The Society for Bioscience and Bioengineering, Japan

D-アミノ酸の神経生理：脳内D-セリンによる記憶・学習制御

掛川　渉*・柚﨑　通介

はじめに

アミノ酸は，我々の生命活動をもたらす根源的な分子である．アミノ酸には構造の違いから互いに光学異性体の関係をもつL-体とD-体とが存在し，我々を含む多くの生命体はおもにL-アミノ酸により構成されている．しかし，近年の計測技術の進歩により，生体内にも多種類のD-アミノ酸が検出されるようになってきた．中でも，D-アミノ酸の一つであるD-セリンが脳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，筆者らが得た最近の研究結果を中心に，脳内D-セリンによる記憶・学習制御の分子機構について概説する．

記憶・学習の分子基盤：シナプス可塑性

我々の脳は，1000億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，脳特有の神経回路網を構築することで機能する．このシナプスでの情報伝達は，神経伝達物質であるグルタミン酸（Glu）とその受容体であるイオンチャ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，記憶･学習の形成過程に伴い，iGluRファミリーに属するAMPA（α-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid）型グルタミン酸受容体（以下，AMPA受容体）がシナプス膜上でダイナミックに動くことがわかってきた．たとえば，あるシナプスでは，受容体がシナプスに挿入されることでシナプス伝達効率が亢進し（長期増強: long-term potentiation; LTP），また，あるシナプスでは受容体が細胞内に取り込まれることで伝達効率が低下する（長期抑圧: long-term depression; LTD）．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長期的変化は「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・学習の分子基盤と考えられつつある．事実，シナプス可塑性が障害された遺伝子改変マウスでは，記憶・学習が著しく低下している例が数多く報告されている[2,3]．

記憶・学習をささえるD-セリン受容体

興味深いことに，脳内の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．D-セリンは海馬・大脳皮質・線条体を含む多くの脳領域において恒常的に存在する．これまで，D-セリンはiGluRメンバーであるNMDA（*N*-methyl-D-aspartate）型グルタミン酸受容体（以下，NMDA受容体）のコアゴニストとして作用し，共役するイオンチャ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，シナプス可塑性および記憶・学習を制御していることが知られている（図1左）[4]．

一方，協調運動や運動記憶・学習を支える小脳においては，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]．そのため，生後発達期の小脳において一過的に増加するD-セリンが，どのような機能的役割を担っているかについては大きな謎であった．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）の細胞外領域に結合することが報告された[6]．デルタ2受容体は小脳の神経回路網の要衝を担う顆粒細胞軸索平行線維（PF）－プルキンエ細胞間シナプス（以下，PFシナプス）に選択的に

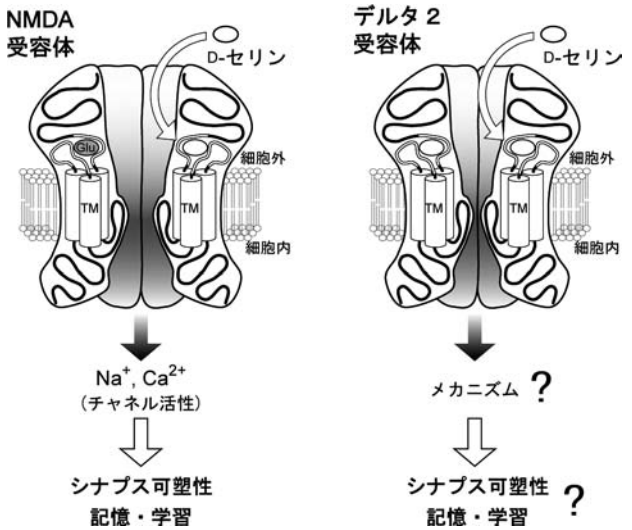

図1．シナプス可塑性および記憶・学習をささえるD-セリン受容体．左，NMDA受容体．右，デルタ2受容体．

*著者紹介　慶應義塾大学医学部生理学教室（専任講師）　E-mail: wkake@z7.keio.jp

NII-Electronic Library Service

The Society for Bioscience and Bioengineering, Japan

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（以下，デルタ2欠損マウス）の解析により明らかにされている[7]．しかし，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ことから，脳内におけるデルタ2受容体の活性化様式については長らく不明であった．とりわけ，脳内D-セリンはデルタ2受容体を活性化できるほど細胞外に放出されているのか，また，D-セリン→デルタ2受容体結合にどのような生理的意義があるのかについては，まったく分かっていなかった（図1右）．そこで筆者らは，これらの疑問に答えるべく以下の実験を行った[8]．

