

平成 21 年 6 月 4 日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007-2008

課題番号：19590218

研究課題名（和文） AMPA 受容体 trafficking における O-GlcNAc 化の分子制御機構

研究課題名（英文） Regulation of AMPA receptor trafficking by O-glycosylation

研究代表者

西崎 知之（NISHIZAKI TOMOYUKI）

兵庫医科大学・医学部・教授

研究者番号：00221474

研究成果の概要：

AMPA受容体は興奮性シナプス伝達ならびに学習・記憶の細胞モデルであるシナプス伝達長期増強現象（LTP）発現に最も重要なイオンチャネル型グルタミン酸受容体の一つである。LTP発現の一要因としてAMPA受容体traffickingが注目されているが、その作用機序の詳細は不明である。本研究はAMPA受容体traffickingにおけるO-GlcNAc化の役割解明を目的とした。O-GlcNAc化はAMPA受容体の細胞膜表面への特異輸送ガイダンスシグナルとして働き、AMPA受容体エンドサイトーシスを阻害することによって細胞膜表面AMPA受容体数を増加させた。この作用はLTP維持に重要であることが示唆された。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・生理学一般

キーワード：AMPA 受容体；Trafficking；O-GlcNAc 化；燐酸化；siRNA

1. 研究開始当初の背景

最近、神経伝達物質受容体 trafficking の概念が提唱されているが、その調節機構・シグナル分子に関しては不明な点が多い。AMPA

受容体は興奮性シナプス伝達ならびに学習・記憶の細胞モデルあるシナプス伝達長期増強現象（LTP）発現に最も重要なイオンチャネル型グルタミン酸受容体の一つである。

AMPA 受容体 trafficking に関して、AMPA 受容体の細胞内から細胞膜への移行は AMPA 受容体の細胞内ドメインのリン酸化、特に CaMKII によるリン酸化が重要であると考えられている。また、最近ではチロシンキナーゼも AMPA 受容体 trafficking 調節因子であることが示唆されている。しかし、AMPA 受容体 trafficking における O-GlcNAc 化の役割に着目した研究は国内外を問わず皆無であり、AMPA 受容体 trafficking における O-GlcNAc 化の分子制御機構解明を目指した本研究の着想に至った。

2. 研究の目的

本研究は、①AMPA受容体のセリン/スレオニン蛋白質リン酸化酵素によるリン酸化 (P i) とO-GlcNAc化が同一の部位で起こるかどうか、②セリン/スレオニン蛋白質リン酸化酵素によるAMPA受容体リン酸化が輸送ガイダンスシグナルとして働き、細胞膜表面の受容体発現数を促進するかどうか、AMPA受容体O-GlcNAc化がクラスリンコーティング開始/エンドサイトーシスシグナルとして働くかどうか、③AMPA受容体O-GlcNAc化がクラスリンコーティング開始/エンドサイトーシスシグナルとして働くかどうか、を決定することにより、AMPA受容体trafficking におけるO-GlcNAc化の分子制御機構を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

(研究計画) AMPA受容体traffickingにおけるO-GlcNAc化とリン酸化の相互関係を決定

(方法)

- ①セリン/スレオニンリン酸化部位変異GluR1、GluR2サブユニットcDNA作成
- ②O-GlcNAc化転移酵素siRNAを作成
- ③HA/T-GluR1、HA/T-GluR2キメラcDNA作成
- ④O-GlcNAc化とリン酸化の相互作用を決定

⑤正常・リン酸化部位変異GluR1、GluR2動態に対するアロキサンの効果解析

⑥正常・リン酸化部位変異GluR1、GluR2動態に対するO-GlcNAc化転移酵素、ホルボールエステル (PKC活性化) の効果解析

(研究計画) AMPA 受容体 trafficking に対する O-GlcNAc 化制御機構の解明

(方法)

- ① 正常・リン酸化部位変異 GluR1、GluR2 を用いた AMPA 受容体 trafficking に対するセリン/スレオニンリン酸化の効果解析
- ②O-GlcNAc 化転移酵素 siRNA を用いた AMPA 受容体 trafficking に対する O-GlcNAc 化の効果解析
- ③HA/T-GluR1、HA/T-GluR2 を強制発現培養ラット海馬神経細胞を用いた AMPA 受容体 trafficking に対する O-GlcNAc 化の効果解析
- ④O-GlcNAc 化転移酵素ノックダウンラット海馬切片におけるシナプス伝達解析

4. 研究成果

(1) AMPA 受容体反応に対するアロキサンの効果.

