

令和 4 年 6 月 6 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H03370

研究課題名(和文)糖鎖の視点を導入したシナプス可塑性制御機構の解析

研究課題名(英文)Regulatory mechanism of synaptic plasticity based on glycan functions

研究代表者

岡 昌吾 (Oka, Shogo)

京都大学・医学研究科・教授

研究者番号：60233300

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：学習記憶の基盤となるシナプス可塑性において、AMPA受容体のシナプス後膜での量的変化が重要である。その制御には、細胞内から細胞表面への輸送、細胞表面での側方移動、細胞内への取り込みなどの様々なトラフィッキング過程が存在する。本研究ではAMPA受容体に発現する糖鎖の視点から、シナプス可塑性の制御機構についての解析を行った。その結果、糖鎖がAMPA受容体の膜表面発現量に深く関与することや、これまで安定的な四量体とされてきたAMPA受容体は、膜表面上で多くのものが単量体として存在し、一過性に二量体、三量体、四量体を形成していることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

シナプス可塑性に重要なAMPA受容体のトラフィッキングに関しては、主に細胞内ドメインのリン酸化修飾などとその相互作用分子が中心に解析されてきた。本研究においてAMPA受容体の細胞外領域に存在する糖鎖もまたその制御に重要な役割を担うことを明らかにした。また、従来の常識であったAMPA受容体の膜表面上での分子動態についても新たな知見を得ることができた。これらの成果は、学習記憶の基盤となるシナプス可塑性制御機構解明へと繋がるものであり、その破綻によるアルツハイマーなどの脳疾患の分子病態を考える上でも重要な知見となる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Quantitative changes in AMPA receptors at the postsynaptic membrane are important in synaptic plasticity, which is the basis of learning and memory. Its regulation involves various trafficking processes such as transport from intracellular to cell surface, lateral migration at the cell surface, and intracellular uptake. In this study, we analyzed the regulatory mechanism of synaptic plasticity from the viewpoint of sugar chains expressed on AMPA receptors. The results revealed that glycans are deeply involved in the membrane surface expression of AMPA receptors and that many AMPA receptors, which have been considered as stable tetramers, exist as monomers on the membrane surface and transiently form dimers, trimers, and tetramers.

研究分野：神経糖鎖生物学

キーワード：AMPA型グルタミン酸受容体 N結合型糖鎖 糖鎖構造 1分子イメージング

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

神経系は正確な神経回路が構築され、学習記憶等の脳の高次機能が発揮される。しかし、その構造は普遍的なものではなく、外界からの刺激により変化する可塑性と呼ばれる柔軟性を持つ。なかでも、シナプスの伝達効率の変化や局所的なシナプスの形態、数に変化がおこる、いわゆるシナプス可塑性が学習や記憶を形成する基盤であると考えられている。近年、代表的なシナプス可塑性である海馬や小脳における長期増強(Long Term Potentiation: LTP)や長期抑圧(Long Term Depression: LTD)の分子機構の詳細が明らかにされつつある。なかでも興奮性シナプス伝達において中心的な役割を担う AMPA 型グルタミン酸受容体 (AMPA 受容体) のシナプス後膜での量的変化がシナプス可塑性に重要であることが知られている。現在までに AMPA 受容体のシナプス後膜での係留制御を含むトラフィッキングに関しては、その主要な構成サブユニットである GluA1 や GluA2 の細胞内ドメインのリン酸化修飾などとその相互作用分子が中心に解析されてきた。一方、近年神経系に特徴的に発現する糖鎖が長期増強 (LTP) に関与することが明らかにされつつある。申請者らはこれまでに、HNK-1 糖鎖が AMPA 受容体の主要な構成サブユニットである GluA1 と GluA2 のうち、GluA2 に特異的に発現していること、その発現の有無によって AMPA 受容体と神経接着分子である N-cadherin との相互作用が変化し、表面発現量が調節されていることを見出している。また、N 型糖鎖のコアフコースを欠損するマウスにおいて LTP の低下が引き起こされることや、AMPA 受容体サブユニットのヘテロ 4 量体会合が亢進していることを明らかにしている。これらの事実は、シナプス可塑性の分子基盤である AMPA 受容体の 4 量体形成を含むトラフィッキング機構の全体像を明らかにするためには AMPA 受容体の細胞内ドメインによる制御解析だけではなく、細胞外ドメインに存在する糖鎖にも着目した解析が必要であると考えられた。

