

「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および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。重本サブグループでは、これまでの4年間で開発された定量的凍結切断レプリカ免疫標識法(SDS-FRL法)を用いてグルタミン酸受容体密度の測定法を確立し、*in vivo*の小脳学習運動に伴う受容体数の変化を検出することに成功した。また慢性刺激電極による*in vivo*の長期増強現象による受容体局在の動態も解析している。その他、電位依存性カルシウムチャネルや過分極により活性化するカチオンチャネル(HCNチャネル)の局在と機能解析を行った。

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。シナプス形成過程におけるシナプス分子の動的集合過程を解析するため、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そって測定した。

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た。

2. 研究実施内容

重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、特に神経伝達機構の解明を目指してきた。

(1) 定量的SDS-FRL法によるグルタミン酸受容体数の分布と動態解析

平成15年度には、前年度に免疫電子顕微鏡法と電気生理学的方法を組み合わせ、小脳苔状線維シナプスのAMPA型受容体数の推定を行った研究 (Momiya et al., J. Physiol., 2003) を発展させ、2光子顕微鏡とcaged glutamateを用いたsingle synapseでの non-stationary fluctuation analysisと定量的SDS-FRL法を組み合わせ、生後3日令ラットの苔状線維シナプスでAMPA型受容体数を決定した。この種のシナプスではAMPA型受容体チャンネル数はシナプス面積に比例し一定の密度 (平方ミクロンあたり約1200個) を示したのに対し、レプリカ上の金標識もほぼ同数が認められ、この標識法が金粒子一個あたり機能的チャンネル一個を検出するほどの高感度であることが証明された (Tanaka et al., in preparation)。同様のレプリカ標識法をadultのラット小脳に適用したところ、平行線維の作るシナプスでも相手がプルキンエ細胞か介在神経細胞かでAMPA型受容体の局在様式は大きく異なることが明らかとなった (Masugi-Tokita et al., in preparation)。介在神経細胞上のシナプスでは苔状線維シナプスにも増してAMPA型受容体密度は極めて一定であったが、プルキンエ細胞上のシナプスにおいては密度がほぼ0から平方ミクロンあたり1000個近くまで、大きなバラツキを示した。次にこのような大きなバラツキを示した理由が、この種のシナプスの持つ高い可塑性にあるのではないかと考え、実際に小脳の運動学習によってこのシナプスのAMPA型受容体の密度分布がどう変化するかを調べた。マウスの行動実験は主な研究参加者である永雄総一自治医大助教授が行い、記憶が安定的に形成される視機能性眼球反応学習1時間の前後で、水平性眼球運動の調節に関係している小脳flocculusの中央部三分の一で多数のシナプスを定量的SDS-FRL法で解析したところ、シナプスのpopulation全体として有意なAMPA型受容体の密度の減少が認められた。このような変化は学習を行っていないコントロールマウスや学習を行った動物でもflocculusからわずか0.5mm以内にあるparaflocculusでは全く認められない。さらに驚くべきことに学習1時間後では有意な変化のなかったシナプス自体の密度が、この学習を数日間続けることによって30%以上も減少することが明らかとなった (Nakadate et al., in preparation)。この変化もコントロールでは全く認められない。この結果は、数日間続ける学習によって蓄積される長期適応現象と呼応しており、学習が飽和した後2週間放置すると、水平性眼球運動の記憶はほとんど失われると同時にシナプス密度もコントロールとほとんど有意差のないところまで回復することを確認している。これらの結果は、分オーダーから時間オーダーの短期的な記憶はAMPA型受容体の密度変化として一定のシナプスのpopulationに蓄えられる一方、日オーダーの長期的な記憶の定着にはシナプス結合そのものという脳のハードウェアのリモデリングが必要であることを示唆している。このような極めて生理的な刺激でダイナミックな脳内の受容体変化が捉えられたのは初めてのことである。また重本グループの深澤助手は海馬に入力するperforant pathをin vivoで特異的にテタヌス刺激することによって投射領域の歯状回分子層でNMDA受容体依存性の長期的なF-actin増加が引き起こされ、これが長期増強現象の維持に必要なことを明らかにしているが、同様の

