

平成 30 年 6 月 6 日現在

機関番号：12301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K18376

研究課題名(和文) 超解像によるNMDA受容体サブユニット局在調整機構解析

研究課題名(英文) Interaction between NMDA receptor subunits and drebrin, an actin binding protein

研究代表者

小金澤 紀子 (KOGANEZAWA, NORIKO)

群馬大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：90643114

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：高次脳機能の実現において重要な役割を果たす要素の一つであるNMDA型グルタミン酸受容体は様々なサブユニットを持ち、各サブユニットの局在変化がシナプス機能へ影響を及ぼす。本研究では興奮性シナプスを構成する樹状突起スパインにおける各サブユニットの局在の経時変化を明らかにすると同時に、神経活動依存的にその局在を変えるドレブリンやシナプス足場タンパク質との相互関係を明らかにすることを目的とした。ドレブリンはNMDA受容体サブユニット輸送を制御する要因の一つである可能性が示唆されている。本研究ではドレブリンノックアウト動物を用いた検証を行い、ドレブリンがNMDA受容体各サブユニットに及ぼす影響を示した。

研究成果の概要(英文)：Dendritic spines are important structures for neuronal communication, that is, synaptic function. Each dendritic spine contains several receptors and N-methyl-D-aspartate receptor (NMDAR) is one of them. NMDAR has critical functions in synaptic plasticity and has several subunits, and localization change of each subunit affects synaptic function. Drebrin, an actin binding protein, exists in dendritic spines and changes its localization depends on neuronal activity. In fact, NMDAR activation induces a bidirectional shift in subcellular distribution of drebrin. Therefore, it is of interest to further examine the relationship between drebrin and NMDAR. Primary cultured hippocampal neurons prepared from drebrin knockout (DXKO) mice were used to investigate if there is an interaction between drebrin and each subunit of NMDAR, and the results indicated that drebrin affects accumulation of NMDAR subunits.

研究分野：神経科学

キーワード：超解像顕微鏡 ドレブリン 樹状突起スパイン

1. 研究開始当初の背景

記憶・学習のような高次脳機能の実現において、神経細胞同士の情報のやり取りを行うシナプス機能は重要な役割を果たす。樹状突起スパインは興奮性シナプスのシナプス後部細胞側の情報受容部位であり、情報伝達の中心的役割を担うのが神経伝達物質受容体である。NMDA 型グルタミン酸受容体 (NMDAR) もその一つであり、中枢神経系におけるシナプス機能を調整している。NMDAR はいくつかのサブユニットから構成されており、現在までに7つのサブユニット (GluN1, GluN2A-D, GluN3A-B) の存在が知られている。高次脳機能を担う海馬や大脳皮質においては GluN2A と GluN2B の発現が顕著であり、それゆえこの2つがシナプス機能を担うサブユニットであると考えられている。この2つの GluN2 サブユニットは発達過程において発現する時期が異なっており、未成熟神経細胞では GluN2B が多く、その後 GluN2A に置き換わり始める。NMDAR のサブユニットはその変換が起こるだけでなく、発達過程、神経活動依存的にその数や局在部位が変化している。それを制御する要因としてシナプス足場タンパク質が知られている。

樹状突起スパインの形態学的可塑性は高次脳機能においてもその重要性を発揮する。このダイナミクスはスパインに高密度で存在しているアクチン細胞骨格に依存しており、シナプス可塑性におけるアクチン動態変化を担うアクチン結合タンパク質に着目した研究は多い。ドレブリンは主要なアクチン線維結合タンパク質で、胎児期に発現量の多い E 型アイソフォームと成熟神経細胞に主に発現している A 型アイソフォームの2つのアイソフォームを持つ。この2つは発達依存的に変化し、E 型は生後2週ほど安定して存在しているがその後減少するのに対し、A 型は生後2週ほどから急速にその発現量を増やす。これは、生後2週間あたりを境に GluN2B から 2A への切り替えが見られる NMDAR サブユニットの変換とタイミングが非常に似ている。また、発達過程におけるスパイン形成の際には PSD-95 クラスタリングにドレブリン A 型アイソフォームが重要な役割を果たしているなど、シナプス足場タンパク質もドレブリンの制御を受けている。これらのことから、ドレブリンは NMDAR サブユニット変換や輸送を制御する要因の1つなのかもしれない。