2. 研究の目的

シナプス可塑性には AMPA 受容体のシナプス後膜での量的変化が重要であるが、その制御には、細胞内から細胞表面への輸送、細胞表面での側方移動、細胞内への取り込みなどの様々なトラフィッキング過程が存在する。現在の定説では、AMPA 受容体は小胞体内で 4 量体が形成され、小胞体脱出後も 4 量体を維持したまま膜表面でシナプス外領域からシナプス領域へと側方移動するとされている。一方、申請者らが糖鎖の視点で研究を行っている、この定説に疑問が生じてきた。なわち、AMPA 受容体が小胞体で 4 量体を形成し、それが維持されたまま移動するのなら、ゴルジ体で修飾される N 型糖鎖のフコースの有無によって、GluA1 と GluA2 のヘテロ 4 量体の割合がなぜ変化するのか。また、GluA1 と GluA2 は構造的に高い相同性を有し、糖鎖付加部位も共通性が見られるにも関わらず、なぜ GluA2 特異的に HNK-1 糖鎖が付加されているのかなどである。そこで本研究では、AMPA 受容体に発現する糖鎖がシナプス後膜での量的変化に関わるトラフィッキングのどのような過程に、どのような機構で関与するかを明確にすることによって、現在提唱されている AMPA 受容体を介したシナプス可塑性の制御機構に新たな視点を導入し、その総合的な理解を目的としている。

3. 研究の方法

3-1) AMPA 受容体の細胞表面発現における N 型糖鎖の役割

AMPA 受容体上の N 型糖鎖の役割を知るために、AMPA 受容体の主要な構成サブユニットである GluA1 と GluA2 の N 型糖鎖付加部位変異体を作成し、単独あるいは GluA1 と GluA2 の

様々な組み合わせで HEK 細胞に導入し、その表面発現量をピオチン化法や細胞染色により解析を行った。

3-2) AMPA 受容体の糖鎖付加部位ごとの糖鎖構造解析

糖鎖機能をより明確にするにはどの糖鎖付加部位にどのような糖鎖が付加しているのかを決定する必要がある。2 週齢のマウス脳から P2 画分を調製し、GluA1 および GluA2 に対する抗体を用いて精製した。免疫沈降物を SDS-PAGE 後、CBB 染色を行い、GluA1 および GluA2 のバンドを切り出し、部位特異的な糖鎖構造を協力研究者の川崎らと共同で解析した。

3-3) 1 分子イメージング法による AMPA 受容体の細胞表面における分子動態の解析

AMPA 受容体の細胞表面上での側方移動やサブユニットの会合を含む分子動態は、1 分子イメージング法によって解析を行った。一分子イメージング法は、全反射顕微鏡を用いて生細胞膜表面上の一分子の動きや会合の様子をリアルタイムに可視化できる手法である。そこで、HEK293 細胞(AMPA 受容体を内在的に発現していない細胞)に AMPA 受容体サブユニットを発現させて、膜表面上の動態について協力研究者の鈴木らと共同で解析した。

3-4) NMDA 受容体の構成サブユニットである GluN1 の N 型糖鎖に関する解析

シナプス可塑性には AMPA 受容体とともに、NMDA 受容体も深く関与する。NMDA 受容体は主に GluN1、GluN2A、GluN2B と呼ばれるサブユニットの四量体から形成される。中でも GluN1 は全ての NMDA 受容体に含まれる必須のサブユニットである。GluN1 は分子内に多くの糖鎖付加部位が存在するにも関わらず、細胞表面への輸送後も、その全てが high-mannose 型糖鎖であることがわかっている。そこで GluN1 上の high-mannose 型糖鎖が NMDA 受容体機能にとってどのような役割があるかを解析するためにまず、GluN1 上の糖鎖が全て high-mannose 型糖鎖に維持されるために必須の領域について解析した。