手法と定量的SDS-FRL法でAMPA型受容体の密度を調べたところ、受容体密度の低いシナプスpopulationが減少していることを確認している。さらに小脳と全く事情が異なる点として、シナプスだけでなくシナプス外のAMPA型受容体の密度が極めて高く、樹状突起のドメインによって勾配を持っていることが明らかにされた (Fukazawa et al., in preparation)。今後、これらのAMPA型受容体の動態をさらに詳しく長期増強現象成立の時間経過とともに解析することによって、シナプス可塑性が長期に定着するメカニズムを解析できるものと考えている。

(2) 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

イオンチャネル型のグルタミン酸受容体でも特に記憶形成に重要であると考えられているNMDA受容体の局在については、九州大学の伊藤功助教授との共同研究で驚くべき発見がもたらされた (Kawakami et al., Science, 2003)。伊藤功助教授はNMDA受容体NR2Bサブユニットの特異的な阻害薬の感受性が右の海馬スライスと左の海馬スライスで異なることに気付き、我々の研究室でもNR2Bのシナプスにおけるタンパク量やpostembedding法による標識密度をCA1で調べたところ、錐体細胞頂上樹状突起の分布するstratum radiatumでは同側から入力するシナプスについて左のほうが右よりもNR2B含量が多く、逆に基底樹状突起の分布するstratum oriensでは右のほうが左よりも多いことが明らかとなった。しかも電気生理学的解析から反対側入力についてはこれと全く反対の関係になっていることが示唆された (図4)。非対称性分布は錐体細胞のシナプスに特異的で同種の入力線維でも介在細胞に対するシナプスでは左右に有意差はない (Wu et al., in preparation)。この結果は分子レベルで脳の左右差がはっきり示された最初の例である。

(3) イオンチャネルの局在と機能

従来法による免疫電子顕微鏡法では、P/Q-type calcium channelがグルタミン酸作動性シナプス周囲へ集積 (Kulik et al., Eur. J. Neurosci., 2003) していること、過分極で活性化されるHCNチャネルの特徴的脳内局在 (Notomi and Shigemoto, J Comp Neurol., 2004)、HCNチャネルとNa/K-ATPaseとの双方向性相互作用 (Kang et al., J. Neurosci., 2004)、HCNチャネルの細胞膜上マイクロドメイン形成 (Tarusawa et al., in prep) を明らかにした。

(4) 機能分子動態解析のためのモデル動物の作製

機能分子動態をさらに定量的に解析するために各種タグを導入したトランスジェニックマウスやノックインマウスの作製を進めている。

岡部サブグループでは以下の研究を行った。

(1) 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によるトランスジェニックマウスと組み換えアデノウイルスを組み合わせるにより、海馬スライス培養系において錐体細胞特異的にGFPなどの分子を発現させる事が可能となった。この手法と電気穿孔法を組み合わせる事

で、シナプス前部のvaricosity構造とシナプス後部のスパイン構造の同時観察が可能となり、2光子励起顕微鏡により両者が近接して存在する部位としてシナプスを同定した。電気刺激により誘発された樹状突起の比較的大きな構造変化によっても、本手法で同定したシナプス部位はその結合を切断されない事から、同定されたシナプス部位は機械的に強い結合を持つ接着構造を反映するものと考えられた。このようにして同定されたシナプス前部および後部構造の同時観察により、両者は接着を保ちながら短時間の内に構造変化を起こす事が明らかになった。シナプス前部と後部の動態は数秒程度の時間枠においては同期して変化しないが、複数のシナプス間で平均化した動態の大きさを定量した場合にはシナプス前部と後部の間での相関が観察された。本研究により開発された複数のシナプス構造を同時に観察する技術は、シナプス形成およびモデリングの過程における両者の果たす役割を解析する上で有効な手法であると考えられる。