2. 研究の目的

本研究では、発達過程における NMDAR サブユニット変換とドレブリンを中心としたシナプス後部に発現するタンパク質の関係について、超解像顕微鏡などのイメージング技術、遺伝子改変動物、分子生物学的手法を用いて明らかにすることが目的である。具体的にはまず、ドレブリンノックアウト動物由来神経細胞を用いて、NMDAR サブユニット数変化を免疫細胞化学的手法により観察し、ドレブ

リンの各アイソフォームの有無が NMDAR 各サブユニット数に及ぼす影響を検証する。さらに、超解像顕微鏡を用いて、樹状突起スパインにおけるドレブリン及び各 NMDAR サブユニットの局在について明らかにする。また、NMDAR サブユニットのダイナミクス制御にはシナプス足場タンパク質の関与が大きく、特に GluN2A は PSD-95 との相互作用が強い。ドレブリン A 型アイソフォームが PSD-95 の局在変化をコントロールしているので、PSD-95 の局在にも着目する。加えて、ヒト iPS 細胞由来神経細胞についても NMDA 受容体サブユニット等の局在解析を目指し、種差を超えた共通のシナプス機能機構の解明につなげたい。そのために、本研究においてはヒト iPS 細胞由来神経細胞の培養方法を確立させていく。

3. 研究の方法

本研究では、マウス海馬由来初代培養神経細胞 (WT 由来神経細胞) 及び、ドレブリンの有無の影響を検証するためにドレブリンノックアウトマウス海馬由来初代培養神経細胞を用いる。ドレブリンは E 型アイソフォームと A 型アイソフォームがあるが、本研究では A 型アイソフォーム特異的ノックアウト動物 (DAKO) と、E 型・A 型両アイソフォームノックアウト動物 (DXKO) の両方を用いて、NMDAR 各サブユニットとドレブリン E 型・A 型アイソフォームとの相互関係を概観する。

(1) NMDAR サブユニットの発現数変化の経時的検証については、WT 由来神経細胞、DXKO 由来神経細胞、DAKO 由来神経細胞を用いて NMDAR サブユニット数について免疫細胞化学的手法により検証する。

(2) 超解像顕微鏡による NMDAR 各サブユニット、ドレブリン、PSD-95 の局在観察は、超解像顕微鏡 (N-STORM) にて検証する。樹状突起スパインの形を明確にするため、各細胞に GFP を導入し発現させる。

(3) 生化学的手法による NMDAR サブユニット検証。超解像顕微鏡を用いた局在確認と平行し、WT・DAKO・DXKO 各脳組織からのサンプルを用いてウエスタンブロッティング法により各サブユニットの発現量を確認する。

(4) ヒト iPS 細胞由来神経細胞培養法確立。市販されているヒト iPS 細胞由来神経細胞を用いてその培養法を検証する。培養法が確立し、可能であればドレブリン等の局在を免疫細胞化学法及び超解像顕微鏡により解析する。

4. 研究成果

本研究では、実験能効率化及び再現性の向上のため凍結神経細胞を用いることとし、その作成法を確立した。これにより、WT マウス由来神経細胞、ドレブリンノックアウト動物 (DAKO・DXKO) 由来神経細胞を比較的容易に培養することが可能となった。

(1) DAKO および DXKO 由来神経細胞で

は NMDAR サブユニットの GluN2A および GluN2B の集積に変化が認められ、ドレブリン E 型と A 型アイソフォームが NMDAR サブユニットの集積に影響を及ぼしていることが示唆された。

(2) 超解像顕微鏡を用いた観察により、ドレブリン、PSD-95 および NMDAR サブユニット (GluN2A および GluN2B) の樹状突起スパインでの局在を明らかにした。さらに、グルタミン酸による NMDAR 刺激を行ったところ、ドレブリンは劇的にその局在を変化させるが、PSD-95 はその変化が起こらないことも見出した。

図 1

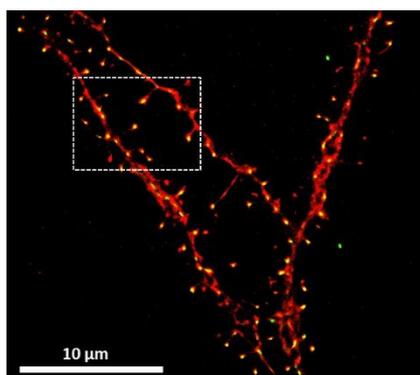


図 2

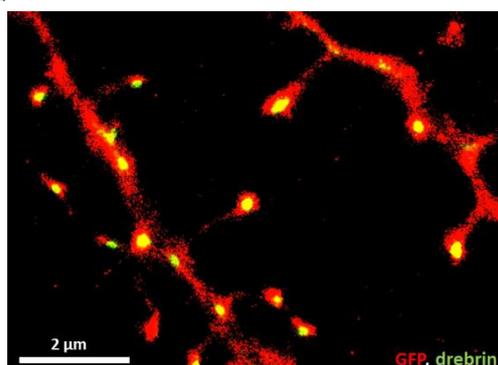


図 1) 超解像顕微鏡によるマウス海馬由来初代培養神経細胞樹状突起および樹状突起スパインにおけるドレブリン局在観察。GFP 染色を赤、ドレブリン染色は緑で示されている。

