

令和 2 年 5 月 22 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08503

研究課題名(和文)非シナプス性結合に入力経路・細胞選択的に集積するNR3A受容体の機能的意義の解明

研究課題名(英文)Functional significance of input pathway- and cell type-dependent accumulation of non-synaptic NR3A

研究代表者

山崎 美和子 (Yamasaki, Miwako)

北海道大学・医学研究院・准教授

研究者番号：10431305

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：グルタミン酸受容体NR3Aは発現部位や生理機能に不明な点が多い。本研究ではマウス脳において、登上線維 小脳抑制性介在ニューロン間、グルタミン酸作動性終末 大脳皮質ソマトスタチン陽性介在ニューロン間の非シナプス性の結合部位にNR3Aが選択的に集積することを明らかにした。さらに、こうした部位にはKv4.3とNR1が共局在していた。NR3Aと生化学的複合体を形成する分子を探索した結果、共局在するKv4.3は複合体には含まれておらず、NR1のみであることがわかった。またNR3A欠損マウスでは運動失調などの小脳の異常に起因するような表現型や、小脳分子層での明らかな組織学的異常も観察されなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

脳機能を担う神経回路の発達においてNMDA型グルタミン酸受容体NR3Aは重要な役割を持つが、発現部位やその機能に不明な点が多く解明が期待されている。本研究では、NR3A受容体は他の受容体とは全く異なり、グルタミン酸作動性神経終末の作る非シナプス性結合選択的に、NR1や早期不活性化KチャンネルKv4.3と共に集積することを見出した。このユニークな知見は今後の脳回路研究の発展に貢献することが期待される。

研究成果の概要(英文)：The localization and physiological function of NMDA receptor subunit NR3A remain largely unexplored. In the present study, we found that NR3A was selectively localized to non-synaptic contacts between climbing fiber to cerebellar stellate cells, and those between glutamatergic terminals and somatostatin-positive GABAergic interneurons in the cerebral cortex. At such contacts, NR3A colocalized with NR1 and Kv4.3. To identify molecular partners that constitute biochemical complex, we immunopurified biochemical complex containing NR3A. We found that NR1 but not Kv4.3 was included in the complex. NR3A knockout mouse showed no evident motor discoordination or histological abnormality.

研究分野：神経組織学

キーワード：NMDA受容体 シナプス

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

NR3A(GluN3A)は NMDA 受容体サブユニットの1つであり、マウスの脳では生後1週頃に一過性に発現が増加する。強制発現系の実験からは、NR1とNR2(GluN1, GluN2)サブユニットから構成される“古典的”NMDA 受容体に NR3A が入ると、応答や Ca²⁺透過性が減弱するとされている (reviewed in Cavara and Hollmann, 2008)。

現在は、このような背景と発達期の大脳皮質・海馬由来の培養細胞を用いた細胞生物学的な解析結果をもとに「発達期に不要なシナプスに運ばれて、除去へと導く」という説が展開されている。しかしながら、実際には「どの細胞の、どの部位に局在するのか?」「成体の脳にはないのか?」「必須サブユニット NR1 と一緒にシナプスに局在するのか?」という分子機能を考える上で基盤となるはずの解剖学的裏付けを欠いており、全体像の解明には程遠い状況である。

2. 研究の目的

これまでの NR3A 受容体に関する知見は、主に in vitro での分子生物学・細胞生物学的な解析によるものが殆どで、in vivo での生理機能の基盤となる解剖・組織学的裏付けは得られていない。従ってまず、本研究により NR3A の発現部位や発達に伴う変化を明らかにし、NR3A を持つ非シナプス性結合の機能的意義を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

発達期・成体期のマウス脳における NR3A 受容体の局在と機能的意義を明らかにするために、組織学・生化学・電気生理学的手法を用いて多角的に解析を行った。具体的には以下の通りである。

