

令和 3 年 6 月 2 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K16074

研究課題名（和文）N型糖鎖による神経細胞膜上AMPA型グルタミン酸受容体の側方移動制御機構の解析

研究課題名（英文）Role of N-glycans in lateral diffusion of AMPA-type glutamate receptor in neuronal plasma membrane

研究代表者

森瀬 譲二（Morise, Jyoji）

京都大学・医学研究科・助教

研究者番号：60755669

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：AMPA型グルタミン酸受容体（AMPA）数は、神経細胞間の興奮性伝達量を規定する。従って記憶学習形成の分子メカニズムを理解する上で、その数の制御機構の解析は重要となる。特にAMPA上の特定の糖鎖構造を欠失させると、記憶学習形成の基盤となる長期増強の低下が観察されてきた。そこで本研究では、特定のN型糖鎖がAMPAの数をどのように制御するか、膜表面発現量や膜表面動態に着目しながら解析を行った。結果、これまで安定的な四量体とされてきたAMPAは、膜表面上で単量体から四量体へ数百ミリ秒単位で組み替わることが分かった。そして特定のN型糖鎖が、AMPAの膜表面発現量を制御することを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでアルツハイマー病を代表とした脳機能疾患において、海馬領域での長期増強異常が見つかってきた。なかでも最近、ハンチントン病態モデルにおいて膜表面上でのAMPAの移動能に異常があることが報告された。そして興味深いことに、一部の統合失調患者で異常な糖鎖修飾がAMPAに観察されることも分かってきた。その中で本研究は特定の糖鎖構造がAMPAの動態にどのように影響を与えるかについて解析したものであり、糖鎖が疾患の原因分子である可能性や、新たな治療標的となりうる可能性を示した点で、重要な知見であると考えられる。

研究成果の概要（英文）：The number of AMPA-type glutamate receptors (AMPA) regulates the excitatory transmission level between neurons. Therefore, the regulation of AMPA number is important for understanding the molecular mechanisms of learning and memory formation. In particular, loss of a specific glycan structure on AMPA reduced long-term potentiation, which is the basis of learning and memory formation. In this study, how specific N-glycans regulate the number of AMPA was investigated by focusing on the AMPA expression level and dynamics in neuronal plasma membrane. As a result, it was found that AMPA, which have been believed to be stable as tetramers, repeatedly associated and dissociated between monomers and tetramers in the plasma membrane within several hundred milliseconds. Furthermore, specific N-glycans regulated the cell surface expression level of AMPA.

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型糖鎖 一分子イメージング法

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

記憶学習形成には、神経活動に伴った適切なスパイン強度の維持が要求される。なかでもシナプスでの興奮伝達には、スパインに高密度に存在するイオン透過型チャネルの AMPA 型グルタミン酸受容体 (AMPA) の活性が必要となる。この受容体の数に従い伝達の強さが変化することから、スパイン内の AMPAR の「数」の制御機構解析が記憶学習形成の分子メカニズムを理解する上で必須となる。神経活動下でのスパイン内 AMPAR 数の制御には、(i) 樹状突起膜上プールからスパイン内への側方移動 (ii) 細胞内小胞プールから膜表面への輸送の 2 つが重要とされる (Nat. Rev. Neurosci., 17, 337-350, 2016)。

これまでに私は、硫酸基を末端に持つ特徴的な 3 糖構造の「HNK-1 糖鎖」および N 型糖鎖の根元にフコースが付いた「コアフコース」が、共に AMPAR 上に発現することを見出してきた (PLoS One. 10, e0135644, 2015; J. Biol. Chem., 290, 17566-17575, 2015)。さらに HNK-1 あるいはコアフコースを欠失した神経細胞では、記憶学習形成の基盤となる長期増強 (long-term potentiation; LTP) の低下が観察されることを明らかにしてきた (Biochim. Biophys. Acta., 1861, 2455-2461, 2017; J. Biol. Chem., 290, 17566-17575, 2015)。LTP の発動には上述 (i) (ii) のメカニズムが働くことから、AMPA の細胞内動態に特定の糖鎖構造が強く関与していることが考えられた。すなわち、AMPA 上の特定の N 型糖鎖が AMPAR の側方移動や膜表面発現を制御している可能性が考えられた。しかし、その具体的な AMPAR の膜表面上の動態メカニズムは不明なままであった。