AMPA 受容体サブユニット GluR1 をアフリカツメガエル卵母細胞膜に発現させた。Two-electrodevoltage-clamp 法を用いてカイニン酸によって誘発される GluR1 電流を測定した。GluR1 反応は O 型 N-アセチルグルコサミン化 (O-GlcNAc 化) 転移酵素の阻害剤であるアロキサン処理後 80 分で約 150%の増大を認めた (図 1)。

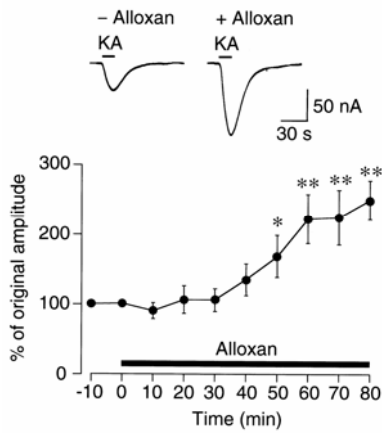


図 1. AMPA 受容体反応に対するアロキサンの効果.

(2) 長期増強現象 (LTP) に対するアロキサンの効果.

ラット海馬切片の CA1 領域より field EPSP を記録した。LTP 維持相において、アロキサン処理群はコントロール群と比較して約 75% の増大効果が認められた (図 2)。

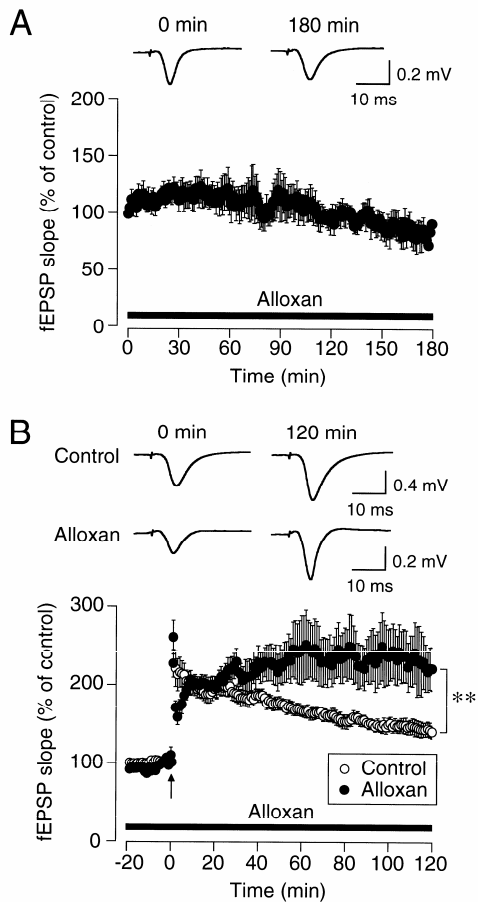


図 2. 長期増強現象 (LTP) に対するアロキサンの効果.

(3) AMPA 受容体 trafficking に対するアロキサンの効果.

ラット海馬切片をシヨ糖密度勾配遠心法で分画し、抗 GluR1 抗体、抗 GluR2 抗体を用いてウェスタンブロッティングした。アロキサン存在下で LTP が誘導された海馬切片における GluR1、GluR2 細胞内分布はともに、コントロール群の分布と比較して細胞膜分画 (ラフト含有分画) に移行していた (図 3)。

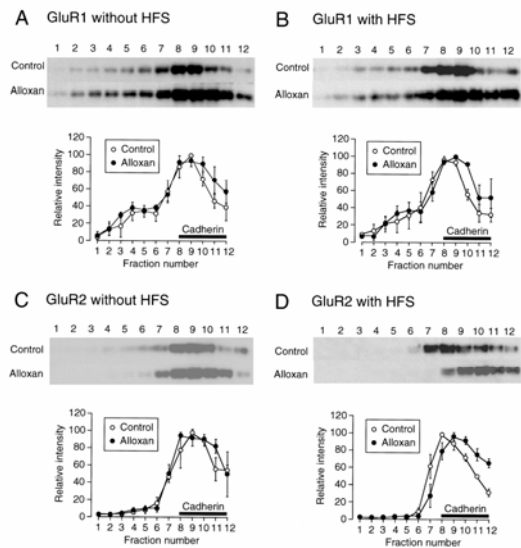


図 3. AMPA 受容体 trafficking に対するアロキサンの効果.

これらの結果は、①セリン/スレオニン蛋白質リン酸化酵素によってリン酸化される部位と同一の部位で起こる O-GlcNAc 化が、AMPA 受容体の細胞膜表面への特異輸送ガイダンスシグナルとして働き、細胞膜表面の受容体発現数を促進する、②細胞膜表面発現 AMPA 受容体に付加されたリン酸基が O-GlcNAc に変換される (O-GlcNAc 化) と AMPA 受容体エンドサイトーシスを阻害する、③AMPA 受容体の O-GlcNAc 化は LTP 維持に必要である、ことを

示している。

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 11 件)

