

グルタミン酸トランスポーター

田中光一

はじめに

グルタミン酸は、哺乳類の中枢神経系において主要な興奮性神経伝達物質であり、脳形成や高次脳機能に重要な役割を果たしている¹⁾。しかし、その機能的な重要性の反面、興奮毒性という概念で表されるように、過剰な細胞外グルタミン酸は神経細胞障害作用を持ち、様々な精神神経疾患の病態に関与すると考えられている²⁾。グルタミン酸の高次脳機能における役割に比べ、脳形成における役割は不明な点が多い。グルタミン酸が脳形成に関与することを支持する *in vitro* のデータは多いが、*in vivo* のデータは少ない。本稿では、グルタミン酸トランスポーターの脳形成における役割を、われわれの研究室の成果を中心に概説する。

●グルタミン酸のシナプスにおける動態

前シナプスニューロンの軸索終末から放出されたグルタミン酸は、シナプス間隙を拡散し、後シナプスニューロンにあるグルタミン酸受容体に結合し、情報を伝える。情報伝達の役割を終えたグルタミン酸は、主にアストロサイトに存在するグルタミン酸トランスポーターにより、シナプス間隙からアストロサイト内に取り込まれる。アストロサイト内に取り込まれたグルタミン酸は、グルタミン合成酵素によりグルタミンに変換され、アストロサイト外に放出される。放出されたグルタミンは、前シナプスニューロンに取り込まれ、グルタミン酸に変換され、再びシナプス小胞に蓄えられる (図 1A)。現在、脳には 4 種類のグルタミン酸トランスポーターが発現し、EAAT1 (GLAST)、EAAT2 (GLT1)、EAAT3 (EAAC1)、EAAT4 と命名されている。EAAT1、EAAT2 は主にアストロサイトに、EAAT3、EAAT4 はニューロンに局在し、それぞれ特徴的な発現パターンを示す (図 1B)³⁾。

●脳形成の素過程

脳形成は、① 神経幹細胞による新しい神経細胞の誕生、② 新生神経細胞の移動、③ 神経細胞の分化の 3 つの過程に分けられる (図 2)。

●グルタミン酸の脳形成における役割—*in vivo* の研究

1. グルタミン酸トランスポーターの欠損が胎児期の脳形成に及ぼす影響

高次脳機能におけるグルタミン酸シナプス伝達の役割を解明するため、グルタミン酸受容体欠損マウスやグルタミン酸の放出を抑制するマウスなどのグルタミン酸シグナルを欠損するマウスが多く作製された。しかし、*in vitro* の結果と異なり、ほとんどのグルタミン酸シグナル欠損マウスでは、脳形成に大きな異常は見られなかった。胎児期では、GABA などの抑制性神経伝達物質も、神経細胞を脱分極し、興奮性神経伝達物質として作用する。筆者らは、グルタミン酸シグナルの欠損マウスでは、他の神経伝達物質による代償作用により、その効果が観察されないと考えた。発想を逆転させ、グルタミン酸シグナルを亢進させたら脳形成に何らかの影響がでるのではと考えた。*In vivo* でグルタミン酸シグナルを亢進させるため、グルタミン酸トランスポーターを欠損させたマウスを作製した。胎児期の脳には、GLAST、GLT1、EAAC1 の 3 種類のグルタミン酸トランスポーターが発現している。しかし、これら 3 種類の個々のサブタイプ欠損マウスは、脳形成異常を示さない^{4,5)}。そこで、サブタイプ間の代償作用を排除するため、2 種類のグルタミン酸トランスポーターを欠損するダブル欠損マウスを作製した⁶⁾。EAAC1 & GLAST、EAAC1 & GLT1 ダブル欠損マウスは正常な脳形成を示したが、GLT1 & GLAST ダブル欠損マウス (DK マウス) は胎生 17 日頃に死亡し、脳に様々な形成異常が観察された (図 3)。胎生 14 日までは野生型と大きな差はなかったが、胎

