

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 13 日現在

機関番号：17601

研究種目：新学術領域研究(研究領域提案型)

研究期間：2011～2015

課題番号：23110010

研究課題名(和文) 高次脳神経機能におけるシナプス可塑性の神経細胞外微小環境による制御機構の解明

研究課題名(英文) Study of the regulation of synaptic plasticity regulated extracellular micro environment underlying the higher brain function

研究代表者

高宮 考悟 (Kogo, Takamiya)

宮崎大学・医学部・教授

研究者番号：40283767

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 76,900,000円

研究成果の概要(和文)：グルタミン酸は、中枢神経系で主な興奮性神経伝達物質である。その受容体であるシナプス後部におけるグルタミン酸受容体は、記憶などを含む多くの神経活動で重要な役割を果たしている。そのなかでもAMPA型グルタミン酸受容体(AMPA-R)は、シナプス可塑性の発現においても中心的役割を果たしている。本研究では、このAMPA-Rの細胞外のN型糖鎖修飾に着目し、受容体タンパク質の糖鎖修飾による神経伝達とシナプス可塑性への制御機構を解析した。糖鎖修飾されていないAMPA-Rは細胞膜上に脂質ラフトが存在するシナプスに集中しており、これによりチャンネル活性やシナプス可塑性を制御することが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Glutamate is a main excitatory neurotransmitter in central nervous system and its receptor, glutamate receptors, play important roles in many neuronal functions including memory. In particular, AMPA-type glutamate receptor (AMPA-R) plays central roles in not only main excitatory neurotransmission, but also expression of synaptic plasticity. In this project, we will focus on N-glycosylation of AMPA-R, and we aim to elucidate their functions in synaptic transmission and plasticity. We already found that non-glycosylated AMPA-R is preferentially localized in lipid raft on the cell membrane and this localization has altered channel property, missing desensitization. We also revealed that there are raft-positive and -negative synapses in the same neuron, proposing the hypothesis that glycosylation of AMPA R decides the synaptic localization, resulting in the regulation of synaptic strength in synaptic plasticity.

研究分野：Neuroscience

キーワード：グルタミン酸受容体 シナプス可塑性 糖鎖修飾

1. 研究開始当初の背景

グルタミン酸は、中枢神経系において主な興奮性神経伝達物質であり、シナプス前部より放出される。その受容体であるシナプス後部におけるグルタミン酸受容体は、記憶などを含む多くの神経活動で重要な役割を果たしている。そのなかでも AMPA 型グルタミン酸受容体 (AMPA-R) は、主たる興奮性神経伝達物質の受容体としてではなく、シナプス可塑性の発現においても中心的役割を果たしている。これまでに AMPA-R と細胞内や膜上で結合する分子群が発見され、それらがシナプス可塑性の制御を行っていることが多数報告されてきた。

2. 研究の目的

海馬を中心とした成熟神経細胞において、神経細胞外微小環境における糖鎖暗号のシグナルがシナプス可塑性をどのように制御するのかということ明らかにすることを本研究の主たる目的とする。具体的には、シナプスに局在するチャンネルの機能をどのように修飾するのか、さらに糖鎖によるシグナルがシナプス可塑性の形成にどのような影響をあたえてゆくのかを AMPA 型グルタミン酸受容体 (AMPA-R) を中心に調べていきたい。まず細胞表面にある AMPA-R の細胞外ドメインがどのような糖鎖修飾を受け、それがチャンネル機能へどのような影響を及ぼすか、またシナプス膜や神経外微小環境に局在するプロテオグリカンがシナプス可塑性の制御にどのように関与するかを電気生理学的・細胞生物学的アプローチにて検討する。さらにその詳細なメカニズムを明らかとすることにより、各々の糖鎖暗号のシナプス可塑性への関与を明らかとし、記憶・学習への糖鎖情報の重要性を解析することで、神経機能と結びついた個々の糖鎖暗号解読をめざす。

グルタミン酸の受容体であるシナプス後

部におけるグルタミン酸受容体は、記憶などを含む多くの神経活動で重要な役割を果たしている。そのなかでも AMPA 型グルタミン酸受容体 (AMPA-R) は、主たる興奮性神経伝達物質の受容体としてではなく、シナプス可塑性の発現においても中心的役割を果たしている。これまでに AMPA-R と細胞内や膜上で結合する分子群が発見され、それらがシナプス可塑性の制御を行っていることが多数報告されてきた。

本研究では、AMPA-R の細胞外からの制御機構を明らかにすることを目的とした。特に AMPA-R の細胞外における N 型糖鎖修飾に注目し、そのチャンネル機能における影響、シナプス可塑性の制御機構に注目して解析を行った。

