

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 5 日現在

機関番号：14301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2013～2014

課題番号：25890009

研究課題名(和文) 海馬長期増強時におけるAMPA受容体数の一過性減少機構の解明

研究課題名(英文) Molecular mechanism of temporal AMPA-type glutamate receptor internalization during hippocampal long-term potentiation

研究代表者

田中 洋光(TANAKA, Hiromitsu)

京都大学・理学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：30705447

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：シナプス入力に応じて情報処理機能が変化する「シナプス可塑性」は、記憶・学習の細胞基盤と考えられている。本研究では、シナプス可塑性の代表例である海馬の長期増強現象が起こる際に、特定のAMPA型グルタミン酸受容体がダイナミンと共に同期して減少することを示唆する結果を、全反射顕微鏡を用いて得た。また、この手法を発展させて、受容体のエンドサイトーシスを個別に観察できる新たな可視化実験系を構築した。

研究成果の概要(英文)：The efficacy of synaptic transmission changes depending on the pattern of neuronal activity. This synaptic plasticity has been regarded as a cellular basis of learning and memory. In this study, we have suggested that the amount of a subtype of AMPA-type glutamate receptors (AMPA receptors) on postsynaptic membrane is reduced together with dynamin during hippocampal long-term potentiation by experiments using total internal reflection fluorescence microscopy. In addition, we have developed a new method to visualize individual endocytosis of AMPA receptors.

研究分野：神経細胞生物学

キーワード：神経科学 分子生物学 ライブイメージング シナプス可塑性 長期増強 長期抑圧 グルタミン酸受容体 全反射顕微鏡

1. 研究開始当初の背景

我々が何かを学習する時、または記憶が形成される時には、神経細胞間の情報を伝える部位「シナプス」において、情報伝達の効率が変化すると考えられている。このシナプス可塑性の代表例として、海馬の興奮性シナプスにおける長期増強現象 (LTP: long-term potentiation) が挙げられる。LTP は、情報を送るシナプス前細胞に一過性の高頻度刺激を加えた時、情報を受け取るシナプス後細胞から記録されるシナプス応答が、その後持続的に増強する現象である。この現象は、記憶・学習の重要な細胞基盤として、国内外を問わずこれまで多くの研究がなされてきた (Malinow & Malenka, *Annu. Rev. Neurosci.*, 2002; Hugarir & Nicoll, *Neuron*, 2013)。LTP が起きる際には、シナプス後細胞のシナプスに面した細胞膜 (シナプス後膜) における AMPA 型グルタミン酸受容体 (AMPA 受容体) の数が増加することが重要である。しかしながら、複数種ある AMPA 受容体がいつどのような経路を通りシナプス後膜で増加するのかは、明らかでなかった。

以上の問題に取り組むために、研究代表者は先行研究において、受容体数が増える動態 (エキソサイトーシスや側方移動) を可視化する新たな実験系を構築した。そして、LTP 発現に際して異なる型の AMPA 受容体が、異なるタイミングで、各々別経路を通り増加することを明らかにした (Tanaka & Hirano, *Cell Rep.*, 2012)。その一方で研究開始以前に、LTP の初期相で一部の AMPA 受容体が一時的に減少する現象を発見した。この現象は、受容体数が減る動態 (エンドサイトーシス) が関与すると考えられるが、LTP 発現とエンドサイトーシスの関係を明らかにした研究はなかった。そのため研究開始当初では、AMPA 受容体の一過性減少機構の解明が求められていた。

2. 研究の目的

海馬の LTP 発現時に、どのようなサブユニット構成の AMPA 受容体の数が、どのような動態で減少するのかを明らかにすることを目的とした (図 1)。本研究では、受容体動態を直接観察する方法が有効と考え、個々のエンドサイトーシスを従来の観察データから抽出する解析手法、及びエンドサイトーシスを個別に可視化する新たな実験系の確立を目指した。