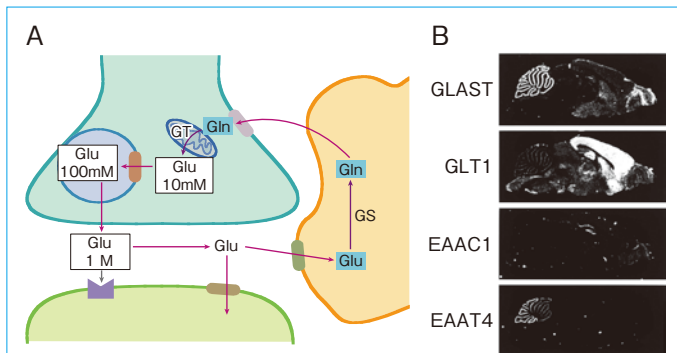


図1 シナプスにおけるグルタミン酸の動態 (A) とグルタミン酸トランスポーターの脳内局在 (B)

Glu: グルタミン酸, Gln: グルタミン, GS: グルタミン合成酵素, GT: グルタミナーゼ. Bはマウス脳の矢状断.

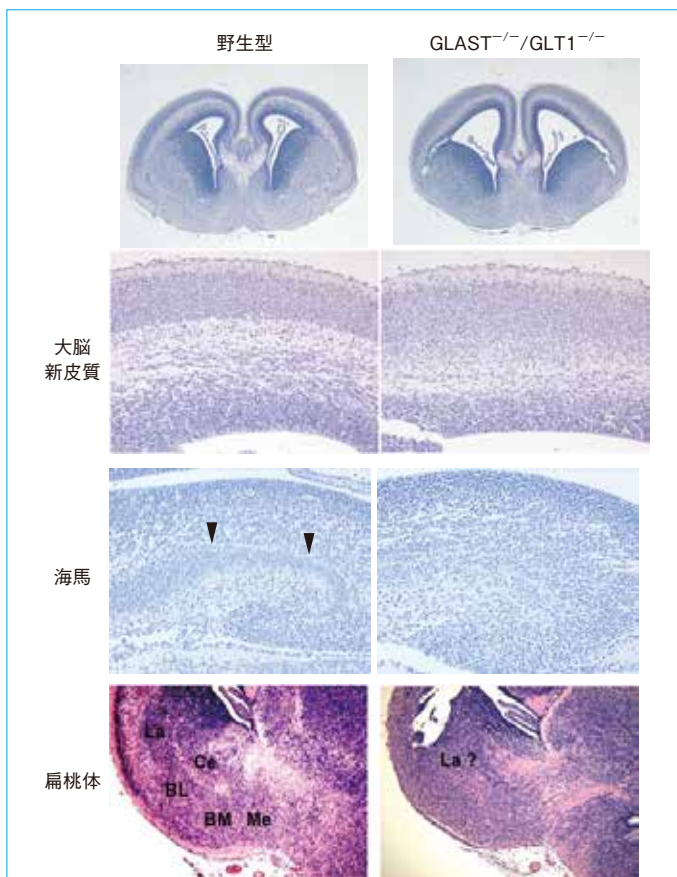


図3 DK マウスで観察される脳の形成異常

海馬における矢頭は錐体細胞層を示す. 扁桃体における La, BL, BM, Me, Ce は垂核の名前. 胎生 17 日目の標本.

生 16 日以降の DK マウスは, 側脳室の拡大, 大脳新皮質および海馬における層形成の異常, 扁桃体の核形成の異常が観察された (図 3). さらに, 蛍光色素のトレーサー DiI を用い, 大脳皮質と視床を繋ぐ軸索を可視化したところ,