(2) 複数のシナプス後肥厚部蛋白質の安定化およびシナプス局在機構の解析

シナプス後部に存在する代表的な足場蛋白質であるPSD-95, GKAP, cortactin-binding protein, Homer 1cについて、そのシナプス部位での動態をタイムラプス顕微鏡観察およびfluorescence recovery after photobleaching (FRAP) 法により定量した。これらの蛋白質のシナプス後部における存在量の時間的変化はそれぞれの蛋白質で異なり、かつFRAP法で測定される定常状態での入れ替わり速度の差と良く一致していた。NMDA受容体、代謝型グルタミン酸受容体のノックアウトマウス由来の神経細胞および薬理的にPSD-95をシナプスから除去した神経細胞の動態解析により、これらの膜局在蛋白質は他のPSD蛋白質の局在および動態に大きな影響を与えない事が示された。これに対して、アクチン線維の速い脱重合を薬理的に引き起こすと、PSD-95を除くPSD蛋白質のシナプスにおける存在量は大きく減少した。以上の結果から膜の内在性蛋白質であるグルタミン酸受容体および膜近傍に安定化して存在するPSD-95分子はPSDの分子構築の維持に必須の蛋白質ではなく、むしろ活発な動態を示し細胞質側からPSD構造と相互作用するアクチン線維の存在がPSD構造の維持に重要な役割を果たしている事が明らかとなった。

久保サブグループでは以下の研究を行った。

(1) 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

代謝型グルタミン酸受容体1型 (mGluR1) はホモ二量体として機能していることが知られており、グルタミン酸により二量体における細胞外領域間の距離が小さくなるということが報告されている。本研究者は、多価陽イオンである Gd^{3+} がこの二量体間のインターフェースに存在するE238に作用することでmGluR1を活性化するという事を報告している。そこで、グルタミン酸や多価陽イオンのmGluR1活性化機構についてFRET (Fluorescent Resonance Energy Transfer) を用いて検討を行った。蛍光タ

ンパク質であるCFPやYFPを細胞内領域に導入し、一量体内および二量体間におけるFRET効率の変化を観察した。グルタミン酸の投与により二量体間のFRET効率は顕著な変化を見せたが、一量体内でのFRET効率には変化が見られなかった。この結果は、Gタンパクと共役する細胞内領域でもグルタミン酸によりmGluR1二量体が再配置されることを示している。多価陽イオン Ca^{2+} や Gd^{3+} もmGluR1二量体間のFRET効率を同様に变化させたが、この変化は陽イオンの作用部位と考えられるS166とE238の変異体では観察されなかった。このことから、多価陽イオンはグルタミン酸と同様な機構によりGタンパクを活性化すると考えられる。作用物質によりmGluRの反応性に違いが見られることから、更に構造機能関連の研究を進めるとともに、 Gd^{3+} の作用部位に対する内因性物質についての同定も今後進めていく。

(2) 新規高分子量GTP結合蛋白質mOPA1の機能解析

我々がマウス脳の神経細胞において高発現していることを明らかにした新規高分子量GTP結合タンパク質 (mOPA1) は、N末端にミトコンドリア輸送シグナルを有し、COS-7細胞に遺伝子導入するとミトコンドリアに局在し、ミトコンドリアの断片化を引き起こすことをこれまでに明らかにしてきた。近年、ヒトにおける相同遺伝子が、遺伝性1型視神経萎縮症の原因遺伝子であることがポジショナルクローニングの手法により同定された。これまでに多くの家系調査により、遺伝病の原因となる変異が様々な部位に導入されていることが発見されてきている。これら変異の導入による機能変化についての知見はなく、本研究においては、疾患の原因となるアミノ酸点変異を導入したマウスクローンの変異体を作製し、培養細胞に発現させたときのミトコンドリア形態に与える影響について検討した。これまでに報告された疾患変異のうち、アミノ酸点変異に由来するものは16種類存在する。mOPA1のアミノ酸配列において、疾患変異に相当する部位のアミノ酸はヒトと同一であったので、マウスクローンにおいて上記の点変異体をすべて作製し、COS-7細胞に遺伝子導入した。その結果、ミトコンドリア形態に与える影響は変異体間で違いが見られ、16種類の疾患変異体の表現型は以下の4グループに分けられた。(1) グアニン塩基への結合能を失った変異体と類似のもの、(2) GTPase活性を失った変異体と類似のもの、(3) C末端欠失変異体と類似のもの、(4) 野生型mOPA1と類似のもの。培養細胞に発現させたときに観察されるミトコンドリア断片化能が、作製した疾患変異体のほとんどにおいて野生型と異なったという今回の結果から、OPA1のミトコンドリア形態に与える機能の変化が、遺伝性視神経萎縮症発症の原因の一部となっていることが推察された。

