

Award Accounts

第3回 D-アミノ酸学会奨励賞

記憶・学習をささえる脳内 D-アミノ酸の機能

掛川 渉

慶應義塾大学 医学部生理学

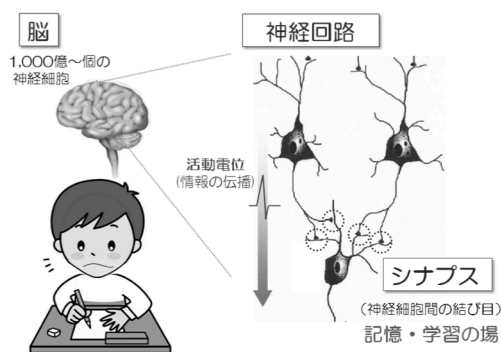
1.はじめに

私たちの生命活動を担うアミノ酸は、タンパク質の構成成分としてだけでなく、細胞内や血液、そして組織液中に遊離し、さまざまな生化学反応に寄与する重要な分子である。アミノ酸には構造の違いからL体とD体が存在し、私たちを含む多くの生命体はおもに L-アミノ酸によって構成されている。しかし、近年になって、たくさんの種類の D-アミノ酸が生体内で検出されるようになってきた。とりわけ、D-アミノ酸のひとつであるD-セリンが脳や脊髄などの中枢神経系に豊富に存在することが確認されて以来、記憶や学習をはじめとする高次脳機能への D-アミノ酸の関与が注目されている¹⁾。そこで本稿では、著者らが見出した、記憶・学習をささえる新しい脳内 D-アミノ酸シグナリングについて紹介したい。

2.記憶の実体—シナプス可塑性

記憶・学習といえば、私たちが生きていく上で必要不可欠な機能であるが、これらの機能が脳内で形成されることについては疑いの余地はない。私たちの脳は、1,000 億を超える数の神経細胞が「シナプス」を介して互いに結合し、脳特有の神経回路を構築することではじめて機能する(図1)。このシナプスでの情報伝達は、神経伝達物質である L-グルタミン酸 (L-Glu) とその受容体であるイオンチャンネル型グルタミン酸受容体 (ionotropic Glutamate Receptors; iGluRs) によって担われているが、最近になって、

iGluR ファミリーに属する AMPA 型グルタミン酸受容体 (以下、AMPA 受容体と略す) の動態が、記憶・学習の形成に重要であることが分かってきた。例えば、あるシナプスでは、細胞内の AMPA 受容体がシナプス表面に挿入される (エキソサイトーシス) ことで伝達効率が亢進したり (長期増強: Long-Term Potentiation; LTP)、また、あるシナプスでは AMPA 受容体が膜表面から細胞内に取り込まれる (エンドサイトーシス) ことで伝達効率が低下 (長期抑圧: Long-Term Depression; LTD) したりする。これら LTP や LTD をはじめとする AMPA 受容体数の変化によって誘導されるシナプス伝達効率の可逆的変化は「シナプス可塑性」と呼ばれ、今日、シナプス可塑性こそが、記憶・学習の実体であると考えられつつある。事実、シナプス可塑性機能を欠出した遺伝子改変動物では、記憶・学習が著しく障害されるといふ所見が数多く報告されている^{2,3)}。

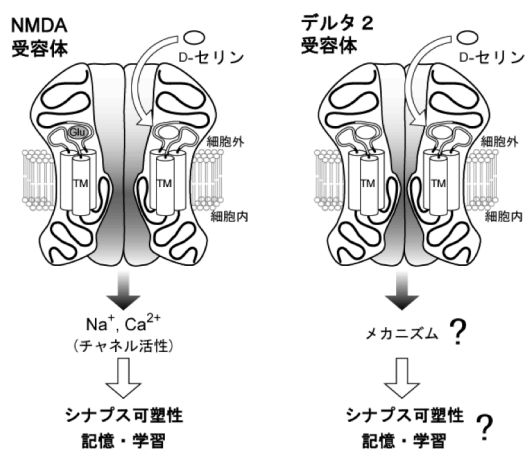


(図1) 私たちの脳

3. 脳内 D-セリン受容体

シナプス可塑性は、脳内のあらゆる領域において普遍的に起こる現象であるが、興味深いことに、D-セリンはこのシナプス可塑性の誘導に深く関与している。げっ歯類の脳を用いた実験では、D-セリンは海馬や大脳皮質を含む多くの領域で恒常的に存在している。これまで、D-セリンは、iGluR メンバーである NMDA 型グルタミン酸受容体 (以下、NMDA 受容体と略す) のコアゴニストとして作用し、共役するイオンチャンネルを介したカルシウム流入を引き金に、シナプス表面の AMPA 受容体数を調節し、シナプス可塑性や記憶・学習を制御することが明らかにされてきた (図 2 左)⁴⁾。