### 2. 研究の目的

本研究を進める上ではじめに、AMPA の主要サブユニット GluA1 と GluA2 の細胞膜表面上の動態を調べる必要があった。これまでに、AMPA は小胞体内でヘテロまたはホモの四量体に形成され、その四量体の形を維持したまま膜表面を移動しシナプスまで運ばれて機能すると信じられてきた。言い換えると、一度四量体が組み立てられると、分解されるまでその組成は変化しないと考えられてきた。ところが私は過去の研究で、コアフコースの欠失に伴い AMPAR の四量体の組成が変化することを見出してきた (J. Biol. Chem., 290, 17566-17575, 2015)。コアフコース転移酵素 Fut8 はゴルジ体で機能することから、小胞体脱出以降において四量体の組み合わせが変化することが示唆されてきた。そこでまずは本質的な AMPAR サブユニットの膜表面上動態を調べるために、岐阜大学鈴木健一博士の研究協力のもと一分子イメージング法を導入し、その解析を試みた。

AMPA の補助サブユニット Stargazin (Stg) はシナプス後部の主要な足場タンパク質である PSD95 と相互作用することで、AMPA をシナプスに係留する働きがある。それに対し最近、Stg が脱感作と呼ばれる AMPAR の構造的変化 (リガンド結合状態でチャネルが閉口する現象) を検知すると膜表面上で Stg が AMPAR から離れ、AMPA の動きが速くなることが報告された (Neuron, 85, 787-803, 2015)。そして、Stg-AMPA の移動制御は足場タンパク質が豊富に存在するシナプスに限らず、足場タンパク質の少ない樹状突起膜上でも行われることも知られてきた (Neuron, 54, 447-460, 2007)。また、特定のアミノ酸に変異を入れた変異体でその脱感作時間に影響が出ることも報告されており (Cell Rep., 9, 728-740, 2014)、AMPA 上の N 型糖鎖もその立体構造の支持に関わる可能性が十分に考えられた。以上から私は、N 型糖鎖が Stg を介して AMPAR の移動能を制御するのではないかと考えた。そこで本研究では Stg により AMPAR の動態がどのように膜表面上で変化するか、同様に一分子イメージング法で解析を試みた。

これまでに GluA1 や GluA2 上の特定の N 型糖鎖が、ヘテロの組み合わせにおいて膜表面発現量を制御することを明らかにしてきた (PLoS One. 10, e0135644, 2015; J. Neurochem. 147, 730-747, 2018)。一方で AMPAR はホモ四量体も神経細胞において機能的に重要であることが知られるものの、ホモの組み合わせにおいて特定の N 型糖鎖がどのようにその膜表面発現を制御するかは分かっていなかった。そこで本研究では、多様なタグを付加した N 型糖鎖付加部位変異体を用いながら蛍光免疫染色によりその解析を試みた。

### 3. 研究の方法

(1) 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。特に鈴木健一博士が有する手法では膜表面に発現させた目的分子に対し 100% の蛍光ラベル効率で導入することが可能なため、全ての一分子の時空間的なダイナミクスを観察できることが特色である。そこで本方法を用いて、HEK293 細胞 (AMPA を内在的に発現していない細胞) に AMPAR サブユニットを発現させて、膜表面上の動態について調べた。特に AMPAR サブユニットの動きの速さは、LTP の発動に関与すると考えられることから、本研究では拡散係数を求めることで速さを評価した。

