

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 18 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24300140

研究課題名(和文) グルタミン酸受容体トラフィックにおけるシナプス後肥厚の動的役割

研究課題名(英文) Dynamic roles of postsynaptic density in glutamate receptor trafficking

## 研究代表者

神谷 温之(Kamiya, Haruyuki)

北海道大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：10194979

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、光反応性AMPA型グルタミン酸受容体ブロッカーであるANQXの光分解を脳スライス標本に適用することで、海馬シナプスでの内在性グルタミン酸受容体の生理的な分子動態を解析することを目的とした。静止状態ではAMPA受容体のシナプス移行はほとんど生じず、高頻度刺激により長期増強を誘発した際にシナプス移行が加速されることが明らかとなった。PSD95ノックアウトマウスから作成したスライス標本のシナプスでは、静止状態においてもシナプス移行の亢進がみられた。PSD95はAMPA受容体のシナプス局在化に関与し、シナプス内外の受容体輸送を制限する受容体スロットとしての機能を有すると考えられた。

研究成果の概要(英文)：In this study, we examined the dynamics of endogenous AMPA-type glutamate receptors at the intact synapses in acute hippocampal slices using photochemical inactivation by using photoreactive AMPA receptor antagonist ANQX. Postsynaptic AMPA receptors are less mobile at the resting condition, and the synaptic delivery from intracellular reserve pools were accelerated during induction of long-term potentiation. We also adopted photochemical inactivation in hippocampal slices obtained from knock out mice of PSD95, one of the major proteins of postsynaptic density. In PSD95 knockout mice, synaptic delivery were accelerated during the resting condition than wild type mice. These results suggested that PSD95 serves as a receptor slot to limit the mobility of AMPA receptors during the resting condition, and may upregulated after the induction of long-term potentiation to increase the synaptic efficacy.

研究分野：神経生理学

キーワード：脳・神経 神経科学 生理学 薬理学 シグナル伝達

## 1. 研究開始当初の背景

近年の研究において、脳の興奮性シナプス伝達を担う AMPA 型グルタミン酸受容体のシナプス局在は極めて動的に制御されていることが示されてきた。なかでも、記憶や学習の細胞モデルとされる海馬シナプス伝達の長期増強現象では、細胞内プールからシナプス後膜への(1)膜移行 exocytosis や、シナプス外からの(2)側方拡散 lateral diffusion の2つのメカニズムを介してシナプス後膜のグルタミン酸受容体の数が増加するという、シナプス可塑性のグルタミン酸受容体トラフィック仮説が提唱され、多くの実験結果がこれを支持してきた。これに対し、シナプス後部にはシナプス後肥厚 PSD と呼ばれる巨大分子複合体が存在するため、シナプス直下には exocytosis (開口放出)の機構が存在せず、グルタミン酸受容体は細胞内プールから開口放出を介してシナプス「外」の細胞膜表面に移行した後、側方拡散によりシナプスに移行する可能性が提唱されている。また、グルタミン酸受容体のシナプス局在化には、膜移行と側方拡散に加えて、シナプス後部にグルタミン酸受容体を捕捉する(3)拡散捕捉 diffusional trapping と呼ばれる過程が存在し、細胞内予備プールのグルタミン酸受容体がシナプスに移行するには上記の(1)-(3)の3つのステップが関わることを示唆されている。このグルタミン酸受容体トラフィックの3ステップモデルは、従前の2ステップモデルでは説明できない多くの実験結果を統合的に説明できることから、グルタミン酸受容体のシナプス輸送に関する統一モデルとなると考えられている。しかしながら、(1)-(3)のそれぞれがどのタイミングで活性化するか、あるいはどのステップがグルタミン酸受容体のシナプス移行における律速的過程として機能するか、など、3ステップモデルの定量的な分子動態や生理的役割については不明な点が多い。

## 2. 研究の目的

本研究では、光反応性(caged)グルタミン酸受容体ブロッカーである ANQX の光分解を脳スライス標本に適用することで、シナプス後部のグルタミン酸受容体を光照射で不活化した後のシナプス応答の回復の時間経過を測定し、海馬シナプスでの「内在性」グルタミン酸受容体の生理的な分子動態を明らかにする。光照射に関して、全般照射と単一シナプスレベルの局所照射によりグルタミン酸受容体の膜移行とシナプス移行の動態を区別して測定する。また、長期増強(long-term potentiation: LTP)などのシナプス可塑性を誘発した際にグルタミン酸受容体輸送の加速がどのタイミングでみられるか調べることで、シナプス可塑性のグルタミン酸受容体トラフィックの速度論的な検討を試みる。さらに、これらの解析をシナプス後肥厚の主要構成タンパクである PSD95