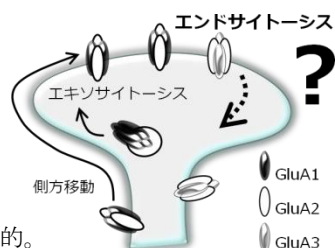


図 1. 本研究の目的。

3. 研究の方法

(1) AMPA 受容体とエンドサイトーシス関連分子のマルチカラーイメージング法

シナプス後膜内外における受容体を効率良く、安定的に可視化するために、全反射顕微鏡を用いた。全反射顕微鏡は、背景光を極端に減らすことにより、ガラス面の極近傍 (約 100 nm) にある蛍光分子のみを観察できる (Toomre & Mainstein, *Trends Cell Biol.*, 2001)。条件によっては、蛍光 1 分子をも観察可能で定量性に優れている。本研究では、興奮性シナプス形成を誘導する接着分子である Neurexin をガラス面にコートし、その上にラット海馬神経細胞を初代培養した。そして、蛍光標識した AMPA 受容体、及びエンドサイトーシス関連分子である Dynamin や Clathrin 等を観察した (図 2)。

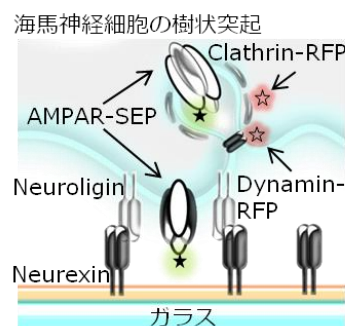


図 2. エンドサイトーシスを観察する模式図。ガラス面にコートした Neurexin が Neuroigin と結合することにより、ガラス面上にシナプス後膜様構造が形成される。

(2) 個別のエンドサイトーシスの新可視化法

AMPA 受容体の蛍光標識に用いた SEP (super-ecliptic pHluorin) の性質を利用して、上記の実験系を発展させた。SEP は、GFP 変異体の一つで、細胞膜表面やエンドサイトーシスされた直後の小胞内などの pH 中性下で発現した場合は、緑色蛍光を発する。そこで、細胞外液の pH を 6.0 と 7.4 に素早く繰り返し切り替えることで、エンドサイトーシスされた直後の AMPA 受容体を可視化した (図 3)。

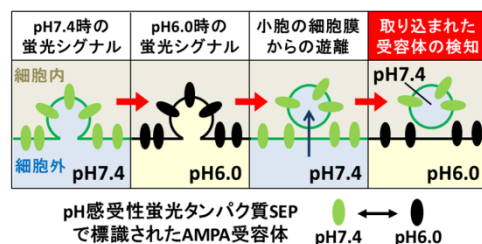


図 3. エンドサイトーシス直後の AMPA 受容体の検出方法。SEP が pH7.4 では蛍光を発し、pH6.0 では消光する性質を用いて、酸性化がまだ始まっていない小胞内にある AMPA 受容体を可視化した。

4. 研究成果

(1) AMPA 受容体とエンドサイトーシス関連分子のマルチカラーイメージング法

AMPA 受容体は、成熟した海馬神経細胞では、GluA1-3 のサブユニットからなるホモまたはヘテロ四量体を構成する。また、エンドサイトーシス関連分子として、Dynamin2 または 3、Clathrin light chain a1、Arf6 (ADP-ribosylation factor 6)、及び BRAG2 (Brefeldin-resistant Arf GEF 2) が挙げられる。特に Dynamin は GTPase の一種で、エンドサイトーシスの際に形成される小胞を細胞膜表面から細胞内へくびり切る機能を持つ。本研究では、各 AMPA 受容体サブユニットに SEP、及び各エンドサイトーシス関連分子に赤色蛍光タンパク質 TagRFPT を標識した融合タンパク質を遺伝子発現させた。そして、LTP 誘導刺激である電場刺激を加え、その前後における各タンパク質の動態を観察した。なお、樹状突起のどこがシナプス後膜かを識別するために、青色蛍光タンパク質 mTurquoise2 で標識した PSD95 (シナプス後膜マーカー) も観察した (図 4)。

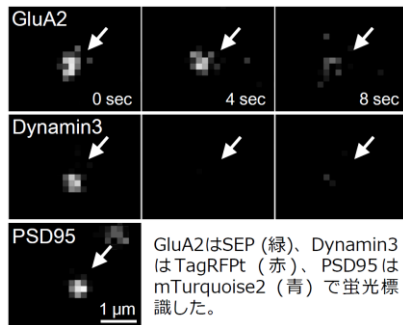


図 4. シナプス後膜における AMPA 受容体のエンドサイトーシス例。GluA2 の蛍光輝度が、Dynamin3 と共に減少した。小胞内の酸性化に時間がかかるために、GluA2 の輝度減少は比較的遅い。

