

「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

本研究課題の目的は、神経細胞膜上の受容体やチャネルなどの機能分子の微細局在や動態を高解像度かつリアルタイムで明らかにし、シナプス局在の分子機構や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解明することである。これまでの3年間で開発された方法として、定量的凍結切断レプリカ免疫標識法(SDS-FRL法)、未固定急速凍結標本を用いたpostembedding法、GFP融合分子を用いたシナプス関連蛋白質のリアルタイム解析法、受容体サブユニット間相互作用のFRET法による検出等がある。これらにより定量的なグルタミン酸受容体密度の測定、電位依存性カルシウムチャネルの局在解析、シナプス形成過程および可塑的変化の過程におけるシナプス分子の集合と離散の可視化、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、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、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などの成果が得られた。

まず、重本、藤本サブグループでは神経伝達物質受容体、イオンチャネルなどの神経機能に直接関連すると考えられる神経細胞膜機能分子の電子顕微鏡レベルでの局在と動態を検討することによって、神経機能、特に神経伝達・伝導の機構の解明を目指している。さらに、近年注目されている細胞膜脂質分子の神経細胞における分布や動態を検討することによって新たなタンパク機能分子-脂質分子の相互作用に起因する事象の発見と解析を行う事を目指している。

久保サブグループでは、イオンチャネル・受容体等の膜機能分子の構造機能連関と、G蛋白質等の他分子との機能協関、およびその動的構造変化を知ることを研究目的としている。内向き整流性K⁺チャネルKir2.1、イオンチャネル型ATP受容体P2X、代謝型グルタミン酸受容体mGluR1、高分子量G蛋白質OPA1、G蛋白質応答調節因子RGS蛋白等を主たる研究対象とし、クローン化させた遺伝子と種々の変異体を発現させ、電気生理学的手法によりその機能を、免疫組織化学的手法によりその局在の動態を、光学的手法FRETにより動的構造変化を解析している。

岡部サブグループでは海馬神経細胞を用いて、シナプス構成蛋白質の細胞膜上での動態およびシナプスへの局在の分子機構を解析することを目指している。シナプス形成過程

および可塑的変化の過程におけるシナプス分子の動的な集合と離散を解析するため、蛍光蛋白質GFPとシナプス前部・シナプス後部蛋白質の融合分子を作成し、これらの蛋白質の局在変化をシナプス形成の時間軸に沿って測定した。

2. 研究実施内容

1) 電子顕微鏡的方法の開発および受容体やチャネルの局在解析 (重本、藤本、Nusser)

まず神経細胞膜機能分子の電子顕微鏡レベルでの局在と動態を解析する目的のための方法論の開発、改良を行った。以下のようにSDS-FRL法やpostembedding法の改良を進めた。

A) SDS-FRL法で行うカーボン蒸着を工夫することにより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。生後3-4日のラットプルキンエ細胞をモデルとして用いた場合、single quantaによって活性化されるAMPAチャネルの密度は電気生理学的方法により約900 channels/ μm^2 と計算された (Momiya et al., J Physiol., 2002) が、改良されたSDS-FRL法ではこれとほぼ同等のimmunogold particle 平均密度 (916 particles/ μm^2)を達成した。その結果、信頼性の高い定量的解析が可能となり、生後3-4日のプルキンエ細胞シナプスにおいてはAMPA チャネルの密度がシナプス間でかなり均一であること、チャネルの密度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 (Tanaka et al. 投稿準備中)。この方法でAdultのAMPA チャネル密度の動態を計測したところ、登上線維とプルキンエ細胞の作るシナプスではシナプス内およびシナプス間におけるAMPA チャネルの密度が極めて均一であるのに比し、平行線維ではバラツキが大きくシナプス内でマイクロクラスターを形成していることが明らかとなった (Masugi et al. 投稿準備中)。一方、GluR \cdot 2受容体はAdultでも平行線維で均一な受容体分布を示した。現在、長期抑圧現象によるシナプス可塑性発現の蓄積がこのようなAMPA チャネル密度の不均一性を引き起こしている可能性を検討するため、長期抑圧現象を起こした後のAMPA チャネル密度の変化を時間経過を追って検討している。また長期抑圧現象に必要な分子を欠損したノックアウトマウスや阻害する薬物等を用いてAMPA チャネルの密度変化がどうなるかを検討中である。

