

「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13年度は、課題達成のための方法論の開発、改良がかなり進み、新しい所見が得られつつある。まず凍結切断レプリカ免疫標識法 (SDS-FRL 法) の安定性や感度が改善するとともに、生体における局在や動態を正しく反映すると考えられる未固定凍結標本を用いた postembedding 法が確立した。これらにより、定量的な細胞膜上機能分子の動態解析を電子顕微鏡レベルで進める条件が整った。また、培養海馬神経細胞を用いたリアルタイム解析ではシナプス形成過程におけるシナプス分子の動的集合過程を可視化するための技術がさらに洗練され、複数の分子の観察法や GFP 融合シナプス分子の局在変化と細胞内カルシウム変化を同時に検出する系が確立された。さらに、リアルタイムで動的構造変化を解析する試みとして、代謝型グルタミン酸受容体 (mGluR1) のサブユニット間相互作用の FRET 法による検出を行っており、今後 FRET をより効率よく記録できるよう改良を進める。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や局在解析、代謝型グルタミン酸受容体の分子構築と機能制御機構の解明、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、海馬神経細胞における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、2光子励起顕微鏡によるシナプス微細構造の動態解析とカルシウム濃度変化の同時測定、神経活動依存的なシナプス分子の局在変化、新規高分子量 GTP 結合蛋白質 mOPA1 の機能解析、内向き整流性 K^+ チャネルの構造機能連関と RGS 蛋白による機能修飾などがある。

2. 研究実施内容

- 1) 受容体やチャネルの局在解析と電子顕微鏡的方法の開発およびスクリーニング (重本、藤本、Nusser)

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た mGluR3 や GABAB 受容体についてのシナプスとの位置関係を論文発表した (Tamaru et

al., Neuroscience, 2001; Kulik et al., Euro. J. Neurosci., 2002)。新しい電子顕微鏡的方法の開発の観点からは、SDS-FRL 法で3-10倍の感度の上昇とラベリングの均一性を確保することができた。Postnatal day3 のラットプルキンエ細胞をモデルとして用いた場合、電気生理学的方法により計算された single quanta によって activate される AMPA channel の density (1200 channels/ μm^2) を超える immunogold particle density (1490 particles/ μm^2) を達成した(図1)。その結果、信頼性の高い定量的解析が可能となり、Postnatal day3 のプルキンエ細胞シナプスにおいては、AMPA channel の density がかなり homogeneous であること(CV<0.2)、density とシナプスの大きさの間には相関が認められないことを明らかにした。今後は saturated dose の glutamate により、同定された single site で Sigworth-type の non-stationary fluctuation analysis を行い、各シナプスに存在する functional channel の絶対数と immunogold particle labeling を関連づけていく実験を行う。これにより原理的には脳の他の場所でも AMPA channel の絶対数を SDS-FRL

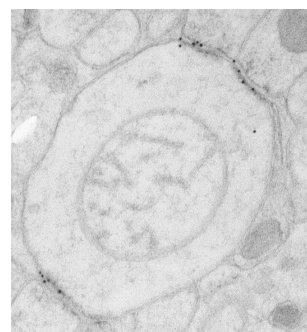


図1

法により推定することが可能となる。とりあえず、発達に伴う AMPA channel density の動態を計測していくと共に、LTP や LTD 等のシナプス可塑性発現にともなう AMPA channel density の変化を精密に計測する計画である。もう一つの potential の高い方法論として、未固定脳を用いた postembedding 法を確立した。膜機能分子

