

平成 22 年 6 月 2 日現在

研究種目：若手研究 (B)
 研究期間：2008～2009
 課題番号：20700330
 研究課題名 (和文) グルタミン酸受容体 (GluR) $\delta 2$ の N 末端細胞外領域の機能解明
 研究課題名 (英文) Study on the functional roles of the N-terminal domain of GluR $\delta 2$

研究代表者
 植村 健 (UEMURA TAKESHI)
 東京大学・大学院医学系研究科・助教
 研究者番号：00372368

研究成果の概要 (和文)：

GluR $\delta 2$ の N 末端細胞外領域 (NTD) の役割を明らかにするため、GluR $\delta 2$ の NTD を GluR $\alpha 1$ の NTD で置き換えた遺伝子 ($\alpha 1$ NTD/GluR $\delta 2$) と GluR $\delta 1$ の NTD に置き換えた遺伝子 ($\delta 1$ NTD/GluR $\delta 2$) をそれぞれ有する遺伝子改変マウスを標的遺伝子組換えにより作出した。現在までに、組換え ES 細胞を用いてキメラマウスを得ている。また、GluR $\delta 2$ の役割を培養神経細胞で検証した。その結果、GluR $\delta 2$ が直接シナプス前終末の分化を誘導する活性を有していること、その活性には GluR $\delta 2$ の NTD が必要かつ十分であることを見出した。さらに、分泌蛋白質 Cbln1 が GluR $\delta 2$ の NTD に結合し、GluR $\delta 2$ のシナプス前終末を誘導する活性には Cbln1 が必要不可欠であることを見出した。

研究成果の概要 (英文)：

To elucidate the functional role of N-terminal domain (NTD) of GluR $\delta 2$, we tried to generate two mutant mice designated as $\alpha 1$ NTD/GluR $\delta 2$ and $\delta 1$ NTD/GluR $\delta 2$ in which the NTD of GluR $\delta 2$ is replaced with the corresponding domain of GluR $\alpha 1$ and GluR $\delta 1$, respectively. We obtained chimera mice using recombinant ES cells. We also analyzed the functional role of NTD of GluR $\delta 2$ in vitro cell culture system and found that NTD of GluR $\delta 2$ is essential and sufficient to induce presynaptic differentiation in vitro using primary cultures of cerebellar granule cells. We also found that Cbln1 interacts with NTD of GluR $\delta 2$ and GluR $\delta 2$ requires Cbln1 for induction of presynaptic differentiation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2009 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：神経科学・神経化学・神経薬理学

キーワード：神経伝達物質・受容体

1. 研究開始当初の背景

ヒトの精神活動の理解する上で記憶・学習の研究は脳の高次機能解明への中心的課題である。記憶・学習の分子基盤を解明するためには、脳におけるシナプス機能を支える多彩な分子のダイナミックな活動を理解し、神経可塑性およびシナプス形成の分子機構を明らかにすることが必須である。しなしながら、脳においてシナプス結合がどのような機構で形成されるのかは依然として謎のままでした。グルタミン酸受容体 GluR δ 2 は小脳プルキンエ細胞特異的に発現し、平行線維シナプスに局在している分子であり、GluR δ 2 欠損マウスの解析から、GluR δ 2 は平行線維-プルキンエ細胞間のシナプス可塑性 (LTD) と運動学習に必須であり、また平行線維-プルキンエ細胞間シナプス形成、登上線維支配領域調整、発達において余剰な登上線維シナプスの除去機構に重要な役割を果たす分子であることが明らかになっている。しかしながら、GluR δ 2 がどのようにこれら生理的に重要な現象を調節しているかは依然として不明であった。

2. 研究の目的

小脳プルキンエ細胞特異的に発現しているグルタミン酸受容体 GluR δ 2 は小脳シナプス形成・安定化、記憶・学習などに重要な役割を果たしている。本研究は小脳プルキンエ細胞特異的に発現する GluR δ 2 の N 末端細胞外領域 (NTD) の果たす役割を明らかにすることを目的としている。

3. 研究の方法

GluR δ 2 の NTD を GluR α 1 の NTD で置き換えた遺伝子 (α 1NTD/GluR δ 2) と GluR δ 1 の NTD に置き換えた遺伝子 (δ 1NTD/GluR δ 2) をそれぞれ有する遺伝子改変マウスを標的遺伝子組換えにより作成する。また、培養神経細胞を用いて GluR δ 2 の NTD の役割を検証する。

