cause epilepsy, hyperactivity, and attention deficit.

Neuroscience 2014 (44th Annual Meeting of the Society for Neuroscience), 2014

安田 浩樹、山本 光、川又 敏夫、向井秀幸 グルタミン酸トランスポーターを介した PKN1 による代謝型グルタミン酸受容体機能制御 第 37 回日本神経科学学会
2014 年

6 . 研究組織

(1)研究代表者

安田 浩樹 (YASUDA, Hiroki)
群馬大学・大学院医学系研究科・准教授
研究者番号：60294071

(2)連携研究者

向井 秀幸 (MUKAI Hideyuki)
神戸大学・医学系研究科・准教授
研究者番号：80252758

大西 浩史 (OHNISHI Hiroshi)
群馬大学・大学院保健学研究科・教授
研究者番号：70334125