

令和 4 年 6 月 17 日現在

機関番号：13401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07264

研究課題名(和文) グルタミン酸受容体の1分子内サブユニット構成の同定と細胞膜上局在の解明

研究課題名(英文) The subunit composition of the AMPA-type glutamate receptor is analyzed by the highly sensitive detection method for membrane molecules that is combining SDS-FRL and genome editing techniques.

研究代表者

黒田 一樹 (Kuroda, Kazuki)

福井大学・学術研究院医学系部門・准教授

研究者番号：60557966

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：AMPA型グルタミン酸受容体(AMPA)は、4つのサブユニットで構成された膜分子複合体で、構成するサブユニットの違いによりその応答特性やシナプス可塑性における役割が異なる。しかし、1分子レベルでサブユニット構成の異なるAMPAを脳内で調べる方法は無かった。我々はAMPAを構成するそれぞれのサブユニットに異なるエピトープタグ(E-tag)を導入したマウスの作製を行い、SDS-FRL法と抗原賦活化法を組み合わせることにより、2xHA-GluA2マウスにおいて抗HA-tag抗体によりGluA2を含むAMPAの検出を可能にした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細胞の外と内の境に存在する細胞膜には、細胞の機能と深く関わる膜分子複合体が発現している。この膜分子は幾つかの部品から構成されていることが多く、同じ分子であっても構成する部品が異なると機能も変化する。しかし一つの分子は小さく、1分子レベルで部品の構成を調べる方法が無かった。本研究では膜分子複合体であるAMPAを標的にして、部品構成が異なるAMPAを識別する方法論の確立を行った。本法の応用範囲は広く、多くの生命現象の素過程を支える分子メカニズムを膜分子複合体の多様性と特異性の観点から解明することに繋がる。

研究成果の概要(英文)：AMPA-type glutamate receptors (AMPA) are membrane molecular complexes composed of four subunits. However, there has been no way to examine AMPARs with different subunit compositions at the single-molecule level in the brain. We generated mice with different epitope tags (E-tags) for each subunit of AMPARs and combined SDS-FRL and antigen retrieval to detect GluA2-containing AMPARs in the brain of 2xHA-GluA2 mice using anti-HA-tag antibody.

研究分野：神経科学

キーワード：AMPA型グルタミン酸受容体 SDS処理凍結割断レプリカ標識 膜分子複合体 サブユニット構成 局在解析 電子顕微鏡

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、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

中枢神経系の興奮性神経伝達の殆どをグルタミン酸が担っており、個々の興奮性シナプス結合における伝達特性は、発現するグルタミン酸受容体の種類と量により決定されている。ミリ秒オーダーで起こる速い興奮性伝達は、イオン透過型グルタミン酸受容体により担われ、アミノ酸配列の相同性と薬理学的特性から、AMPA 型、NMDA 型(NMDAR)、Kainate 型(KAR)の3つに分類される。これらイオン透過型受容体は4つの基本サブユニットで構成されたヘテロ4量体として機能し、AMPA には4種類、NMDAR には5種類、KAR には5種類の基本サブユニットが同定されている。1つの受容体を構成するこれらの基本サブユニットの違いにより、グルタミン酸の結合親和性、グルタミン酸結合時のチャンネルの開口確率や開閉の時間動態、脱感作等の生物物理学的特性や薬理学的特性も変化し、更に透過する陽イオンの種類も変化する。また、基本サブユニットの多様性に加え、各受容体型に固有の補助サブユニットが存在し、複雑且つ緻密に制御された受容体サブユニット構成の多様性が脳内神経回路の動作と機能創出を支える重要な分子基盤となっている。従って、グルタミン酸受容体のサブユニット構成の多様性と各受容体の脳内分布と動態を神経回路ごとに明らかにすることが、脳機能創出のメカニズムを理解する上で重要である。しかし、内在性の膜分子複合体のサブユニット構成を明らかにする手法が無いため、脳内受容体におけるサブユニット構成の多様性とシナプス特異性の全貌は未だ不明である。

