

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成30年6月18日現在

機関番号：22701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K06713

研究課題名(和文) 光操作を用いた単一スパインレベルのAMPA受容体機能解析

研究課題名(英文) Optical inactivation of GluA1 homomeric receptors in a single dendritic spine.

研究代表者

竹本 研 (TAKEMOTO, Kiwamu)

横浜市立大学・医学部・助教

研究者番号：80466432

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：学習記憶における重要な分子機構の一つにAMPA受容体のシナプス移行がある。本研究ではまず、これまでに開発したGluA1のCALI法がGluA1ホモマーに複合体特異性があることを明らかにした。さらにGluA1 KOマウスの海馬初代培養を用いて、in vitroにおけるGluA1に対する特異性を示し、さらにin vivo CALIでは記憶消去を誘導できないことを示した。学習後の様々な時間において急性スライスや初代培養ニューロンで単一シナプスのCALIを行い、in vivoにおけるGluA1ホモマーの時空間的な機能マッピングを進めた。

研究成果の概要(英文)：AMPA type glutamate receptors (AMPA-Rs) are known to have the important roles in synaptic activities and animal learning in vivo. AMPA-Rs are composed of variable combinations of four subunits, GluA1-4. In this project, to show the specificity of our GluA1 CALI technology, we found that CALI with Z9139 antibody showed the complex specificity to GluA1 homomer. We also elucidate the molecular specificity fo CALI with Z9139 in vivo using GluA1 KO mice. These results were published in Nature Biotechnology. We now conduct the CALI in single spine on primary cultured neurons and acute hippocampal slices to elucidate the spatio-temporal function of GluA1 homomer.

研究分野：神経科学

キーワード：学習記憶 光操作

1. 研究開始当初の背景

動物はいかにして効率よく記憶を獲得するのだろうか? LTP(長期増強)はシナプスに短い間連続刺激を与えたときに、数時間以上の長い時間シナプスの応答効率が上昇する現象であり、記憶の基本メカニズムと考えられている。この際誘導される重要な分子機構の一つに AMPA 受容体のシナプス移行がある。AMPA 受容体は GluA1~GluA4 の4つのサブユニットをもつイオン透過性のチャネルであるが、成体の海馬においては GluA1/1 ホモ 4 量体や GluA1/2 および GluA2/3 ヘテロ 4 量体を形成する。申請者の所属する研究室ではこれまでに、GluA1 は *in vivo* において経験依存的にシナプスに提示されるが、GluA2/3 は恒常的にシナプス移行を繰り返す (Takahashi ら Science 2003) ことを明らかにした。また、海馬依存的恐怖記憶の形成に GluA1 のシナプス移行が重要だと明らかにした (Mitsushima D et al. PNAS 2011)。さらに LTP 誘導後 GluA1/1 と GluA1/2 がまずシナプス膜へ移行し、その後 GluA2/3 に置き換わることから、GluA1 を含む分子が記憶の獲得、GluA2/3 が記憶の維持を行うとの仮説を立てることができる (Malinow et al. Curr Opin Neurobiol. 2000, Tanaka H et al, Cell rep. 2012)。AMPA 受容体のシナプス移行を二光子顕微鏡でイメージングしシナプス応答を可視化する試みはすでに幅広く行われている (Makino H et al. Neuron 2009/2011, Matsuo N et al. Science 2008, Takahashi N et al. Science 2012 など)が、今後は実際の学習において、いかに機能するかを単一シナプスレベルで解明する必要がある。

2. 研究の目的

CALI(Chromophore assisted light inactivation)法は光に反応して活性酸素を放出する、光増感物質を利用した分子機能不活化法である (Jay DG et al. PNAS 1988)。申請者はこれまでに、光増感物質にエオシンを採用することで、CALI 法の効率を飛躍的に高めることに成功した (Takemoto et al. ACS Chem Biol. 2011)。また申請者はエオシン CALI 法を用いて、恐怖学習時にシナプス移行した内在性 GluA1 を、シナプスで特異的に機能破壊する技術を開発を進めている。本研究では、本技術の分子特異性などの技術の評価を *in vitro* および *in vivo* で進め、最終的には培養細胞や急性スライスにおいて、単一シナプスレベルの CALI システムの構築と機能解析を行うことを目的とする。

3. 研究の方法

本技術の分子特異性を示すために、GluA1 ホモマー阻害剤である NASPM や GluA1KO マウスを用いた CALI 法を行う。また CALI 法で重要な性質として、光照射による空間特異性があり、これについては聴覚野をコン

ロールに実験を進めた。また一重項酸素の拡散半径 (3-4nm) 外であれば CALI の効果はなく高度な分子特異性があることを示すために、anti-IgG をブリッジとして挿入する手法を用いて、これを検討した。最終的に海馬培養ニューロンや急性スライスにおける単一シナプスの操作系の確立を進めた。

4. 研究成果

本研究ではまず、これまでに開発した GluA1 の CALI 法の分子的及び空間的特異性を明らかにする実験を進めた。これまでに GluA1 ホモマー阻害剤 NASPM を用いて本技術が GluA1 ホモマーに複合体特異性があることを明らかにした。さらに GluA1 KO マウスの海馬初代培養を用いて、*in vitro* における GluA1 に対する特異性を示し、さらに *in vivo* CALI では記憶消去を誘導できないことを示した。また、anti-IgG-Fab をエオシンラベル化し、Z9139 抗体との間にブリッジとして挿入し GluA1 と Z9139 との距離を広げた場合、CALI 効果は劇的に減少することを示した。これは CALI の特性と一致すると示唆された。加えて、海馬学習の際に関係のないことが分かっている聴覚野に光を当てても、記憶は消去されないことも示した。以上二点は本技術の空間特異性を示すものである。これらの研究成果は論文 2 として Nat. Biotechnol. に掲載された。