本研究では特に GluA2 と Dynamin3 が、LTP 誘導刺激後に同期して輝度減少する現象に注目した。そして、個々のエンドサイトーシスを画像データから抽出するために、輝度減少するタイミング、度合、相対的位置関係などの観点から網羅的解析を行った。具体的にはまず、PSD95 のシグナル領域をシナプス後膜内、それ以外をシナプス後膜外とした。そして、GluA2 と Dynamin3 が±2 秒以内に同期して輝度減少する場合は「エンドサイトーシス」、輝度変化がバックグラウンドレベルの場合を「ノイズ振動」、それら以外を「その他」と3種類に分類した。そして、これらの現象が LTP 誘導刺激後のいつ起こるのかを1分単位で分類した。また、側方移動による輝度減少と区別するために、Dynamin3 周辺領域の GluA2 の輝度も解析した (図 5)。その結果、シナプス後膜内外共に、刺激 1-2 分後にエンドサイトーシスの頻度が増加する傾向

がみられたが、有意な差は認められなかった。これは、現実験系の技術的な問題によりノイズとシグナルとの区別が十分に最適でなかったから生じた結果ではないかと考えられる。そこで次に、以下のような実験系の確立を試みた。

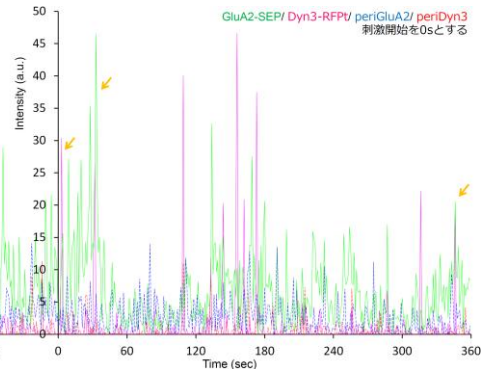


図 5. シナプス後膜における Dynamin3 と共存する GluA2 の蛍光輝度変化例 (緑実線)。側方移動とエンドサイトーシスを区別するために、Dynamin3 周辺領域 (peri) における GluA2 の輝度変化も解析した (青破線)。矢印は、エンドサイトーシスと考えられる現象を示す。

(2) 個別のエンドサイトーシスの新可視化法

より明確にエンドサイトーシスを観察するために、SEP の pH 感受性に着目した。研究方法で上述したように、小胞内の酸性化には時間がかかるために、エンドサイトーシスされた直後の小胞内では pH が中性にしばらく維持され、SEP は蛍光を発することができず。そこで、U 字形で先端に小孔を開けたガラス管 (U 字管) を全反射顕微鏡に組み合わせ、pH6.0 の酸性化した液を局所投与し、注目する領域の細胞外液を素早く酸性化させた。これにより、細胞膜表面の AMPA 受容体に融合した SEP の蛍光シグナルを消光させる一方、細胞内にエンドサイトーシスされた直後の未だ酸性化されていない小胞内の SEP シグナルのみを選択的に観察できる手法を確立した。

この手法を、AMPA 受容体のエンドサイトーシスがより起こりやすいと考えられる長期抑圧現象 (LTD: long-term depression) に適用した。LTD は、LTP と並ぶシナプス可塑性の代表例で、LTP とは反対に興奮性シナプス応答が持続的に減少する現象である。この際、AMPA 受容体が細胞内へ取り込まれると考えられており、エンドサイトーシスの頻度が増加する可能性が高い。本研究では、NMDA 投与による細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇によって、化学的に LTD 発現を誘導した (図 6)。そして、LTD 誘導直後に AMPA 受容体がシナプス後膜近傍でエンドサイトーシスされる現象の可視化に初めて成功した (図 7)。