(3) P_2X 型 ATP 受容体の諸性質の発現密度依存的変化

P_2X 型ATP受容体は、時間依存的にイオン選択性が変化することや、記録ごとにうち向き整流性の強度がばらつくなどの特徴あるポアの性質を持つことが知られている。また、我々は本研究遂行過程において、その内向き整流性のばらつきが発現密度に相関することを見いだした。これを手がかりとして、 P_2X 受容体の種々の性質を発現レベルとの関連において解析し以下の知見が得られた。(1) $\text{P}_{\text{K}^+}/\text{P}_{\text{Na}^+}$ の発現密度に依存した変

化は観察されなかったが、 $P_{\text{NMDG}^+}/P_{\text{Na}^+}$ は発現密度と負の相関を示した。(2) 内向き整流性の強弱は発現密度と負の相関を示した。脱分極パルス直後に観察される外向き電流 (I_{initial}) は、経時的に減衰し定常レベルに (I_{steady}) に達した。 I_{initial} および I_{steady} の、内向き電流の大きさに対する割合はどちらもチャンネルを高発現にすることによって増加した。(3) 高濃度のATP (100 microM) により弱い内向き整流性電流を呈する発現密度の高い細胞に、低濃度ATP (3 microM) を投与するとその内向き整流性は増強した。(4) [ATP] - 応答関係のKdの値は発現密度と負の相関を示した。Hill係数は発現密度に相関なく一定値2であった。(5) ポア上部の点変異I328Cにより上記の発現密度に依存したポアの性質の変化がほぼ消失した。以上の結果をまとめると、「 P2X_2 受容体の内向き整流性等の性質は、膜上に存在する「開状態」のチャンネルの密度に依存して動的に変化する。」と表現できる。我々は「ATP投与により開状態に入った、ごく近傍にある P2X_2 受容体チャンネル間の相互作用によりポア上部においてなんらかの構造変化が起こり、ポアの性質やリガンド感受性が変わる。」というイメージでデータを説明できると考えている。

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：

- (1) 定量的SDS-FRL法によるグルタミン酸受容体数の分布と動態解析
- (2) 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
- (3) イオンチャンネルの局在と機能
- (4) 機能分子動態解析のためのモデル動物の作製

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・大学院医歯学総合研究科 教授)

研究項目：

- (1) 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
- (2) 複数のシナプス後肥厚部蛋白質の安定化およびシナプス局在機構の解析

久保グループ

研究分担グループ長：久保義弘 (平成15年11月まで：東京医科歯科大学大学院機能協
関システム医学・教授、平成15年12月より：岡崎国立共同研究機構・生理学研究所・神経機能素子研究
部門・教授)

