

令和元年6月20日現在

機関番号：13701

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K19521

研究課題名(和文)膜微小ドメインによるAMPA受容体チャネル活性制御：超高精度1分子法による解明

研究課題名(英文) Regulation of channel activity of AMPA receptors by membrane microdomains as revealed by high-resolution single-molecule imaging

研究代表者

鈴木 健一 (Suzuki, Kenichi)

岐阜大学・研究推進・社会連携機構・教授

研究者番号：50423059

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、神経細胞上でのAMPA受容体(AMPA)の分布を明らかにし、シナプス可塑性を生む機構を解明することである。HEK293細胞上で1分子観察を行った結果、AMPAの4量体は安定ではなく、単量体も存在していた。マウス神経細胞上でも、AMPAは、約100ミリ秒という短寿命のホモダイマーを形成した。Homer-1bドメイン上のシナプス領域ではAMPAの運動は非常に遅いが、シナプス領域外では速い成分も存在した。これらの結果から、刺激に応じて神経細胞がシナプス領域内外のAMPA密度を迅速に変えシナプス伝達効率を変更できるのは、AMPA単量体の速い動きが原因だということを提案した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、神経細胞間での情報伝達が起きているシナプスと言われる領域で、情報伝達の担い手である受容体が、刺激に応じて増減する機構を解明しようと試みた。神経細胞上で受容体の1分子ずつを観察した結果、受容体は今まで考えられてきたような安定な4量体ばかりではなく、短い寿命の2量体や単量体も多くみられた。シナプス領域中のHomer1bというタンパク質でできた膜領域では、受容体の運動は非常に遅かったが、その外では速い成分も存在していた。これらの結果から、刺激に応じて神経細胞がシナプス領域内外の受容体密度を迅速に変えることができるのは、受容体の単量体の速い動きが原因だというモデルを提案した。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study is to unravel the distribution of AMPA receptors (AMPA) and the mechanisms of synapse plasticity. Single-molecule observation in HEK203 cell plasma membranes revealed that AMPARs did not form stable tetramers, and even monomers existed. Furthermore, we found that AMPARs formed transient homodimers with a lifetime of about 100 ms in mouse neuronal membranes. The mobility of AMPARs was very slow in Homer 1b domain of synapse region, meanwhile some of AMPARs diffused rapidly outside of Homer 1b domains. Based on these results, we propose a model that AMPARs alter the density in and out of the post-synapse upon stimulation and generate synapse plasticity, which is caused by the rapid mobility of AMPAR monomers.

研究分野：細胞生物物理学

キーワード：AMPA受容体 1分子蛍光観察 超解像蛍光観察 チャネル活性

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

AMPA 受容体(AMPA)は、4つのサブユニット(GluA1~GluA4)から成るホモ又はヘテロ四量体として機能し、シナプス領域で高密度に存在し、速い興奮伝達をもたらすイオン透過型チャネルである。シナプス領域における受容体数に従いシナプス伝達効率が変化することから、記憶学習形成の基盤となるシナプス可塑性の根幹を担う分子として知られる。その数の変動には小胞輸送や、シナプス外領域とシナプス領域の間を AMPAR が移動する側方拡散という現象が関わる。従ってシナプス可塑性の分子メカニズムを明らかにするには、AMPA の膜表面発現量が変動する機構を解明することが欠かせない。しかし、AMPA が生細胞膜上においてどのような動態を示すのか、相互作用分子が AMPAR の拡散と局在にどのように寄与するのか、は全く明らかになっていない。

一方、我々は、一般に膜貫通型タンパク質がダイマー、トリマー、テトラマーと会合していくと、その拡散係数は大きく減少することを見出している(オリゴマートラッピングモデル)。もし、AMPA が安定なホモあるいはヘテロテトラマーを形成している場合、拡散係数は大きく減少すると予想できる。しかし、今までの報告によると、あたかもモノマーと同じような速い拡散も観察されていて、これは予想と合わない。従って、AMPA の会合状態と拡散係数の両方を説明することはできない状況であった。

2. 研究の目的

本研究の目的は、1分子蛍光観察と超解像蛍光観察を組み合わせた超高精度イメージング法により、神経細胞のシナプス内外での AMPAR の会合状態と拡散挙動を明らかにし、シナプス可塑性を生み出す機構を解明することである。また、AMPA の発現密度、会合状態とイオンチャネル活性の相関を調べ、これにより AMPAR がシナプス内外で活性を発揮するのかを明らかにする。

3. 研究の方法

(1) HEK293 細胞膜上に ACP-GluA1, ACP-GluA2, Halo7-GluA1, Halo7-GluA2 を発現させ、ほぼ 100% となるように蛍光ラベル標識した。