4 . 研究成果

4-1) AMPA 受容体の細胞表面発現における N 型糖鎖の役割

AMPA 受容体の主要な構成サブユニットである GluA1 と GluA2 の各糖鎖付加部位変異体を単独で HEK 細胞に導入し、その表面発現量をピオチン化法や細胞染色により解析した。その結果、GluA1 の N63 と N363 位および GluA2 の N370 位の 3 つの糖鎖が細胞内から細胞表面への輸送に重要な役割を担うことが明らかになった。そこでこれら 3 つの糖鎖の細胞発現調節機構の違いを明確にするため、それぞれの糖鎖付加部位変異体と野生型とを組み合わせで発現させ、その細胞表面発現量の変化を解析した。その結果、GluA1 N63 位の糖鎖付加部位変異体は野生型の GluA1 や GluA2 と共発現させても細胞表面量の抑制は解除されず、むしろ野生型の GluA1 表面発現量を低下させることが明らかとなった。GluA1 N363 位の変異体は GluA2 の野生型により細胞表面発現量は回復するものの、GluA1 の野生型では回復が見られなかった。また、野生型 GluA1 の表面発現量には影響を与えなかった。GluA2 N370 位の変異体は GluA2 の野生型により細胞表面発現量は回復し、GluA1 の野生型では回復が見られなかった。また、野生型の GluA1 表面発現量を低下させることが明らかとなった。以上のことからそれぞれの糖鎖は異なる表面発現調節を行っていることが示された。

以上の結果の一部は、J. Neurochem, 153, 567-585. (2020), Int J Mol Sci, 21, 5101. (2020)に宮崎大学の高宮教授らとの共同研究として報告した。

4-2) AMPA 受容体の糖鎖付加部位ごとの糖鎖構造解析

GluA1 と GluA2 の N 型糖鎖付加部位変異体の解析により、一部の糖鎖付加部位変異体では細胞表面発現量が大きく減少することがわかった。そこで、脳内の GluA1 や GluA2 の各 N 型糖鎖

付加部位に存在するの構造についての解析を協力研究者の川崎教授らとの共同で行った。その結果、表面発現に重要な糖鎖付加部位である GluA1 の N63 には高マンノース型糖鎖が N363 位には主に複合型糖鎖が存在することが明らかとなった。また GluA1 の N401 には糖鎖が付加していないものが存在することが明らかとなった。また、その存在量が年齢に依存して変化することやその糖鎖付加の制御について、宮崎大学の高宮教授らとの共同研究で明らかにすることができた。

以上の結果の一部は、J. Neurochem, 153, 567-585. (2020)に報告した。

4-3) 一分子イメージング法による AMPA 受容体の細胞表面における分子動態の解析

GluA1 と GluA2 の細胞表面上での側方移動やサブユニットの会合を含む分子動態を、一分子イメージング法によって解析した。その結果、AMPA 受容体は安定的な 4 量体として細胞表面を移動するのではなく、多くのものが単量体として存在し、一過性に二量体、三量体、四量体を形成していることが明らかとなった。この現象は神経細胞でも観察され、樹状突起膜上では多くのものが単量体として高速で動きシナプス内に入り込むこと、また、シナプスから出ていくときも単量体として素早く出ていくことが、協力研究者の鈴木教授らとの共同研究により明らかとなった。この結果は、従来の考え方を大きく変えるものであり、AMPA 受容体によるシナプス可塑性制御機構解明に大きく寄与するものである。また GluA1 や GluA2 の糖鎖付加部位変異体を用いて解析するための基礎的なデータとして有用となる。