研究項目：

- (1) 代謝型グルタミン酸受容体の分子構築と機能制御機構
- (2) 新規高分子量GTP結合蛋白質mOPA1の機能解析

(3) イオンチャネルの動的構造機能連関

4. 主な研究成果の発表（論文発表および特許出願）

(1) 論文発表

- Momiyama-A, Silver-R, Angas, Häusser-M, Notomi-T, Wu-Y, Shigemoto-R, Cull-Candy-G S, The density of AMPA receptors activated by a transmitter quantum at the climbing fibre-Purkinje cell synapse in immature rats, *J. Physiol.*, 549:75-92, 2003
- Somogyi-P, Dalezios-Y, Luján-R, J David B-R, Watanabe-M, Shigemoto-R, High level of mGluR7 in the presynaptic active zones of select populations of GABAergic terminals innervating interneurons in the rat hippocampus, *Eur. J. Neurosci*, 17 : 2503-2520, 2003
- Kawakami-R, Shinohara-Y, Kato-Y, Sugiyama-H, Shigemoto-R, Ito-I, Asymmetrical allocation of NMDA receptor $\epsilon 2$ subunits in hippocampal circuitry, *Science*. 300:990-994, 2003
- Kaneda-K, Imanishi-M, Nambu-A, Shigemoto-R, Takada-M, Differential expression patterns of mGluR1 α in monkey nigral dopamine neurons, *Neuro Report*, 14(7):947-950, 2003
- López-Bendito-G, Luján-R, Shigemoto-R, Ganter-P, Paulsen-O, Molnár-Z, Blockade of GABA_B receptors alters the tangential migration of cortical neurons, *Cerebral Cortex*, 13:932-942, 2003
- Minami-I, Kengaku-M, Sillevius Smitt-P, Shigemoto-R, Hirano-T, Long-term potentiation of mGluR1 activity by depolarization-induced Homer1a in cerebellar Purkinje neurons, *Eur. J. Neurosci*. 17:1023-1032, 2003
- Kang-Y., Notomi-T., Saito-M., Zhang-Wei, Shigemoto-R., Bidirectional Interactions between H-Channels and Na⁺-K⁺ Pumps in Mesencephalic Trigeminal Neurons, *J. Neurosci*. 24:3694-3702, 2004.
- Kulik- A., Nakadate-K., Hagiwara-A., Fukazawa-Y., Lujan-R., Saito-H., Suzuki-N., Futatsugi, A., Mikoshiba, K., Frotscher-M., Shigemoto-R, Immunocytochemical localization of the α_{1A} subunit of the P/Q-type calcium channel in the rat cerebellum, *Eur. J. Neurosci.*, 19:2169-2178, 2004.
- Notomi-T, Shigemoto-R, Immunohistochemical localization of Ih channel subunits, HCN1-4 in the rat brain, *J. Comp. Neurol.*, 471:241-276, 2004.
- Somogyi-J, Baude-A, Omori-Y, Shimizu-H, Mestikawy-S.E, Fukaya-M, Shigemoto-R, Watanabe-M, Somogyi-P, GABAergic basket cells expressing cholecystokinin contain vesicular glutamate transporter type 3(VGLUT3) in their synaptic terminals in hippocampus and isocortex of the rat, *Eur. J.*

Neurosci. 19:552-569, 2004.

- Kulik-A, Vida-I, Lujan-R, Hass-CA, Lopez-Bendito-G, Shigemoto-R, Frotscher-M, Subcellular localization of metabotropic GABA_B receptor subunits GABA_{B1a/b} and GABA_{B2} in the rat hippocampus, J. Neurosci., 23:11026-11035, 2003.
- Nakazawa, T., Watabe, A. M., Tezuka, T., Yoshida, Y., Yokoyama, K., Umemori, H., Inoue, A., Okabe, S., Manabe, T., and T. Yamamoto p250GAP, a novel brain-enriched GTPase-activating protein for Rho family GTPase, is involved in the NMDA receptor signaling. Molecular Biology of the Cell, 13, 2921-2934, 2003.
- Inoue A., and S. Okabe The dynamic organization of postsynaptic proteins: translocating molecules regulate synaptic function. Current Opinion in Neurobiology, 13, 332-340, 2003.
- Enomoto, M., Shinomiya, K., and S. Okabe 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., and S. Okabe. 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., and K. Sobue. 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.
- Kawabata, I., Umeda, T., Yamamoto, K., and S. Okabe Electroporation-mediated gene transfer system applied to cultured CNS neurons. Neuroreport, 15, 971-975, 2004.
- Abe, H., Misaka, T., Tateyama, M. and Kubo, Y. Effects of co-expression with Homer isoforms on the function of metabotropic glutamate receptor1a. Molecular and Cellular Neuroscience 23, 157-168 (2003)
- Abe, H., Tateyama, M. and Kubo, Y. Functional identification of Gd3+ binding site of metabotropic glutamate receptor1a. FEBS letters 545, 233-238 (2003)

(2) 特許出願

H15年度特許出願件数：0件（CREST研究期間累積件数：0件）