また、協調運動や運動記憶・学習を担う小脳では、生後発達期という限られた期間にのみ D-セリンが検出される⁵⁾。最近、X 線結晶解析法を用いた構造学的研究により、D-セリンが NMDA 受容体ばかりでなく、他の iGluR メンバーであるデルタ2型グルタミン酸受容体 (以下、デルタ2受容体と略す) の細胞外領域にも結合することが報告された (図 2 右)⁶⁾。デルタ2受容体は小脳神経回路の要衝を担う顆粒細胞軸索平行線維 (parallel fiber; PF)–プルキンエ細胞間シナプス (PF シナプス) にほぼ選択的に発現し、PF シナプスで観察される LTD や小脳依存性の運動記憶・学習を調節する重要な分子であることが、デルタ2受容体発現を欠く遺伝子欠損マウス (デルタ2欠損マウス) の解析から明らかにされている⁷⁾。しかし

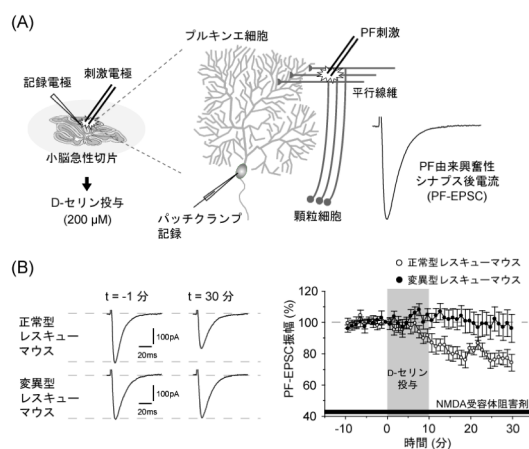


(図 2) 脳内に発現する D-セリン受容体

奇妙なことに、デルタ2受容体は iGluR メンバーであるにもかかわらず、*in vitro* 系では、D-セリンを含む一般的な iGluR 作用薬に対してまったくチャネル応答を示さない。そのため、脳内のデルタ2受容体がどのように機能しているのかは長らく不明であった。加えて、発達期小脳に豊富に存在する D-セリンがデルタ2受容体に結合する生理的意義についてもまったく分かっていなかった。そこで著者らは、D-セリンとの結合能を失った変異デルタ2受容体をデルタ2欠損プルキンエ細胞に発現させた“レスキュー”マウス (変異型レスキューマウス) を作製し⁸⁾、上記課題を追究することにした。

4. D-セリンは小脳 PF シナプスの伝達機能を制御する

はじめに、デルタ2受容体への D-セリン結合が PF シナプスの伝達機能を制御しうるかを、マウス小脳急性切片を用いた電気生理学実験により検討した (図 3)。PF を電気刺激することにより誘発されるシナプス応答をパッチクランプ法によりプルキンエ細胞から記録すると、AMPA 受容体を介する速い興奮性シナプス後電流 (PF-evoked excitatory postsynaptic current; PF-EPSC) が観察される (図 3A)。この PF-EPSC の振幅が安定した後、D-セリン (200 μ M, 10 分間) を細胞外投与すると、野生型デルタ2受容体を発現する正常型レスキューマウスでは、PF-EPSC が徐々に減少し (rundown)、D-セリン

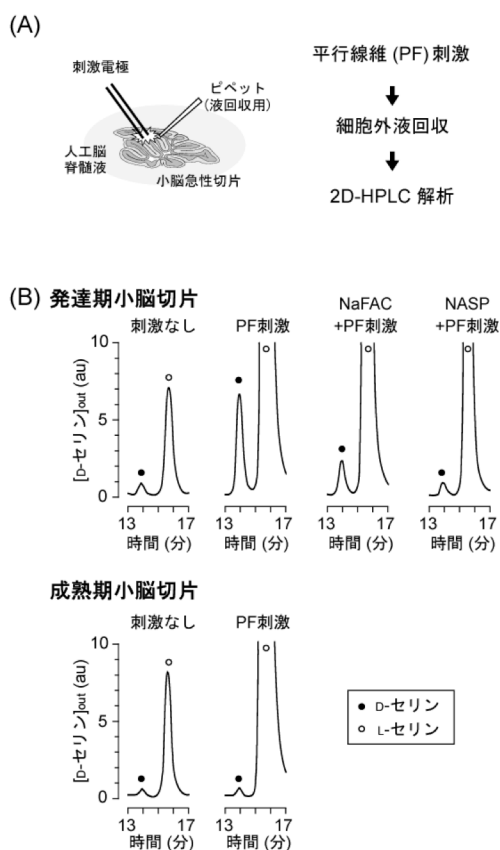


(図 3) D-セリン依存性 PF-EPSC rundown. D-セリン–デルタ2受容体シグナリングの関与を直接評価するため、NMDA 受容体阻害剤存在下で実験を行った。