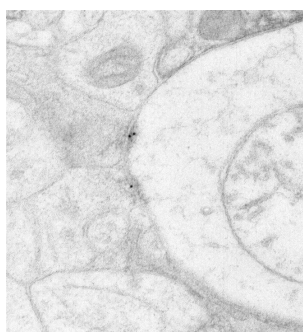


図2

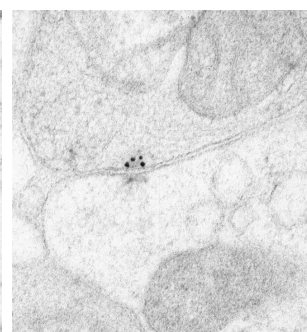


図3

は、種々の生理的あるいは非生理的刺激によって容易に局在変化をきたす。従って通常、電子顕微鏡用試料作製に固定液として用いられるアルデヒドのような化学物質による固定を施した場合、生体における局在や動態を正しく反映しない可能性がある。このため化学的固定ではなく、組織細胞を液体ヘリウムあるいは窒素により急速凍結固定する必要があるが、急速凍結固定法を神経組織の電子顕微鏡レベルでの微細構造解析に応用した報告はほとんどない。そこでまず我々は、凍結前の組織の処理、凍結条件や凍結後の処理などを独自に検討してきた。その結果、液体窒素による加圧凍結した後、アセトン凍結置換し樹脂包埋することによって微細形態の保持が良好な試料が得られることを確認した。この方法によりラット小脳における AMPA 型グルタミン酸受容体 (GluR2/3、図2; GluR4、図3)、NMDA 型グルタミン酸受容体 2A (NR2A)、グルタミン酸受容体 δ 2 (GluR δ 2、図4)、イノシトール3リン酸受容体1 (IP3R1、図5、6) など良好な標識を得た。GluR2/3、NR2A、GluR δ 2 がシナプス後肥厚 (PSD) にほぼ均一に分布しているのに対し、GluR4 は PSD の中央部に局在している。IP3R1 はプルキンエ細胞の樹状突起(図5)、細胞体、軸索(図6)にある滑面小胞体膜上に広く分布していることが確認された。樹状

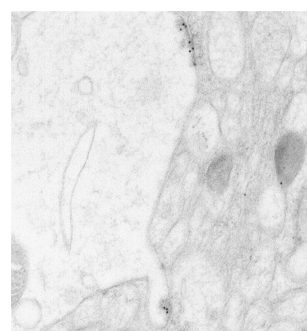


図4

突起(図5)、細胞体、軸索(図6)にある滑面小胞体膜上に広く分布していることが確認された。樹状

突起あるいは細胞体では、小管あるいは多数の小胞状の小胞体に IP3R1 の免疫陽性を認めたが、軸索では IP3R1 陽性の小胞体は主として小管状を呈しており、IP3R1 の機能を考える上で興味深い所見と考えている。今後はさらに、根本的な方法の開発として、遺伝子操作を用いた分子標識を

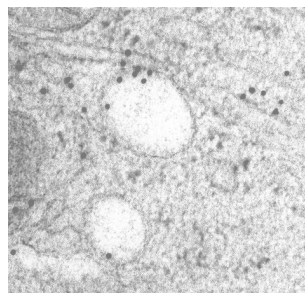


図5

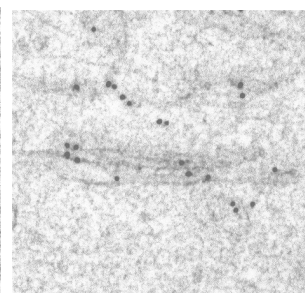


図6

行う方法を検討する。現在、メタルチオネインに重金属を結合させることで電子顕微鏡レベルでの標識とする実験を開始している。また、全く異なる観点からの試みとして活動依存的な標識法の開発を開始した。従来、テタヌス刺激などでカルシウムの強い増加が起こった神経終末や樹状突起では、カルシウムを沈殿として可視化することで電子顕微鏡的に可塑的変化の起こった部位を同定する方法が報告されている。この方法を発展させ、動物個体で生理的な刺激を用いて、活性化した神経要素を標識する予備実験が成功した。上記のような SDS-FRL 法や postembedding 法では、一般に生体脳において可塑的な変化が起こっているシナプスとそうでないものを見分けることができない。従って機能分子の動態を観察する場合に、活性化した神経要素を同定することは大変重要な意味を持つ。今後はカルシウムイメージングとこの方法を組み合わせ更に基礎的な検討を進めたいと考えている。

2) 生細胞での観察と機能解析 (岡部)