図 2) 図 1 の白点線四角部位拡大図。

(Koganezawa et al., 2017 より改変)

(3) ウエスタンブロッティング法により各細胞における NMDAR サブユニットの発現量を検証し、ドレブリンは NMDAR 発現量よりはその集積具合に影響を及ぼす可能性が高いことが示された。

(4) 本研究では数種類のヒト iPS 細胞由来神経細胞の培養を試み、また、培地等の検討を行った。その結果、培養法の最適化が進み、免疫細胞化学法によるドレブリンの検出が可能となった。

以上、本研究により、NMDAR 各サブユニットの集積におけるドレブリン各アイソフォームの役割が示唆された。ドレブリン欠損動物ではシナプス可塑性に障害が示されていることから、ドレブリンはさらに NMDAR の機能にまで影響を及ぼしている可能性があるが、今後更なる検討が必要である。

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 4 件)

- ① Koganezawa N, Hanamura K, Sekino Y, Shirao T. “The role of drebrin in dendritic spines” 査読有 Molecular and Cellular Neuroscience 84: 85-92 (2017) doi: 10.1016/j.mcn.2017.01.004
- ② Kajita Y, Kojima N, Koganezawa N, Yamazaki H, Sakimura K, Shirao T. “Drebrin E regulates neuroblast proliferation and chain migration in the adult brain” 査読有 Eur J Neurosci. 46:2214-2228. (2017) doi: 10.1111/ejn.13668
- ③ Shirao T, Hanamura K, Koganezawa N, Ishizuka Y, Sekino Y. “The role of drebrin in neurons” 査読有 Journal of Neurochemistry 141: 819-834. (2017) doi: 10.1111/jnc.13988
- ④ 小金澤紀子、花村健次、白尾智明 「ヒト iPS 細胞由来神経細胞を用いた医薬品評価系の現状について」査読有 日本薬理学雑誌 149: 104-109. (2017) doi: 10.1254/fpj.149.104.

[学会発表] (計 11 件)

- ① Koganezawa N and Shirao T “Alterations of MAP2 immunostainability in drebrin knockout neurons” 第 95 回 日本生理学会大会 (2018)
- ② Koganezawa N and Shirao T “Differential changes of postsynaptic proteins in response to glutamate stimulation” 第 8 回 国際放射線神経生物学会大会 (2018)
- ③ Koganezawa N and Shirao T “Super-resolution imaging of synaptic proteins” Society for Neuroscience 44th Annual Meeting (2017)
- ④ Koganezawa N, Puspitasari A, Miao S,

Nakano T, Shirao T “Transient synaptic dysfunction caused by X-irradiation induces acute cognitive deficits” Radiation Research Society (2017)

- ⑤ Koganezawa N and Shirao T “Different localization changes of drebrin and PSD-95 in response to glutamate stimulation” 第 60 回日本神経化学会大会 (2017)
- ⑥ Koganezawa N and Shirao T “Nanoscale organization of synaptic proteins” 第 40 回日本神経科学大会 (2017)
- ⑦ Koganezawa N and Shirao T “Accumulation of NMDA receptor subunits is regulated by drebrin during development” Gordon Research Conference (2017)
- ⑧ Koganezawa N and Shirao T “Nanoscale organization of synaptic proteins: super-resolution imaging study” 第 7 回 国際放射線神経生物学会大会 (2017)
- ⑨ Koganezawa N and Shirao T “Developmental regulation of NMDA receptor subunits expression by drebrin” Society for Neuroscience 45th Annual Meeting (2016)
- ⑩ Koganezawa N and Shirao T “Drebrin regulates expression pattern of NMDA receptor subunits” 第 39 回日本神経科学大会(2016)
- ⑪ Koganezawa N, Miao S, Sekino Y, Shirao T “Nanoscale organization of synaptic proteins revealed by super-resolution imaging” The 10th FENS Forum of Neuroscience (2016)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小金澤 紀子 (KOGANEZAWA, Noriko)
群馬大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号：90643114