

「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。初年度となる平成11年度は、各グループで、課題達成のための実験設備の整備、および方法論の開発を開始するとともに、現在確立している方法による機能分子動態の解析を行ってきた。具体的には、機能分子の電子顕微鏡レベルでの二次元的な局在や動態をスクリーニングするためのSDS-FRL法の開発、代謝型グルタミン酸受容体の神経伝達調節に関する細胞生理学的研究、NMDA受容体およびその結合蛋白であるPSD-95などの蛋白質の膜表面への発現機構および生細胞での動態を可視化などを行った。今後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や、神経細胞の活動依存性におこる変化を更に解析していく予定である。

2. 研究実施内容

【研究目的】

脳機能は、神経回路網の作用の統合によって達成されるが、その機能的根本は神経細胞の興奮の伝導と伝達にある。この十数年間に、分子生物学あるいは細胞工学的手法によって、これらの過程に直接関係すると考えられる多種多様な受容体やイオンチャネルのような細胞膜貫通型タンパク質分子が同定され、そしてそれら分子の生化学的特性が急速に明らかにされてきている。しかし、現時点において、これらの分子の特性を総合しただけでは、個々の神経細胞の持つ特性やシナプスの可塑性、神経伝達調節メカニズムを十分に説明することはできない。これらを解明するためには、個々の機能分子の生化学的反応の解析だけでなく、その分子の膜上における微細局在、分布密度やそれに関連する他の分子との位置関係というような「場」の情報が必要である。また、さらに、生きた細胞でリア

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、明らかにすることが重要と考えられる。本年度は、このような目的を達成するための新しい方法論を、まず確立することを目標とした。

【方法】

従来の超薄切片を用いた免疫電子顕微鏡法では、二次元的な広がりを持つ平面上の分子配列を解析することは必ずしも容易ではない。最近、藤本はフリーズフラクチャーレプリカを用いて細胞化学的標識（主として免疫細胞化学的標識）を行う方法（SDS処理フリーズフラクチャーレプリカ標識法、SDS-FRLと略す）を考案し、これによって、細胞膜上における膜構成分子の二次元的な分布状態を解析することを可能にし、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も明らかにした。本研究では、SDS-FRLを用いて神経伝達物質受容体やイオンチャネルなどの神経機能分子の神経細胞膜上における二次元的な分布状態ならびに動態を検討する。そのためにさらに多くの膜上分子のスクリーニングを可能とするための改良、そして方法の評価、補強のためのpostembedding法の改良を同時に進めた。また、生細胞におけるリアルタイム解析のためにグルタミン酸受容体分子およびその細胞質に存在する結合蛋白質に着目して、これらの分子とクラゲ由来の蛍光蛋白質（GFP）の融合分子を作成し、融合分子をアデノウィルスベクターを用いて初代培養海馬神経細胞に発現させる系を開発した。

【現在までに得られた所見と今後の計画】

1. 神経膠細胞の一つである星状膠細胞において代謝調節型グルタミン酸受容体と水チャネルが凝集して存在し、グルタミン酸処理によって両者が解離することを明らかにした。今後、これらの分子の動態と神経膠細胞の生理機能との関連性を検討する。また、神経細胞のシナプス膜領域を中心にして、従来法と組合せた機能分子の微細局在について広く検索を開始した。
2. 現在、SDS-FRL用の二次抗体として10nm径のコロイド金標識抗体を用いているが、この二次抗体による一次抗体のマスキングから標識効率の低下を引き起こしている可能性がある。1 nm金粒子標識二次抗体を利用できるようにレプリカ免疫標識法の改良を試み、より鋭敏且つ分子の定量を可能にする。
3. リアルタイム観察系を更に発展させるために、現在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。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である。既に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、データが得られつつある。さらに高時空間解像度での解析を可能にするための2光子励起顕微鏡や、異なった複数の分子の動態を解析する多波長測光システム、膜機能蛋白の構造変化と相互作用を検出するFRET法については、年度末にようやく一部の設備が納入され、現在セットアップを進めるとともに、その基本的な性能についての評価段階である。

4. 受容体の伝達調節メカニズムを探る一環として、代謝型グルタミン酸受容体 (mGluR1a) の細胞外Ca²⁺感受性の生理的意義について調べた。mGluR1aを遺伝子導入したCHO (Chinese Hamster Ovary) 細胞が、細胞外Ca²⁺に依存して spindle shapeへ形態変化を示すことから、細胞外Ca²⁺が「常在」する生理的状況下でも、mGluR1aに対する細胞外Ca²⁺の恒常的刺激に意義があることを確認した。また、mGluR1aに対する細胞外Ca²⁺の恒常的刺激によりひき起こされている細胞応答、すなわちこのCHO細胞の形態変化の基礎にある細胞内情報伝達系を明らかにする実験を行い、以下の知見を得た (図1)。

- (1) adenylate cyclase - cAMP- protein kinase A --- MAP kinase kinase - MAP kinase 系の活性化がある。
- (2) mGluR1aを発現しているCHO細胞では、細胞内cAMP濃度の基礎値が高い。
- (3) cAMP濃度の上昇は、膜分画のみを用いた実験でも観察され、その上昇はGs蛋白に対する抗体でブロックされる。以上3点の結果から、CHO細胞において、mGluR1aは (よく知られている) Gq蛋白のみならずGs蛋白にも直接作用すること、mGluR1aに対する細胞外Ca²⁺の恒常的刺激によりGs系の基礎活性が高まっていることが明らかになった。今後は、細胞外Ca²⁺による機能分子動態の調節の可能性についても検討する予定である。

3. 主な研究成果の発表 (論文発表)

- Saitoh, O., Yoshihiro KUBO, Odagiri, M., Ichikawa, M., Yamagata, K. and Sekine, T. RGS7 and 8 differentially accelerate G protein-mediated modulation of K⁺ currents. *Journal of Biological Chemistry* 274, 9899-9904 (1999)
- Okabe, S., Kim, H., Miwa, A., Kuriu, T., and H. Okado. Continual remodeling of postsynaptic density and its regulation by synaptic activity. *Nature Neuroscience*, 2, 804-811, (1999).
- Silveira Smitt P, Kinoshita A, De Leeuw B, Moll W, Coesmans M, Jaarsma D, Henzen-Logmans S, Vecht C, De Zeeuw C, Sekiyama N, Nakanishi S, Shigemoto R. Paraneoplastic cerebellar ataxia due to autoantibodies against a glutamate receptor. *N Engl J Med* Jan 6;342(1):21-7 (2000)