小脳D-セリンは神経活動依存的にグリアから放出される

はじめに，生後発達期小脳に豊富に存在するD-セリンが神経活動依存的に細胞外へ放出されうるかを2次元高速液体クロマトグラフィー（2D-HPLC）法[9]を用いて検討した（図2）．生後発達期および成熟期のマウスから小脳急性スライスを作製し，人工脳脊髄液中においてスライス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，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．次に，D-セリンが脳内のどの細胞から放出されているかを検討した．脳内には神経回路網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

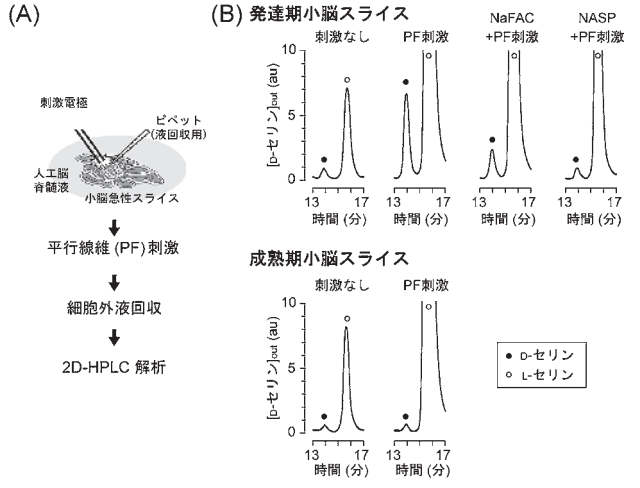

図2．2D-HPLC法を用いた細胞外D-セリン検出．（A）実験手順．（B）各条件下におけるD-セリン（黒丸）およびL-セリン（白丸）シグナル．

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，生後発達期小脳スライスをグリア細胞選択的な代謝阻害剤であるNaFAC（sodium fluoroacetate）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（1-naphtyl acetyl spermine; 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ィ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示唆された．

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-セリンはシナプス可塑性の誘導に影響しうるのであろうか？このことを確かめるために，パッチクランプ法を用い，生後発達期小脳スライスのプルキンエ細胞よりシナプス応答（興奮性シナプス後電流（excitatory postsynaptic current; EPSC））を記録した（図3A）．まず，野生型マウスの小脳スライスをD-アミノ酸分解酵素（D-amino acid oxidase; DAO）により処理したのち小脳LTD記録を行ったところ，未処理群に比べ，小脳LTDが有意に阻害された（図3B）．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，正常型デルタ2受容体，あるいは，D-セリンとの結合能を欠く変異型デルタ2受容体を，デルタ2欠損マウスのプルキンエ細胞に遺伝子導入した“レスキュー”マウス（以下，正常型レスキューマウスおよび変異型レスキューマウスと略す）を作製し，生後発達期における小脳LTDを観察したところ，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が障害されていた（図3C）．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明らかとなった．

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”ではイオンチャネルとして機能しているのであろうか？この疑問に対し，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ネルポア部位に点変異を加えてチャネル機能を失わせた変異型受容体（チャネルポア（×））を[10]，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