3. 研究の方法

1) AMPA-R の N 型糖鎖修飾を酵素的に除去するために PNGase F、Endo H を使用した。また個々の AMPA-R の N 型糖鎖修飾を阻害するために PCR を用いてアミノ酸変異を導入した。

2) 用いた細胞は、胎仔マウスもしくはラットより調整された初代培養神経細胞、もしくは、HEK 293T 細胞を用いた。これらの細胞は、必要に応じて AMPA-R の発現ベクターを導入して用いた。

3) 神経細胞培養には、野生型マウスの他、AMPA-R の GluA1 サブユニットを欠損したマウス (GluA1 ノックアウトマウス) も使用した。また GluA1 ノックアウトマウスへレンチウイルスベクターを用いて遺伝子導入し、電気生理学的解析に使用した。

4) 個々の糖鎖構造解析では、京都大学岡博士、横浜市立大学の川崎博士との共同研究のもと MAS Spectrogram で解析した。

5) 培養神経細胞、HEK293T 細胞を用いた細胞生物学的解析では、GluA1 サブユニットの細胞外、細胞内を認識する抗体を用いて免疫

組織学的染色を行った。また必要に応じて GluA1 サブユニット cDNA の N 末端部分にタグを導入した発現ベクターを作成し、細胞に導入後、タグに対する抗体を用いて解析に使用した。GluA1 サブユニットのリンカー部分をペプチドで作成し、それを用いてウサギを免疫することで同部位を認識する抗体を作成した。

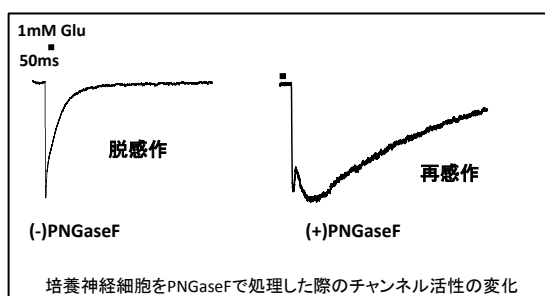
6) 培養神経細胞、HEK293T 細胞、マウス脳からタンパク質抽出液を調整し、SDS-PAGE, Blue Native PAGE などの生化学的解析に使用した。

また、GluA1 リンカー部分を大腸菌を用いて GST との融合タンパク質として作成し結合タンパク質検索に使用した。

7) チャンネル機能を解析するために、培養神経細胞、GluA1 cDNA 導入 HEK293T 細胞へグルタミン酸刺激を行いパッチクランプ法にて観察した。またシナプス可塑性の解析でも急性海馬スライスを作成し、同様にパッチクランプ法で解析した。

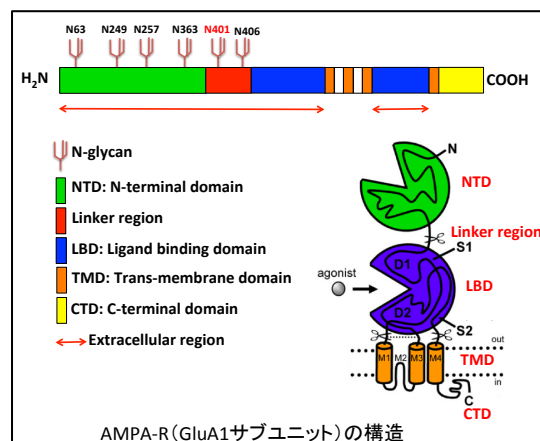
4. 研究成果

1) 初代培養神経細胞をグルタミン酸刺激を行うと、通常 AMPA-R の反応である急速なチャンネルの開口に引き続きグルタミン酸刺激を行っても急速にチャンネルが閉じグルタミン酸刺激に反応しない“脱感作現象”がみられる。それを PNGase F で処理すると、このグルタミン酸に対する急速な反応に引き続き、さらにグルタミン酸に反応する“再感作現象”がみとめられた。



私たちは、AMPA-R のなかでも GluA1 サブ

ユニットに注目した。GluA1 には、細胞外領域に 6 箇所の N 型糖鎖修飾部位が存在する (N63, N249, N257, N363, N401, N406)。



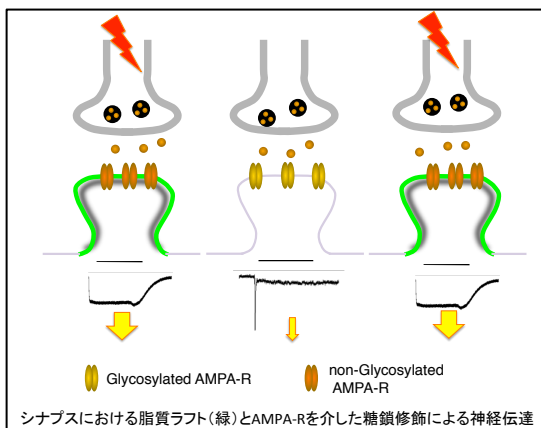
GluA1 の個々の N 型糖鎖修飾部位をグルタミン酸へと変異を加え、糖鎖修飾されないようにした GluA1 cDNA を HEK293T 細胞に導入し、各々をグルタミン酸刺激下でパッチクランプ法を用い、チャンネル機能を解析した。その結果、N401 の部位に変異を入れた際、細胞表面への輸送やチャンネルとして 4 量体形成は正常だったが、パッチクランプ解析で同様の再感作現象がみとめられた。