AMPA の細胞膜上の発現量はエンドサイトーシス/エキソサイトーシスにより、シナプスの PSD への局在は細胞膜上での拡散により制御され、これらの制御はサブユニット構成に依存することが知られている。AMPA の基本サブユニットには GluA1、GluA2、GluA3 と GluA4 があり、GluA2 は通常 RNA 編集によりアミノ酸置換(Q から R)され、この GluA2 を含む AMPAR は Ca^{2+} 非透過性(CI)となり、含まない AMPAR は Ca^{2+} 透過性(CP)となる。成熟マウスの海馬 CA1 錐体細胞には CI-及び CP-AMPA の両方が発現し、それぞれがシナプス伝達の長期増強現象 (long-term potentiation: LTP)の異なる局面で重要な役割を持ち、CP-AMPA は LTP 初期の神経細胞内への Ca^{2+} 透過を担うことが報告されている。また、ヒトのてんかんや筋萎縮性側索硬化症(ALS)では、神経細胞での過剰な CP-AMPA の発現が原因であるとの報告もなされている。

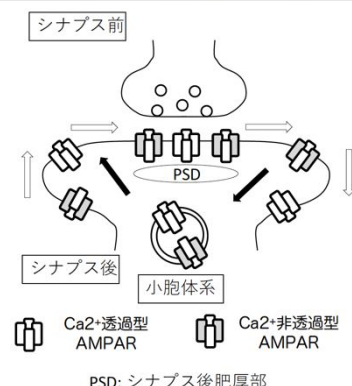
CP-AMPA は正常な脳機能と神経変性疾患の発症の両面に深く関与している。しかし正確な CP-AMPA の実体は明らかではなく、GluA1 又は GluA3 のホモ4量体、或いは GluA2 を含まない GluA1/3 のヘテロ4量体が想定され、生化学的な解析では脳内 AMPAR の少なくとも10%程度が GluA1 ホモ4量体であると推定されている。以上のことから、CP-AMPA の実体を明らかにし、発現や局在の調節メカニズムを解明することが待望されている(図1)。しかし、細胞膜上の内在性膜分子複合体のサブユニット構成を解析できる実験手法が無く、全く解明されていなかった。

2. 研究の目的

我々独自の分子局在解析技術である SDS-FRL 法は膜分子の発現分布を高感度で定量的に解析可能な手法である。しかし複数種のサブユニットを同時に検出するには、本手法に適用可能で、しかも認識部位が分子の細胞内か細胞外のどちらか一方に揃った抗体を複数用意する必要があり困難であった。最近、申請者は本研究課題とは別のプロジェクトにおいて、 Na^+/K^+ -ATPase (NAK)の3サブユニットのN末端に FLAG-tag を導入した knock-in (KI)マウスをゲノム編集技術により作製し、神経細胞の膜上に発現する FLAG-NAK 3 を含む分子を抗 FLAG 抗体により SDS-FRL 法で検出することに成功した(図2)。

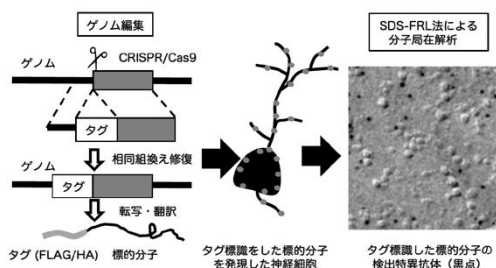
そこで、AMPA の基本サブユニット毎に異なるエピトープタグ(E-tag)を付加したマウスを作製し、脳内 AMPAR のサブユニット構成を同定できるように SDS-FRL 法を改良を行い、CP-AMPA の実体や局在を明らかにすることを目的とした。

図1 シナプス後のAMPAの局在分布



PSD: シナプス後肥厚部

図2 SDS-FRL法とゲノム編集を組み合わせた高感度膜分子検出法の確立



3. 研究の方法

(1) 電子顕微鏡レベルの高感度検出に適した E-tag 挿入時のノウハウの蓄積と、複数の E-tag/抗体の組合せを選定し、膜分子の局在を高感度で解析できる汎用性の高い SDS-FRL 法の技術基盤を構築する。

