

「脳を知る」  
平成11年度採択研究代表者

## 重本 隆一

(岡崎国立共同研究機構・生理学研究所、教授)

### 「細胞膜上機能分子の動態と神経伝達調節メカニズム」

#### 1. 研究実施の概要

神経細胞の細胞膜には、受容体、チャネルなど様々な機能分子が発現しているが、これらの動的な分布の変化と、シナプスにおける神経伝達機能の調節の関連については不明の点が多い。本研究課題では、高解像度で、あるいはリアルタイムで膜上機能分子の動態や相互作用を明らかにできる方法を確立し、そのダイナミズムに基づいた神経伝達調節のメカニズムを、分子レベルから個体レベルに至る先導的な方法論によって探求する。平成12年度は、平成11年度に引き続き、各グループで、課題達成のための方法論の開発、改良を進めるとともに、現在確立している方法による細胞膜上機能分子の構造機能連関、局在、動態、分子間相互作用の解析を行ってきた。方法論については、凍結切断レプリカ免疫標識法(SDS-FRL法)の改良、定量的電子顕微鏡法の開発、生細胞での観察と機能解析のためのモデル系の導入、分子間 FRET 法の開発などを進めている。また具体的なテーマとしては、定量的解析法を用いたグルタミン酸受容体密度の測定、代謝型グルタミン酸および GABA 受容体の電子顕微鏡的局在解析、電位依存性カルシウムチャネルの構造と神経細胞における局在解析、mGluR3 と AQP4 の共存メカニズムの解析、海馬神経細胞における蛍光蛋白質 GFP で可視化されたシナプス構成蛋白質の動態解析、シナプス形成の時間軸にそったシナプス局在の分子機構の解明、代謝型グルタミン酸受容体のクラスター化分子による機能修飾の解析などがある。

#### 2. 研究実施内容

##### 1) 電子顕微鏡的方法の開発とスクリーニング(重本グループ)

受容体の脳内局在様式の解析については、preembedding 法や postembedding 法などの従来法を用いて、GABA<sub>B</sub> 受容体や代謝型グルタミン酸受容体(mGluR3)のシナプスとの位置関係を明らかにした。さらに SDS-FRL 法により多くの機能分子の解析を通じて分子間の共存や相互作用を見い出すためのスクリーニングを行っている。

##### a) SDS-FRL 法によるスクリーニングの進捗状況

神経伝達物質受容体とチャネルを中心に現在までに、約60種類ほどの分子に

ついて SDS-FRL 法による小脳を用いた局在のスクリーニングを行った。現在までの結果では、約半数の例で特異的な標識が認められ、既に知られていた局在を確認する所見とともに新しい所見も数多く見出ししている。方法論のさらなる改良に向け、より安定に定量的解析が可能となるようにさらに検出感度を改善すること、レプリカ上の均一な蛋白保持などが必要であり現在検討中である。

#### b) 定量的電子顕微鏡法の開発状況

定量的解析のための別の方法として、抗体による免疫標識のみならず、遺伝子操作を用いた分子標識を行う方法を考えている。現在、多くの機能分子で GFP をはじめとする蛍光物質を融合タンパク質として発現させることが行われており、当面これを電子顕微鏡レベルでの標識に利用することが現実的と考えられる。AMPA channel については、peak-scaled non-stationary fluctuation analysis のような電気生理学的解析を併用することで、標識を機能的なチャンネル数に対して calibrate する。これにより、その他のシナプスにおいても機能的なチャンネル数がある程度推定することができると考えている。

#### c) 代謝型グルタミン酸受容体 (mGluR7) の機能と局在調節

mGluR7 は、従来 Group III mGluR の一つとして伝達物質放出を調節すると考えられてきたが、新たな情報伝達経路が見出される (Perroy et al., 2000) と共に前シナプスの放出部位に集積するメカニズムが一部解明された (Boudin et al., 2000)。また、mGluR7 の標識細胞依存性の伝達物質放出部位への集積メカニズムを探るために、岡部の開発した海馬培養細胞をモデル系として試み、特定の介在神経細胞にシナプスする終末のみに mGluR7 が集積する現象の再現に成功した。現在、この現象に影響を与える各種の条件や刺激を探ると共に、標的神経細胞に特異的に発現している接着分子やシグナリング分子の特定するための実験を行っている。