除去後も尚、その大きさが維持された (図 3B)。また、この現象は、AMPA 受容体のエンドサイトーシスを阻害する薬剤でほぼ完全に抑制された。それに対して、変異型レスキューマウスからの PF-EPSC 記録では、D-セリン投与による rundown は認められなかった。すなわち、D-セリンはデルタ2受容体に結合することでシナプス表面の AMPA 受容体のエンドサイトーシスをもたらすことが示唆された⁹⁾。

5. 小脳 D-セリンはグリア細胞から放出される

次に、生後発達期小脳に豊富に存在する D-セリンが神経活動にともなって細胞外へ放出されるかを2次元高速液体クロマトグラフィー (2D-HPLC) 法¹⁰⁾により検討した (図 4)。生後発達期および成熟期のマウスから小脳急性切片を作製し、人工脳脊髄液中において小脳切片の神経活動を上昇させるような刺激 (PF の電気刺激や薬剤刺激) を与えると、



(図 4) 2D-HPLC 法による細胞外 D-セリン検出。(A) 実験手順。(B) 各条件下における D-セリン (黒丸) および L-セリン (白丸) シグナル。

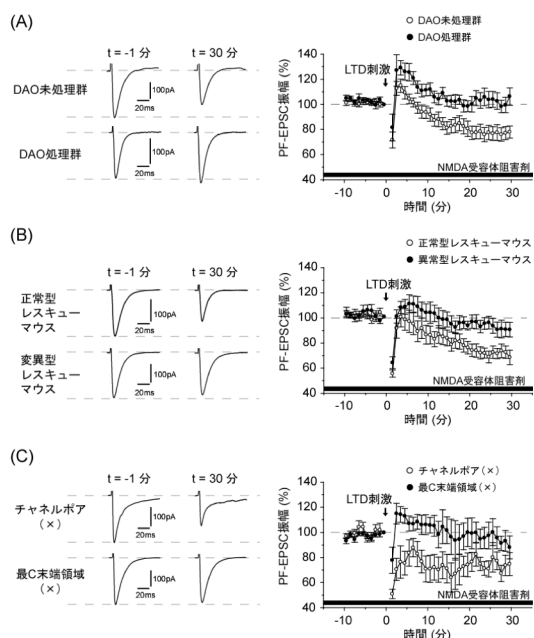
生後発達期標本において細胞外への D-セリンの放出が観察された。一方、成熟期標本では同様な刺激を与えても D-セリンの放出は認められなかった。続いて、D-セリンが脳内のどの細胞から放出されているかを確かめることにした。脳内には神経回路を構築する神経細胞に加えて、その数をはるかに超える数のグリア細胞と呼ばれる細胞が存在する。これまで海馬や大脳皮質標本を用いた実験では、D-セリンはグリア細胞から放出されることが示されている⁴⁾。そこで、生後発達期小脳切片をグリア細胞選択的な代謝阻害剤 (NaFAC) で処理すると、D-セリンの放出は著しく抑えられた。また、グリア細胞に発現する iGluR の選択的阻害剤 (NASP) で処理した標本や、小胞性放出機構を阻害するテタヌス毒素をアデノウイルスベクターによりグリア細胞に発現させた標本では、神経活動依存的な D-セリン放出が有意に抑制された。以上の結果から、生後発達期小脳において、D-セリンは神経活動依存的にグリア細胞から放出されることが分かった⁹⁾。

6. 小脳 LTD を促進する D-セリン→デルタ2受容体相互作用

では、神経活動依存的に放出される D-セリンは、PF シナプスの伝達機能を制御し、シナプス可塑性の誘導に影響を与えうるのであろうか？このことを確かめるために、生後発達期小脳切片のプルキンエ細胞より LTD 記録を行った。野生型マウス小脳切片の PF に LTD 誘導刺激を与えると、大きな LTD が観察される。しかし、小脳切片を D-アミノ酸分解酵素 (DAO) により処理したのち小脳 LTD 記録を行うと、LTD が完全に阻害された (図 5A)。すなわち、この結果は、小脳における LTD 誘発に D-セリンが必要であることを示唆する。