一方上述の通り、Stg は動いている AMPAR サブユニットと結合することで機能を制御する。従って AMPAR の動態を理解するためには、Stg が AMPAR サブユニットどの程度の時間会合しあっているか、いわゆる会合時間を計測する必要がある。そこで Stg を発現させた HEK293 細胞膜上で、AMPA サブユニットとの会合時間を計測し、Stg による AMPAR サブユニットの動態制御能につい

て評価した。

(2) AMPAR サブユニットは恒常的に小胞体内に多量に貯留され、その一部が膜表面に輸送される。ここで、AMPA サブユニット上の N 型糖鎖の役割を知るために、N 型糖鎖付加部位変異体を作製し HEK293 細胞に発現させ、膜表面発現量の解析を試みた。すなわち各変異体の膜表面発現量の解析は、各 N 型糖鎖による小胞体脱出能制御の理解につながる。本研究では特に、ホモの組み合わせでの小胞体脱出能の違いを調べるために、異なるタグ(HA、myc、GFP)を使い分け、蛍光免疫染色によりその膜表面発現量を定量評価した。

#### 4. 研究成果

(1) 一分子イメージング法により HEK293 細胞膜上の GluA1 と GluA2 の動きを観察したところ、これまで定説とされてきた安定的な四量体の形ではなく、単量体で拡散しては一過的に二量体、三量体、四量体を形成しては崩壊する様子が観察された。それぞれの会合時間を計測すると、ホモ二量体形成時間は約 160 ミリ秒だったのに対し、ヘテロ二量体形成時間は約 330 ミリ秒で、2 倍以上長い時間会合することが分かった。そしてホモ四量体形成時間は約 100 ミリ秒だったのに対し、ヘテロ四量体形成時間は約 200 ミリ秒で、二量体の結果と同様の傾向が見られた。生体内の神経細胞ではヘテロフォームの AMPAR がホモと比べて顕著に多いが(Neuron. 62, 254-268, 2009)、これは会合時間の差によるものであることが示唆された。加えて、単量体の拡散係数は  $0.15 \mu\text{m}^2/\text{s}$  程度に対し、四量体は  $0.014 \mu\text{m}^2/\text{s}$  で非常に動きが遅かった。さらに、AMPA サブユニットの発現密度が高いほど四量体の形成割合が高かった。ここで、スパイン内では AMPAR の密度が非常に高く、樹状突起膜上では密度が低いことが知られる。以上から、樹状突起膜上では AMPAR サブユニット密度が低いために主に単量体で移動する。単量体は移動能が高いため、刺激などの環境変化に応じて速やかにスパイン内に移行できる(i.e. AMPAR サブユニット数の速やかな供給が可能となる) スパイン内では AMPAR サブユニットが集積しているため四量体が積極的に形成されるが、ミリ秒単位で崩壊してはすぐに新たな組み合わせの四量体が組み立てられる、といった新たなモデルを見出した。

次に Stg と AMPAR サブユニットの同時 2 色一分子観察手法を行なった結果、Stg は GluA1 の単量体と ~200 ミリ秒の会合時間を示したことから、2 者は一過的な複合体を膜上で作ることが分かった。興味深いことに、Stg は GluA1 の二量体とも同様に ~200 ミリ秒程度の会合時間を示したことから、AMPA と Stg の会合能にサブユニットの数は影響されないことが示唆された。Stg は四量体と相互作用すると予想されてきたが、これらの結果から実際には単量体や二量体と一過的に複合体を形成することが明らかとなった。一方 Stg 過剰発現下で GluA1 のホモ二量体形成時間が変化することが想定されたが、有意な差は見られなかった(Stg の発現有り無しでいずれも約 160 ミリ秒)。また、GluA2 においても同様の結果が得られた。これらのことから、AMPA サブユニットと Stg は膜表面上で安定的に複合体を形成するのではなく、準安定的に複合体を形成しては壊れるモデルが得られた。