のノックアウトマウスから作成したスライスに適用することで、シナプス後肥厚がグルタミン酸受容体のシナプス局在化を規定する「受容体スロット」として機能する可能性について検証することを目的とする。

ANQX の光分解法では、光照射の部位とタイミングを制御することで、時間的・空間的にコントロールして細胞膜上に発現するグルタミン酸受容体の不可逆的な機能阻害を行うことが可能で、その後の回復過程をみることで内在性グルタミン酸受容体の動態を解析できる。ANQX の化学反応論的な特性から、光阻害するためにはシナプス部に ANQX を急速投与する必要があり、急速灌流が可能な培養ニューロンには適用可能であるが、スライス標本には適用できないと報告された(Adesnik et al., Neuron 48:977-985, 2005)。これに対し申請者は、ANQX の投与方法を工夫することで再現性良く海馬スライス標本の興奮性シナプス伝達を不活化することに成功した。長期増強などのシナプス可塑性の誘発は培養系では困難だが、スライス標本では再現性良く誘発できることから、本研究により初めて「内在性」グルタミン酸受容体の生理的な分子動態と可塑性への関与の様式が明らかになることが期待される。また、長期増強の誘発後、様々な時間間隔で光不活化を与えることで、長期増強のどのタイミングでグルタミン酸受容体輸送が加速されるかを明らかにする。これまでの電気生理学的研究から、長期増強の誘発直後の初期相と、誘発後2~3時間を経た後期相ではそのメカニズムが変化する可能性も提唱されており、本研究ではこの点についても直接的に検証する。

海馬スライス標本を用いた ANQX の光分解法では、細胞外記録による長時間の安定な記録が可能であることから、グルタミン酸受容体の動態とシナプス局在を制御する分子群のノックアウトマウスの解析に応用することが容易である。グルタミン酸受容体のシナプス局在を制御する分子として、PSD95をはじめとする足場タンパク群や TARP s と呼ばれる受容体関連分子群など、多くの分子が関与する可能性が指摘されている。本研究では、特にシナプス後肥厚が拡散補足 diffusional trapping の構造的基盤、すなわちグルタミン酸受容体の「受容体スロット」として作用する可能性に着目し、この「受容体スロット数」の動的な調節が長期増強の発現機構であるとの作業仮説に基づき、PSD95 ノックアウトマウスから作成した海馬スライスに ANQX の光分解法を適用することでこれを検証する。

## 3. 研究の方法

(1) 海馬スライスの CA1 野シナプスにおいて光反応性グルタミン酸受容体ブロッカー ANQX の光分解を行う。全般的な紫外線(UV)照射によって細胞膜表面のグルタミン酸受容体を架橋形成により不可逆的に阻害した後、シナプス応答が回復する時間経過を観

察し、グルタミン酸受容体の細胞内プールからのシナプス移行の速度論的解析を行う。また、側方拡散と拡散補捉によるシナプス「外」受容体からのシナプス移行について実時間解析するために、単一シナプスレベルの局所的な UV 照射によりシナプス後膜でのグルタミン酸受容体のみを光不活化する。また、長期増強誘発後さまざまなタイミングで光不活化を行い、これらの過程が長期増強 (LTP) のどのタイミングで加速されるかを解析する。

本研究では、海馬スライスに光反応性グルタミン酸受容体ブロッカーである ANQX の光分解法を適用する。ANQX 投与と光照射を組み合わせ、細胞膜上の AMPA 型グルタミン酸受容体を不可逆的に阻害し、その後のシナプス応答の回復の程度と時間経過を計測することで、グルタミン酸受容体のシナプス移行の分子動態を明らかにする。細胞外から ANQX を投与し紫外線 (UV) 照射を行うと、ANQX はグルタミン酸受容体のリガンド結合部位に不可逆的に結合し分子間架橋を形成することで、受容体応答を持続的にブロックする。マウス海馬スライス標本において、グルタミン酸性興奮性シナプス後電位 (EPSP) を記録し、ANQX 投与後に紫外線 (UV) を照射し、EPSP の抑制からの回復の時間経過を調べ、内在性グルタミン酸受容体のシナプス移行の動態を解析する。申請者は ANQX の合成法に関する論文が報告された後、直ちにカスタム合成に取り掛かり、また実験条件の最適化を図ることで、スライス標本における適用を可能にしている。

光反応性 AMPA 型グルタミン酸受容体ブロッカー ANQX は紫外線 (UV) 照射によりグルタミン酸受容体と分子間架橋を形成し、不可逆的に受容体応答を抑制する。照射の領域やタイミングを制御することにより空間的・時間的にコントロールされた興奮性シナプス伝達の不活化 (抑制) が可能になる。本研究では、光学的手法による時間的分解能を生かして、光不活化後のシナプス応答の回復の程度と時間経過を計測し、シナプス後部のグルタミン酸受容体の動態、ターンオーバーと可塑性に伴う変化を明らかにする。