岡部研究室では、海馬培養神経細胞をモデル系として spine や synapse の形成と動態を解析し報告した (Okabe et al., J.Neurosci., 2001; Okabe et al., J.Neurosci., 2001)。

a) シナプス前部と後部構造の形成過程の GFP 分子の波長バリエーションを用いた解析

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、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積順序について解析した。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いて、spine 構造の形成の直後にシナプス後肥厚部の構成蛋白である PSD-95 の集積がおこる事が明らかになった。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 の集積に先立って、synaptophysin のシナプス前部への集積が起こる事も明らかになった。

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、NMDA 受容体からの比較的ゆっくりとしたカルシウム流入によりそのクラスターを分散させ、逆にカルシウムチャネルからの急激なカルシウム流入によってそのクラスター形成が促進される事が明らかになった。

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により、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 とシナプス後部分子のキメラ蛋白質の局在の時間的変化を解析する事ができるようになった。今後は細胞間の接着活性をカドヘリン等の膜蛋白質の機能阻害を起こすことで変化させ、その際のシナプス形態の変化を解析する予定である。

d) 神経細胞内における GFP シグナルとカルシウム濃度変化の2光子励起顕微鏡法による同時測定

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、GFP 融合シナプス分子の局在変化と細胞内カルシウム変化を同時に検出する系を構築した。プレ側の線維の電気刺激により引き起こされるシナプス後部側のカルシウム濃度変化を記録し、その後のシナプス後部における PSD-Zip45 の動態を解析する事で、シナプスを介した刺激による樹状突起でのカルシウム上昇が引き金となって、シナプス後部分子のリモデリングが引き起こされる事が明らかとなった。

3) 代謝型グルタミン酸受容体の分子構築と機能制御機構の解明およびサブユニット間相互作用の FRET 法による検出(久保)

久保研究室では、代謝型グルタミン酸受容体 (mGluR1) が示す細胞外 Ca^{2+} や Gd^{3+} などの多価陽イオン感知能を解析する過程において、発現系により mGluR1 の Gd^{3+} 応答能に差が見られることを見いだした。その分子基盤の一つとして、mGluR1 をクラスター化/離散化させる分子である Homer の有無を想定し、Homer の共発現が mGluR1 の受容体機能に及ぼす作用について、HEK293 細胞一過性発現系を用いて細胞内 Ca^{2+} 濃度の測定により解析した。その結果、(1) Homer の共発現が mGluR1 のグルタミン酸応答のピーク値・応答の立ち上がり速度・グルタミン酸に対する用量応答関係に影響を及ぼすこと、(2) mGluR1 をクラスター化させる分子である Homer1c の共発現により Gd^{3+} 投与に対する応答が出現することを明らかにした。さらに、(1) Homer 結合能を欠く mGluR1 の mutant P1147E では上記に示した Homer 共発現の影響が観察されないという結果から、mGluR1 と Homer との結合がグルタミン酸応答に対する性質に影響を与えていることを実証し、(2) mGluR1 の細胞表面での発現量に対する Homer 共発現の影響の免疫組織学的解析により、クラスター能を欠く Homer1a の共発現は細胞表面での mGluR1 の発現を増大させ、一方 Homer1c は細胞表面での発現を減少させることを示し、(3) Homer 分子が、グルタミン酸応答に対する影響と同様の効果を細胞外 Ca^{2+} に対する応答に関しても示すことを明らかにした。Homer がグルタミン酸に対する用量応答関係に与えた影響の一部は細胞表面における mGluR1 量の制御により説明できると思われる。しかし、このメカニズムでは Gd^{3+} 投与に対する応答が出現することを説明することはできないので、mGluR1 のリガンド受容という機能が Homer 分子との結合により何らかの質的变化を示していると考えられる。

