

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 5 日現在

機関番号：13401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25560425

研究課題名(和文)膜分子の絶対密度を解析する実験系の確立

研究課題名(英文)Quantitative localization of membrane molecules at nano-scale spatial resolution

研究代表者

深澤 有吾 (Fukazawa, Yugo)

福井大学・医学部・教授

研究者番号：60343745

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：生物のからだの中ではタンパク質をはじめとする生体分子がお互いに相互作用することで、機能が創出されています。ですから、個々の生命機能に関わる生体分子を明らかにし、それらの分布を正確に見積もることができれば、生命現象の素過程や疾患原因の理解を深め、疾患の治療法を開発することにも繋がると考えられます。しかし、各タンパク質の存在場所と量を正確に知ることは現在の技術を用いても容易では有りません。そこで本研究課題では、既存の分子分布解析法の改良を行い、シナプスに発現する2種の分子分布をこれまでより高い空間分解能と感度で明らかにしました。

研究成果の概要(英文)：Each of the biological phenomenon or functions of our body is generated by the interaction among molecules at subcellular and cellular levels. Thus, in order to deepen our knowledge about underlying mechanisms for the biological phenomenon and to develop new therapeutic approaches for diseases, it is important to uncover quantity (expression density) of individual bio-molecules at nano-scale spatial resolution. However, it is not possible to obtain such information by conventional molecular localization techniques. Here in this research project, I introduced several optimizations in SDS-digested freeze-fracture replica labeling and revealed localization of several ion channels in neuronal plasma membrane.

研究分野：分子神経解剖学

キーワード：電子顕微鏡 生体分子 分子局在 分子定量

1. 研究開始当初の背景

生命現象の理解はその現象を支える生体分子の同定とその分子の組織や細胞での発現パターンを解明することで飛躍的に深まった。しかし同時に、個々の生命現象は多種類の分子間相互作用によって成り立っており、各分子の相対的な量の違いによって、どの現象が誘導されるのかが変わることも明らかにされている。そこで関連するそれぞれの分子の数(濃度)をそのばらつきを含めて正確に知ることが実際に生体内で起きている現象を理解する上で重要と考えられる。既に生化学や分析化学的な手法を用いて、個体を構成する全タンパク質の定量に関する研究が行われている(Taniguchi et al., Science 2010)。しかし、現在行われている研究は単細胞生物を対象にしており、多細胞生物の個々の細胞で、特定の機能に關与する全ての生体分子を絶対定量する試みは報告されていない。

80年代後半以降は分子同定が猛烈な勢いで進んでいた時代で、それぞれの現象のカギとなる遺伝子産物が急速に同定され、各現象に關与する遺伝子産物が日々増えていった時代だった。しかし、個々の組織や細胞で現象が起こる場ではある1種類の分子の有無で生体現象の有無が決まる筈がないことは自明であり、当時院生だった申請者はこの様な研究の流れの先には、「現象が起きる細胞(場)毎に相互作用するそれぞれの分子の数やそのばらつきを検討することが求められる日が来る」と考えていた。実際、ポストドク時代に神経細胞の樹状突起棘のアクチン線維の増加がシナプス伝達の長期増強現象に伴い起き、現象の長期化に重要であることを発見した際(Fukazawa et al., Neuron 2003)、アクチン線維の量がいかにして伝達増強の長期化を引き起こしているかを理解するにはシナプス伝達に直接關与する分子の時空間的発現変化に関する情報が必要となった。そこで、生理学研究所に移り「AMPA型グルタミン酸受容体(AMPA)の定量的シナプス局在」を電子顕微鏡レベルで解析する研究に着手した(Antal, Fukazawa et al., J Neurosci 2008, Tarusawa et al. J Neurosci 2009)。この過程で機能ドメイン単位の分子の量とそのばらつきのどちらもが生理的に重要な意味を持つことを実感し、更に現行のSDS処理凍結切断レプリカ標識法が改良により、より高感度に細胞膜上分子の絶対定量を行えるようになると考えた(Fukazawa & Shigemoto. Curr Opin Neurobiol, 2012)。

2. 研究の目的

対象現象に關わる分子の種類とその存在量(濃度)を正確に把握し、それらの相互作用と機能発現との相関や因果關係を検証することを可能にするため、SDS-digested Freeze-Fracture Replica 分子標識法を膜分子の絶対定量測定が可能な方法に改良する工