本研究には SDS-FRL 法で使用可能な複数の E-tag と E-tag 抗体の組み合わせが必要である。既に、GluA1 や GluA2 の N 末端(シグナル配列より C 末端側)に FLAG-tag や HA-tag を KI したマウス(FLAG-GluA1 と HA-GluA2)を作製し、光学顕微鏡レベルの免疫組織染色で FLAG-tag を検出した。しかし SDS-FRL 法では有意な FLAG-tag の検出が行えなかった。別に作成した FLAG-NAK 3 マウスでは SDS-FRL 法でも FLAG-tag が検出できている。従って SDS-FRL 法による E-tag の検出過程は、挿入された E-tag 周辺のアミノ酸配列や立体構造の影響を受け、高感度標識を達成するには E-tag 周辺にリンカーを入れる等の工夫が必要であることを示唆している。そこで、培養細胞の強制発現系を用いて、SDS-FRL 法で効率良く検出できる E-tag の挿入方法を検討し、高効率検出が可能な E-tag と抗体の組合せを選定する。

(2) 標的分子に E-tag を挿入した KI マウスの作製を行い、海馬 CA1 錐体細胞に発現する AMPAR サブユニット構成の多様性を明らかにし、CP-AMPA の実体を明らかにする。

E-tag を CRISPR/Cas9 法を用いて目的部位に KI した 3 種類のマウスの作製に既に成功している。そこで、新しく選定した複数の E-tag とリンカー配列を AMPAR の各サブユニットの遺伝子に KI したマウスを順次作製する。また、SDS-FRL 法による E-tag の標識効率が最大になる様に実験条件の最適化を行う。

4. 研究成果

(1) これまでに 1xFLAG や 1xHA を導入した 1xFLAG-GluA1 及び 1xHA-GluA2 の KI マウスを作製し、間接抗体染色や生化学的手法により海馬の神経細胞で FLAG-GluA1 および HA-GluA2 が発現することを確認していた。しかし E-tag 抗体を用いて SDS-FRL 法により FLAG-GluA1 および HA-GluA2 の検出を行ったが、神経の細胞膜上に発現する FLAG-GluA1 および HA-GluA2 は検出出来なかった。そのため、新たな E-tag を GluA1 や GluA2 のシグナルペプチドの直後に挿入した発現ベクターを作成し、培養細胞に強制発現系させ、SDS-FRL 法で効率良く検出可能な E-tag と抗 E-tag 抗体の組合せの選定を行い、2xFLAG や 2xHA が有効であることが分かった。

(2) 新たに選定した E-tag を CRISPR/Cas9 法を用いて GluA1 および GluA2 遺伝子に挿入し、2xHA-GluA2 KI マウスを作製した。この 2xHA-GluA2-KI マウスにおいて、間接抗体染色や生化学的手法により海馬の神経細胞で 2xHA-GluA2 が発現することを確認した(図3)。一方、2xFLAG-GluA1 マウスの作製に関しては、導入した E-tag が GluA1 の機能に影響を与えるのか KI マウスが作製出来ず、GluA1 の機能またはマウスの生存に影響を与えない新たな E-tag の検索を行い、E-tag-GluA1 マウスの作製を継続している。

(3) この 2xHA-GluA2-KI マウスより脳組織を回収し、SDS-FRL 法により脳内の神経細胞における GluA2 を含む AMPAR の検出を抗 HA 抗体により行ったが、GluA2 を含む AMPAR の検出は出来なかった。通常の間接蛍光抗体染色では抗エピトープタグ抗体により神経細胞に発現する GluA2 の検出は出来ていることから、実験条件の変更や抗原賦活化等により解析を進めた。これらの改善により、SDS-FRL 法により抗 HA 抗体を用いて神経細胞に発現する 2xHA-GluA2 を含む AMPAR の検出が可能となった(図4)。

図3 2xHA-GluA2-KIマウスの免疫組織学的解析

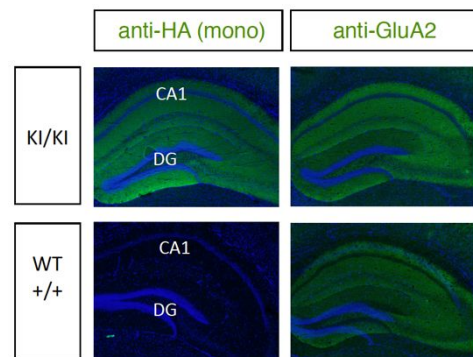
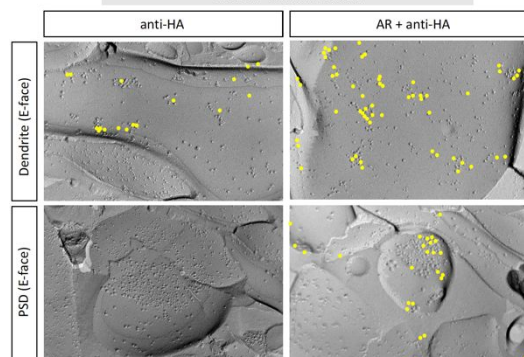