(1) 発達・成体期における NR3A の発現細胞と局在部位の同定

多重蛍光 in situ ハイブリダイゼーション

各種細胞マーカーとの多重標識により発現細胞の神経化学特性を同定し、発現レベルの定量・比較を行った。グルタミン酸作動性ニューロンのマーカー(1型、2型小胞膜型グルタミン酸トランスポーター VGluT1, VGluT2)、GABA 作動性ニューロンのマーカー(GAD67, somatostatin, nNOS, VIP, CCK, calretinin)を用いた(Yamasaki et al., 2010, 2011, 2014, 2016)。

特異的抗体を用いた多重蛍光免疫染色、包埋前免疫電顕・包埋後免疫電顕

興奮性シナプスのシナプス後膜肥厚のマーカーとして PSD95 抗体、また NMDA 受容体必須サブユニットである NR1 抗体、すべての AMPA 受容体サブユニットを認識する panAMPA 抗体を用いて、NR3A の局在部位の特徴を明らかにした。

特異的抗体を用いた多重・フリーズレプリカ免疫電顕

シナプスとシナプス外の分子を同時に検出する目的において、最も信頼性の高い方法であるフリーズレプリカ免疫電顕(Matsumoto-Makidono et al., 2016)により、NR3A の非シナプス性結合部位での選択的な局在を確認した。

(2) NR3A と共局在し、生化学的複合体を形成する分子の探索および局在機構の解析

特異的抗体を用いた多重蛍光免疫染色による共局在分子の網羅的探索

多数所有している特異的抗体を使用し、NR3A と非シナプス性結合に共局在する分子(受容体、電位依存性チャネルなど)を網羅的に探索した。

生化学的解析

アフリカツメガエル卵母細胞を用いた強制発現系や小脳シナプトソーム分画を用いた免疫沈降により、で判明した分子と NR3A が複合体を形成しているかどうかについて検討した。

コンディショナルノックアウトを用いた解析

NR3A と複合体を形成する NR1 を小脳抑制性介在ニューロンで選択的に欠損するコンディショナルノックアウトマウスを作成し、NR3A の発現変化を免疫組織化学および生化学的手法で検討した。

(3) 非シナプス性結合における NR3A の機能的意義の検討

NR3A 欠損モデルマウス(遺伝子改変マウス、成体期でのノックダウン)を用いて、野生型で NR3A が集積する非シナプス性結合の解剖学的・生理学的解析を行った。

微細形態(シナプス小胞の集積、シナプス後膜肥厚など)の検討

非シナプス性結合部位が、そのままの構造として残っているかどうか、もしくはシナプス結合に変化していないかについて免疫電顕法により登録線維終末 抑制性介在細胞間の非シナプス性結合を同定し、詳しく検討した。