夫を行い、将来、各機能分子の絶対量に基づいて生命現象を理解したり、或いは予測することを可能にする技術とすることを目的とした。

3. 研究の方法

生体膜分子の絶対定量を可能にする目的で、以下の項目について方法論の改良を行う。

(1) 抗体標識法の改善

現行の抗体を用いた分子標識法を種々の免疫標識前処理法と組み合わせることで検出感度を向上させる。

(2) レプリカ上分子の形態観察による分子同定技術の確立

レプリカ電子顕微鏡画像の空間解像度を向上し、膜分子の詳細な構造情報を取得することで、分子同定を行う試み。分子の形により分子同定するので理論上100%の検出感度を得られる。

(3) 代謝標識法の応用

生体内の特定の分子に標識を共有結合で付加する化学反応を応用して、標的分子の高感度検出を行う方法をレプリカ標識法に適用する。

4. 研究成果

実験計画(1)に関しては、抗体反応の洗浄後にグルタルアルデヒド処理を導入することにより、最終抗体反応量とS/Nが向上するかを検討し、標識量の有意な増加を認めた(図2参照)。

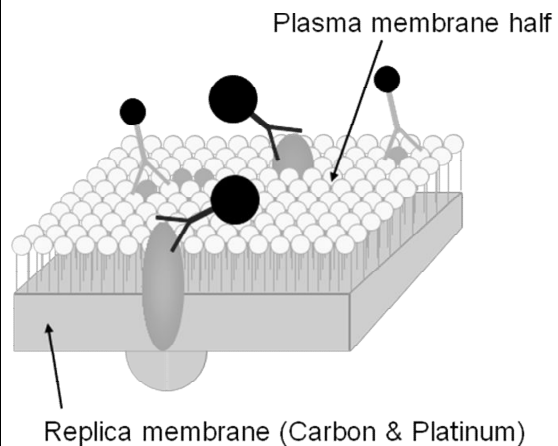


図1 SDS-FRL法の模式図。

凍結切断レプリカの表面には膜分子(タンパク質と脂質)が補足されており、特異抗体などのプローブを用いて標識することが可能である。図下面の灰色の部分は膜の凹凸情報を可視化するためのプラチナと分子補足と膜の強化のための炭素で構成された薄膜である。

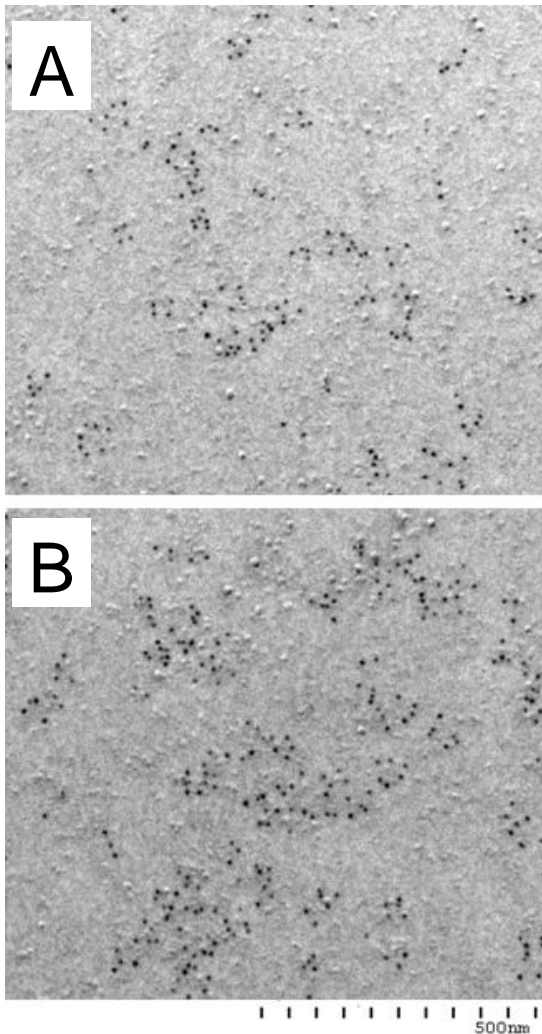


図2 標識効率へのグルタルアルデヒド処理の影響。

マウス CA1 錐体細胞上に発現する KCC2 分子を標識対象とし、抗体反応後にグルタルアルデヒドを処理することで、免疫金標識(黒い点)量の増加が認められるかを検討した実験結果を示す。A: 処理無し。B: 処理有り。処理により標識密度が倍増した。