次に、小脳 LTD を制御する D-セリンの作用点がデルタ2受容体である可能性を検証するため、デルタ2レスキューマウスを用いることにした。その結果、正常型レスキューマウスでは LTD が認められたのに対し、変異型レスキューマウスでは LTD が有意に抑制されていた (図 5B)。したがって、生後発達期小脳における LTD は D-セリン→デルタ2受容体シグナリングを介して調節されることが確認できた⁹⁾。

それでは、D-セリンに結合したデルタ2受容体はどのような活性化様式を伴って小脳 LTD を調節するのであろうか？ 前述のとおり、デルタ2受容体は iGluR メンバーであることから、“脳内”ではイオンチャンネルとして機能しているかもしれない。この疑問に答えるため、デルタ2受容体のアミノ酸配列に保存されている推定上のチャンネルポア部位に点変異を加えてチャンネル機能を失わせた変異型受容体（チャンネルポア (X)）を¹¹⁾、シンドビスウイルスベクターを用いてデルタ2欠損マウスのプルキンエ細胞に導入した。すると、驚くべきことに、デルタ2欠損マウスで障害されていた小脳 LTD がほぼ完全に回復した（図 5C）。また、デルタ2受容体の細胞内最 C 末端領域7残基を欠失させた変異型受容体（最 C 末端領域 (X)）を¹²⁾、デルタ2欠損マウスに導入して LTD 記録を行うと、十分量の受容体が発現しているにもかかわらず、LTD 障害の回復はほとんど認められなかった（図 5C）。以上の結果から、生後発達期小脳に存在する D-セリンは、デルタ2受容体と結合することにより、最 C 末端領域を介した細胞内シグナル伝達系を駆動させ、シナプス表面の AMPA 受容体数を調節することで、小脳 LTD を制御している

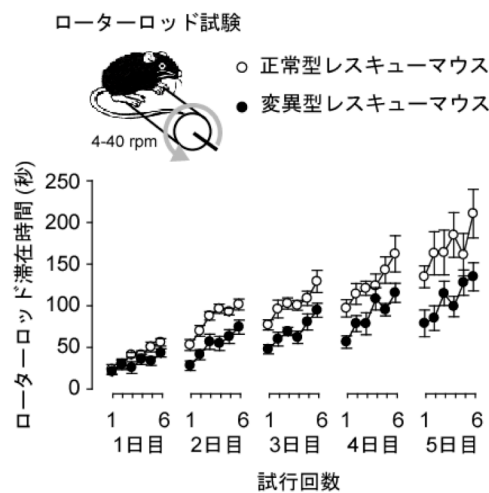


(図 5) D-セリン依存性小脳 LTD 記録。D-セリン-デルタ2受容体シグナリングの関与を直接評価するため、NMDA 受容体阻害剤存在下で実験を行った。

ことが示唆された⁹⁾。iGluR メンバーであるデルタ2受容体が、チャンネル活動に非依存的に働いていることはきわめて興味深い。

7. D-セリン→デルタ2受容体結合が運動記憶・学習を亢進させる

最後に、デルタ2受容体へのD-セリン結合が運動記憶・学習に影響を与えるかどうかを、マウスの運動記憶・学習能を評価するローターロッド試験を用いて調べた。正常型レスキューマウスと変異型レスキューマウスとのあいだで成績を比較したところ、変異型レスキューマウスは正常型レスキューマウスに比べ、生後発達期での学習成績が低下していることが分かった。また、連日にわたり試験をくり返すと、変異型レスキューマウスにおいては前日までに得られた成績が次の日まで維持されない、すなわち、効率よく記憶されていないことも示された（図 6）。以上の結果は、D-セリンによるデルタ2受容体の活性制御がマウスの運動記憶・学習を調節しうることを強く示唆する⁹⁾。



(図 6) ローターロッド試験を用いたデルタ2レスキューマウスの行動実験

8. おわりに

今回、著者らは、D-セリンがデルタ2受容体の内在性のリガンドとして作用し、シナプス可塑性や運動記憶・学習を制御することを報告した。この生後

発達期小脳で働く D-セリン→デルタ2受容体シグナリングの生理的意義については、依然として想像の域を越えないが、おそらく、この新規 D-セリンシグナリングは、自然界で生まれた動物が厳しい生活環境を生きぬくうえで必要な運動能力や運動技能を、逸早く身につけるために使われてきたのかもしれない。