グルタミン酸刺激を短時間と長時間と組み合わせると刺激を行ったところ再感作現象は、通常のグルタミン酸に対する急速な脱感作を伴った反応と、脱感作を伴わない反応の合計の反応だとわかった。つまり、GluA1 の N401 部位の糖鎖修飾を阻害すると、通常の脱感作を生じるものと、脱感作が消失する 2 種類のチャンネル特性を有する 2 群が存在することがわかった。

2) それでは、この 2 種類の GluA1 のなにが違うのかを検討した。GluA1 の N401 部位の糖鎖修飾を阻害した cDNA (GluA1 N401Q) を発現した HEK293T 細胞を解析したところ、野生型の GluA1 に比べ、GluA1 N401Q は、細胞膜における脂質ラフトに多く存在することがわかった。さらに脂質ラフトをコレステロールを除去することで破壊する MCD を用いると、再感作現象が消失した。

3) 脂質ラフトの神経細胞活動における役割が、まだよく理解されていないため培養神経細胞を用いて解析を行い以下のことが明らかとなった。

- 神経細胞の発達に伴ってシナプスにおける脂質ラフトの割合が増加する。
- 神経活動を抑制するとシナプスにおける脂質ラフトが減少した。
- シナプス可塑性を誘導する刺激を加えると、シナプスにおける脂質ラフトが増加した。さらに GluA1 陽性の脂質ラフトが増加した。
- GluA1 N401 は、すでに脂質ラフトに集中して存在し、シナプス可塑性を誘導する刺激には、もはや反応しない。
- 上記のようなシナプス可塑性を誘導する刺激で GluA1 が脂質ラフトに挿入される現象は、MCD で脂質ラフトを破壊すると、阻害されることがわかった。



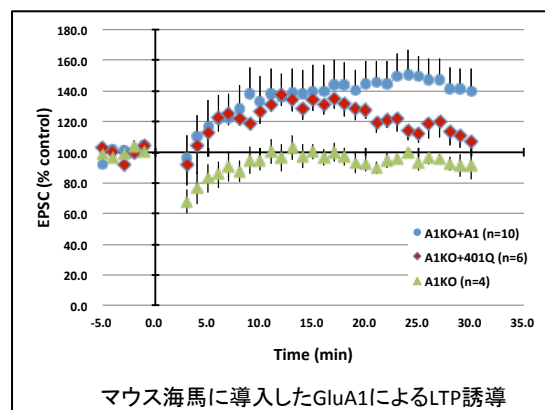
以上のように、神経活動依存性にシナプスには脂質ラフトが形成され、シナプス可塑性において刺激が加えられると脂質ラフト陽性シナプスに AMPA-R の GluA1 が好んで挿入されることが明らかとなった。

4) AMPA-R は、GluA1-4 のサブユニットが存在するが、これらのうちシナプス可塑性において GluA1, GluA2 サブユニットが重要な役割を果たすことが知られている。アミノ酸配列から予想されるこれらサブユニットの N 型糖

鎖修飾部位の糖鎖構造をマウスの脳より抽出されたサンプルを用いて解析した。ほとんどの N 型糖鎖修飾部位は、高マンノース型または複合型の糖鎖修飾を受けるが、GluA1 N401 のみ 7 割が糖鎖修飾されていないことがわかった (共同研究)。

5) GluA1 のリンカー部位を大腸菌で融合タンパク質として発現・精製し、マウス脳タンパク抽出物と反応させ、結合する分子を検索したところ Heat Shock Protein 70 ファミリー分子 (Bip を含む) が同定された。これら分子は、GluA1 と小胞体、ゴルジ装置で結合し N401 部位の糖鎖修飾を阻害することが示唆された。

6) GluA1 ノックアウトマウスの海馬に野生型と N401 の変異型 (GluA1 N401Q) をレンチウイルスベクターで導入し、急性脳スライスを作成して長期増強現象 (LTP) をパッチクランプで検討した。GluA1 ノックアウトマウスの海馬では LTP は欠損しているが、野生型を導入したものでは、LTP は回復する。しかし N401Q では、LTP が維持できないことがわかった。

