

Title	神経伝達の新規制御機構：活動依存的な細胞外イオン濃度変化による制御機構の解明
Sub Title	Investigation of new regulation mechanism of synaptic transmission by activity dependent extracellular Ca ²⁺ dynamics
Author	荒井, 格(Arai, Itaru)
Publisher	慶應義塾大学
Publication year	2018
Jtitle	学事振興資金研究成果実績報告書 (2017.)
JaLC DOI	
Abstract	<p>中枢神経系において、神経活動が亢進するとシナプス近傍の細胞外でCa²⁺等の濃度が一時的に変化することが知られているが、その機能的意義については不明な点が多い。δ2型グルタミン酸受容体(GluD2)は小脳平行線維シナプスに存在し、Dセリンと結合してシナプス可塑性を制御するが、細胞外領域にCa²⁺結合部位を持つ。近年, <i>in vitro</i>実験からGluD2のDセリンに対する親和性は細胞外Ca²⁺濃度に依存することが報告された(Hansen et al. 2009, J Neurosci.)。このことは小脳平行線維シナプスの可塑性がDセリンだけでなく、細胞外Ca²⁺濃度にも制御されている可能性を示唆している。本研究は、GluD2をモデルに神経活動による細胞外Ca²⁺濃度変化がDセリン–GluD2シグナリングへ及ぼす影響を解析し、新規シナプス制御機構を明らかにすることを目的とした。そのためにはGluD2のCa²⁺に対する結合能を操作した遺伝子改変マウスを作製する必要がある。そこで本年度は主にGluD2に点変異を導入したノックインマウスの作成を行った。変異導入部位については、Hansen et al. (2009)に従い、①D782AによってCa²⁺結合能を欠損したGluD2、②E521C及びD782Cによって常時Ca²⁺結合状態を模倣したGluD2を設計した。ノックインマウス①について、標的塩基配列を含むガイドRNAを3種類作製し、それぞれCas9 mRNA及びドナーDNAと共に野生型マウスより採取した受精卵にインジェクションした。生まれてきた仔に対してシーケンス解析した結果、一部にノックインホモマウスを確認した。ノックインマウス②についてはエクソンの異なる2か所に変異を導入するため、変異導入を2回に分けて行う方法を探った。本年度はまず1点目としてD782Cの変異導入をノックインマウス①と同様の方法で行い、ホモマウスが生まれた事を確認した。今後、ホモマウスから採取した受精卵を使って2点目のE521Cの変異導入を行い、ノックインマウス②を作成する予定である。</p> <p>It has been well-known that extracellular Ca²⁺ concentration ([Ca]_o) at synapse can change by neural activity in the central nervous system. However, the functional significance of this [Ca]_o dynamics in synaptic transmission is still elusive. Delta 2 glutamate receptors (GluD2), that are expressed at cerebellar parallel fiber – Purkinje cell synapse (PF-PC synapse), has been reported to regulate synaptic plasticity by binding to D-serine. It has been reported that GluD2 has Ca²⁺ binding site near its ligand binding domain, and that the affinity of GluD2 to D-serine can be influenced by [Ca]_o (Hansen et al. 2009, J Neurosci.). This suggests that the synaptic plasticity at PF-PC synapse can be regulated not only by D-serine but also by [Ca]_o. In this study, using D-serine-GluD2 signaling at PF-PC synapse, I aimed to investigate the possibility of the synaptic transmission being regulated by the [Ca]_o dynamics. For this aim, in this year, I tried to produce two knock-in (KI) mice which have mutations in GluD2 by CRISPR/Cas9 system; (1) D782A single mutation to impair Ca²⁺ binding ability, and (2) E521C and D782C two points mutation to mimic constitutive Ca binding state. Regarding KI mouse (1), KI homo mice were already obtained successfully. KI mouse (2) is in the process of production but will be obtained soon.</p>
Notes	
Genre	Research Paper
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=2017000001-20170297

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the Keio Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