4. 研究成果

GluR δ 2 の N 末端細胞外領域 (NTD) を GluR α 1 の NTD で置き換えたキメラ遺伝子 (α 1NTD/GluR δ 2) と GluR δ 1 の NTD に置き換えたキメラ遺伝子 (δ 1NTD/GluR δ 2) をそれぞれ GluR δ 2 遺伝子の翻訳開始メチオニン部位に導入し、GluR δ 2 プロモーター制御下に発現させることが可能になるようターゲティングベクターを作成した。C57BL/6 系マウス由来の ES 細胞と作製したジーンターゲティングベクターを用いて相同組換え体のスクリーニングを行い、遺伝子組換え ES 細胞を得た。遺伝子組換え ES 細胞を CD-1 マウスの胚盤胞にインジェクションし、キメラマウスを作製した。

GluR δ 2 の NTD が果たす役割を検証するため、GluR δ 2 を発現させた HEK293T 細胞と培養小脳顆粒細胞を共培養させた。プレシナプスのアクティブゾーンマーカー Bassoon で染色した結果、GluR δ 2 を発現させた HEK293T 細胞の細胞膜表面に Bassoon シグナルの集積が観察された。シナプス小胞性グルタミン酸トランスポーター (VGLUT1) で染色したところ同様の結果が得られた。これらの結果は、GluR δ 2 が直接シナプス前終末の分子と相互作用してシナプス前終末の分化を誘導していることを示唆するものであった。同様の実験を同じ δ ファミリーに属する GluR δ 1 と AMPA 型グルタミン酸受容体 GluR α 1、GluR α 2 を用いて行ったところ、GluR δ 1 を発現させた HEK293T 細胞でも Bassoon 及び VGLUT1 の集積が観察された。GluR α 1、GluR α 2 を発現させた HEK293T 細胞ではこれらのマーカーの集積は観察されなかった。GluR δ 2 の NTD を GluR α 1 の NTD で置き換えた遺伝子 (α 1NTD/GluR δ 2) を HEK293T 細胞に発現させ同様の実験を行ったところ、シナプス前終末のマーカーの集積は全く観察されなかった。さらに、GluR δ 2 の NTD とヒト IgG の Fc 領域との融合蛋白質 (GluR δ 2-NTD-Fc) を作成し、分泌蛋白質として精製した後、磁気ビーズに結合させた。GluR δ 2-NTD-Fc を結合させた磁気ビーズを培養小脳顆粒細胞に添加したとこと、

GluRδ2-NTD-Fc を結合させた磁気ビーズの周囲に Bassoon 及び VGluT1 のシグナルが観察された。この結果は、シナプス前終末の分化誘導には GluRδ2 の NTD が直接関与していることを強く示唆するものであった。

GluRδ2 の NTD と直接相互作用するシナプス前終末に存在する分子を同定するために、GluRδ2-NTD-Fc を結合させ磁気ビーズを用いてシナプス前終末を分化誘導させた後、膜非透過性蛋白質架橋剤 (DTSSP) で処理した。架橋された蛋白質は界面活性剤を用いて可溶化し、磁気ビーズを用いて回収した。回収した蛋白質を SDS-PAGE で解析し、トリプシン消化した後、LC-MS/MS にて網羅的に解析した。同定した蛋白質の中で分泌蛋白質 Cbln1 が直接 GluRδ2 の NTD に結合することが生化学的実験により明らかとなった。また結合を表面プラズモン共鳴分析法を用いた速度論的解析を行い、両者の結合は $K_D = 16.5$ nM の高い親和性を示すことが明らかになった。さらに、GluRδ2-NTD と Cbln1 の相互作用が GluRδ2 の有するシナプス前終末の分化誘導活性に重要であるかどうかを検証した。Cbln1 ノックアウトマウス由来の培養小脳顆粒細胞と GluRδ2 を発現させた HEK293T 細胞との共培養を行ったところ、野生型の培養小脳顆粒細胞との共培養で観察されたプレシナプスマーカーの集積は全く観察されなかった。これらの結果から、Cbln1 は GluRδ2 の機能的なリガンドであり、GluRδ2 のシナプス前終末の分化誘導活性に必須であることが明らかとなった。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