以上の結果の一部は、Nature Communications, 10, 5245 (2019)に報告した。

4-4) NMDA 受容体の構成サブユニットである GluN1 の N 型糖鎖に関する解析

GluN1 は全ての NMDA 受容体に含まれる必須のサブユニットである。GluN1 は分子内に多くの糖鎖付加部位が存在するにも関わらず、細胞表面への輸送後も、その全てが high-mannose 型糖鎖であることがわかっている。ここで、GluN1 上の糖鎖が全て high-mannose 型糖鎖に維持されるために必要な領域の解析を行った。具体的には、細胞内トラフィッキングに最も影響を与えると考えられる GluN1 の C 末端領域を GluA2 の C 末端領域と置き換えて解析したところ、GluN1 の C 末端領域を持つ GluA2 は細胞表面上で high-mannose 型糖鎖を有することが明らかになった。さらに GluN1 の C 末端領域に存在する 3 つのドメイン(C0, C1, C2)のどの場所が最も重要であるかを解析した。この解析には膜表面での発現が強く観察が容易な AMPA 受容体補助サブユニット Stargazin を利用した。その結果、C1 領域に high-mannose 型糖鎖維持に必須の領域が存在することが明らかとなった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 9件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Morise Jyoji, Yamamoto Saki, Midorikawa Ryosuke, Takamiya Kogo, Nonaka Motohiro, Takematsu Hiromu, Oka Shogo	4. 巻 21
2. 論文標題 Distinct Cell Surface Expression Patterns of N-Glycosylation Site Mutants of AMPA-Type Glutamate Receptor under the Homo-Oligomeric Expression Conditions	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 5101 ~ 5101
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms21145101	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Midorikawa Ryosuke, Takakura Daisuke, Morise Jyoji, Wakazono Yoshihiko, Kawasaki Nana, Oka Shogo, Takamiya Kogo	4. 巻 153
2. 論文標題 Monitoring the glycosylation of amino 3 hydroxy 5 methyl 4 isoxazole propionate type glutamate receptors using specific antibodies reveals a novel regulatory mechanism of N glycosylation occupancy by molecular chaperones in mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Neurochemistry	6. 最初と最後の頁 567 ~ 585
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/jnc.14964	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 緑川 良介, 若園 佳彦, 高倉 大輔, 森瀬 譲二, 川崎 ナナ, 岡 昌吾, 高宮 考悟	4. 巻 82
2. 論文標題 N型糖鎖修飾を介したAMPA受容体のチャンネル機能制御	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 日本生理学雑誌	6. 最初と最後の頁 35 - 35
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 若園 佳彦, 緑川 良介, 岡 昌吾, 高宮 考悟	4. 巻 82
2. 論文標題 AMPA受容体におけるN型糖鎖修飾の神経可塑性メカニズムの電気生理学的解析	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 日本生理学雑誌	6. 最初と最後の頁 34 - 35
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Matsui Taro, Hamada Yukihiro, Kuwahara Motoi, Morise Jyoji, Oka Shogo, Kaida Kenichi, Kusunoki Susumu	4. 巻 339
2. 論文標題 Association of variability in antibody binding affinity with a clinical course of anti-MAG neuropathy	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Neuroimmunology	6. 最初と最後の頁 577127 ~ 577127
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jneuroim.2019.577127	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Morise Jyoji, Suzuki Kenichi G. N., Kitagawa Ayaka, Wakazono Yoshihiko, Takamiya Kogo, Tsunoyama Taka A., Nemoto Yuri L., Takematsu Hiromu, Kusumi Akihiro, Oka Shogo	4. 巻 10
2. 論文標題 AMPA receptors in the synapse turnover by monomer diffusion	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 5245
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-019-13229-8	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Oka Shogo	4. 巻 31
2. 論文標題 HNK-1 Carbohydrate, an Attractive Unique Glyco-Epitope	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Trends in Glycoscience and Glycotechnology	6. 最初と最後の頁 SE12 ~ SE14
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.4052/tigg.1905.2SE	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計12件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 岡 昌吾
2. 発表標題 HNK-1糖鎖抗原について
3. 学会等名 第17回糖鎖科学中部拠点 若手のカフォーラム (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Jyoji Morise, Kenichi G.N. Suzuki, Ayaka Kitagawa, Yoshihiko Wakazono, Kogo Takamiya, Taka A. Tsunoyama, Hiromu Takematsu, Akihiro Kusumi, Shogo Oka
2. 発表標題 AMPA-type glutamate receptor subunits in the synapse turnover by monomer diffusion; unraveling by single-molecule tracking
3. 学会等名 The 20th International Conference on Systems Biology (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 森瀬 讓二, Munal Babu Kandel, 山本 采季, 緑川 良介, 若園 佳彦, 高宮 考悟, 岡 昌吾
2. 発表標題 AMPA型グルタミン酸受容体の細胞膜表面発現に関わるN型糖鎖の解析
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 河村 大己, 森瀬 讓二, 岡 昌吾
2. 発表標題 神経細胞培養培地中への糖鎖切断酵素の添加による神経細胞形態への影響の解析
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 緑川良介, 高倉大輔, 森瀬讓二, 川崎ナナ, 岡昌吾, 高宮考悟
2. 発表標題 Monitoring the glycosylation of AMPA-type glutamate receptors using specific antibodies reveals a novel regulatory mechanism of N-glycosylation occupancy by molecular chaperones
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 森瀬 譲二, 中村 綾沙, 竹松 弘, 岡 昌吾
2. 発表標題 胎生期マウス脳に発現するHNK-1糖鎖は神経突起伸長を促進させる
3. 学会等名 第66回日本生化学会近畿支部
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

ホームページ http://oka-lab.hs.med.kyoto-u.ac.jp/index.html

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	森瀬 譲二 (Morise Jyoji) (60755669)	京都大学・医学研究科・助教 (14301)	

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	鈴木 健一 (Suzuki Kenichi) (50423059)	岐阜大学・糖鎖生命コア研究所・教授 (13701)	
研究協力者	川崎 ナナ (Kawasaki Nana) (20186167)	横浜市立大学・生命医科学研究科・教授 (22701)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------