研究代表者	所属	医学部基礎教室	職名	助教(有期・医学部)	補助額	500 (特B)千円
	氏名	荒井 格	氏名 (英語)	Itaru Arai		
研究課題 (日本語)						
神経伝達の新規制御機構:活動依存的な細胞外イオン濃度変化による制御機構の解明						
研究課題 (英訳)						
Investigation of new regulation mechanism of synaptic transmission by activity dependent extracellular Ca ²⁺ dynamics						
1. 研究成果実績の概要						
<p>中枢神経系において、神経活動が亢進するとシナプス近傍の細胞外で Ca²⁺等の濃度が一時的に変化することが知られているが、その機能的意義については不明な点が多い。δ2型グルタミン酸受容体(GluD2)は小脳平行線維シナプスに存在し、Dセリンと結合してシナプス可塑性を制御するが、細胞外領域に Ca²⁺結合部位を持つ。近年、in vitro 実験から GluD2 の Dセリンに対する親和性は細胞外 Ca²⁺濃度に依存することが報告された(Hansen et al. 2009, J Neurosci.)。このことは小脳平行線維シナプスの可塑性が Dセリンだけでなく、細胞外 Ca²⁺濃度にも制御されている可能性を示唆している。本研究は、GluD2 をモデルに神経活動による細胞外 Ca²⁺濃度変化が Dセリン—GluD2 シグナリングへ及ぼす影響を解析し、新規シナプス制御機構を明らかにすることを目的とした。そのためには GluD2 の Ca²⁺に対する結合能を操作した遺伝子改変マウスを作製する必要がある。そこで本年度は主に GluD2 に点変異を導入したノックインマウスの作成を行った。変異導入部位については、Hansen et al. (2009)に従い、①D782A によって Ca²⁺結合能を欠損した GluD2、②E521C 及び D782C によって常時 Ca²⁺結合状態を模倣した GluD2 を設計した。ノックインマウス①について、標的塩基配列を含むガイド RNA を 3種類作製し、それぞれ Cas9 mRNA 及びドナー DNA と共に野生型マウスより採取した受精卵にインジェクションした。生まれてきた仔に対してシーケンス解析した結果、一部にノックインホモマウスを確認した。ノックインマウス②についてはエクソンの異なる 2か所に変異を導入するため、変異導入を 2回に分けて行う方法を採った。本年度はまず 1点目として D782C の変異導入をノックインマウス①と同様の方法で行い、ホモマウスが生まれた事を確認した。今後、ホモマウスから採取した受精卵を使って 2点目の E521C の変異導入を行い、ノックインマウス②を作成する予定である。</p>						
2. 研究成果実績の概要 (英訳)						
<p>It has been well-known that extracellular Ca²⁺ concentration ([Ca]_o) at synapse can change by neural activity in the central nervous system. However, the functional significance of this [Ca]_o dynamics in synaptic transmission is still elusive. Delta 2 glutamate receptors (GluD2), that are expressed at cerebellar parallel fiber – Purkinje cell synapse (PF-PC synapse), has been reported to regulate synaptic plasticity by binding to D-serine. It has been reported that GluD2 has Ca²⁺ binding site near its ligand binding domain, and that the affinity of GluD2 to D-serine can be influenced by [Ca]_o (Hansen et al. 2009, J Neurosci.). This suggests that the synaptic plasticity at PF-PC synapse can be regulated not only by D-serine but also by [Ca]_o. In this study, using D-serine – GluD2 signaling at PF-PC synapse, I aimed to investigate the possibility of the synaptic transmission being regulated by the [Ca]_o dynamics. For this aim, in this year, I tried to produce two knock-in (KI) mice which have mutations in GluD2 by CRISPR/Cas9 system; (1) D782A single mutation to impair Ca²⁺ binding ability, and (2) E521C and D782C two points mutation to mimic constitutive Ca binding state. Regarding KI mouse (1), KI homo mice were already obtained successfully. KI mouse (2) is in the process of production but will be obtained soon.</p>						
3. 本研究課題に関する発表						
発表者氏名 (著者・講演者)	発表課題名 (著書名・演題)	発表学術誌名 (著書発行所・講演学会)	学術誌発行年月 (著書発行年月・講演年月)			
Sho Wakayama, Shigeki Kiyonaka, Itaru Arai, Wataru Kakegawa, Shinji Matsuda, Keiji Ibata, Yuri L. Nemoto, Akihiro Kusumi, Michisuke Yuzaki & Itaru Hamachi	Chemical labeling for visualizing native AMPA receptors in live neurons	Nature Communications	2017年4月			
Misako Matsushita, Yuhki Nakatake, Itaru Arai, Keiji Ibata, Kazuhisa Kohda, Sravan Goparaju, Miyako Murakami, Miki Sakota, Nana Chikazawa-Nohtomi, Shigeru Ko, Takanori Kanai, Michisuke Yuzaki & Minoru S.H. Ko	Neural differentiation of human embryonic stem cells induced by the transgene-mediated overexpression of single transcription factors	Biochemical and Biophysical Research Communications	2017年6月			
Gen Shiihashi, Daisuke Ito, Itaru Arai, Yuki Kobayashi, Kanehiro Hayashi, Shintaro Otsuka, Kazunori Nakajima, Michisuke Yuzaki, Shigeyoshi Itohara, Norihiro Suzuki	Dendritic homeostasis disruption in a novel frontotemporal dementia mouse model expressing cytoplasmic fused in sarcoma	EBioMedicine	2017年9月			