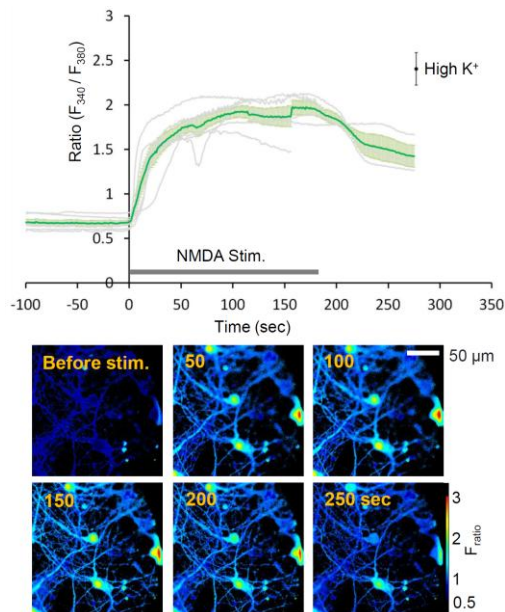


図 6. Fura2-AM を用いた、NMDA 投与前後における細胞内カルシウムイメージング。

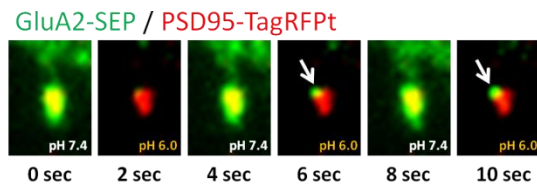


図 7. LTD 発現に際してシナプス後膜近傍で起こった GluA2 のエンドサイトーシス例 (矢印)。NMDA 刺激開始を 0s とする。

以上をまとめると、本研究により①全反射顕微鏡を用いたマルチカラーイメージング法の構築、②LTP 発現時における GluA2 と Dynamin3 の動態変化解析、③本実験系に U 字管を組み合わせた個々のエンドサイトーシスの可視化、という成果を挙げられた。これらの成果は、LTP 発現時における神経伝達物質受容体のエンドサイトーシスに注目した国内外で初めての研究と位置付けられる。また、エンドサイトーシスの可視化に成功したことにより、エキソサイトーシス、側方移動を含めた受容体の全動態を可視化できる基礎技術が整った。これにより今後、興奮性シナプスだけでなく抑制性シナプスにおける受容体の動態解析も展開することで、哺乳類の中枢神経内でどのようにシナプス伝達が制御されているかを統合的に理解する研究へつなげられると思われる。

今後の展望としては、シグナル・ノイズ比の良い新たなエンドサイトーシスの可視化法を LTP に適用し、記憶・学習が成立する基礎過程の解明に貢献する。具体的には、LTP 発現に際する GluA1-3 のエンドサイトーシスの頻度変化を解析することで、どのようなサブユニット構成の AMPA 受容体数が減少するかを明らかにする。また、この方法をアルツハイマー病の実験モデル等に適用するこ

とで、シナプス病変の病態解明やその治療薬開発への貢献が期待される。

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 Hiromitsu TANAKA, Shumpei FUJII, Tomoo HIRANO. “Live-cell imaging of receptors around postsynaptic membranes” *Nature Protocols*, 査読有, vol9, p76-89, 2014
DOI: 10.1038/nprot.2013.171

[学会発表] (計 5 件)

- ① 藤井俊平、田中洋光、平野丈夫「シナプス後膜周辺における AMPA 受容体の個別のエンドサイトーシスの可視化と解析」生理学研究所研究会、生理学研究所(岡崎)、2014 年 12 月 3 日
- ② Shumpei FUJII, Hiromitsu TANAKA, Tomoo HIRANO. “Live-cell imaging of individual endocytosis of AMPA receptor around postsynaptic membrane” *Neuroscience 2014*, Washington, D.C. (USA), 2014 年 11 月 15 日
- ③ 藤井俊平、田中洋光、平野丈夫「シナプス後膜周辺における神経伝達物質受容体の個別のエンドサイトーシスの可視化」第 37 回日本神経科学大会、パシフィコ横浜 (横浜)、2014 年 9 月 11 日
- ④ Hiromitsu TANAKA, Shumpei FUJII, Tomoo HIRANO. “New live-cell imaging system of neurotransmitter receptors” *New Frontier of Molecular Neuropathology 2014*, 東京医科歯科大学 (東京), 2014 年 3 月 17 日
- ⑤ 平野丈夫、田中洋光、藤井俊平「シナプス後膜内外でのグルタミン酸受容体動態の可視化」第 36 回日本分子生物学会年会、神戸ポートアイランド (神戸)、2013 年 12 月 4 日

[その他]

所属研究室のホームページ

<http://www.neurosci.biophys.kyoto-u.ac.jp/main.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田中 洋光 (TANAKA Hiromitsu)
京都大学・大学院理学研究科・助教
研究者番号: 30705447

(2) 研究分担者: なし

(3)連携研究者：なし