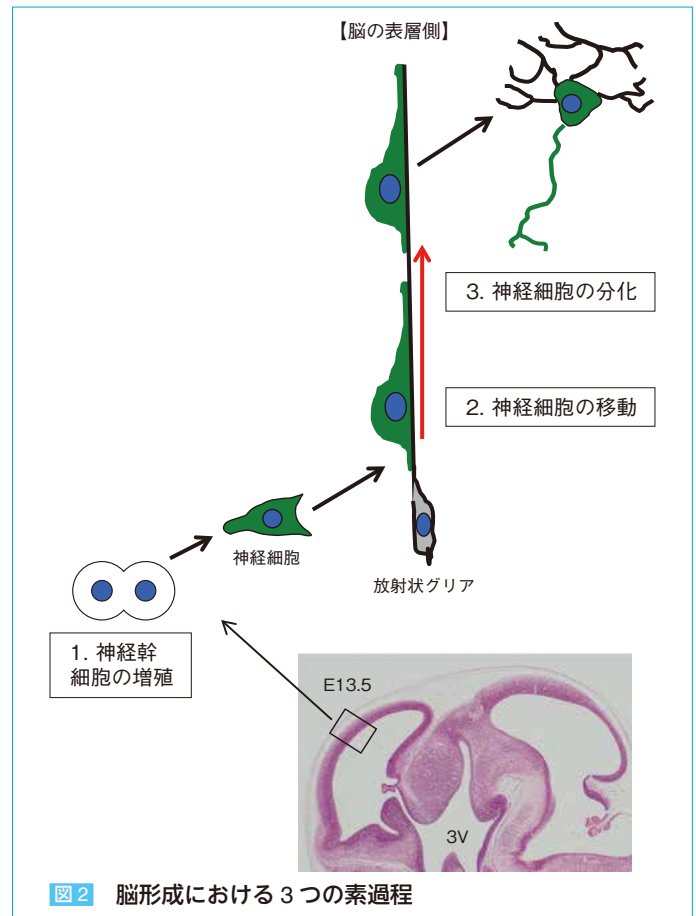


図2 脳形成における 3つの素過程

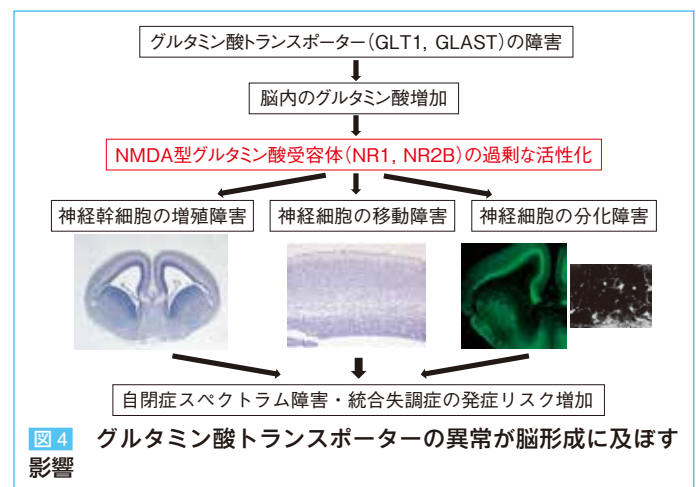


図4 グルタミン酸トランスポーターの異常が脳形成に及ぼす影響

DK マウスにおいて, 大脳皮質と視床間の線維連絡は障害されていた. また, 大脳新皮質錐体細胞の突起の数および長さにも異常が観察された. 詳細な解析の結果, DK マウスでは, 脳形成の主要な素過程である, ① 神経幹細胞の増殖, ② 神経細胞の移動, ③ 神経細胞の分化の全ての過程が障害されていることがわかった. これらの脳形成異常

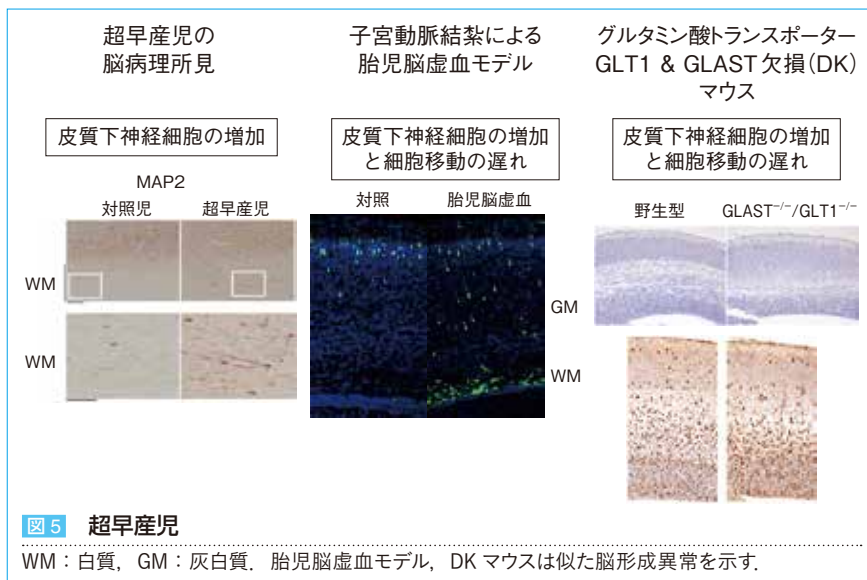


図5 超早産児

WM：白質，GM：灰白質。胎児脳虚血モデル，DK マウスは似た脳形成異常を示す。

は、DK マウスから胎児期の主要なグルタミン酸受容体サブタイプである NMDA 型受容体を欠損させたトリプル欠損マウス (GLAST, GLT1, NR1 の 3 つの遺伝子が欠損したマウス, TK マウス) では、正常に回復していた⁷⁾。以上の結果は、グルタミン酸トランスポーター GLT1 と GLAST の異常は、細胞外グルタミン酸を増加、NMDA 型受容体を過剰に活性化し、神経幹細胞の増殖、神経細胞の移動、神経細胞の分化に障害をもたらすことを示している (図 4)。つまり、グルタミン酸は、*in vivo* においても、脳の形成に重要な役割を果たしている。脳の形成には、遺伝的プログラムと神経活動の両者が関与している。従来、遺伝的プログラムは脳の初期形成に、神経活動は脳形成の最終段階に関与すると考えられてきた。グルタミン酸は、脳の 70% の神経細胞が神経伝達物質として用いており、神経活動依存的な脳形成に重要な役割を果たす。筆者らの作製した DK マウスは、グルタミン酸つまり神経活動が脳の初期形成にも重要な役割を果たしていることを示している。

2. グルタミン酸トランスポーターの欠損が生後の脳形成に及ぼす影響

生後の脳の成熟には、幼若期の外界刺激による神経回路の再編が必要である。グルタミン酸は、脳の 70% の神経細胞が神経伝達物質として用いており、外界刺激による神経回路の改築に重要な役割を果たす。幼若期における生育環境の重要性は、母国語形成や運動・楽器演奏能力として社会的にも広く認知され、古来より「三つ子の魂百まで」として知られている。この現象は、神経回路発達における「臨界期可塑性」として注目されていたが、その分子機構は不

明である。臨界期可塑性として、生後の早い時期に強い感覚刺激を受けた大脳皮質領域が拡大し、弱い感覚刺激を受けた領域は縮小するという現象が知られている。マウスの体性感覚野には、1本1本のひげの触覚刺激を処理するシナプスの集合体が存在する。生後 0~3 日までの間にひげを抜くと、抜かれたひげに対応する体性感覚野の領域は縮小し、反対に周囲の抜かれていないひげに対応する体性感覚野の領域は拡大する。グルタミン酸トランスポーター GLAST 欠損マウスを用い、体性感覚野の臨界期可塑性を調べたところ、抜かれたひげに対応する領域の縮小と他のひげに対応する領域の拡大は観察されなかった⁸⁾。

GLAST 欠損マウスでは、細胞外グルタミン酸濃度が上昇し、グルタミン酸を多く放出する回路 (抜かれていないひげの触覚刺激を処理する回路) とそうでない回路 (抜かれたひげの触覚刺激を処理する回路) との区別ができなかったため、臨界期可塑性に障害が起こったと考えられる。この結果は、感覚刺激の大小をシナプス活動の強弱へと反映させる細胞外グルタミン酸濃度調節機構が、臨界期に受けた刺激の大小を神経回路の効率的な改変へと導くのに必要不可欠であることを示唆している。

また、GLAST 欠損マウスにおける小脳のシナプスを調べたところ、グリア細胞によるシナプスの被覆不全、複数の登上線維による単一プルキンエ細胞への入力、登上線維-プルキンエ細胞間シナプス、平行線維-プルキンエ細胞間シナプスの局在異常が観察された。さらに、小脳神経回路が完成した後の 4 週齢の野生型マウスに GLAST の阻害剤を投与しても、上記と同じ異常が観察された⁹⁾。これらの結果は、GLAST の障害によりグルタミン酸が近隣のシナプスに漏出すると、神経回路の形成や維持に障害をもたらすことを示している。

● グルタミン酸による脳形成異常と精神疾患

自閉症スペクトラム障害や統合失調症などの疾患において、脳の形成異常の関与が報告されている。周産期傷害、超早産児、ウイルス感染、母体肥満、母体ストレスなどの環境要因は、自閉症スペクトラム障害や統合失調症の危険因子として知られている^{10~12)}。しかし、胎児期の環境要因がどのような機序で脳の形成異常を起こすのかは不明であ

る。周産期傷害、超早産児の場合、脳虚血が起こり、細胞外グルタミン酸濃度が上昇することが知られている¹³⁾。さらに、ウイルス感染、高血糖、母体ストレスによりグルタミン酸トランスポーターの発現・機能が低下することが報告されている^{14,15)}。つまり、自閉症スペクトラム障害や統合失調症の発症を高める環境要因は、共通してグルタミン酸トランスポーターの機能を障害し、細胞外グルタミン酸濃度を上昇させる可能性がある。また、自閉症スペクトラム障害や統合失調症の発症に関与する GLT1 および GLAST の遺伝子変異も報告されており、グルタミン酸の過剰による脳形成異常が自閉症スペクトラム障害や統合失調症の発症に関与する可能性は高い。筆者らの作製した DK マウスは、細胞外グルタミン酸が過剰になる状態を再現したモデルであり、自閉症スペクトラム障害や統合失調症に似た脳形成異常を示す。例えば、自閉症スペクトラム障害や統合失調症の危険因子の一つである超早産児（妊娠週数 28 週未満で産まれた子）では、DK マウスと同じ皮質下神経細胞の増加が見られる（図 5）。さらに、胎児脳虚血のモデルである子宮動脈結紮モデルにおいても、DK マウスと同様な神経細胞移動の障害による大脳新皮質の層形成異常が観察される¹⁶⁾。これらの結果は、自閉症スペクトラム障害や統合失調症の危険因子がどのような機序で脳の形成障害を起こし、症状を引き起こすのかを解明する手がかりとなる。

むすび

DK マウスで観察される脳の形成異常は、自閉症スペクトラム障害や統合失調症の脳形成異常と似ている。また、自閉症スペクトラム障害や統合失調症の危険因子として知られている周産期傷害、超早産、ウイルス感染、母体肥満、母体ストレスは全て、グルタミン酸トランスポーターの発現・機能を障害し、細胞外グルタミン酸濃度を上昇させる。さらに、統合失調症の患者で GLAST, GLT1 の遺伝子欠損や GLT1 のミスセンス変異が報告され^{17~19)}、GLT1 が自閉症スペクトラム障害のリスク遺伝子座の近傍に位置することが知られている²⁰⁾。つまり、自閉症スペクトラム障害や統合失調症の危険因子の多くの共通経路として、グルタミン酸トランスポーターの障害による細胞外グルタミン酸濃度の上昇、それによる NMDA 型受容体の過剰な活性化が考えられる。グルタミン酸トランスポーターを活性化する化合物は、過剰なグルタミン酸シグナルを抑制し、新しい精神神経疾患の治療薬として期待される³⁾。