NII-Electronic Library Service

The Society for Bioscience and Bioengineering, Japan

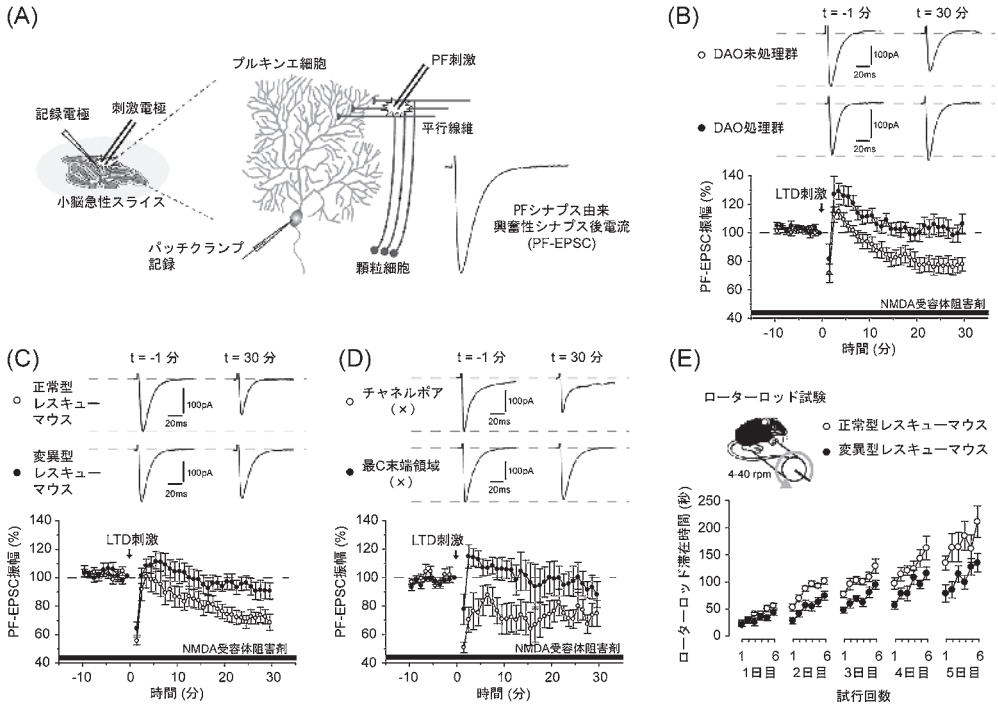

図3. D-セリン依存性小脳LTD記録とデルタ2受容体レスキューマウスの表現型解析.（A）生後発達期小脳急性スライスを用いたPFシナプス由来興奮性シナプス後電流（PF-EPSC）記録.（B）DAO処理標本からの小脳LTD記録.（C）生後発達期のデルタ2受容体レスキューマウスにおける小脳LTD記録.（D）各種変異型デルタ2受容体を強制発現させたプルキンエ細胞からのLTD記録. 上記の小脳LTD実験は, D-セリン→デルタ2受容体シグナリングの関与を評価するため, NMDA受容体阻害剤存在下で行った.（E）生後発達期のデルタ2受容体レスキューマウスにおけるローターロッド試験.

胞に導入すると，驚くべきことに，この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3D）. 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（×））を[11]，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3D）. 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を制御していることが示唆された. iGluRメンバーであるデルタ2受容体が，チャ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.

デルタ2受容体へのD-セリン結合が運動記憶・学習を亢進させる

次に，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・学習能を評価しう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間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，生後発達期において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3E）. したがって，D-セリンによるデルタ2受容体の活性制御はマウスの運動記憶・学習を調節しうることが示唆された.

デルタ2受容体最C末端領域を介するLTD調節シグナリング

最後に，D-セリン結合に伴って活性化されるデルタ2受容体は，どのような細胞内シグナル経路を介してAMPA受容体数を減少させ，小脳LTDを引き起こしているのであろうか？この疑問に対する明確な答えは現段階で得られていない. しかし，最近，我々は，成熟期マウスで観察される小脳LTDにおけるデルタ2受容体の関与について解析を行ったところ，デルタ2受容体の最C末端領域で結合するチロシン脱リン酸化酵素PTPMEG（megakaryocyte protein tyrosine phosphatase）がAMPA受容体の細胞内チロシン残基（具体的には，AMPA受容体を構成するGluA2サブユニットの細胞内チロシン[876]