近年、D-セリンはデルタ2受容体だけでなく、その同族分子であるデルタ1受容体にも結合しうることが分かってきた¹³⁾。デルタ1受容体は、胎生期から成熟期にかけて脳全域に広く発現し¹⁴⁾、デルタ1受容体発現を欠く遺伝子欠損マウスでは、作業記憶や恐怖条件付け学習など、いくつかの記憶・学習パラダイムに障害を呈することが報告されている¹⁵⁾。そのため、D-セリン→デルタ1受容体シグナリングが、各脳領域で観察されるシナプス可塑性を調節し、種々の記憶・学習過程に関与している可能性も考えられる。今後、D-セリン→デルタ受容体シグナリングの解明が、記憶・学習形成の分子レベルでの理解に繋がることを期待している。

謝 辞

本研究は、九州大学・浜瀬健司准教授および国際医療福祉大学・金野柳一教授らとの共同研究によるものである。

文 献

1. Hashimoto A, Oka T. 1997. Free D-aspartate and D-serine in the mammalian brain and periphery. *Prog Neurobiol* 52:325-353.
2. Chen C, Tonegawa S. 1997. Molecular genetic analysis of synaptic plasticity, activity-dependent neural development, learning, and memory in the mammalian brain. *Ann Rev Neurosci* 20:157-184.
3. Yuzaki M. 2013. Cerebellar LTD vs. motor learning — lessons learned from studying GluD2. *Neural Networks* 47:36-41.
4. Oliet SH, Mothet JP. 2009. Regulation of N-methyl-D-aspartate receptors by astrocytic D-serine. *Neuroscience* 158:275-283.
5. Schell MJ, Brady RO Jr, Molliver ME, Snyder SH. 1997. D-Serine as a neuromodulator: regional and developmental localizations in rat brain glia resemble NMDA receptors. *J Neurosci* 17:1604-1615.
6. Naur P, et al. 2007. Ionotropic glutamate-like receptor $\delta 2$ binds D-serine and glycine. *Proc Natl Acad Sci USA* 104:14116-14121.
7. Kashiwabuchi N, et al. 1995. Impairment of motor coordination, Purkinje cell synapse formation, and cerebellar long-term depression in GluR $\delta 2$ mutant mice. *Cell* 81:245-252.
8. Hirai H, et al. 2005. Rescue of abnormal phenotypes of the $\delta 2$ glutamate receptor-null mice by mutant $\delta 2$ transgenes. *EMBO Rep* 6:90-95.
9. Kakegawa W, et al. 2011. D-Serine regulates cerebellar LTD and motor coordination through the $\delta 2$ glutamate receptor. *Nat Neurosci* 14:603-611.
10. Miyoshi Y, et al. 2009. Determination of D-serine and D-alanine in the tissues and physiological fluids of mice with various D-amino-acid oxidase activities using two-dimensional high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 877:2506-2512.
11. Kakegawa W, Kohda K, Yuzaki M. 2007. The $\delta 2$ 'ionotropic' glutamate receptor functions as a non-ionotropic receptor to control cerebellar synaptic plasticity. *J Physiol* 584:89-96.
12. Kakegawa W, et al. 2008. Differential regulation of synaptic plasticity and cerebellar motor learning by the C-terminal PDZ-binding motif of GluR $\delta 2$. *J Neurosci*

- 28:1460-1468.
13. Yadav R, Rimerman R, Scofield MA, Dravid SM. 2011. Mutations in the transmembrane domain M3 generate spontaneously open orphan glutamate d1 receptor. *Brain Res* 1382:1-8.
 14. Konno K, et al. 2014. Enriched expression of GluD1 in higher brain regions and its involvement in parallel fiber-interneuron synapse formation in the cerebellum. *J Neurosci* 34:7412-7424.
 15. Yadav R, et al. 2013. Deletion of glutamate δ -1 receptor in mouse leads to enhanced working memory and deficit in fear conditioning. *PLoS One* 8:e60785.



掛川 渉(かけがわ わたる)氏

略 歴

- 1993-1997 群馬大学工学部材料工学科
1997-1999 群馬大学大学院工学系研究科
修士課程
1999-2003 群馬大学大学院医学系研究科
博士課程
2002-2004 日本学術振興会特別研究員
2003 St. Jude Children's Research Hospital
博士研究員
2004-2011 慶應義塾大学医学部生理学
助手 (2007より助教)
2011-現在 慶應義塾大学医学部生理学
専任講師