実験計画(2)では、AMPA 抗体により標識されるレプリカ膜上の膜内粒子(intra-membraneparticles: IMPs)の形状を電子顕微鏡により観察・撮影し、非標識 IMP との差を検討した。同様に、NMDA 受容体を構成する NR1 subunit に対する抗体で標識された IMP の形状とも比較を行った。しかし、これらの比較から AMPAR により標識される IMP に特有の形状情報は得られなかった。これはレプリカ作製時に用いたプラチナ原子の拡散運動による空間分解能の低下による可能性が疑われた。

実験計画(3)は、申請者の異動による研究

計画の遅れから着手することができなかった。しかし、研究期間終了後も行ってゆく予定である。

成果としては実験計画(1)により明らかになった標識実験手法の改良を、国内外の研究者を受け入れて行った標識実験に取り入れ、カリウムチャンネルやグルタミン酸受容体、GABA 受容体の解析を行い、原著論文として6編の研究報告とシンポジウムや招待講演として3回の学会発表を行った。

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6件)

Javdani F, Holló K, Hegedűs K, Kis G, Hegyi Z, Dócs K, Kasugai Y, Fukazawa Y,

Shigemoto R, Antal M. (2015) Differential expression patterns of K⁺/Cl⁻ co-transporter 2 in neurons within the superficial spinal dorsal horn of rats. *J Comp Neurol*. doi: 10.1002/cne.23774. [Epub ahead of print]

(査読有り)

Mansouri M, Kasugai Y, Fukazawa Y, Bertaso F, Raynaud F, Perroy J, Fagni L, Kaufmann WA, Watanabe M, Shigemoto R Ferraguti F. (2014) Different subsynaptic localization of type 1 metabotropic glutamate (mGlu1) receptors at glutamatergic and GABAergic synapses in the rodent cerebellar cortex. *Eur J Neurosci* 41: 157-67. doi: 10.1111/ejn.12779 (査読有り)

Garcia-Negredo G, Soto D, Llorente J, Morato X, Galenkamp KMO, Gomez-Soler M, Fernandez-Dunas V, Watanabe M, Adelman JP, Shigemoto R, Fukazawa Y, Lujan R, Ciruela F. (2014) Coassembly and Coupling of SK2 Channels and mGlu5 Receptors. *J Neurosci* 33: 14793-802. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2038-14.

(査読有り)

Rubio ME, Fukazawa Y, Kamasawa N, Clarkson C, Molnar E, Shigemoto R (2014) Target- and input-dependent organization of

AMPA and NMDA receptors in synaptic connections of the cochlear nucleus. J Comp Neurol 522: 4023-42. doi:10.1002/cne.23654
(査読有り)

Ballesteros-Merino C, Watanabe M, Shigemoto R, Fukazawa Y, Adelman JP, Luján R. (2014) Differential subcellular localization of SK3-containing channels in the hippocampus. Eur J Neurosci 39: 883-892. doi: 10.1111/ejn.12474 (査読有り)

Aziz W, Wang W, Kesaf S, Mohamed AA, Fukazawa Y, Shigemoto R. (2014) Distinct kinetics of synaptic structural plasticity, memory formation and memory decay in massed and spaced learning. PNAS 111: E194-202. doi: 10.1073/pnas.1303317110
(査読有り)

[学会発表] (計 3 件)

深澤有吾 「免疫電子顕微鏡法による神経細胞の細胞膜上分子分布の定量解析」 第120回日本解剖学会全国学術集会・第92回日本生理学会大会 合同大会, 神戸国際会議場(神戸市), 2015年3月

深澤有吾 「SDS 処理凍結切断レプリカ標識法を用いた神経科学研究」 日本顕微鏡学会 第70回記念学術講演会 幕張メッセ国際会議場(千葉市), 2014年5月

深澤有吾 「AMPA 型グルタミン酸受容体の微小空間配置とその生理的意義」 日本解剖学会・第119回全国学術集会, 自治医科大学(下野市), 2014年3月

[図書] (計 1 件)

Fujimoto T, Fukazawa Y (2013) Electron microscopy of biological membrane. Encyclopedia of Biophysics. London: Springer. ISBN 978-3-642-16711-9. doi 10.1007/978-3-642-16712-6

[産業財産権]

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

[その他]
ホームページ等
<http://kaibou2.med.lab.u-fukui.ac.jp/>

6 . 研究組織

(1) 研究代表者
深澤 有吾 (FUKAZAWA, Yugo)
福井大学・医学部・教授
研究者番号 : 60343745

(2) 研究分担者
なし

(3) 連携研究者
なし