(2) HEK293 細胞膜上の GluA1, GluA2 の各輝点同士が共局在する期間を測定し、ホモダイマー、ヘテロダイマー、ホモテトラマー、ヘテロテトラマーの寿命を測定した。また、輝点強度分布を測定し、モノマー、ダイマー、トリマー、テトラマー比を求めた。

(3) GluA1 と N-terminal domain の LIVBP が不在の deletion mutant を様々な濃度で HEK293 細胞に発現させ、カルシウム応答を Fluo8-AM を用いて測定した。

(4) HEK293 細胞膜上の GluA1, GluA2 の拡散係数を測定した。

(5) マウス神経細胞に Halo7-GluA1, Halo7-GluA2 を発現させ、2-3 週間後、Homer1b domain 内外での GluA1, GluA2 の各輝点同士が共局在する期間、拡散係数、ステップサイズを測定した。

(6) Homer1b domain の超解像観察と GluA1, GluA2 の 1 分子追跡の同時観察技術を開発しようとして試みた。

4. 研究成果

(1) HEK293 細胞膜上で、GluA1, GluA2 は、安定なテトラマーを形成しておらず、短寿命のホモダイマー(200ms)、ヘテロダイマー(330ms)、ホモテトラマー(100ms)、ヘテロテトラマー(200ms)を形成していることが明らかとなった。また、この値は、調節性タンパク質の Stargazin を共発現させてもあまり変わらなかった。

(2) GluA1 の発現量、つまり GluA1 のテトラマー量に比例して、リガンド添加後のカルシウム応答が見られた。LIVBP の不在の deletion mutant の場合、Wild type と同じ発現量ではカルシウム応答が極めて弱くしか観察されなかった。GluA1 と deletion mutant のテトラマーが同じ程度存在していれば、同程度のカルシウム応答が観察された。

(3) HEK293 細胞膜上で、GluA1, GluA2 とともにテトラマーの拡散係数は、モノマーの拡散係数よりもずっと小さく、ダイマーの拡散係数もモノマーよりやや小さかった。

(4) 神経細胞膜上のシナプス以外の領域での GluA1, GluA2 の拡散係数は、モノマーしか形成しない膜貫通型タンパク質のものに近かった。一方、シナプス内(Homer 1b ドメイン内)での拡散係数は非常に小さかった。GluA1, GluA2 のテトラマーしか存在していなければ、このような速い拡散は観察されないと予想された。

(5) 上記結果から、刺激に応じて神経細胞が、シナプス領域内外の AMPAR 密度を迅速に調整しシナプス伝達効率を変更できるのは、AMPA モノマーの速い動きが原因であるというモデルを提案した。

(6) HEK293 細胞で、超解像観察と 1 分子追跡の同時観察技術の開発に成功した。今後は、神経細胞において、Homer1b domain の超解像観察と GluA1, GluA2 の 1 分子追跡を同時に行っていく予定である。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 10 件)

- ① T. Matsu-ura, H. Shirakawa, K. G. N. Suzuki, A. Miyamoto, K. Sugiura, T. Michikawa, A. Kusumi, K. Mikoshiba. (2019) Dual-FRET imaging of IP₃ and Ca²⁺ induced IP₃ production maintains long lasting Ca²⁺ oscillations in fertilized mouse eggs. *Sci. Rep.* 9, 4829. (査読有)
DOI: 10.1038/s41598-019-40931-w.
- ② K. G. N. Suzuki, H. Ando, N. Komura, T. Fujiwara, M. Kiso, A. Kusumi. (2018) Unraveling of lipid raft organization in cell plasma membranes by single-molecule imaging of ganglioside probes. *Adv. Exp. Med. Biol.* 1104, 41-58 (査読有)
DOI: 10.1007/978-981-13-2158-0_3.
- ③ M. Kinoshita, K. G. N. Suzuki, M. Murata, N. Matsumori. (2018) Evidence of lipid rafts based on the partition and behavior of sphingomyelins. *Chem. Phys. Lipids.* 215, 84-95. (査読有)
DOI: 10.1016/j.chemphyslip.2018.07.002.
- ④ T. A. Tsunoyama, Y. Watanabe, J. Goto, K. Naito, R. S. Kasai, K. G. N. Suzuki, T. K. Fujiwara, A. Kusumi. (2018) Super-long single-molecule tracking reveals dynamic-anchorage-induced integrin function. *Nat. Chem. Biol.*, 14, 497-506. (査読有)
DOI: 10.1038/s41589-018-0032-5
- ⑤ K. G. N. Suzuki, H. Ando, N. Komura, A. Imamura, H. Ishida, M. Kiso, T. K. Fujiwara, A. Kusumi. (2018) Revealing the raft domain organization in the plasma membrane by single-molecule imaging of fluorescent ganglioside analogs. *Methods in Enzymol.*, 598, 267-282. (査読有)
DOI: 10.1016/bs.mie.2017.06.038
- ⑥ S. S. Tiwari, Y. M. Shirai, Y. L. Nemoto, K. Kojima, K. G. N. Suzuki. (2018) Native prion protein homodimers are destabilized by oligomeric amyloid β 1-42 species as shown by single-molecule imaging. *Neuroreport* 29, 106-111. (査読有)
DOI: 10.1097/WNR.0000000000000916
- ⑦ N. Komura, K. G. N. Suzuki, H. Ando, M. Konishi, A. Imamura, H. Ishida, A. Kusumi, M. Kiso. (2017) Synthesis of fluorescent gangliosides for the studies of raft domains. *Methods in Enzymol.* 597, 239-263. (査読有)
DOI: 10.1016/bs.mie.2017.06.004.
- ⑧ K. G. N. Suzuki, H. Ando, N. Komura, T. K. Fujiwara, M. Kiso, A. Kusumi. (2017) Development of new ganglioside probes and unraveling of raft domain structure by single-molecule imaging. *Biochim. Biophys. Acta* 1861, 2494-2506. (査読有)
DOI: 10.1016/j.bbagen.2017.07.012.
- ⑨ M. Kinoshita*, K. G. N. Suzuki*(equal contribution), N. Matsumori, M. Takada, H. Ano, K. Morigaki, M. Abe, A. Makino, T. Kobayashi, K. M. Hirosawa, T. K. Fujiwara, A. Kusumi, M. Murata. (2017) Raft-based sphingomyelin interactions revealed fluorescent sphingomyelin analogs. *J. Cell Biol.* 216, 1183-1204. (査読有)
DOI: 10.1083/jcb.201607086.
- ⑩ K. G. N. Suzuki. (2017) Investigation of raft dynamics by single-molecule observation of ganglioside probes. *Seikagaku* 89, 121-125. (査読有)
<https://seikagaku.jbsoc.or.jp/10.14952/SEIKAGAKU.2017.890121/data/index.pdf>