以上の結果については、2019 年 11 月に Nature Communications に掲載された。

(2) GluA1 には 6 箇所、GluA2 には 4 箇所の N 型糖鎖付加部位が存在する(GluA1; N63, N249, N257, N363, N401, N406、GluA2; N256, N370, N406, N413)。これら糖鎖付加部位のアスパラギンを別のアミノ酸に変異させた糖鎖付加部位変異体を HEK293 細胞に発現させ、その 24 時間後に膜表面発現量を解析すると、GluA1 N63、GluA1 N363、GluA2 N370 の 3 つの変異体で表面発現量が低いことがこれまでに明らかとなっている(PLoS One. 10, e0135644, 2015; J. Neurochem. 147, 730-747, 2018)。ところが、これら変異体を発現させた細胞を 72 時間培養すると、GluA1 N63 は膜表面に依然ほとんど発現しなかった一方で、GluA1 N363、GluA2 N370 は経時的に膜表面発現量が増加することが新たに分かった。このことから、3 つの変異体は同じような表現型を示すものと考えられてきたが、実際には GluA1 N63 は小胞体からの脱出が顕著に抑制された変異体であり、GluA1 N363 と GluA2 N370 は小胞体脱出レートが遅くなっている変異体であることが示唆された。

さらに、それぞれの変異体と合わせて野生型の同じサブユニットを同時に発現させ(ホモ発現条件)、24 時間後に膜表面発現量を解析した。結果、GluA2 野生型発現下において GluA2 N370 の膜表面発現量が野生型と同程度まで回復した。GluA2 野生型は GluA1 N363 の膜表面発現量も回復させることから、GluA2 が各サブユニットを主導的に輸送制御していることが分かった。それに対し、GluA1 野生型の発現下において GluA1 N63 および GluA1 N363 の膜表面発現量は低いままだった一方、GluA1 野生型の膜表面発現量は GluA1 N63 の発現下でのみ顕著に低下することが分かった。すなわち、GluA1N63 位の N 型糖鎖はホモの組み合わせにおいて小胞体を脱出するために必須の因子であることが分かった。

以上の結果については、2020 年 7 月に International Journal of Molecular Sciences に掲載された。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Morise J, Yamamoto S, Midorikawa R, Takamiya K, Nonaka M, Takematsu H, Oka S.	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 Int. J. Mol. Sci.	6. 最初と最後の頁 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 R, Takakura D, Morise J, Wakazono Y, Kawasaki N, Oka S, Takamiya K.	4. 巻 153
2. 論文標題 Monitoring the glycosylation of AMPA (a-amino-3-hydroxy-5-methyl-4isoxazole-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 J. Neurochem.	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 Matsui T, Hamada Y, Kuwahara M, Morise J, Oka S, Kaida K, Kusunoki S.	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 J. Neuroimmunol.	6. 最初と最後の頁 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 J, Suzuki KGN, Kitagawa A, Wakazono Y, Takamiya K, Tsunoyama TA, Nemoto YL, Takematsu H, Kusumi A, Oka S.	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 Nat. Commun.	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 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件／うち国際学会 1件）

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 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
2. 発表標題 N型糖鎖修飾を介したAMPA受容体のチャンネル機能制御
3. 学会等名 第70回西日本生理学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 森瀬 譲二, 北野 仁望, 岡 昌吾
2. 発表標題 腎障害に伴った非硫酸化型HNK-1糖鎖抗原の腎臓内発現変化と早期疾患マーカーとしての可能性の解析
3. 学会等名 第59回日本臨床化学会年次学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 森瀬 譲二, 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 譲二, 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 譲二, 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 <a href="http://oka-lab.hs.med.kyoto-u.ac.jp/index.html">http://oka-lab.hs.med.kyoto-u.ac.jp/index.html</a>
---

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
研究協力者	鈴木 健一  (Suzuki Kenichi)		

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