まず、CA1 野シナプスにおけるグルタミン酸受容体トラフィックの解析を行う。これまでの GFP 標識分子追跡法を用いた解析から、グルタミン酸受容体は細胞内プールから細胞膜表面に輸送されること、また長期増強 (long-term potentiation: LTP の誘発に伴いこの課程が促進されることなどが示されている。しかしながらこれらの研究では、GFP で標識した外来性のグルタミン酸受容体サブユニット (GluA1 など) を強制発現し蛍光観察を行うため、必ずしも内在性グルタミン酸受容体分子の生体内での挙動を反映しない可能性がある。そこで、内在性グルタミン酸受容体についても同様の分子挙動をとるかについてシナプス光不活化法を用いて検

討する。CA1 野シナプスの存在する放線層の細胞外に ANQX を急速投与し、全般的な光照射を与えることで、シナプスおよびシナプス外の細胞膜表面のグルタミン酸受容体を不活化する。光照射によりグルタミン酸受容体応答が减弱した後に、シナプス応答 (EPSP) が回復する時間経過を測定し、グルタミン酸受容体の細胞内プールからの膜移行、側方拡散、拡散補捉の全経過によるシナプス移行の速度論的解析を行う。また、入力線維に高頻度刺激を与え長期増強を誘発した後に、様々なタイミングで光不活化を行い、神経活動依存的なシナプス移行の加速がどの時点で見られるかについて解析を行う。

(2) さらに PSD95 等のロックアウトマウスを用いることで、グルタミン酸受容体輸送におけるシナプス後肥厚の役割について明らかにする。海馬スライス標本では細胞外記録による長時間の安定な記録が可能であることから、ロックアウトマウスを用いる解析に適用することも容易である。そこで、上記の全般照射による解析を種々の遺伝子改変マウスに適用することで、グルタミン酸受容体シナプス移行の分子メカニズムの解析を行う。AMPA 型グルタミン酸受容体のシナプス局在を制御する分子として、PSD95 をはじめとする足場タンパク群や TARPs と呼ばれる受容体関連分子群など、多くの分子が関与する可能性が指摘されている。このうち、PSD95 の全欠損型マウスでは、シナプスでの AMPA 型グルタミン酸受容体応答が低下し、また、高頻度刺激による長期増強が亢進することが報告されている (Beique et al., PNAS 103:19535-19540, 2006)。PSD95 は脳内のほとんどの興奮性シナプスに存在するシナプス後肥厚の主要成分であり、また AMPA 型グルタミン酸受容体の足場タンパクとして機能することから、前述の 3 ステップモデルの最終過程である拡散補捉 diffusional trapping の最重要因子、すなわち「受容体スロット」の分子実体と予想される。そこで、PSD95 ロックアウトマウスから作成した海馬スライスを用いて、全般的 UV 照射による光不活化実験を行い、グルタミン酸受容体のシナプス移行における PSD の役割を検証する。また、長期増強の誘発による影響についても検討する。なお、上述した PSD95 の全欠損型マウスは既に米国 Jackson Laboratory より購入し繁殖して実験に使用した。

#### 4. 研究成果

(1) ANQX の光分解を用いた AMPA 受容体の動態計測実験を行った。正常マウスから作成した海馬スライスを用いた解析では、静止状態では AMPA 受容体のシナプス移行はほとんど生じず、高頻度刺激により長期増強を誘発した際にシナプス移行が加速されることが示された。このうち、静止時にシナプス移行がほとんどみられないという点は、培養細胞

を用いた他の研究で得られた結論と異なる。培養細胞と脳スライスのシナプスでの定常状態での AMPA 受容体ターンオーバーの違いの原因として、培養細胞における成熟度の低いシナプスでは、AMPA 受容体の可動性が高いのではないかと、この仮説を立てた。PSD95 などの足場タンパクの発現レベルが低く、PSD95 ノックアウトマウスから作成したスライス標本の CA1 野シナプスでは、静止状態においてもシナプス移行の亢進がみられ、PSD95 は AMPA 受容体のシナプスに局在化し、シナプス内外の受容体輸送を制限する、いわゆる「受容体スロット」としての機能を有すると考えられた。培養細胞では、スライス標本のシナプスよりも PSD95 の発現量が低く、AMPA 受容体の可動性が高くシナプス移行が高率で生じている可能性が想定された。

