

機関番号：22701

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21700412

研究課題名 (和文) 光制御による AMPA 受容体機能破壊技術の開発

研究課題名 (英文) A light induced loss of function technology for AMPA receptors

研究代表者

竹本 研 (TAKEMOTO KIWAMU)

横浜市立大学・医学部・助教

研究者番号：80466432

研究成果の概要 (和文)：神経細胞は、シナプスを介した電気的な信号伝達により、学習記憶などの機能を発揮する。しかしながら、学習記憶などの高次機能において個々のシナプスがどのように機能しているかなどはまったく不明であり、シナプスレベルで脳情報を解読する技術は存在しない。本研究はシナプス機能に重要な AMPA 受容体を、光で特異的に機能破壊できる新技術を世界で初めて開発し、脳情報の解読に向けた基盤技術を確立した。

研究成果の概要 (英文)：Neurons communicate with each other by electronic signals through synapses to exhibit the brain function. Function of each synapse was not identified in learning and memory, however, technology of brain decoding at synaptic resolution was not exist. In this research, we developed a light induced loss of function technology for AMPA receptors that is important for synaptic function.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2010 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：神経化学・神経薬理学

キーワード：光操作

## 1. 研究開始当初の背景

LTP (長期増強) はシナプスに短い間連続刺激を与えたときに、数時間以上の長い時間シナプスの応答効率が上昇することであり、記憶の基本メカニズムと考えられている。この際誘導される重要な分子機構の一つに AMPA 受容体のシナプスへの移行がある。AMPA 受容体は主に GluR1～GluR4 の 4 つのサブユニットをもつイオン透過性のチャネルであるが、成体の海馬においては多くが GluR1/2 および GluR2/3 のヘテロ 2 量体を形成してい

る。申請者の所属する研究室ではこれまでに、GluR1/2 は in vivo において経験依存的にシナプスに提示されるが、GluR2/3 は恒常的にシナプス移行を繰り返す (Takahashi ら Science 2003) ことを明らかにした。さらに LTP 誘導後 GluR1/2 がまずシナプス膜へ移行し、その後 GluR2/3 に置き換わることから、GluR1/2 が記憶の獲得、GluR2/3 が記憶の維持を行うとの仮説を立てることができた (Malinow ら Curr Opin Neurobiol. 2000)。それでは各サブユニットの生理機能を in

vivo で解明するにはどうすればよいだろうか？これまでにノックアウトマウスが精力的に作製されたが、発生初期から遺伝子そのものが無いため解釈に困る場合が多い (Jia ら Neuron 1996 など)。よって残念ながら現在のところ、そもそも記憶の獲得が出来ないのか？維持が出来ないのか？という重要なポイントを区別して解析することは極めて困難と言える。以上から私は、AMPA 受容体のシナプス膜への移行の生理機能を解明する場合、一度学習後に様々な時間経過においてそれぞれの受容体機能を acute に機能破壊可能な新技術が重要であると考えた。

Acute にタンパク質機能を破壊する方法として、CALI (chromophore assisted light inactivation) 法がある。これは光照射依存的に活性酸素を放出する、光増感物質を用いる手法である。ところが従来用いられる光増感物質マラカイトグリーンは大出力のレーザーが必要であり、さらに励起波長が 600nm 以上と長いことから、深部での刺激を可能にする 2 光子励起には向いていない。また近年用いられるフルオロセインは一重項酸素産性能が低いため、より高効率で CALI を可能にする光増感物質が求められた。これに対して、申請者はこれまでに CALI に関する基礎的な研究を進め、高効率で CALI が可能な光増感物質としてエオシンを見だし、 $\beta$ -ガラクトシダーゼの酵素活性を acute に破壊することに成功している (Takemoto et al. ACS. Chem. Biol. 2011)。さらにエオシンの細胞内ラベル化技術を開発し、細胞内分の機能破壊も可能にした。

