

令和 4 年 10 月 26 日現在

機関番号：10101

研究種目：国際共同研究加速基金（国際共同研究強化）

研究期間：2017～2019

課題番号：17KK0160

研究課題名（和文）抑制性介在細胞の非シナプス結合におけるNR3A受容体選択的集積メカニズムの解明

研究課題名（英文）Elucidating the mechanisms underlying selective NR3A accumulation at non-synaptic junctions

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） 11,100,000円

渡航期間： 12ヶ月

研究成果の概要（和文）：基課題において、NR3A受容体は他の受容体とは全く異なり、特定の入力経路・細胞の非シナプス性結合に選択的に集積するにユニークな性質があることを見出した。本研究ではこの選択的集積の分子メカニズムを明らかにするため、生化学的手法により分子の同定を試みた。BN-PAGE法や免疫沈降法、質量分析を行った結果、NR3AチャンネルのアセンブリにはNR1が必須であるのに対し、共局在するKv4.3は必要ないことがわかった。またNR1コンディショナル欠損マウスにおいてはNR3A受容体の特徴的な集積が認められないことや、アデノ随伴ウイルスを用いたNR1導入でNR3Aの選択的集積が回復することもわかった。

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、組織学的解析により見出した「NR3A受容体と共局在する分子」の生化学的スクリーニングを行い、NR3A受容体の特徴である「特定の神経回路におけるユニークな集積パターン」に必要な分子とそうでない分子を明らかにした。こうした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）：In the preceding project, we found that NR3A selectively localized to non-synaptic contacts between climbing fiber and cerebellar stellate cells, and those between glutamatergic terminals and somatostatin-positive GABAergic interneurons in the cerebral cortex. To identify molecular partners that constitute biochemical complex, we immunopurified biochemical complex containing NR3A and conducted analysis by mass spectrometry. We found that NR1 but not Kv4.3 was included in the complex. Furthermore, in a reconstitution system using *Xenopus* oocytes, NR3A assembly required NR1, but not Kv4.3. Rescue experiment using AAV revealed that NR1 was required for selective NR3A expression at non-synaptic contacts.

研究分野：神経組織学

キーワード：NMDA受容体 抑制性ニューロン

様式 F - 19 - 2

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ため、基課題において NR3A 受容体の発現部位の同定を試みたところ、NR3A 受容体は他の受容体とは全く異なり、特定の入力経路・細胞の非シナプス性結合に選択的に集積するにユニークな性質があることを見出した。

2. 研究の目的

基課題で得られた知見から「NR3A 受容体は新規の分子と複合体を形成し、入力経路・標的細胞選択的に非シナプス結合に集積している」という仮説を立てるに至った。したがって本研究では、この選択的集積の分子メカニズムを明らかにするため、生化学的手法により責任分子を同定することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 生化学的手法による NR3A 複合体の新規の構成分子・結合分子の同定

複合体構造をとるタンパク質および膜タンパク質複合体の大きさや分子種を調べるために有用な手法である BN-PAGE 法や免疫沈降法を用いた複合体解析により構成分子の同定に取り組んだ。また、アフリカツメガエル卵母細胞の強制発現系を用いて、同定した分子がこれまでに同定された Auxiliary subunit と同様にチャネル活性に影響を及ぼすか検討した。

(2) NR3A 受容体選択的集積に重要な機能ドメインを同定

一般的に用いられる初代培養細胞系では観測されない入力経路特異的な受容体局在の解析に最適な方法を用いて解析を行った。すなわち、NR3A の変異体を作成し、アデノ随伴ウイルス (AAV) を用いてマウス大脳・小脳に導入し、NR3A の局在変化を検討する方法である。

4. 研究成果

(1) 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 (図1)、Kv4.3 は含まれていない (図2) ことがわかった。

(2) 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 (図3)。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。