B) SDS-FRL法の欠点として構造の同定が困難であることが挙げられる。これは、一つには膜面を2次元的に観察できる代わりに断面が見ることができないためであり、二つ目には藤本が開発した原法ではレプリカが断片状になるため、組織学的なオリエンテーションが失われるためであった。そこでレプリカ下の組織を保ったままグリッド上や樹脂内に固定し、ultrathin sectionによる断面の観察を行う方法を開発した。また、レプリカを断片化せず、組織のオリエンテーションを保ったままラベリングする方法を開発した。これにより、より複雑で小さい組織に適応できるようになり、標識された構造物についてさらに多くの形態学的情報が得られるようになった。現在、海馬のCA1 stratum radiatum, CA3 stratum lucidumやdentate molecular layerなどについて活動依存的な機能分子の局在変化について動物個体を用いてスクリーニングを行っ

ている。

C) もう一つのpotentialの高い方法論として、未固定脳を用いた急速凍結による包埋法を確立した(村手、藤本)。脂質分子を含めた膜機能分子は、種々の生理的あるいは非生理的刺激によって、容易に局在変化を来す。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。我々は化学的固定ではなく、液体窒素による急速凍結固定法で解析した。小脳の200ミクロン厚組織スライスを作製し、1. 直ちに凍結固定する、あるいは2. 室温で30~60分間、人工的脳脊髄液に静置した後に凍結固定し、凍結置換後、樹脂包埋した。樹脂包埋試料の超薄切片を作製、電子顕微鏡下で観察した。スライスを作製後、直ちに凍結した場合、典型的なマッシュルーム様の形態を呈するスパインは少なく、扁平な丘状の隆起として観察された。室温で30~60分間静置することによって、典型的なマッシュルーム様の形態を呈するスパインが増え、扁平な丘状隆起の後シナプスの数は減少した。この変化は、静置時間を長くすることによって、より顕著になった。但し、前シナプス形態に大きな変化は見られなかった。本研究結果は、電気生理学的解析に利用される脳スライスの形態学的変化を明らかにしたとともに、スパイン消失-形成機構のモデル系として利用できる可能性を示唆した。

従来法による成果としては、preembedding法やpostembedding法によりGABAB受容体(Kulik et al., Eur. J. Neurosci., 2002; Lopez-Bendito et al., Eur. J. Neurosci., 2002)とシナプスとの位置関係を明らかにし、HCN1チャネルの樹状突起における密度勾配ついて定量的な解析を行った(Lorincz et al., Nature Neurosci., 2002)。電位依存性カルシウムチャネルについてもシナプス前終末のグルタミン酸放出部位に集積していることや、シナプス後部でも平行線維プルキンエ細胞シナプスの周囲に密度が高いことを明らかにした(Kulik et al. 投稿準備中)。レプリカ免疫標識法では、電位依存性カルシウムチャネルサブタイプの微細局在について、 $\alpha 1A$, $\alpha 1B$, $\alpha 1C$, $\alpha 1E$ の微細局在を小脳で観察した。これらの分子はシナプス前膜に局在していたが、 $\alpha 1A$, $\alpha 1B$, $\alpha 1C$ はシナプス膜の周辺部、 $\alpha 1E$ は中心部に局在していることが分かった。高カリウム処理等の神経伝達物質放出刺激を行った場合の局在変化を検討することによって、これらサブタイプの局在の相違の生理的意義を検証する。