文献

1. Nakanishi S, Nakajima Y, Masu M, et al. Glutamate receptors: brain function and signal transduction. *Brain Res Rev.* 1998; 26: 230-5.
2. Choi DW. Glutamate neurotoxicity and diseases of the nervous system. *Neuron.* 1988; 1: 623-34.
3. Tanaka K. Antibiotics rescue neurons from glutamate attack. *Trends Mol Med.* 2005; 11: 259-62.
4. Tanaka K, Watase K, Manabe T, et al. Epilepsy and exacerbation of brain injury in mice lacking the glutamate transporter GLT-1. *Science.* 1997; 276: 1699-702.
5. Watase K, Hashimoto K, Kano M, et al. Motor discoordination and increased susceptibility to cerebellar injury in GLAST mutant mice. *Eur J Neurosci.* 1998; 10: 976-88.
6. Matsugami TR, Tanemura K, Mieda M, et al. Indispensability of the glutamate transporters GLAST and GLT1 to brain development. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2006; 103: 12161-6.
7. Aida T, Ito Y, Takahashi YK, et al. Overstimulation of NMDA receptors impairs early brain development *in vivo*. *PLoS One.* 2012; 7: e36853.
8. Takasaki C, Okada R, Mitani A, et al. Glutamate transporters regulate lesion-induced plasticity in the developing somatosensory cortex. *J Neurosci.* 2008; 28: 4995-5006.
9. Miyazaki T, Yamasaki M, Hashimoto K, et al. Glutamate transporter GLAST controls synaptic wrapping by Bergmann glia and ensures proper wiring of Purkinje cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2017; 114: 7438-43.
10. Brown AS. The environment and susceptibility to schizophrenia. *Prog Neurobiol.* 2011; 93: 23-58.
11. Khandaker GM, Diben CR, Jones PB. Does maternal body mass index during pregnancy influence risk of schizophrenia in the adult offspring? *Obes Rev.* 2012; 13: 518-27.
12. Guinchat V, Thorsen P, Laurent C, et al. Pre-, peri- and neonatal risk factors for autism. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 2012; 91: 287-300.
13. Volpe JJ. Perinatal brain injury: from pathogenesis to neuroprotection. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev.* 2001; 7: 56-64.
14. Lau JC, Kroes RA, Moskal JR, et al. Diabetes changes expression of genes related to glutamate neurotransmission and transport in the Long-Evans rat retina. *Mol Vis.* 2013; 19: 1538-53.
15. Ovanesov MV, Vogel MW, Moran TH, et al. Neonatal Borna disease virus infection in rats is associated with increased extracellular levels of glutamate and neurodegeneration in the striatum. *J Neurovirol.* 2007; 13: 185-94.
16. Kubo K, Deguchi K, Nagai T, et al. Association of impaired neuronal migration with cognitive deficits in extremely preterm infants. *JCI Insight.* 2017; 2: e88609.
17. Xu S, Han JC, Morales A, et al. Characterization of 11p4-p12 deletion in WAGR syndrome by array CGH for identifying genes contributing to mental retardation and autism. *Cytogenet Genome Res.* 2008; 122: 181-7.
18. Need AC, McEvoy JP, Gennarelli M, et al. Exome sequencing followed by large-scale genotyping suggests a limited role for moderately rare risk factors of strong effect in schizophrenia. *Am J Hum Genet.* 2012; 91: 303-12.
19. Walsh T, McClellan JM, McCarthy SE, et al. Rare structural variants disrupt multiple genes in neurodevelopmental pathways in schizophrenia. *Science.* 2008; 320: 539-43.
20. Autism Genome Project Consortium, Szatmari P, Paterson AD, et al. Mapping autism risk loci using genetic linkage and chromosomal rearrangements. *Nat Genet.* 2007; 39: 319-28.