[学会発表] (計 12 件)

- ① 鈴木健一 (2019 年 1 月) 高精度 1 分子観察によるラフト組織化と機能の解明 第 66 回脳の医学・生物学研究会、名古屋 (招待講演)
- ② Kenichi G. N. Suzuki (2018 年 11 月) Regulation mechanisms of EGFR activity by gangliosides as revealed by single-molecule imaging. JAACT2018 つくば (招待講演)
- ③ Kenichi G. N. Suzuki (2018 年 9 月) Regulation mechanisms of EGFR activity by ganglioside homodimer rafts as revealed by single-molecule imaging. The 56th Annual meeting of the Biophysical Society of Japan. 岡山 (招待講演)

- ④ 鈴木健一 (2018年9月) 高精度1分子観察によるラフト組織化とシグナル制御機構の解明 第40回日本生物学的精神医学会・第61回日本神経化学学会大会 合同年会 神戸 (招待講演)
- ⑤ 鈴木健一 (2018年9月) 細胞膜の組織化と機能：高精度1分子観察による解明 第19回運動器科学研究会、岐阜 (Plenary lecture)
- ⑥ 鈴木健一 (2018年3月) 1分子観察によるラフト組織化と機能の解明 大阪大学蛋白質研究所セミナー生体膜の生物化学、大阪 (招待講演)
- ⑦ 鈴木健一 (2017年12月) 1分子観察で明らかになったガングリオシドクラスター形成とそのEGF受容体活性制御機構 ConBio2017、神戸 (招待講演)
- ⑧ 鈴木健一 (2017年11月) 細胞膜の組織化と機能：高精度1分子法による解明 名古屋大学IGERセミナー、名古屋 (招待講演)
- ⑨ 鈴木健一 (2017年10月) 高精度1分子イメージングで明らかになったラフト組織化と機能 第10回セラミド研究会、札幌 (招待講演)
- ⑩ Kenichi G. N. Suzuki (2017年10月) Unraveling of raft organization and function by single-molecule imaging. International seminar on biophysics and chemical biology of biomembranes and lipid bilayers.大阪 (招待講演)
- ⑪ 鈴木健一 (2017年9月) 細胞膜上での超高速1分子蛍光観察法 第55回日本生物物理学会、熊本 (招待講演)
- ⑫ 鈴木健一 (2017年6月) 1分子観察で明らかになったガングリオシドのクラスター形成機構とEGF受容体活性制御機構 第59回日本脂質生化学会、京都 (招待講演)

〔図書〕 (計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計1件)

名称：新規蛍光標識スフィンゴミエリン及びその利用

発明者：村田道雄、松森信明、木下祥尚、楠見明弘、鈴木健一

権利者：同上

種類：特許

番号：特許願 2017-506557

出願年：2018年

国内外の別：国内

○取得状況 (計0件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<https://www1.gifu-u.ac.jp/~single/>

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号 (8桁)：

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。