2) 久保サブグループの研究実施内容

(a) 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

我々は、代謝型グルタミン酸受容体1型(mGluR1)がグルタミン酸のみならず細胞外の Ca^{2+} や Gd^{3+} といった多価陽イオンによっても活性化されることを見いだした。その後、TsuchiyaらによりmGluR1の細胞外領域の結晶構造の解析により、 Gd^{3+} の結合部位が、Glu238を含むサブユニット間のインターフェイス部分に同定された。しかし、この部位が、 Gd^{3+} による受容体の活性化を引き起こすことに機能的に関与しているかどうかは明らか

にされていない。我々は、この部位の機能的意義を明らかにすることを目的としてE238Q変異体を作成し、そのGd³⁺感受性を解析した。その結果、E238Q変異により、Gd³⁺に対する感受性がほぼ完全に失われること、それに対し、グルタミン酸、Ca²⁺に対する感受性は変化しないことが明らかになった。さらに、Gd³⁺の存在下では、mGluR1のグルタミン酸に対する感受性を高めること、そしてこの効果もE238Q変異により失われることを見いだした。これらの結果は、Gd³⁺もしくは、類縁の生理的に脳脊髄液中に存在する内因性の物質がmGluR1のこの部位へ結合することにより、単独でもしくはグルタミン酸と共働的に、mGluR1を活性化するというを示唆する。今後、Gd³⁺の作用をmimicする内因性の物質の同定を目指して研究をすすめていく計画である。

(b) 代謝型グルタミン酸受容体 (mGluR) のサブユニット間相互作用のFRET法による検出
分子内構造の変化を光学的に解析するためには、目的とする場所に特異的に蛍光ラベルを導入することが鍵となる。昨年度より、GFP融合蛋白の作成による蛍光ラベルを試みる以下の実験を進めている。構造解析の結果から、代謝型グルタミン酸受容体 (mGluR1) 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、まず、mGluR1のC端細胞内領域の末端に 2色の蛍光蛋白 CFP もしくは YFP を融合させた分子をまず作成した。そして、HEK293 細胞に 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 法などにより解析した。その結果リガンド非存在下で若干の FRET を検出した。しかし、その強度が微弱だったため、mGluR1 の様々な部位にCFPもしくはYFP を融合させた分子を系統的に作成した。その中で、第 7 膜貫通部位の直下、第 1 と第 2 の膜貫通部位間の細胞内チェーンに融合させたコンストラクトにおいて、明確なFRET を検出した。さらに、リガンド投与によるFRET効率の変化 (分子構造変化) の解析を目的として、膜表面の分子由来の蛍光に限定して測光するために全反射顕微鏡下におけるFRET解析を試み、既に成功している。今後、膜上のmGluR1 の各種リガンド投与による構造変化の解析を行う。

3) 岡部サブグループの研究実施内容

a) トランスジェニックマウスを用いたシナプス機能分子の長期動態解析

シナプス後部構造の長期的なリモデリングの過程を明らかにするために、シナプス後肥厚部 (PSD) の代表的な構成蛋白質である PSD95-GFP および PSD-Zip45-GFP を発現するトランスジェニックマウス系統を作成した。これらの胎児から海馬神経細胞を培養して、一週間以上にわたるシナプス構造の変化を追跡した。この系を用いる事で、A) filopodia から spine への形態変化と PSD 蛋白質の集積過程、B) 樹状突起が伸長する際の PSD 蛋白質の新規に形成された樹状突起での集積過程、C) 細胞全体での同期したシグナルにより起こる PSD 蛋白質クラスターの分布変化、などの現象が可視化できた。これらの観察から、神経細胞におけるシナプスリモデリングは、細胞全体に作用する global なシグナル系によって強く制御されていると考えられた。