分子プロファイルの解析

多重免疫染色・免疫電顕法により、野生型マウスにおいて NR3A と共局在している分子の局在変化について定量解析を行った。

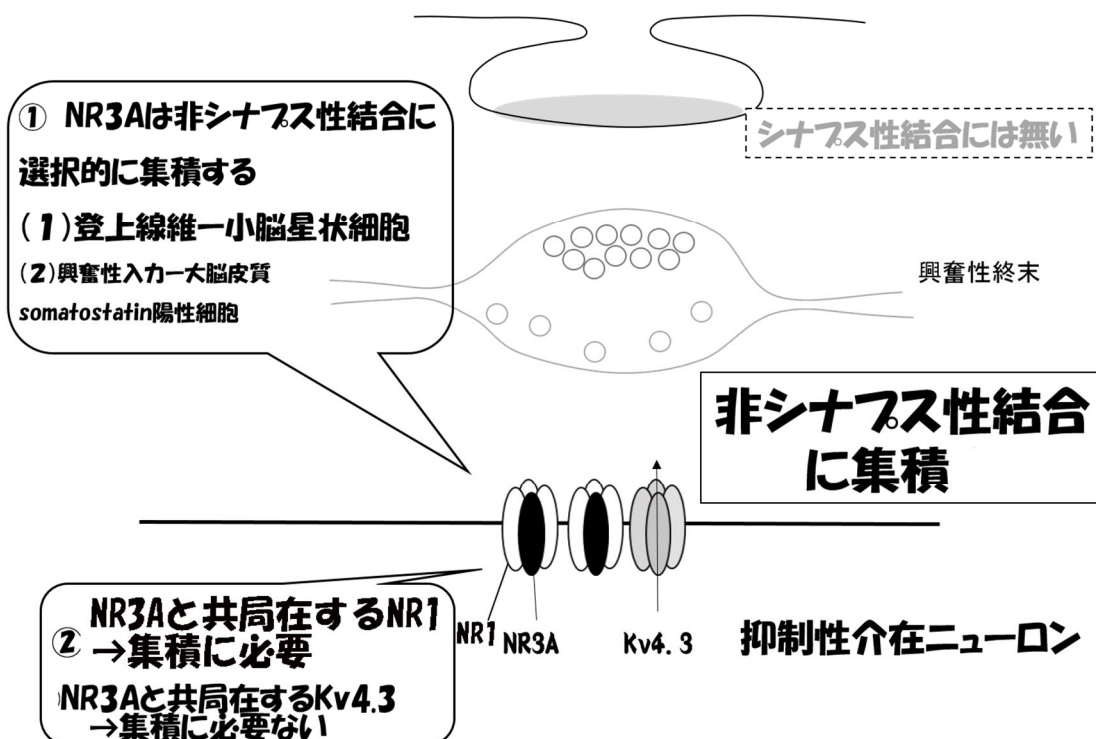
ノックアウトマウスにおける形態学変化

野生型シナプスでは NR3A が検出される非シナプス性接触部の形態学的な変化の有無を検討した。

4. 研究成果

本研究において、マウスの脳における局在について以下の重要な5つの新規の知見を得た。

- (1) 成体の脳では、特定の抑制性介在ニューロンの非シナプス性結合部位に選択的に集積する
 蛍光多重 In situ ハイブリダイゼーション法により、発現細胞を検討し、特異的抗体を用いた免疫染色に加え包埋前および包埋後免疫電顕や SDS-FRL 法を用いた免疫電顕で発現部位の検討を行った。本研究の基礎データとなった、登上線維 抑制性介在ニューロン間の非シナプス性結合部位に加え、大脳皮質のグルタミン酸作動性終末 ソマトスタチン陽性の抑制性介在ニューロン間の非シナプス性結合にも選択的に局在していた。
- (2) 大脳皮質や発達期の小脳皮質・大脳皮質においても、シナプスではなく、非シナプス性結合に選択的に局在する
 蛍光多重 In situ ハイブリダイゼーション法、特異的抗体を用いた免疫染色、包埋前および包埋後免疫電顕や SDS-FRL 法を用いた免疫電顕で発現部位の検討を行った。電顕発達期の生後2週頃での発現レベルは、成体期と比較して格段に高いが、発現部位に関しては成体と同じであり、興奮性シナプスには検出されなかった。
- (3) NR3A は NR1, 早期不活性化型 K チャネル Kv4.3 と共局在するが、生化学的複合体を形成するのは NR1 のみである。
 免疫染色で検討した結果、同定した局在部位である非シナプス性結合において NR1 と Kv4.3 と常に共局在していることがわかった。また、小脳および大脳皮質シナプトソームを用いた免疫沈降法によって検討した結果、NR1 は NR3A と複合体を形成するが、Kv4.3 は含まれていないことがわかった。
- (4) NR3A チャネルのアセンブリには NR1 サブユニットが必要である
 NR3A と複合体を形成する NR1 を小脳抑制性介在ニューロンで選択的に欠損するコンディショナルノックアウトマウスにおいて、NR3A の選択的な集積が消失し、シナプトソーム分画からも顕著に減少していることがわかった。またこれらの減少は NR1 サブユニットをアデノ随伴ウイルスを用いて導入したマウスにおいては発現量と選択的局在が復活していた。これに対し、NR3A の C 末の変異体を導入しても受容体の選択的集積は回復しなかった。この結果は NR3A の C 末ドメインが選択的集積に重要である可能性を示唆している。従って、NR3A の選択的集積には NR1 が必要であり、しかも C 末ドメインが選択的集積に重要である可能性を示唆している。
- (5) NR3A は非シナプス性結合構造の維持には必須ではない
 当初の予想とは異なり、NR3A ノックアウトマウスの非シナプス性結合部位は減少していないことがわかった。また、明らかな小脳性運動失調も認められなかった。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Rawangwong A, Khrongyut S, Chomphoo S, Konno K, Yamasaki M, Watanabe M, Kondo H, Hipkaeo W.	4. 巻 100
2. 論文標題 Heterogeneous localization of muscarinic cholinergic receptor M1 in the salivary ducts of adult mice.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Arch Oral Biol.	6. 最初と最後の頁 14-22
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.archoralbio.2019.02.001.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Rossato JI, Moreno A, Genzel L, Yamasaki M, Takeuchi T, Canals S, Morris RGM.	4. 巻 28
2. 論文標題 Silent Learning.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Curr Biol.	6. 最初と最後の頁 3508-3515
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.cub.2018.09.012.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Yamasaki Miwako, Takeuchi Tomonori	4. 巻 2017
2. 論文標題 Locus Coeruleus and Dopamine-Dependent Memory Consolidation	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Neural Plast.	6. 最初と最後の頁 1~15
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1155/2017/8602690	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Shiotani Hajime, Miyata Muneaki, Itoh Yu, Wang Shujie, Kaito Aika, Mizoguchi Akira, Yamasaki Miwako, Watanabe Masahiko, Mandai Kenji, Mochizuki Hideki, Takai Yoshimi	4. 巻 526