一方、mGluR1 の分子内構造の変化を光学的に解析するために、GFP 融合蛋白質の作成による蛍光ラベルを試みる以下の実験を行った。構造解析の結果から、mGluR は、ホモ 2 量体で構成され、リガンドの結合により構造変化がおこること、リガンドの非存在化でもその揺らぎがあり、basal

activity を引きおこしていることが推定されている。この dynamic な構造変化を生理学的に捉えるために、mGluR1 の細胞内領域に 2色の蛍光蛋白 CFP もしくは YFP を融合させた分子を作成した。現在、2分子を共発現させることにより、FRET がおきるかどうかを、蛍光分光光度計による測定 蛍光波長スキャン、acceptor bleaching 法などにより解析中である。Preliminary な実験結果として、リガンド非存在下で若干のFRETを検出している。今後さらに、FRET 効率が、リガンドの投与やクラーター化分子 Homer 1c の共存により変化するかどうかについて解析を進める。また、construct についても、CFP や YFP の位置を変える、適当なリンカーを導入するなどの手法により、FRET をより効率よく記録できるよう改良する計画である。

3. 研究実施体制

(1) 重本グループ(岡崎国立共同研究機構生理学研究所)

- ①研究者名 重本隆一(教授)
- ②研究項目 受容体やチャンネルの局在と定量的解析

(2) 岡部グループ(東京医科歯科大学)

- ①研究者名 岡部繁男(教授)
- ②研究項目 海馬培養神経細胞を用いたシナプス構成蛋白質の細胞膜上での動態解析

(3) 久保グループ(東京医科歯科大学)

- ①研究者名 久保義弘(教授)
- ②研究項目 代謝型グルタミン酸受容体の分子構築と機能制御機構の解明

4. 研究成果の発表

(1) 論文発表

- Mion-S, Corti-C, Neki-A, Shigemoto-R, Corsi-M, Fumagalli-G, Ferraguti-F. Bidirectional regulation of neurite elaboration by alternatively spliced metabotropic glutamate receptor 5 (mglur5) isoforms, *Mol Cell Neuroscience* 17(6):957-72, 2001.
- Tamaru-Y, Nomura-S, Mizuno-N, Shigemoto-R. Distribution of metabotropic glutamate receptor mGluR3 in the mouse central nervous system: Differential location relative to pre- and postsynaptic sites, *Neuroscience* 106(3):481-503, 2001.
- Lopez-Bendito G, Shigemoto R, Lujan R, Juiz JM. Developmental changes in the localisation of the mGluR1alpha subtype of metabotropic glutamate receptors in Purkinje cells. *Neuroscience* 105(2):413-29, 2001.
- Kulik A, Nakadate K, Nyíri G, Notomi T, Malitschek B, Bettler B, Shigemoto R. Distinct localization of GABA_B receptors relative to synaptic sites in the rat cerebellum and ventrobasal thalamus. *Eur. J. Neuroscience* 15:291-307, 2002.
- Okabe, S., Urushido, T., Konno, D., Okado, H., and K. Sobue. Rapid redistribution of the postsynaptic density protein PSD-Zip45 (Homer 1c) and its differential regulation by NMDA receptors and calcium channels. *Journal of Neuroscience*, 21,9561-9571,2001.

- Okabe, S., Miwa, A., and H. Okado. Spine formation and correlated assembly of presynaptic and postsynaptic molecules. *Journal of Neuroscience*, 21, 6105–6114, 2001.
 - Umeda, T. and S. Okabe. Visualizing synapse formation and remodeling: recent advances in real-time imaging of CNS synapses. *Neuroscience Research*, 40,291–300, 2001.
 - Murata, Y., Okado, H. and Kubo, Y. Characterization of heteromultimeric G-protein coupled inwardly rectifying potassium channels of the tunicate tadpole with a unique property. *Journal of Biological Chemistry* 276, 18529–18539 (2001)
 - Murata, Y., Okado, H., Katsuyama, Y., Okamura, Y. and Kubo, Y. Primary structure, developmental expression and functional properties of an inward rectifier K⁺ channel of the tunicate. *Receptors and Channels* 7, 387–399 (2001)
 - Misaka, T., Miyashita, T. and Kubo, Y. Primary structure of a dynamin-related mouse mitochondrial GTPase and its distribution in brain, subcellular localization and effect on mitochondrial morphology. *Journal of Biological Chemistry* (2002), published on line on Feb. 14, 2002
- (2) 特許出願
なし