① T. Uemura and M. Mishian (2008) The amino-terminal domain of glutamate receptor δ2 triggers presynaptic differentiation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 377, 1315-1319. 査読有

[学会発表] (計 14 件)

① 遠藤のぞみ、植村健、崎村建司、糸原重美、三品昌美. A study of the role of the

layer 4 of the cerebral cortex in fear memory. 第 83 回日本薬理学会年会. 2010 年 3 月 18 日 (大阪国際会議場、大阪府)

② 李聖真、植村健、三品昌美. High-affinity and selective binding of Cbln1 to glutamate receptor δ2. 第 83 回日本薬理学会年会. 2010 年 3 月 17 日 (大阪国際会議場、大阪府)

③ 植村健、李聖真、安村美里、吉田知之、羅紋真、田口良、三品昌美. Identification of Cbln1 as a novel ligand for glutamate receptor δ2. 第 83 回日本薬理学会年会. 2010 年 3 月 17 日 (大阪国際会議場、大阪府)

④ 安村美里、竹内倫徳、植村健、崎村建司、三品昌美. Control of synaptic connection by Cbln1 in the adult cerebellum. 第 83 回日本薬理学会年会. 2010 年 3 月 17 日 (大阪国際会議場、大阪府)

⑤ 遠藤のぞみ、植村健、崎村建司、糸原重美、三品昌美. 誘導型 Cre (CrePR) を大脳皮質第 4 層選択的に発現するマウス系統の作成. 第 121 回日本薬理学会関東部会. 2009 年 10 月 10 日 (東京女子医科大学、東京都)

⑥ 加藤永子、植村健、陳西貴、渡辺文寛、安村美里、糸原重美、崎村建司、三品昌美. Effects of inducible ablation of cerebellar granule or Purkinje cells on motor control. The 32nd Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society. 2009 年 9 月 18 日 (名古屋国際会議場、愛知県)

⑦ 遠藤のぞみ、植村健、崎村建司、糸原重美、三品昌美. Establishment of a mouse line for inducible ablation of neurons in the layer 4 of the cerebral cortex. The 32nd Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society. 2009 年 9 月 18 日 (名古屋国際会議場、愛知県)

⑧ 植村健、三品昌美. The role of the N-terminal domain of glutamate receptor $\delta 2$ in synapse formation. 第32回日本神経科学大会. 2009年9月17日(名古屋国際会議場、神奈川県)

⑨ 遠藤のぞみ、植村健、崎村建司、糸原重美、三品昌美. Establishment of a mouse line for inducible ablation of neurons in the layer 4 of the cerebral cortex. Neuro2009 Satellite Symposium "The 4th MCCS-Asia Symposium". 2009年9月15日(名古屋国際会議場、愛知県)

⑩ 加藤永子、植村健、陳西貴、渡辺文寛、安村美里、糸原重美、崎村建司、三品昌美. Effects of inducible ablation of cerebellar granule or Purkinje cells on motor control. Neuro2009 Satellite Symposium "The 4th MCCS-Asia Symposium. 2009年9月15日(名古屋国際会議場、愛知県)

⑪ 加藤永子、植村健、陳西貴、渡辺文寛、安村美里、糸原重美、崎村建司、三品昌美. Differential effects of cerebellar granule and Purkinje cell deficiencies on motor performance. 第120回日本薬理学会関東部会. 2009年7月11日(東京医科歯科大学、東京都)

⑫ 植村健、三品昌美. Induction of presynaptic differentiation by the extracellular N-terminal domain of glutamate receptor $\delta 2$. 第82回日本薬理学会年会. 2009年3月16日(パシフィコ横浜、神奈川県)

⑬ 安村美里、植村健、山崎美和子、崎村建司、渡辺雅彦、三品昌美. Role of the internal Shank-binding segment of GluR $\delta 2$ in cerebellar functions. 第31回日本神経科学大会. 2008年7月11日(東京国際フォーラム、東京都)

⑭ 植村健、柿澤昌、山崎美和子、崎村建司、渡辺雅彦、飯野正光、三品昌美. Role of the C-terminal PDZ binding domain of Glutamate receptor $\delta 2$ in synaptic plasticity and climbing fiber wiring. 第31回日本神経科学大会. 2008年7月11日(東京国際フォーラム、東京都)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

植村 健 (UEMURA TAKESHI)

東京大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：00372368

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし