

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 2 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21500311

研究課題名（和文）SDS-FRL法による膜分子定量的局在解析法の技術基盤の強化

研究課題名（英文）Technical Improvement of SDS-FRL for quantitative molecular localization

研究代表者

深澤 有吾 (Fukazawa Yugo)

名古屋大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号：60343745

研究成果の概要（和文）：SDS-digested freeze-fracture replica labeling method (SDS-FRL法)は、2次元的に広がる細胞膜上の分子局在を電子顕微鏡レベル解像度で定量的に解析することが出来る独特な方法である。我々の研究室では試行錯誤の結果、既存の分子局在解析法の欠点を補完できることを示してきたが、技術的制約が存在しその適用範囲はまだ狭い。そこで本研究では、SDS-FRL法の技術基盤の強化を行い、より多種の分子に対応できる技術にすることを目指した。その結果、レプリカ前処理法の検討や感度の向上を経て、低密度に発現する標的分子の解析や細胞膜内葉に分配される分子に対する解析も信頼性良く定量的に行えるようになった。

研究成果の概要（英文）：SDS-digested freeze-fracture replica labeling (SDS-FRL) was innovated as a suitable technique to reveal the fine structure of plasma membrane and quantitative localization of biomolecules over the membrane structure. However, it was difficult to apply this technique to molecules immobilized on protoplasmic faces (P-face) quantitatively. Thus, in this research project, I tried to optimize labeling protocols of SDS-FRL. The optimization was carried out at steps of SDS treatment, pretreatment and blocking of replicated membranes as well as components on each labeling solutions. As a result, although details of labeling protocol differ among experiments, new protocol provided high-sensitive labeling not only for molecules on exoplasmic faces but also for those on P-faces. Localization data obtained by these investigations were published as original papers.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：分子神経解剖学

科研費の分科・細目：神経科学・神経科学一般

キーワード：凍結割断レプリカ・電子顕微鏡・分子局在・細胞膜

1. 研究開始当初の背景

凍結割断レプリカ法は、生体膜の3次元の微細構造を解析するために開発され、1970年代頃に盛んに用いられた形態観察法の一つである。しかし、観察部位の同定や構造と機能の関連付けが困難であることから近年では殆ど利用されていない。ところが、レプリカ膜面に生体分子(脂質、蛋白質、糖)が保持されており、界面活性剤(SDS)による前処理と免疫金標識とを組み合わせることで、膜分子の局在解析法として有用であることが報告された(SDS-digested freeze-fracture replica labeling: SDS-FRL法, Fujimoto, 1995)。そこで、この方法を脳組織の局在解析に応用し、従来法に比べ高い検出効率を持ち(Tanaka et al., 2005)、既存法では検出できなかった膜ドメイン上の分子局在までも検出できることを明らかにした。これらの成果から、この方法の有用性は国内外に認められ、研究分野を問わず多くの研究者から共同研究や技術協力の依頼を受けており、その基本的な手法に関しても発表を行ってきた(深澤・重本, 2006, Fukazawa et al., 2008)。しかし、この方法を適用できる分子種は細胞膜上に発現する分子の中でも限られたものでしかないと経験してきた。そこでこの技術の応用範囲を拡大する目的で、技術基盤の改良と強化を図ることが期待されていた。

2. 研究の目的

SDS-FRL法の技術基盤の強化を行い、より多種の分子に対応できる技術にする。

3. 研究の方法

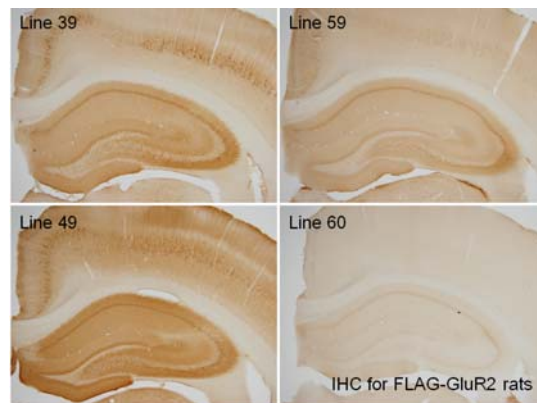
レプリカ試料作製後のSDS処理や前処理、更に標識反応の各ステップについて処理用液の組成、温度、反応時間についての条件を検討した。検出感度やノイズの除去に有効な条件を複数の標的分子に対して検討した。この実験により得られた条件を、複数の新規分子の脳内局在情報解析に適用し、その分布を明らかにすると同時に、SDS-FRL法がより広範な分子局在解析に用いることの出る有用な方法であることを立証した。

