

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 22 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2014

課題番号：26560457

研究課題名(和文) シナプスグルタミン酸受容体動態の定量的計測

研究課題名(英文) Measuring dynamics of synaptic glutamate receptors

研究代表者

尾藤 晴彦 (Bito, Haruhiko)

東京大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：00291964

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、近年開発されたケミカルタグを用い、シナプス可塑性と連動して発生するグルタミン酸受容体の側方拡散とexo-endocytosisを、スパイン等の局所マイクロドメインにて、高感度かつ実時間で計測する手法の開発を試みた。膜非透過性低分子プローブの蛍光標識条件の最適化を実施し、海馬初代培養神経細胞への遺伝子導入の最適化を行い、受容体ダイナミクスのイメージング計測法を開発した。さらにパルスチェース測定可能な蛍光リガンドのスクリーニングを行い可視化実験に供することのできるコンパウンドを同定した。予備的にこれらのイメージング条件を統合し、可塑性刺激時のGluA1の動態計測を実施した。

研究成果の概要(英文)：In this study, we aimed to develop a sensitive real-time imaging method which takes advantage of recently introduced wash-free chemical ligands to probe the lateral diffusion and exo-endocytosis of glutamate receptors during synaptic plasticity in single spines. AMPA receptor subunits in which enzyme tags were introduced were expressed and transfected into primary hippocampal neurons in culture, and an expression protocol was determined to express the exogenous surface receptors to a degree comparable to endogenous synaptic glutamate receptors. Using screened small molecular weight chemicals, we further developed a versatile surface receptor imaging protocol. Finally, we identified a useful chemical ligand that enabled pulse-chase labeling and imaging of newly membrane-inserted receptors. Preliminary experiments were carried out to test these imaging tools and to measure real-time GluA1 dynamics in neurons undergoing plasticity.

研究分野：神経生化学

キーワード：脳神経 神経科学 シグナル伝達

1. 研究開始当初の背景

学術的背景

海馬神経細胞では神経活動依存的な AMPA 型グルタミン酸受容体 (AMPA) の動態は、シナプス伝達効率の長期増強に重要であることが知られている。シナプス膜における AMPAR の分子数の増減は細胞内小胞輸送、開口放出による膜挿入、細胞膜上での側方拡散などの機構が考えられており、その動態を可視化しようとする試みが多く報告されている。これまでの報告によって、AMPA のシナプス輸送には細胞膜への膜挿入および細胞膜上での側方拡散が特に重要であることが分かりつつあるが、厳密にそれらを区別して解析することが困難であった。

何をどこまで明らかにするのか

本研究計画では、電気刺激による LTP におけるスパイン容積増大を単一シナプスレベルで効率よく可視化する実験系がすでに構築されている (Okuno et al. Cell 2012; Fujii et al. Cell Rep 2013) ことに基づき、i) extracellular surface のグルタミン酸受容体のみを選択的標識、ii) 細胞内から細胞表面への受容体挿入を別個のカラーで染色 (Komatsu, Johnsson, Okuno, Bito et al. JACS 2011)、を同時に成功させ、LTP 発現時のグルタミン酸受容体の側方拡散と受容体挿入のイメージングをスパイン増大イメージングと同時に実施する。これにより、スパイン容積増大中 (初期 1 min) と、容積安定化中 (その後 5min 程度) の過程を区別しながら、長期可塑性の初期相におけるグルタミン酸受容体ダイナミクスの制御を明らかにする。さらに、Arc 誘導などと組み合わせ、可塑性の後期相におけるグルタミン酸受容体ダイナミクスの制御についても解明する。

学術的特徴と意義

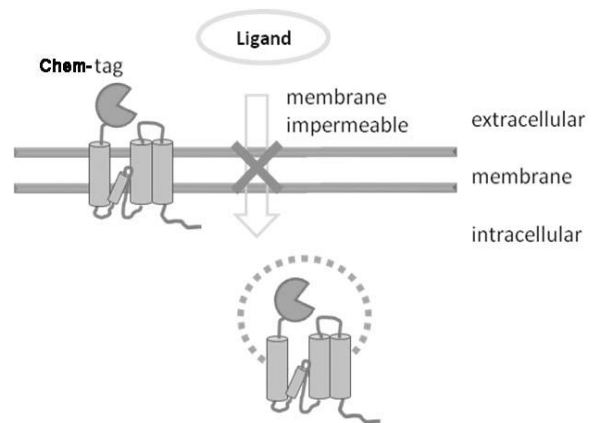
活動依存的なシナプス膜への GluR1 の挿入は、

記憶・学習の基礎過程である長期増強の成立を左右する重要な問題である。今後、シナプスレベルでの GluR1 の動態の kinetics を解明することが可能となれば、記憶・学習機能の基盤解明のみならず、認知機能の低下に伴う神経疾患の病態解明や新薬・治療法の開発へつながる可能性を大きく秘めている。