2. 論文標題 Localization of nectin-2 at the boundary between the adjacent somata of the clustered cholinergic neurons and its regulatory role in the subcellular localization of the voltage-gated A-type K ⁺ channel Kv4.2 in the medial habenula	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J Comp Neurol.	6. 最初と最後の頁 1527~1549
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/cne.24425	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Tatsumi Kouko, Isonishi Ayami, Yamasaki Miwako, Kawabe Yoshie, Morita-Takemura Shoko, Nakahara Kazuki, Terada Yuki, Shinjo Takeaki, Okuda Hiroaki, Tanaka Tatsuhide, Wanaka Akio	4. 巻 12
2. 論文標題 Olig2-Lineage Astrocytes: A Distinct Subtype of Astrocytes That Differs from GFAP Astrocytes	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Front. Neuroanat.	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fnana.2018.00008	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Yoshikawa Tomoko, Inagaki Natsuko F., Takagi Seiji, Kuroda Shigeru, Yamasaki Miwako, Watanabe Masahiko, Honma Sato, Honma Ken-ichi	4. 巻 7
2. 論文標題 Localization of photoperiod responsive circadian oscillators in the mouse suprachiasmatic nucleus	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Sci Rep.	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-017-08186-5	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Miyazaki Taisuke, Yamasaki Miwako, Hashimoto Kouichi, Kohda Kazuhisa, Yuzaki Michisuke, Shimamoto Keiko, Tanaka Kohichi, Kano Masanobu, Watanabe Masahiko	4. 巻 114
2. 論文標題 Glutamate transporter GLAST controls synaptic wrapping by Bergmann glia and ensures proper wiring of Purkinje cells	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Proc Natl Acad Sci U S A.	6. 最初と最後の頁 7438 ~ 7443
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.1617330114	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 Miwako Yamasaki
2. 発表標題 Distinct central synapse that shows unique property to maintain AMPAR numbers equal
3. 学会等名 Gordon Research Conference (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 山崎美和子
2. 発表標題 マウス線条体シナプスのAMPA受容体密度は細胞種や入力経路によらず一様である
3. 学会等名 第63回東北・北海道連合支部学術集会（弘前大学、青森県・弘前市）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Miwako Yamasaki, Xiaohong Song, Masahiko Watanabe
2. 発表標題 AMPA density is homogeneous across striatal synapses irrespective of cell types and input pathways
3. 学会等名 第40回日本神経科学大会（幕張メッセ、千葉県・千葉市）
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考