上記に加え、SDS-FRL法による分子分布解析の基礎的な知見を得ることを目的に、凍結割断時に細胞膜が乖離する際に、膜上に発現していたタンパク質がどのように内葉と外葉に分配されるのかについて調べられる実験系も確立した。この実験では、AMPA型グルタミン酸受容体の細胞内外の両端のアミノ酸配列に同一の抗原配列を持つ様遺伝子を作製し、この分子が神経細胞で発現する遺伝子導入ラットを作製した。

4. 研究成果

本研究課題により見出された最適な標識条件は標的分子ごとに異なっていたが、それぞれの最適標識条件を用いて、ラットやマウスの脳スライスを用いた解析を行った。これまでに行ってきたAMPA型グルタミン酸受容体、NMDA型グルタミン酸受容体、delta2グルタミン酸受容体などの細胞膜外葉に分配される分子のみならず、GABA_A受容体、カリウムチャネル(SK)、グルタミン酸トランスポーターなどの細胞膜内葉に分配される分子に対しても定量的な解析が信頼性良く行えることを証明し、得られた分布情報を論文として発表した。

また、凍結割断時の膜上分子の分配様式の解析の為に、前述の遺伝子改変ラットを作製し、複数系統の遺伝子改変ラットを得た(下図参照)。現在、レプリカ膜上の標識密度を内葉と外葉で計測しており、近々、成果として報告する予定である。



FLAG配列に対する免疫組織染色像。FLAG配列をAMPA型グルタミン酸受容体の細胞内外アミノ酸配列に付加し、神経細胞で発現するラットを作製した。3系統のラットで海馬や大脳皮質の特異的な細胞に導入遺伝子が発現していることが判る(図中、濃く見える部分がFLAG陽性の脳領域)。現在、遺伝子改変ラット49系統を解析中。

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12件)

(1) Sumegi M, Fukazawa Y, Matsui K, Lorincz A, Eyre MD, Nusser Z, Shigemoto R (2012) Virus-mediated swapping of zolpidem-insensitive with zolpidem-sensitive GABA_A receptors in cortical pyramidal cells. *J Physiol* (査読有り): in press.

(2) Fukazawa Y, Shigemoto R. (2012) Intra-synapse-type and inter-synapse-type relationships