2. 研究の目的

近年開発された wash-free のケミカルタグを用い、シナプス可塑性と連動して発生するグルタミン酸受容体の側方拡散と exo-endocytosis を、スパイン等の局所マイクロドメインにて、高感度かつ実時間で計測する手法を開発する。これらの技術開発により、長期増強・長期減弱時の受容体ダイナミクスの全貌を明らかにする。

3. 研究の方法



ポストシナプス AMPA 酸受容体の細胞外領域に酵素タグ (上記図の Chem-tag) を付与し、膜非透過性蛍光リガンドを用い、側方拡散のイメージングを実現する。さらに、別色の高親和性 wash-free リガンドを併用することで、pulse-chase による側方拡散分子と新規膜挿入分子の同時可視化技術を樹立する。これらの技術の応用として、長期増強・長期減弱時の GluA1, GluA2 受容体の包括的ダイナミク

ス動態解析を実現する。

4. 研究成果

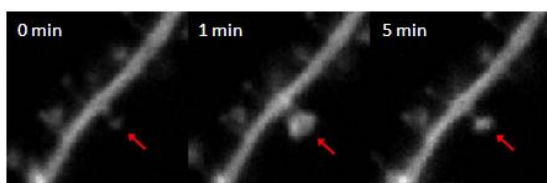
蛍光標識の条件最適化

初代培養海馬神経細胞に AMPAR を発現させて蛍光標識を行うため、まず HEK293 細胞を用いた条件検討を実施した。細胞外領域に酵素タグを挿入した AMPAR の GluA1, GluA2 サブユニットを HEK293 細胞に発現させ、数種類の細胞膜非透過性の低分子合成プローブで蛍光標識を行い、その蛍光強度を FACSソーティングにより測定する。結合定数が速い蛍光プローブを決定した。引き続きこのプローブを用い、初代培養神経細胞に発現した GluA1, GluA2 のライブイメージングを試みたところ、十分なシグナルを得ることに成功した。

初代培養海馬神経細胞の発現・刺激条件最適化

まず、初代培養神経細胞への発現条件の最適化を行った。CaMKII プロモーターを用いた発現実験では、海馬初代培養細胞へのタグ付き受容体発現量は、N-末端細胞外領域抗体による定量に基づき、14 div 以降であれば、概ね内因性受容体の 1~2 倍の範囲に収まることが確認された。そこで、以降、本実験による膜上の受容体ダイナミクスの計測に大きな支障はないと考えられた。

次に、様々なシナプス刺激条件検討の一環として、AMPA のシナプス輸送の亢進が起こるとされる Gly 刺激や LTP 様フィールド刺激 (50Hz, 2s) について Ca²⁺ 指示薬 Fluo-4 を用いたイメージングを実施した。その結果、ポストシナプスのスパインへのシナプス入力、ポスト細胞の発火に先立ち生じることを確認した。



そこで、各種可塑性刺激を加え、スパイン容量増大がどの程度起こるかを測定した。Gly 刺激や LTP 様フィールド刺激によって樹状突

起におけるスパイン構造が一定の割合で増大することをこれまでに確認した。さらに LTD 様刺激や chemical LTD 刺激 (NMDA-LTD 刺激や mGluR-LTD 刺激) についても同様の検討を行い、刺激依存的なスパイン容積減弱についても引き起こせる条件を同定した。

経時観察のための装置・撮像条件最適化

シナプス刺激依存的な AMPAR の動態の経時観察を行うため、CO₂ ステージチェンバーを実装した倒立顕微鏡を設置し、撮像条件を最適化した。

可塑性刺激下のグルタミン酸受容体動態観察

第1の実験として、細胞膜上の GluA1 を短時間で pulse 蛍光標識した後、経時観察を行い刺激後に増大した棘突起における蛍光強度の解析を行った。その結果、pulse label を用いた側方拡散の可視化においては、スパイン容量増大に伴うダイナミックな側方拡散による NMDA 依存性 GluA1 受容体容量増大を確認した。また、若干の違いはあるものの、GluA2 受容体についても、側方拡散による活動依存性スパイン容量増大と並行し観察することができた。

第2に、細胞膜上のほぼすべての GluA1 を pulse 蛍光標識した後、膜非透過性の chase 蛍光プローブ存在下でのリアルタイムな膜挿入の経時観察を行った。まず基底状態における細胞膜上の GluA1 の拡散と新規の膜挿入を別々の色で同時に可視化できるようにした。このような条件下で、側方拡散と受容体挿入の同時記録を実現する条件を決定し、LTP 条件下の受容体動態の解読を試みた。さらにその上で、可塑性刺激下での両者のシナプス輸送の貢献度合いを定量的に観察した。

これらの成果は、現在論文準備中である。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 2 件)

Bito H. Arc targeting to the synapses: inverse synaptic tagging rule and beyond. 48th Winter Conference on Brain Research. Big Sky, Montana, USA. 2015/01/25.

Bito H. Activity-dependent Arc expression: mechanism, function and application. 8th International Meeting on Metabotropic Glutamate Receptors. Taormina, Sicily, Italy. 2014/10/02.

〔図書〕(計 0 件)

〔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：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

尾藤 晴彦 (Bito, Haruhiko)
東京大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：00291964

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：