1. Yaguchi T, Nagata T, Nishizaki T. 1-Palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine improves cognitive decline by enhancing long-term depression. Behav Brain Res (2009) [Epub ahead of print]. 査読有り
2. Yamamoto S, Kanno T, Yamada K, Yasuda Y, Nishizaki T. Dual regulation of heat-activated K⁺ channel in rat DRG neurons via α_1 and β adrenergic receptors. Life Sci (2009) [Epub ahead of print]. 査読有り
3. Nakagomi T, Taguchi A, Fujimori Y, Saino O, Nakano-Doi A, Kubo S, Gotoh A, Soma T, Yoshikawa H, Nishizaki T, Nakagomi N, Stern DM, Matsuyama T. Isolation and characterization of neural stem/progenitor cells from post-stroke cerebral cortex in mice. Eur J Neurosci 29(9):1842-1852 (2009). 査読有り
4. Yasuda Y, Saito M, Yamamura T, Yaguchi T, Nishizaki T. Extracellular adenosine induces apoptosis in Caco-2 human colonic cancer cells by activating caspase-9/-3 via A_{2a} adenosine receptors. J Gastroenterol 44(1):56-65 (2009). 査読有り
5. Yaguchi T, Nagata T, Nishizaki T. Dilinoleoylphosphatidylcholine ameliorates scopolamine-induced impairment of spatial learning and memory by targeting α_7 nicotinic ACh receptors. Life Sci 84(9-10):263-266 (2009). 査読有り
6. Fujikawa H, Kanno T, Nagata T, Nishizaki T. The phosphodiesterase III inhibitor olprinone inhibits hippocampal glutamate release via a cGMP/PKG pathway. Neurosci Lett 448(2):208-211 (2008). 査読有り
7. Watanabe K, Kanno T, Oshima T, Miwa H, Tashiro C, Nishizaki T. Vagotomy upregulates expression of the N-methyl-D-aspartate receptor NR2D subunit in the stomach. J Gastroenterol 43(5):322-326 (2008).
8. Watanabe K, Kanno T, Oshima T, Miwa H, Tashiro C, Nishizaki T. The NMDA receptor NR2A subunit regulates proliferation of MKN45 human gastric cancer cells. Biochem Biophys Res Commun 367(2):487-490 (2008).
9. Tomiyama T, Nagata T, Shimada H, Teraoka R, Fukushima A, Kanemitsu H, Takuma H, Kuwano R, Imagawa M, Ataka S, Wada Y, Yoshioka E, Nishizaki T, Watanabe Y, Mori H. A new amyloid b variant favoring oligomerization in Alzheimer's-type dementia. Ann Neurol 63(3):377-387 (2008). 査読有り
10. Sakamoto T, Ebisu Y, Ikeda A, Nakaya M, Nishizaki T. Hippocampal size may contribute prospective diagnosis of age-related dementia. Psychogeriatrics 7:76-80 (2007). 査読有り
11. Yang D, Yaguchi T, Yamamoto H, Nishizaki T. Intracellularly transported adenosine induces

apoptosis in HuH-7 human hepatoma cells by downregulating c-FLIP expression causing caspase-3/-8 activation. *Biochem Pharmacol* 73(10):1665-1675 (2007). 査読有り

[学会発表] (計 5 件)

1. 矢口貴博, 楊冬琴, 石澤洋平, 西崎知之. アデノシンは HuH-7, HepG2 ヒト肝癌細胞を異なった経路でアポトーシスを誘導する. 第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会合同大会
2008 年 12 月 9-12 日 (神戸)
2. 菅野武史, 中村俊一, 西崎知之. スフィンゴシン 1-リン酸はラット海馬顆粒細胞からの自発的なグルタミン酸放出を促進する. 第 114 回日本薬理学会近畿部会
2008 年 11 月 14 日 (神戸)
3. Yaguchi T, Nataga T, Nishizaki, T. The cis-unsaturated free fatty acid derivative HEPBA regulates $\alpha 7$ ACh receptor trafficking, and synaptic plasticity via a CaMKII pathway. 第 51 回日本神経化学会大会
2008 年 9 月 11-13 日 (富山)
4. 矢口貴博, 楊冬琴, 石澤洋平, 西崎知之. HuH-7, HepG2 におけるアデノシン誘導アポトーシスの際の遺伝子発現変化解析. 第 17 回日本アポトーシス研究会学術集会
2008 年 8 月 1-2 日 (京都)
5. Yaguchi T, Nishizaki T. Availability of linoleic acid derivative DCP-LA as anti-dementia. 第 7 回国際バイオフィォーラム
2008 年 7 月 2-4 日 (東京)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

西崎 知之 (NISHIZAKI TOMOYUKI)
兵庫医科大学・医学部・教授
研究者番号：00221474

(2) 研究分担者

永田 徹 (NAGATA TETSU)
兵庫医科大学・医学部・准教授
研究者番号：60131588

(3) 連携研究者

なし