このように私はこれまでに、光により一重項酸素を発生する光増感物質を用いたタンパク質機能破壊の新技術について研究を重ねてきた。本研究ではこの技術を AMPA 受容体に適用することで、世界にさきがけて新しい解析を可能にすることを目的とする。本提案は、「in vivo における記憶の消去を 1 スパインレベルで可能にする新技術」の基礎となる研究であり、将来的にはトラウマや薬物依存症、アルコール依存症などの望まない記憶や習慣の消去にもつながると期待できる。

## 2. 研究の目的

以上のような背景から、私は AMPA 受容体のシナプス膜への移行の生理機能を解明する場合、一度学習後に様々な時間経過においてそれぞれの受容体機能を acute に機能破壊可能な新技術が重要であると考えた。本提案はこれまで開発した CALI に関する基礎技術を応用して、光操作による AMPA 受容体の

acute な機能破壊技術を開発し、将来的には in vivo における「記憶の消去」を 1 スパインレベルで可能にする革新的新技術の基礎を確立するものである。

in vivo で応用可能な分子機能破壊技術として、遺伝子破壊法や RNAi 法がある。両者ともに時空間的に自在に制御できる方法ではないため、前述の通り記憶獲得維持のシステムを in vivo で理解することは困難である。CALI 法は光照射依存的に活性酸素を放出する、光増感物質を用いる手法である。光増感物質から放出された活性酸素により、ごく近傍に存在する標的タンパク質が酸化・立体構造破壊され、強光照射依存的な機能破壊が可能となる。本提案で用いる新規光増感物質エオシンは、一重項酸素を産生するが、その拡散半径は約 10nm であり標的タンパク質の特異的な機能破壊が可能である。以上から本提案の有する独創性とは、「光操作によって AMPA 受容体の acute な機能破壊を初めて達成可能」な点である。現在までに薬剤を海馬に注入して記憶の消去を目指す研究があるが (Pastalkova ら Science 2006)、薬剤を in vivo で 1 スパインレベルで作用させることは極めて困難である。それに対して我々の研究では、将来的に in vivo において、1 スパインレベルで「記憶の消去」を acute に誘導できるというのが最大の意義である。例えば A という記憶を与えた場合、どのスパインにあるどの AMPA 受容体が如何なるパターンでシナプス移行するのか？どのスパインで機能破壊すれば記憶は消去できるのか？を解析することで、将来的には学習記憶の分子システムの解明につながると期待できる。

## 3. 研究の方法

まず培養細胞系にて、膜表面に提示された AMPA 受容体に対してグルタミン酸を添加して発生する AMPA 電流について、acute な機能破壊を可能にする新技術を開発する。共発現した NMDA 受容体に対する本技術の特異性も合わせて電気生理学的に解析する。

次に海馬分散培養系において、グルタミン酸刺激により誘導される AMPA 電流について、同様に機能破壊できるかを電気生理学的に確認する。

以上の結果を踏まえて、さらにシナプスにおいて本技術が機能するかを解析する必要がある。海馬分散培養系において、電極刺激により発生する AMPA 電流について、同様に機能破壊できるかを解析する。また NMDA に対して、本技術の特異性を電気生理学的に解析する。

#### 4. 研究成果

イメージングと同時に任意のタイミングでタンパク質機能を破壊する技術の開発は、イメージングで得られたシグナルパターンの生理的意味を解明するために不可欠な方法論であると考えた。本研究では学習記憶に重要な AMPA 受容体の N 末端に GFP を付加した GFP-GluR1 をターゲットに、光制御にて GluR1 の機能破壊を誘導する新技術の開発を進めている。研究開始までに既に AMPA 受容体を光により機能破壊可能な抗 GFP 抗体は既に一種類取得済みである。一年目はこの抗体の基本機能を解析と、抗 GFP 抗体スクリーニングをさらに進めた。GluR1 発現 CHO 細胞にて本抗体を添加しても、GluR1 の amplitude には影響を与えず、光を照射して初めて機能破壊が誘導されることを示した。さらに光照射によって Access Resistance などのパッチクランプ時の電気生理学的特性には影響を与えていないことも示した。抗体の特異性を示すためには、異なる複数の抗体で同じ phenotype ができるかを確認する必要がある。上記と平行して GluR1 を光にて機能破壊可能な抗体のスクリーニングをさらに進めた。これまでに、従来の抗体と同程度の効率で機能破壊が可能な抗体を 2 種類取得した。