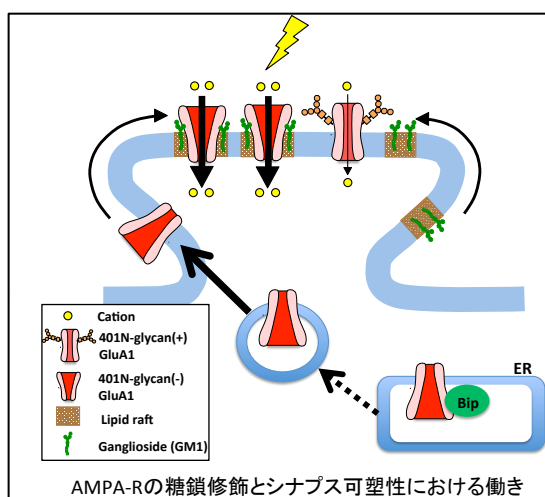


6) さらに N401 部位が糖鎖修飾されていない GluA1 の挙動を観察するために、これを選択的に認識する抗体を作成した。そしてこの抗体を用いて、培養神経細胞にシナプス可塑性を誘導する刺激を加えたところ、GluA1 N401 部位が糖鎖修飾されていないものが刺激に応じて脂質ラフト陽性のシナプスに挿入されることが明らかとなった。

さらにシナプス可塑性刺激を加えた際、AMPA-R がシナプスに挿入される現象は、主にもともと細胞内にプールされている GluA1 の N401 部位が糖鎖修飾されていないものが、脂質ラフト陽性のシナプスに挿入され LTP が発現するものであるということがわかった。

得られた上記の結果より、中枢神経のシナプスにおいて発達に伴って神経活動依存的に脂質ラフトが形成される。シナプス可塑性のモデルである LTP において第一の反応は、シナプス後部に GluA1 が挿入されることが必須であることが知られている。GluA1N401 は、7割が糖鎖修飾されておらず、通常細胞内にプールされているが、シナプス可塑性を誘導する刺激において選択的にシナプス後部に挿入され LTP 誘導を形成することがわかった。

これまでシナプス可塑性の制御機構として、細胞膜において AMPA-R が挿入されたり細胞内に取り込まれ、その数が変化することにより発現されていることが知られている。その制御機構として、AMPA-R のリン酸化や細胞内、細胞膜上での結合タンパク質の関与が知られているが、本研究により新たに細胞外の N 型糖鎖修飾が主要な制御機構の一つとして働いていることが示された (論文作成中)。



5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 2 件)

① Jyoji Tsutajima, Takato Kunitake, Yoshihiko Wakazono, Kogo Takamiya, Selective Injection System into Hippocampus CA1 via Monitored

Theta Oscillation, PLoS ONE 8(12): e83129. 2013 (査読あり)

② 高宮 考悟、学習・記憶におけるシナプス可塑性の分子機構 (総説), 「生化学」(83(11):1016-1026. 2011 (査読なし)

[学会発表] (計 18 件)

(国内)

① 若園佳彦、N-glycosylation of AMPA receptor play a key role in synaptic plasticity, 第 39 回日本神経科学大会、2016 年 7 月 20-22 日、パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市)

② 緑川 良介、GluA1 N-glycosylation regulates channel properties of AMPA receptors, 第 39 回日本神経科学大会 2016 年 7 月 20-22 日、パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市)

③ 高宮考悟、AMPA 型グルタミン酸受容体のチャンネル活性を制御する糖鎖構造, 第 87 回日本生学会大会、2014 年 10 月 17 日、京都国際会議場、京都府・京都市

(他 13 回)

(国外)

① TAKAMIYA, Kogo, A novel regulatory mechanism of synaptic plasticity mediated by AMPA-type glutamate receptor glycosylation, 2016 Nov. 10-12, 2016 International Symposium on Neurodegenerative Diseases & the 43rd Annual Conference of Japan Brain Sciences Society, Xi'an (China)

② TAKAMIYA, Kogo, N-glycosylation modulates AMPA receptor channel properties, 2014 Nov. 16-19, Society for Glycobiology (SFG) & Japanese Society of Carbohydrate Research (JSCR) 2014 Joint Annual Meeting, Hawaii (U.S.A)

[その他]

神経糖鎖生物学

<http://shinkei-tosa.net/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高宮 考悟 (TAKAMIYA, Kogo)

宮崎大学・医学部・教授

研究者番号: 40283767

(2) 研究分担者

緑川 良介 (MIDORIKAWA, Ryoosuke)

宮崎大学・医学部・助教

研究者番号: 20470320

若園 佳彦 (WAKAZONO, Yoshihiko)

宮崎大学・医学部・助教

研究者番号: 90377755

(3) 研究協力者

岡 昌吾 (OKA, Shogo)

京都大学大学院

川崎 ナナ (KAWASAKI, Nana)

横浜市立大学大学院