#### d) 電位依存性カルシウムチャンネル ( $\alpha 1A$ subunit) の局在

藤本らは細胞間結合装置構成分子、Fc 受容体、Na-K-ATPase のようなイオンポンプ分子ならびに膜脂質の膜平面上における二次元的な分布状態ならびに種々の生理的变化に伴うその動態を明らかにした。さらに電位依存性カルシウムチャンネル ( $\alpha 1A$  subunit) の局在を検討し、 $\alpha 1A$  がシナプス領域ではやや周辺部に局在すること、樹状突起細胞膜上では大きなパッチ (直径 1 ミクロン程度) を形成して存在していることを明らかにした。

### 2) 生細胞での観察と機能解析 (岡部グループ)

#### a) GFP 分子の波長バリエーションを用いた複数シナプス分子の局在の同時観察

GFP 分子とシナプス機能分子の融合蛋白質を用いた観察系を更に発展させ

るために、GFP 分子の波長バリエーションである YFP および CFP 分子とシナプス前部、シナプス後部の機能分子の融合蛋白質を作成し、複数の分子種の局在を時間軸に沿って観察する、多波長動態解析の手法を開発した。この方法を用いることにより、これまで明らかでなかった、シナプス形成過程における複数の分子のシナプスへの集合の順序を確定することが可能となった。PSD-95-YFP 分子と CFP 分子を同時に発現させることで、シナプス形成過程における spine 構造の形成とシナプス後肥厚部の形成の時間的關係について解析した。また、シナプス前部蛋白質である synaptophysin と CFP 分子の融合蛋白質を用いることで、PSD-95 と synaptophysin のシナプス部位への集積の時間關係も明らかにした。

#### b) 神経活動依存的なシナプス分子の局在変化

シナプス後部構造に局在し、代謝型グルタミン酸受容体と結合する PSD-Zip45 (Homer1c) 分子について、GFP との融合蛋白質を作成し、その動態を海馬神経細胞において解析した。PSD-Zip45 は神経活動依存的にその局在を変化させる分子であり、PSD-95 分子とは全く異なった動態を示すことが明らかになった。

#### c) 2光子励起顕微鏡を用いたシナプス微細構造の動態解析

神経細胞特異的プロモーターと組み換えアデノウィルスを組み合わせることで、海馬スライス培養系において錐体細胞特異的に GFP などの遺伝子発現を行うことができるようになった。この系を用いて、GFP を発現した神経細胞の樹状突起の形態を 2光子励起顕微鏡法を用いて解析し、dendritic spine の動的な形態変化を解析することができた。今後はこの系を用いて、神経シナプスにおける細胞接着分子の動態を解析する予定である。

#### d) 多くの蛍光分子の励起波長選択性が 2光子励起法の場合緩やかであるので、GFP と蛍光指示薬の同時測定が理論的には可能である。この方法を具体化するため、カルシウム指示薬の 2光子励起法における波長特異性を調べ、GFP 融合シナプス分子の局在変化と細胞内カルシウムの同時検出系を構築する。現在予備的な実験を開始しており、1光子励起法による解析結果との比較を行っている。

### 3) 構造機能連関と分子間相互作用 (久保グループ)

久保グループでは、内向き整流性 K<sup>+</sup> チャネルのポア内側の構造について解析し、内向き整流性を決定する新たな構造基盤を同定した。分子間機能協関については、代謝型グルタミン酸受容体のクラスター化分子による機能修飾について解析し、クラスター化分子の存在によりリガンド感受性が変わることを見いだした。また、新規高分子量 GTP 結合蛋白質と結合する分子群の two hybrid 法によるク

ローニングを進め、新規分子群と共に GABA<sub>A</sub> 受容体の 1 サブユニットを同定した。今後、これらの研究をさらに発展させると共に、動的構造機能連関と機能協関をモニターするための FRET 法による解析を目指していく。