- between synaptic size and AMPAR expression. *Current Opinion Neurobiology* (査読有り) 22: 1-7.
- (3) Budisantoso T, Matsui K, Kamasawa N, Fukazawa Y, Shigemoto R. (2012) Mechanisms underlying signal filtering at a multi-synapse contact. *J Neurosci* (査読有り) : in press.
- (4) Ballesteros-Merino C, Lin M, Wu WW, Ferrandiz-Huertas C, Cabañero MJ, Watanabe M, Fukazawa Y, Shigemoto R, Maylie J, Adelman JP, Luján R. (2011) Developmental profile of SK2 channel expression and function in CA1 neurons. *Hippocampus* (査読有り) : in press.
- (5) Szabadits E, Cserép C, Szónyi A, Fukazawa Y, Shigemoto R, Watanabe M, Itohara S, Freund T, Nyiri G (2011) NMDA receptors in hippocampal GABAergic synapses and their role in nitric oxide signaling. *J Neurosci* (査読有り) 31: 5893-5904.
- (6) Kasugai Y, Swinny JD, Roberts JDB, Daleziy Y, Fukazawa Y, Sieghart W, Shigemoto R, Somogyi P (2010) Quantitative localization of synaptic and extrasynaptic GABA_A receptor subunits on hippocampal pyramidal cells by freeze-fracture replica immunolabelling. *Eu J Neurosci* (査読有り) 32: 1868-1888.
- (7) Dong Y-L, Fukazawa Y, Wang W, Kamasawa N, Shigemoto R (2010) Differential postsynaptic compartments in the laterocapsular division of the central nucleus of amygdala for afferents from the parabrachial nucleus and the basolateral nucleus in the rat. *J Comp Neurol* (査読有り) 518: 4771-4791.
- (8) Parajuli KL, Fukazawa Y#, Watanabe M, Shigemoto R (2010) Subcellular distribution of $\alpha 1G$ subunit of T-type calcium channel in the mouse dorsal lateral geniculate nucleus. *J Comp Neurol* (査読有り) 518: 4362-4374. #, Corresponding author
- (9) Matsuda K, Miura E, Miyazaki T, Kakegawa W, Emi K, Narumi S, Fukazawa Y, Ito-Ishida A, Kondo T, Shigemoto R, Watanabe M, Yuzaki M (2010) Cbln1 is a ligand for an orphan glutamate receptor $\delta 2$, bidirectional synapse organizer. *Science* (査読有り) 328: 363-368.
- (10) Tarusawa E, Matsui K, Budisantoso T, Molnar E, Watanabe M, Matsui M#, Fukazawa Y#, Shigemoto R (2009) Input-specific intrasynaptic arrangements of ionotropic glutamate receptors and their impact on postsynaptic responses. *J Neurosci* (査読有り) 29: 12896-12908. #, Corresponding authors
- (11) Rives ML, Vol C, Fukazawa Y, Tinel N, Trinquet E, Ayoub MA, Shigemoto R, Pin JP, Prézeau L (2009) Crosstalk between GABA_(B) and mGlu1 \square receptors reveals new insight into GPCR signal integration. *EMBO J* (査読有り) 28: 2195-2208.
- (12) Kaufmann WA, Ferraguti F, Fukazawa Y, Kasugai Y, Shigemoto R, Laake P, Sexton JA, Ruth P, Wietzorrek G, Knaus H-G, Strom JF, Ottersen OP (2009) Large-conductance calcium-activated potassium channels in Purkinje cell plasma membranes are clustered at sites of hypolemmal microdomains. *J Comp Neurol* (査読有り) 515: 215-230.
- [学会発表] (計 28 件)
- (1) Parajuli L, Kulik A, 重本隆一, 深澤有吾 (2011.10.14) 「R型電位依存性カルシウムチャネル(Cav2.3)のマウス脳内微細局在」第 71 回日本解剖学会中部支部学術集会 (名古屋)
- (2) Parajuli LK, Fukazawa Y, Shigemoto R (2011.9.17) Presynaptic localization of R-type calcium channel in the interpeduncular nucleus. 第 34 回日本神経科学大会 (横浜)
- (3) Kuki T, Matuzaka Y, Fukazawa Y, Yawo H, Muchiaki H (2011.9.16) Analysis of functional connectivity among cortical layers during optogenetically induced perturbations. 第 34 回日本神経科学大会 (横浜)
- (4) Ahmed H, Kawakami R, Fukazawa Y, Shigemoto R (2011.9.15) Right-hemispheric dominance of dentate granular cell c-fos expression after spatial exploration in split-brain mice. 第 34 回日本神経科学大会 (横浜)
- (5) Kurita H, Fukazawa Y, Ageta-Ishihara N, Shigemoto R, Kinoshita M (2011.9.15) Ultrastructural localization analysis of septins in mammalian nervous system. 第 34 回日本神経科学大会 (横浜)
- (6) Shigemoto R, Armed H, Kawakami H, Fukazawa Y, (2011.7.16) Right hemisphere dominance of dentate granule cell activation after exploration of novel environment in wild-type and *iv* mutant mice. 8th IBRO world congress of neuroscience (Florence, Italy)