NII-Electronic Library Service

The Society for Bioscience and Bioengineering, Japan

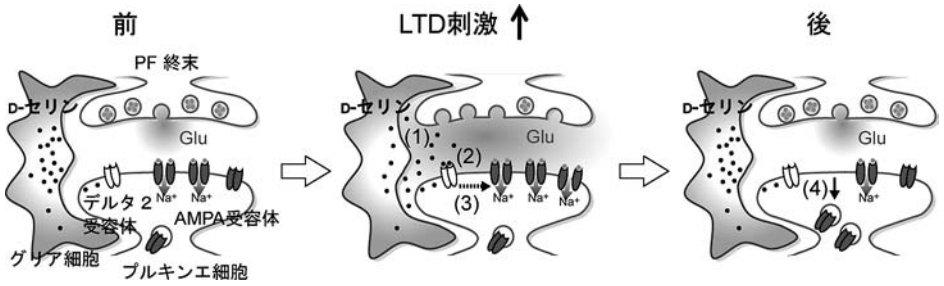

図4. 小脳LTDおよび運動記憶･学習をささえるD-セリン→デルタ2受容体シグナリング．(1)グリア細胞からのD-セリン放出．(2)デルタ2受容体へのD-セリン結合．(3) デルタ2受容体最C末端領域を介する細胞内シグナリング駆動（PTPMEGの局在・活性変化？）．(4) AMPA受容体のエンドサイトーシス（＝小脳LTD）．

残基）を脱リン酸化することで，AMPA受容体の細胞内取り込み（エンドサイトーシス）を促すことを明らかにしている[12]．事実，デルタ2受容体の最C末端領域7残基を欠く変異型受容体はPTPMEGと結合しない．また，興味深いことに，PTPMEG発現を欠く遺伝子欠損マウスでは，成熟期の小脳LTDが障害され，運動記憶・学習が低下している[13]．これらの結果から想像を逞しくすると，発達期小脳においてグリア細胞から放出されるD-セリンは，デルタ2受容体結合を介して，細胞内のPTPMEG局在あるいは活性状態を変化させ，最終的にAMPA受容体のエンドサイトーシス，そして，小脳LTDを誘導しているのかもしれない（図4）．今後，PTPMEG欠損マウスを用いた解析が待たれる．

おわりに

今回，筆者らは，D-セリンがデルタ2受容体の内在性のリガンドとして働き，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，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抜く上で必要な運動能力および運動技能を，いち早く身につけるために使われてきたのかもしれない．

この新規D-セリンシグナリングはマウスばかりでなくヒトにも存在するものと考えられ，ヒトの幼児期での運動記憶・学習過程の理解に有用な知見を提供しうるものと期待される．また，成熟期の小脳ではD-セリンは消失してしまうもののデルタ2受容体は生涯を通じて恒常的に発現していることから，デルタ2受容体より下流の細胞内シグナル経路を明らかにし，これを制御することにより，将来，大人でも効率的に運動学習を促進させうる可能性も期待できる．

また，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[14]．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[15]，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ことが報告されている[16]．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つな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．また，本研究を遂行した研究室メンバーに深く感謝したい．

文　献

1) Hashimoto, A. and Oka, T.: *Prog. Neurobiol.*, **52**, 325 (1997).
2) Chen, C. and Tonegawa, S.: *Ann. Rev. Neurosci.*, **20**, 157 (1997).
3) Yuzaki, M.: *Neural Networks*, **47**, 36 (2013)
4) Oliet, S. H. and Mothet, J. P.: *Neuroscience*, **158**, 275 (2009).
5) Schell, M. J. *et al.*: *J. Neurosci.*, **17**, 1604 (1997).
6) Naur, P. *et al.*: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **104**, 14116 (2007).
7) Kashiwabuchi, N. *et al.*: *Cell*, **81**, 245 (1995).
8) Kakegawa, W. *et al.*: *Nat. Neurosci.*, **14**, 603 (2011).
9) Miyoshi, Y. *et al.*: *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.*, **877**, 2506 (2009).
10) Kakegawa, W. *et al.*: *J. Physiol.*, **584**, 89 (2007).
11) Kakegawa, W. *et al.*: *J. Neurosci.*, **28**, 1460 (2008).
12) Kohda, K. *et al.*: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **110**, E948 (2013).
13) Kina, S. *et al.*: *Eur. J. Neurosci.*, **26**, 2269 (2007).
14) Yadav, R. *et al.*: *Brain Res.*, **1382**, 1 (2011).
15) Konno, K. *et al.*: *J. Neurosci.*, **34**, 7412 (2014).
16) Yadav, R. *et al.*: *PLoS One*, **8**, e60785 (2013).

NII-Electronic Library Service