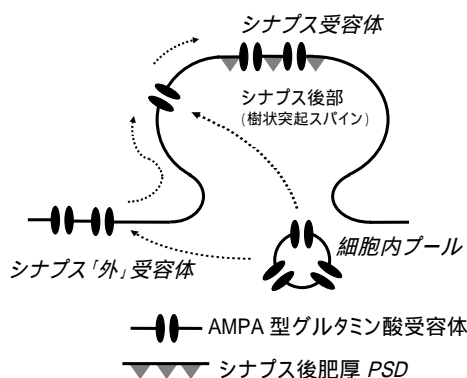


図1  
シナプス後肥厚の主要タンパクである PSD95 による AMPA 型グルタミン酸受容体のシナプス動態の制御

(2) さらに、もう一つのグルタミン酸受容体であるカイニン酸型グルタミン酸受容体のシナプス局在化における PSD95 の役割について検討を行った。カイニン酸型グルタミン酸受容体は強い局在性を示し、海馬 CA3 野苔状線維シナプスなど特定のシナプスに選択的に発現することが知られている。苔状線維シナプスでは AMPA 型受容体を介する速い成分の興奮性シナプス後電流に加えて、カイニン酸型受容体を介する遅い成分の二成分からなる興奮性シナプス後電流が記録されるが、PSD95 ノックアウトでは AMPA 型受容体成分が減弱し、カイニン酸型受容体成分もより強く減弱していることが示された。PSD95 は AMPA 受容体のシナプス後肥厚への局在化因子であることが知られているが、カイニン酸受容体のシナプス局在化にも重要な役割を担う受容体スロットとして機能していると考えられた。

## 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 2 件)

Obara N, Kamiya H, Fukuda S. Serotonergic modulation of inhibitory synaptic transmission in mouse inferior colliculus. *Biomed Res.* 査読有り. 35 巻 2014, 81-84  
DOI: 10.2220/biomedres.35.81

Kamiya H. Photochemical inactivation analysis of temporal dynamics of postsynaptic native AMPA receptors in hippocampal slices. *J. Neurosci.* 査読有り. 32 巻 2012, 6517-6524  
DOI:  
10.1523/JNEUROSCI.0720-12.2012

[学会発表](計 8 件)

Kamiya H. Local control of axonal excitability of hippocampal mossy fibers. 第 120 回日本解剖学会総会・全国学術大会、第 92 回日本生理学会合同大会(招待講演), 2015 年 3 月 22 日, 神戸国際会議場(兵庫県神戸市)

神谷 温之. 軸索の神経生物学: 膜興奮と伝播. 第 120 回日本解剖学会総会・全国学術大会、第 92 回日本生理学会合同大会(招待講演), 2015 年 3 月 22 日, 神戸国際会議場(兵庫県神戸市)

Kamiya H. Photoinactivation analysis of synaptic AMPA receptors in PSD-95 knockout mice. *Neuroscience* 2014, 2014 年 11 月 19 日, Washington DC Convention Center (Washington DC, USA)

Kamiya H. PSD-95 limits synaptic delivery of native AMPA receptors in situ. *Conferences Jacques Monod*, 2014 年 06 月 14 日, CNRS ロスコフ生物研究所 (Roscoff, France)

Kamiya H. Input-selective synaptic photoinactivation at the hippocampal mossy fiber synapse. *Neuroscience* 2013, 2013 年 11 月 11 日, San Diego Convention Center (San Diego, USA)

Kamiya H. Photoinactivation analysis of synaptic AMPA receptor dynamics. 4th European Synapse Meeting, 2013 年 08 月 29 日, Bordeaux University

(Bordeaux , France)

Kamiya H. Photochemical approach for analysis of AMPA receptor dynamics . 第 90 回日本生理学会大会 ( 招待講演 ) , 2013 年 3 月 27 日 , タワーホール船堀 ( 東京都 )

Kamiya H. Photoinactivation of AMPA receptors in hippocampal CA1 synapse at physiological temperature. Neuroscience 2012, 2012 年 10 月 13 日, Ernest N. Morial Convention Center (New Orleans, USA)

〔その他〕  
ホームページ等

北海道大学大学院医学研究科神経生物学分野ホームページ

<http://www.hucc.hokudai.ac.jp/~e20632/index.htm>

北海道大学プレスリリース「海馬神経伝達を光でスイッチ・オフ～記憶形成の時間経過を解明～」

[http://www.hokudai.ac.jp/news/120509\\_pr\\_med.pdf](http://www.hokudai.ac.jp/news/120509_pr_med.pdf)

脳科学辞典「カイン酸型グルタミン酸受容体」鈴木江津子・神谷温之、査読有り

<http://bsd.neuroinf.jp/wiki/カイン酸型グルタミン酸受容体>

## 6 . 研究組織

### (1) 研究代表者

神谷 温之 ( KAMIYA, Haruyuki )

北海道大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号 : 1 0 1 9 4 9 7 9