- (7) Aziz W, Wang W, Fukazawa Y, Shigemoto R (2011.7.15) Structural correlate of long-term motor memory formation in cerebellar cortex of mice. 8th IBRO world congress of neuroscience (Florence, Italy)
- (8) 「定量的分子局在解析と計算論的手法によるシナプス構造-機能連関の解析」日本顕微鏡学会 第67回学術講演会 (福岡), 2011年5月16日
- (9) Tabuchi S, Tsunematsu T, Fukazawa Y, Tominaga M, Yamanaka A (2010.11.17) Orexin neurons are directly and indirectly activated by orexin through the orexin 2 receptor. Neuroscience2010 (SanDiego, USA)
- (10) Szabadits E, Szőnyi A, Cserep C, Fukazawa Y, Watanabe M, Shigemoto R, Freund TF, Nyiri G (2010.11.16) NMDA receptors in hippocampal GABAergic synapses. Neuroscience2010 (SanDiego, USA)
- (11) Shigemoto R, Aziz W, Fukazawa Y, Wang W, Tarusawa E (2010.11.16) Structural changes at parallel fiber-Purkinje cell synapses after long-term adaptation of horizontal optokinetic response in mice. Neuroscience2010 (SanDiego, USA)
- (12) Kulik A, Fukazawa Y, Shigemoto R, Frotscher M, Vida I (2010.11.4) GABA(B) receptor activity dynamically regulates expression of Kir3 channels. Neuroscience2010 (SanDiego, USA)
- (13) Ji Z, Ishizuka T, Fukazawa Y, Shigemoto R, Yawo H (2010.9.3) Characterization of DRG neuron subpopulations selectively expressing ChR2 in Thy-1.2 transgenic rat. 第33回日本神経科学大会(神戸)
- (14) Matsui K, Budisantoso T, Kamasawa N, Fukazawa Y, Shigemoto R (2010.9.3) Presynaptic, postsynaptic, and morphological determinants of signal transmission at the retinogeniculate synapse. 第33回日本神経科学大会(神戸)
- (15) Ageta-Ishihara N, Hagiwara A, Kurita H, Morita T, Tominaga T, Fukazawa Y, Shigemoto R, Kinoshita M (2010.9.2) Exploring functions of the septin cytoskeleton in the formation and remodeling of neuroglial network. 第33回日本神経科学大会(神戸)
- (16) Parajuli KP, Fukazawa Y, Kulik A, Shigemoto R (2010.9.2) Regional and subcellular distribution of the $\alpha 1E$ subunit of voltage-gated calcium channel in the adult mouse brain. 第33回日本神経科学大会(神戸)
- (17) Tabuchi S, Tsunematsu T, Tominaga M, Fukazawa Y, Yamanaka A (2010.9.2) Orexin 2 receptor positively regulates the activity of orexin neurons. 第33回日本神経科学大会(神戸)
- (18) Kulik A, Fukazawa Y, Shigemoto R, Frotscher M, Vida I. (2010.4.7) GABA(B) receptor activity dynamically regulates surface expression of Kir3 channels. FENS2010 (Amsterdam, Netherland)
- (19) Prezeau L, Rives ML, Fukazawa Y, Tinel N, Trinquet E, Ayoub M, Shigemoto R, Pin JP (2010.4.7) Cross-regulation between GABAB and mGlu1a receptors reveals new insight into signal integration between GPCRs. FENS2010 (Amsterdam, Netherland)
- (20) 「水平性視機性眼球反応適応時の小脳回路変化とそのメカニズム」第115回日本解剖学会 全国学術集会 (盛岡), 2010年3月30日
- (21) Parajuli LK, Fukazawa Y, Watanabe M, Shigemoto R (2009.9.17) Compartmentalized distribution of $\alpha 1G$ subunit of T-type calcium channel in the dorsal lateral geniculate nucleus of mouse brain. Neuroscience 2009 (Nagoya, Japan).
- (22) Fukazawa Y, Itakura M, Takahashi T, Saitoh Y, Inokuchi K, Molnar E, Shigemoto R (2009.9.17) In vivo remodeling of postsynaptic glutamate receptor organization revealed by freeze-fracture replica labeling. Neuroscience 2009 (Nagoya, Japan).
- (23) Aziz W, Fukazawa Y, Tarusawa E, Shigemoto R (2009.9.16) Structural changes at parallel fiber to Purkinje cells synapses after long-term adaptation of horizontal optokinetic response. Neuroscience 2009 (Nagoya, Japan).
- (24) Fukuda Y, Fukazawa Y, Danev RS, Shigemoto R, Nagayama K (2009.8.1) Zernike phase contrast electron microscopy visualizes detailed structures of vitrified biological specimens. IUPS2009 (Kyoto, Japan).
- (25) Dong D, Fukazawa Y, Shigemoto R (2009.7.31) The enhancement of PSD size and AMPA receptor density in the central amygdala in rat model of neuropathic pain. IUPS2009 (Kyoto, Japan).
- (26) Aziz W, Fukazawa Y, Tarusawa E, Shigemoto R (2009.7.29) Structural changes at parallel fiber-Purkinje cells synapses after long-term adaptation of horizontal optokinetic response in mice. IUPS2009 (Kyoto, Japan).
- (27) Fukazawa Y, Itakura M, Takahashi T, Saitoh Y, Inokuchi K, Molnar E, Shigemoto R

(2009.7.28) Remodeling of postsynaptic glutamate receptor organization in awake rats revealed by freeze-fracture replica labeling. IUPS2009 (Kyoto, Japan).

- (28) Parajuli LK, Fukazawa Y, Watanabe M, Shigemoto R (2009.7.28) Immunohistochemical localization of $\alpha 1G$ subunit of T-type calcium channel in the dorsal lateral geniculate nucleus of mouse brain. IUPS2009 (Kyoto, Japan).

〔図書〕（計 2 件）

- (1) Fujimoto T, Fukazawa Y (2012) Electron microscopy of biological membrane. Encyclopedia of Biophysics, in press. Oxford: Academic Press.
- (2) Fukazawa Y, Shigemoto R (2009) Glutamate receptor organization: ultrastructural insights. In: Squire LR (ed.) Encyclopedia of Neuroscience, volume 4, pp. 901-904. Oxford: Academic Press.

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等 なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

深澤 有吾 (FUKAZAWA YUGO)

名古屋大学・大学院医学系研究科・准教授
研究者番号：60343745

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者 なし