以上のように一年間までに、GFP 融合 GluR1 に対してエオシンラベルした抗 GFP 抗体を用いて CALI による光照射依存的機能破壊の技術開発に成功した。2 年目は本技術の特異性等について解析を進めた。まず CHO 細胞に GFP-GluR1 と NMDA 受容体 (NR1A/2B) を共発現し、グルタミン酸添加による AMPA 電流及び NMDA 電流を測定する実験系を構築した。この実験系にて CALI の前後で機能破壊の特異性と解析したところ、AMPA 電流のみを特異的に機能破壊することが分かった。さらに海馬初代培養ニューロンにおいても同様な高い特異性が認められた。これらの実験はグルタミン酸添加によるものであり、シナプス性電流を抑制した結果であるかは不明である。さらに本事件で使用する抗体がシナプスクレフトに入り込むかも大きな問題となる。そこで海馬初代培養ニューロンを培養したカバーガラスに刺激電極を設置することで、神経細胞間にシナプス電流を発生させる実験系を構築し、CALI の効果を解析したところ、光照射依存的に AMPA 電流のみが特異的に抑制できることがわかった。以上からエオシンラベルした抗体は、シナプスクレフトに入り込み CALI が可能であることが示された。

また内在性の GluR1 については一年目より

スクリーニングを続けた。細胞外ドメインについて 2 つのエピトープを設定し、東大浜窪研と共同でモノクローナル抗体の作製を進めた。N 末端に非常に近いエピトープ 1 では残念ながら、CALI ができる抗体は得られなかった。2 年目はもう少し C 末端よりのエピトープに関して、モノクロー抗体を取得した。このエピトープに対する抗体は、ウエスタンブロット/IP ともに非常に良い性能を示し、しかも生きた細胞のまま GluR1 に結合することが分かった。現在 CALI が可能かのスクリーニングを続けている。将来的には in vivo で使用する抗体を取得し、各種疾患の革新的治療に応用したいと考えている。

#### 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 3 件)

① Takemoto K, Matsuda T, McDougall M, Klaubert D, Hasegawa A, Los G, Wood K, Miyawaki A, Nagai T, Chromophore-assisted light inactivation of HaloTag fusion proteins labeled with eosin in living cells, ACS. Chem. Biol., 査読有り、2011、印刷中

② Jitsuki S, Takemoto K, Kawasaki T, Tada T, Takahashi A, Becamel C, Sano A, Yuzaki M, Zukin RS, Ziff EB, Kessels HW, and Takahashi T. Serotonin mediates cross-modal reorganization of cortical circuits., Neuron, 査読有り、2011、69 巻、2011、780-792

③ Kuranaga E, Matsunuma T, Kanuka H, Takemoto K, Koto A, Kimura K, and Miura M, Apoptosis controls the speed of looping morphogenesis in Drosophila male terminalia, Development, 査読有り、2011、138 巻、1493-1499

[学会発表] (計 1 件)

① Kiwamu Takemoto, Takeharu Nagai and Takuya Takahashi, Light induced loss of function technology for AMPA receptors in living cells, Neuro2010, 2010 年 9 月 3 日、神戸 神戸国際展示場 1 号館

[その他]

ホームページ等

<http://neurosci.med.yokohama-cu.ac.jp/2>

.html

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

竹本 研 (TAKEMOTO KIWAMU)

横浜市立大学・医学部・助教

研究者番号：80466432

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：