図4 SDS-FRL法における抗原賦活化(AR)による 2xHA-GluA2の検出



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 黒田 一樹、深澤 有吾	4. 巻 92
2. 論文標題 SDS-FRL法を用いたシナプス伝達関連膜分子の定量的局在解析	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 生化学	6. 最初と最後の頁 844 ~ 849
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.14952/SEIKAGAKU.2020.920844	査読の有無 無
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 Iguchi Tokuichi, Oka Yuichiro, Yasumura Misato, Omi Minoru, Kuroda Kazuki, Yagi Hideshi, Xie Min-Jue, Taniguchi Manabu, Bastmeyer Martin, Sato Makoto	4. 巻 41
2. 論文標題 Mutually Repulsive EphA7/EfnA5 Organize Region-to-Region Corticopontine Projection by Inhibiting Collateral Extension	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The Journal of Neuroscience	6. 最初と最後の頁 4795 ~ 4808
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1523/JNEUROSCI.0367-20.2021	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 Shimoda Yoshiteru, Beppu Kaoru, Ikoma Yoko, Morizawa Yosuke M., Zuguchi Satoshi, Hino Utao, Yano Ryutaro, Sugiura Yuki, Moritoh Satoru, Fukazawa Yugo, Suematsu Makoto, Mushiake Hajime, Nakasato Nobukazu, Iwasaki Masaki, Tanaka Kenji F., Tominaga Teiji, Matsui Ko	4. 巻 163
2. 論文標題 Optogenetic stimulus-triggered acquisition of seizure resistance	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Neurobiology of Disease	6. 最初と最後の頁 105602 ~ 105602
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.nbd.2021.105602	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 Xie Min-Jue, Iwata Keiko, Ishikawa Yasuyuki, Nomura Yuki, Tani Tomomi, Murata Koshi, Fukazawa Yugo, Matsuzaki Hideo	4. 巻 12
2. 論文標題 Autistic-Like Behavior and Impairment of Serotonin Transporter and AMPA Receptor Trafficking in N-Ethylmaleimide Sensitive Factor Gene-Deficient Mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Genetics	6. 最初と最後の頁 748627 ~ 748627
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fgene.2021.748627	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 Martín-Belmonte Alejandro, Aguado Carolina, Alfaro-Ruiz Rocío, Albasanz José Luis, Martín Mairena, Moreno-Martínez Ana Esther, Fukazawa Yugo, Luján Rafael	4. 巻 22
2. 論文標題 The Density of Group I mGlu5 Receptors Is Reduced along the Neuronal Surface of Hippocampal Cells in a Mouse Model of Alzheimer's Disease	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 5867 ~ 5867
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms22115867	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4件(うち招待講演 0件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 黒田 一樹、石川 達也、村田 航志、深澤 有吾
2. 発表標題 神経細胞における凍結割断レプリカ標識法(SDS-FRL法)と免疫タグノックインを組み合わせたNAK 3を含むNa ⁺ /K ⁺ -ATPaseの定量的分布解析の最適化
3. 学会等名 日本解剖学会・日本生理学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 黒田一樹、石川達也、村田航志、深沢有吾
2. 発表標題 神経細胞における凍結割断レプリカ標識法と免疫タグノックインを組み合わせた膜分子の定量的分布解析の最適化
3. 学会等名 日本解剖学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 石川達也、村田航志、黒田一樹、堀記代美、奥田洋明、尾崎紀之、深沢有吾
2. 発表標題 Na/K-ATPase- α 3の神経細胞膜上発現分布の定量的局在解析
3. 学会等名 日本解剖学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 黒田一樹、石川達也、村田航志、深澤 有吾
2. 発表標題 脳内AMPA受容体のサブユニット構成に基づいた神経細胞膜上での局在解析法の確立
3. 学会等名 日本解剖学会
4. 発表年 2022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
研究分担者	深澤 有吾 (Fukazawa Yugo) (60343745)	福井大学・学術研究院医学系部門・教授 (13401)	

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
---------	---------