さらに海馬 primary culture においてイメージングと CALI を行い、GluA1 ホモマーが含まれるスパインの形態的な特徴を解析した。一方で海馬 primary culture の場合、GluA1 のシナプス移行がほとんどの細胞で起こることが明らかとなり、GluA1 が学習などの神経活動依存的にシナプス移行する *in vivo* の生理的状況とは異なる。よって *in vivo* において学習後に GluA1 ホモマーの機能マッピングをすることは、primary culture では見いだせない知見を得る可能性がある。ここではまず、海馬依存的な受動的回避学習 (IA 学習) 後のマウスについて海馬急性スライスを作製し、CALI を行う実験系の確立を進めた。エオシンラベルした抗体を ACSF に添加し、CALI の効果を指標にラベル化抗体の濃度等の条件の確立を目指したが、抗体を添加するとスライスの生存に必要な酸素バブリングにより ACSF に激しい泡立ちが起こり、スライスの生存率を大幅に低下してしまふことが分かった。そこであらかじめ *in vivo* で海馬にラベル化抗体を injection し IA 学習後に急性スライスを作製したところ、CALI 実験が可能ながわかった。現在学習後の様々な時間において急性スライスを作製後にスライス上で CALI を行い、*in vivo* における GluA1 ホモマーの時空間的な機能マッピングを進めている。

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 5件)

1. Tada H, Miyazaki T, Takemoto K, Jitsuki S, Nakajima W, Koide M, Yamamoto N, Taguchi A, Kawai H, Komiya K, Suyama K, Abe H, Sano A and Takahashi T “Social isolation suppresses actin dynamics and synaptic plasticity through ADF/cofilin inactivation in the developing rat barrel cortex.” *Sci. Rep.* 7(1):8471, 2017 (査読有)
2. Takemoto K, Iwanari H, Tada H, Suyama K, Sano A, Nagai T, Hamakubo T and Takahashi T “Optical inactivation of synaptic AMPA receptors erases fear memory.” *Nat. Biotechnol.*, 35(1):38-47, 2017 (査読有)
3. Tada H, Miyazaki T, Takemoto K, Takase K, Jitsuki S, Nakajima W, Koide M, Yamamoto N, Komiya K, Suyama K, Sano A, Taguchi A and Takahashi T “Neonatal isolation augments social dominance by altering actin dynamics in the medial prefrontal cortex.” *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 113, E7097-E7105, 2016 (査読有)
4. Sakamaki K, Ishii TM, Sakata T, Takemoto K, Takagi C, Takeuchi A, Morishita A, Takahashi H, Nozawa A, Shinoda H, Chiba K, Sugimoto H, Saito A, Tamate S, Satou Y, Jung SK, Matsuoka S, Koyamada K, Sawasaki T, Nagai T and Ueno N “Dysregulation of a potassium channel, THIK-1, targeted by caspase-8 accelerates cell shrinkage.” *Biochem Biophys Acta.*, 1863(11):2766-2783, 2016 (査読有)
5. Jitsuki S, Nakajima W, Takemoto K, Sano A, Strittmatter S and Takahashi T “Nogo restricts adult neural plasticity by limiting the reserve pool of synaptic AMPA receptors.” *Cereb. Cortex*, 26(1):427-439. 2016 (査読有)

[学会発表](計 6件)

1. Takemoto K and Takahashi T “Complex-specific optical inactivation of synaptic AMPA receptors erases

fear memory” (第 40 回 日本分子生物学会, 神戸, 2017 年 12 月)

2. Takemoto K and Takahashi T “Complex-specific optical inactivation of neurotransmitter receptors for memory decoding” (第 40 回 日本神経科学会, 幕張, 2017 年 7 月)
3. 竹本 研、岩成 宏子、永井 健治、浜窪 隆雄、高橋 琢哉 「複合体特異的な AMPA 受容体の光不活化と恐怖記憶の消去」 (第 39 回 日本分子生物学会年会、横浜、2016 年 12 月)
4. Takemoto K, Iwanari H, Nagai T, Hamakubo T and Takahashi T “Optical inactivation of synaptic AMPA receptors for artificial memory erasure” (第 39 回 日本神経科学会, 横浜, 2016 年 7 月)
5. Takemoto K, Iwanari H, Nagai T, Hamakubo T and Takahashi T “Optical inactivation technology of synaptic AMPA receptors in vivo” (SFN, シカゴ, 2015 年 10 月)
6. Takemoto K, Iwanari H, Nagai T, Hamakubo T and Takahashi T “Optical inactivation of synaptic AMPA receptors erases fear memory” (第 38 回 日本神経科学会, 神戸, 2015 年 7 月)

[図書](計 0件)

[産業財産権]

○出願状況(計 1件)

名称:AMPA 型グルタミン酸受容体サブユニットを認識するモノクローナル抗体及びその利用

発明者:竹本研・浜窪隆雄・岩成宏子・高橋琢哉

権利者:同上

種類:特許

番号:特願 2014-153743

出願年月日:

国内外の別:国内

○取得状況(計 0件)

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

竹本 研 (TAKEMOTO, Kiwamu)

横浜市立大学・医学部・助教

研究者番号：80466432

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

なし