b) 刺激依存的なシナプス後肥厚部(PSD)分子のシナプスターゲティング

PSD蛋白質の一種であるPSD-Zip45は、NMDA受容体と電位依存性カルシウムチャネルからのカルシウム流入によってその局在を二方向性に变化させる事をこれまで明らかにしてきた。このような局在变化の生理学的意味を知る為に、シナプスを介したシグナル伝達系の活性化の過程と、PSD-Zip45分子の局在变化の関連を解析した。まず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。カルシウム上昇のパターンにより、PSD-Zip45はシナプス後部に集積する場合とむしろ分散する場合とがあった。更に特定のシナプスからの刺激によりその近傍のシナプス後部側のPSD-Zip45のクラスターがどのように変化するかを知る為に、プレ側の線維を細胞体でのパッチ電極による脱分極で発火させ、その際のプレ側の線維のカルシウム濃度の上昇と線維に接触するポスト側のPSD-Zip45の局在变化の関連について解析した。一秒に一回の脱分極刺激により、発火したプレ側の線維の近傍で特異的なPSD-Zip45のクラスター形成が観察され、特定のシナプスでのPSD蛋白質の分布が、そのシナプスの活動によって制御されている可能性が示唆された。

3. 研究実施体制

重本グループ

研究分担グループ長：重本隆一（岡崎国立共同研究機構 生理学研究所、教授）

研究項目：

- a) SDS-FRL法の改良と細胞膜上機能分子のスクリーニング
- b) 神経伝達調節の電気生理学的解析
- c) グルタミン酸受容体、GABA受容体やイオンチャネルの局在と定量的解析
- d) mGluR7の標的細胞依存性メカニズムの解析
- e) NMDA受容体サブユニット局在の左右差形成メカニズムの解析
- f) 機能分子動態解析のためのモデル動物の作製

藤本グループ

研究分担グループ長：藤本 和（福井県立大学 教授）

研究項目：急速凍結試料の凍結切断レプリカあるいは凍結置換・包埋試料の超薄切切片を用いた免疫電子顕微鏡による神経細胞の機能分子の微細局在と動態の解析

久保グループ

研究分担グループ長：久保義弘（東京医科歯科大学大学院機能協関システム医学 教授）

研究項目：

- (a) 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
- (b) 代謝型グルタミン酸受容体のサブユニット間相互作用のFRET法による検出
- (c) 新規高分子量GTP結合蛋白質mOPA1の機能解析

(d) イオンチャネルの動的構造機能連関

岡部グループ

研究分担グループ長：岡部繁男（東京医科歯科大学大学院細胞相関機構学 教授）

研究項目：シナプス形成過程および可塑的变化におけるシナプス後部蛋白質の動態

4. 主な研究成果の発表（論文発表および特許出願）

(1) 論文（原著論文）発表

- Kulik-A, Nakadate-K, Nyiri-G, Notomi-T, Malitschek-B, Bettler-B, Shigemoto-R
Distinct localization of GABAB receptors relative to synaptic sites in the rat cerebellum and ventrobasal thalamus.
European Journal of Neuroscience 15:291-307 (2002)
- Lopez-Bendito-G, Shigemoto-R, Fairen -A, Lujan-R
Differential distribution of group I metabotropic glutamate receptors during rat cortical development.
Cerebral Cortex 12:625-638 (2002)
- Millan-C, Lujan-R, Shigemoto-R, Sanchez-Prieto-J
The Inhibition of glutamate release by metabotropic glutamate receptor 7 affects both $[Ca^{2+}]_C$ and camp.
Journal of Biological Chemistry 277:14092-14101 (2002)
- Dalezios-Y, Lujan-R, Shigemoto-R, Roberts-J.D.B, Somogyi-P
Enrichment of mGluR7a in the presynaptic active zones of GABAergic and non-GABAergic terminals on interneurons in the rat somatosensory cortex.
Cerebral Cortex 12:961-974 (2002)
- Kitano-J, Kimura-K, Yamazaki-Y., Soda-T, Shigemoto-R, Nakajima-Y, Nakanishi-S
Tamalin, a PDZ domain-containing protein, links a protein complex formation of group I metabotropic glutamate receptors and the guanine nucleotide exchange factor cytohesins.
Journal of Neuroscience 22(4):1280-1289 (2002)
- Lopez-Bendito-G, Shigemoto-R, Kulik-A, Paulsen-O, Fairen-A, Lujan-R
Expression and distribution of metabotropic GABA receptor subtypes GABABR1 and GABABR2 during rat neocortical development.
European Journal of Neuroscience 15(11):1766-1778 (2002)
- Millan-C, Lujan-R, Shigemoto-R, Sanchez-Prieto, -J
Subtype-specific expression of group III metabotropic glutamate receptors and Ca^{2+} -channels in single nerve terminals
Journal of Biological Chemistry 277(49):47796-47803 (2002)
- Lorincz-A, Notomi-T, Tamas-G, Shigemoto-R, Nusser-Z