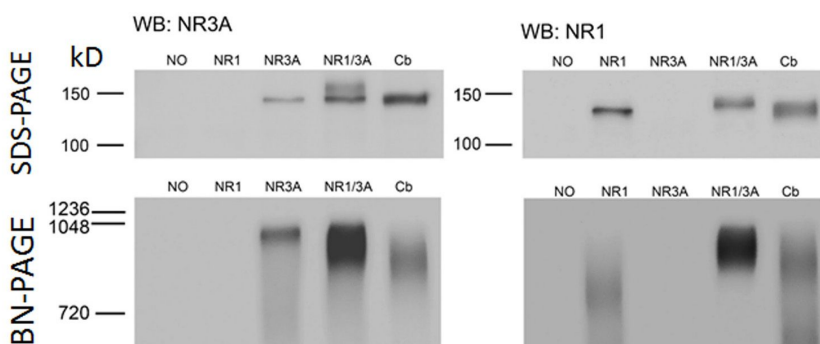


図1
強制発現系と BN-PAGE 法を用いた複合体形成の検討。NR3A が複合体を形成し、バンドとして検出されるようになるには NR1 が必要である。

WB: Kv4.3

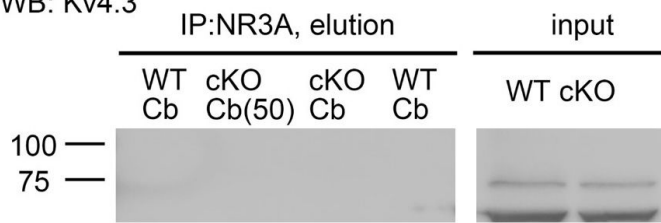


図 2

免疫共沈法を用いた複合体構成分子の検討。Kv4.3は検出されない

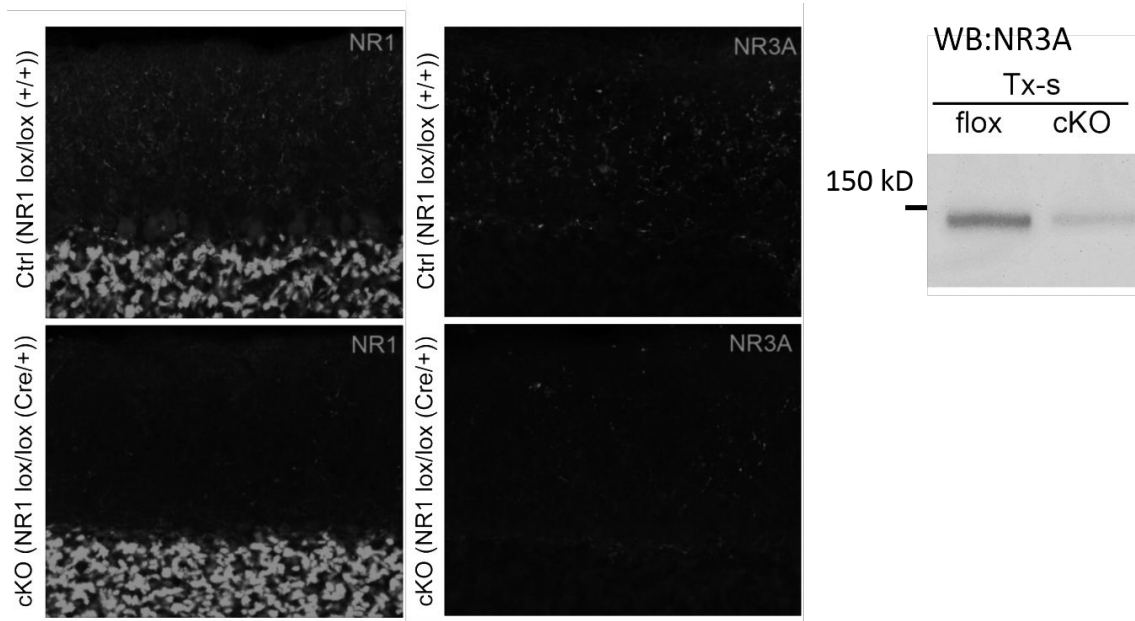


図 3

NR1 コンディショナル欠損マウス (NR1 小脳抑制性細胞で欠損) では野生型小脳で見られる選択的集積パターンが消失し、シナプトソーム分画からも顕著に減少している。

5. 主な発表論文等

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

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 Ramos C, Lutz S, Yamasaki M, Yanagawa Y, Sakimura K, Tomita S, Watanabe M, Castillo PE.	4. 巻 42
2. 論文標題 Activation of Extrasynaptic Kainate Receptors Drives Hilar Mossy Cell Activity.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 J Neurosci.	6. 最初と最後の頁 2872-2884
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1523/JNEUROSCI.0922-21.2022.	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 Yamasaki M, Aiba A, Kano M, Watanabe M.	4. 巻 194
2. 論文標題 mGluR1 signaling in cerebellar Purkinje cells: Subcellular organization and involvement in cerebellar function and disease	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Neuropharmacology.	6. 最初と最後の頁 108629
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.neuropharm.2021.108629.	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 Salm EJ, Dunn PJ, Shan L, Yamasaki M, Malewicz NM, Miyazaki T, Park J, Sumioka A, Hamer RRL, He WW, Morimoto-Tomita M, LaMotte RH, Tomita S.	4. 巻 31
2. 論文標題 TMEM163 Regulates ATP-Gated P2X Receptor and Behavior.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cell Rep.	6. 最初と最後の頁 107704
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.celrep.2020.107704.	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

〔学会発表〕 計1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

〔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
主たる渡航先の主たる海外共同研究者	富田 進 (Tomita Susumu)	米国イェール大学・医学部・教授	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------