#### 4) 共存メカニズムの解析 (重本グループ)

現在、はっきりとした共存が確認されている mGluR3 と AQP4 について、その共存メカニズムと機能的な意義を探る段階に来ている。AQP4 の機能を調べるために 2 光子顕微鏡を用いた cell volume assay 法を起ち上げ、低浸透圧刺激による water influx を高速で検出し permeability が計測できるようになった。今後、各種の刺激による mGluR3 と AQP4 の共存変化や AQP4 を介した water permeability の変化を検討する。また、この共存のメカニズムを明らかにするため、mGluR2 と mGluR3 のキメラ分子を発現させた細胞を作製した。mGluR2 は mGluR3 に極めてよく似たアミノ酸配列をもっているが、脳では同じ細胞に発現しておらず、培養細胞を用いたモデル系でも共存がみられないことから、mGluR3 と AQP4 の共存に必要なアミノ酸配列は、mGluR3 特異的な配列のどこかに含まれていることが予想される。さらに、mGluR3 と AQP4 の共存には第 3 の分子が必要であることが予想され、dystrophin complex の関与を現在検討している。

#### 3. 主な研究成果の発表 (論文発表)

Ichise T, Kano M, Hashimoto K, Yanagihara D, Nakao K, Shigemoto R, Katsuki M & Aiba A (2000): mGluR1 in cerebellar Purkinje cells essential for long-term depression, synapse elimination, and motor coordination. *Science* 288 : 1832-1835.

Perroy J, Prezeau L, De Waard M, Shigemoto R, Bockaert J & Fagni L (2000): Selective blockade of P/Q-type calcium channels by the metabotropic glutamate receptor type 7 involves a phospholipase C pathway in neurons. *J Neurosci* 20 : 7896-7904.

Boudin H, Doan A, Xia J, Shigemoto R, Huganir RL, Worley P & Crag AM (2000): Presynaptic clustering of mGluR7a requires the PICK1 PDZ domain binding site. *Neuron* 28 : 485-497.

Asai, K., Fujimoto, K., Harazaki, M., Kusunoki, T., Korematsu, S., Ide, C., Ra, C. and Hosoi, S.: Distinct Aggregation of b and g Chains of The High-Affinity IgE Receptor upon Cross-Linking. *J. Histochem. cytochem.*, 48 : 1705-1715, 2000.

Noda, T., Fujimoto, K. and Ide, C.: Annulate lamellae are interconnected by three distinct cisternal structures. *Acta histochem. cytochem.*, 34 : 103-110, 2001.

Miyashita, T. and Kubo, Y.: Extracellular Ca<sup>2+</sup> sensitivity of mGluR1  $\alpha$  associated with persistent glutamate response in transfected CHO cells.

*Receptors and Channels* 7, 25-40 (2000)

Miyashita, T. and Kubo, Y.: Extracellular  $\text{Ca}^{2+}$  sensitivity of mGluR1  $\alpha$  induces an increase in the basal cAMP level by direct coupling with Gs protein in transfected CHO cells. *Receptors and Channels* 7, 77-91 ( 2000 )

Kubo, Y. and Murata, Y.: Control of rectification and permeation by two distinct sites after the second transmembrane region in Kir2.1  $\text{K}^+$  channel. *Journal of Physiology* 531, 645-660 ( 2001 )

Saitoh, O., Masuho, I., Terakawa, I., Nomoto, S., Asano, T. and Kubo, Y.: RGS8 requires its N-terminus for subcellular localization and acute desensitization of G protein gated  $\text{K}^+$  channels. *Journal of Biological Chemistry* 276, 5052-5058 ( 2001 )

Soom, M., Schönherr, R., Kubo, Y., Kirsch, C., Klingner, R. and Heinemann, S. H.: Multiple  $\text{PIP}_2$  binding sites in Kir2.1 inwardly rectifying potassium channels. *FEBS letters* 490, 49-53 ( 2001 )

Kondo, M., Okabe, S., Sumino, R., and H. Okado.: High GluR1 /GluR2 expression ratio correlates with expression of  $\text{Ca}^{2+}$ -binding proteins in the rat forebrain neurons. *European Journal of Neuroscience*, 12, 2812-2822, 2000.

#### 英文著書

Shigemoto R & Mizuno N ( 2000 ): Metabotropic glutamate receptors : Immunocytochemical and in situ hybridization analyses. "Handbook of Chemical Neuroanatomy" ( Eds. Ottersen OP & Storm-Mathisen J ) Elsevier, Amsterdam, vol. 18 Glutamate, pp. 63-98.