Polarized and compartment-dependent distribution on HCN1 in pyramidal cell dendrites.

Nature Neuroscience 5:1185-1193 (2002)

- Losonczy-A, Zhang-L, Shigemoto-R, Somogyi-P, Nusser-Z
Cell type dependence and variability in the short-term plasticity of EPSCs in identified mouse hippocampal interneurons.
Journal of Physiology 542(1):193-210 (2002)
- Momiyam-T
Parallel decrease in ω -conotoxin-sensitive transmission and dopamine-induced inhibition at the striatal synapse of developing rats.
Journal of Physiology 546, 483-490 (2002)
- Misaka,-T, Miyashita-T, 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 277, 15834-15842 (2002)
- Ai-T, Fujiwara-Y, Tsuji-K, Otani-H, Nakano-S, Kubo-Y, Horie-M
Novel KCNJ2 mutation in familial periodic paralysis with ventricular dysrhythmia.
Circulation 105, 2592-2594 (2002)
- Saitoh-O, Murata-Y, Odagiri-M, Itoh-M, Itoh-H, Misaka-T, Kubo-Y
Alternative splicing of RGS8 gene determines inhibitory function of receptor-type-specific Gq signaling.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99, 10138-10143 (2002)
- Murata-Y, Fujiwara-Y, Kubo-Y
Identification of a site involved in the block by extracellular Mg^{2+} and Ba^{2+} as well as permeation of K^+ in Kir2.1 K^+ channel.
J. Physiol. 544, 665-677 (2002)
- Fujiwara-Y, Kubo-Y
Ser 165 in the second transmembrane region of the Kir2.1 channel determines its susceptibility to blockade by intracellular Mg^{2+} .
J. Gen. Physiol. 120, 677-692 (2002)
- Enomoto-M, Shinomiya-K, Okabe-S
Migration and differentiation of neural progenitor cells from two different regions of embryonic central nervous system after transplantation into the intact spinal cord.
European Journal of Neuroscience, 17, 1223-1232 (2003)

- Ebihara-T, Kawabata-I, Usui-S, Sobue-K, Okabe-S
Synchronized formation and remodeling of postsynaptic densities: long-term visualization of hippocampal neurons expressing postsynaptic density proteins tagged with GFP.
Journal of Neuroscience, 23, 2170-2181 (2003)
- Usui-S, Konno-D, Hori-K, Maruoka-H, Okabe-S, Fujikado-T, Tano-Y, Sobue-K
Synaptic targeting of PSD-Zip45 (Homer 1c) and its involvement in the synaptic accumulation of F-actin.
Journal of Biological Chemistry, 278, 10619-10628 (2003)
- Ebihara-T, Komiya-Y, Nakaseko-I, Adachi-Akahane-H, Okabe-S, Okamura-Y
Coexpression of a Ca_v1.2 protein lacking N-terminus and the first domain specifically suppresses L-type calcium channel activity.
FEBS Letters, 529, 203-207 (2002)
- Nakatomi-H, Kuriu-T, Okabe-S, Yamamoto-S, Hatano-O, Kawahara-N, Tamura-A, Kirino-T, Nakafuku-M
Regeneration of hippocampal pyramidal neurons by recruitment of endogenous neural progenitors: An animal model for a neuronal replacement therapy for ischemic brain injury .
Cell, 110, 429-441 (2002)

(2) 特許出願

H14年度特許出願件数：0件（研究期間累積件数：0件）