

記憶や学習に関わる神経伝達物質受容体の迅速な蛍光標識に成功

—記憶のメカニズム解明や神経疾患の診断への活用に期待—

発表のポイント

- ▶ 記憶の分子メカニズムを解明するために、神経伝達物質受容体に対して迅速に目印をつける方法が求められていた。
- ▶ 記憶や学習に必須のグルタミン酸受容体にわずか数分で蛍光の目印をつける方法を開発し、グルタミン酸受容体の動きを定量的に評価することに成功した。
- ▶ この蛍光標識技術では受容体の動きを詳細に可視化できるので、グルタミン酸受容体の異常で起こる脳卒中などの神経疾患や精神疾患の原因解明、および新たな診断技術開発への応用が期待される。

概要

名古屋大学大学院工学研究科の清中 茂樹 教授、曾我 恭平 博士前期課程学生、京都大学大学院工学研究科の浜地 格 教授、小島 憲人 博士後期課程学生、白岩 和樹 博士後期課程学生らは、記憶や学習に必須でありながら、その異常は脳卒中などの疾患の原因ともなってしまう、脳内タンパク質のグルタミン酸受容体に対して、蛍光色素などの目印を迅速につける（蛍光標識する）手法を開発しました。

脳内において、グルタミン酸受容体は記憶や学習に関わる重要なタンパク質で、その代表例として、AMPA受容体や NMDA 受容体が知られています。グルタミン酸受容体の神経細胞内での動きを知ることは、記憶のメカニズム解明だけでなく、神経疾患の診断方法などにもつながります。そのためには、神経細胞の受容体に蛍光の標識をつけて、記憶の強化や減弱に伴う受容体の発現量の変化を解析できる技術の開発が不可欠です。これまでに、蛍光タンパク質（2008 年下村脩 先生らのノーベル化学賞）を使って AMPA 受容体や NMDA 受

容体を蛍光標識する技術が開発されています。しかし、蛍光タンパク質を用いた方法では、多くの場合において新たに蛍光タンパク質を標識した受容体を遺伝子工学的に神経細胞内に強制発現させる必要があるだけでなく、蛍光タンパク質のサイズが大きいため受容体の本来の機能を阻害することも問題となっていました。そのような背景のもと、本研究グループは、2017年にAMPA受容体に対して蛍光の標識をつけることができる小分子化合物を見いだしました。しかし、蛍光標識には2~4時間の時間を必要としたため、受容体の動きの定量的な観察には問題を抱えていました。もし、迅速に蛍光標識することができれば、任意のタイミングで定量的に観察することが可能となります。

今回、AMPA受容体およびNMDA受容体に対して選択的に目印をつけられる新たな有機小分子化合物を開発し、2~3分と従来法に比べて60分の1以下の時間で蛍光標識を実現しました。この手法を用いることで、神経細胞でのAMPA受容体およびNMDA受容体の動きの定量解析に成功し、モデル動物細胞に発現させた場合に比べて、受容体タンパク質の寿命が約6倍と大幅に長くなることを見いだしました。また、この迅速な蛍光標識技術により、神経細胞内ではAMPA受容体が効率的に細胞膜と細胞内を行き来（リサイクリング）することも明らかにしました。今後、この蛍光標識技術を用いて受容体の動きを詳細に可視化することで、記憶や学習の脳高次機能の解明だけでなく、神経疾患や精神疾患の原因解明や新たな診断方法の開発につながることが期待されます。

本研究成果は、2021年2月5日に国際学術誌「Nature Communications」のオンライン版で公開されました。

1. 背景

脳内において、グルタミン酸受容体は記憶や学習に関わる重要なタンパク質です。神経細胞間の情報伝達は、1つの神経細胞の前シナプスから神経伝達物質としてグルタミン酸が放出され、別の神経細胞の後シナプスに存在するグルタミン酸受容体がそれを受け取ることで達成されます。グルタミン酸受容体としては、脳内にAMPA受容体やNMDA受容体などの種類が存在します。記憶や学習時において、AMPA受容体は細胞膜上の発現量を増加させ情報の伝達効率を上げることが重要であると知られています。NMDA受容体も同様に記憶や学習に不可欠なタンパク質ですが、脳卒中で起こるNMDA受容体の異常な活性化は神経細胞死を引き起こし、予後の悪さ（脳機能障害）の主要な原因です。

AMPA受容体およびNMDA受容体の神経細胞内での動きを知ることは、記憶のメカニズム解明だけでなく、神経疾患の診断方法などにもつながります。そのためには、神経細胞の受容体に蛍光の標識をつけて受容体の動きを解析できる技術の開発が不可欠です。これまでに、蛍光タンパク質を使ってAMPA受容体やNMDA受容体を蛍光標識する技術が開発されています。しかし、蛍光タンパク質を用いた方法では、多くの場合において新たに蛍光タンパク質を標識した受容体を遺伝子工学的に神経細胞内に強制発現させる必要があるだけでなく、蛍光タンパク質のサイズが大きいため受容体の本来の機能を阻害することも問題となっていました。そのような背景のもと、本研究グループは、2017年にAMPA受容体に対して蛍光の標識をつけることができる小分子化合物を見いだしました。しかし、蛍光標識には2~4時間の時間を必要としたため、標識された受容体は標識時間内に動いてしまい、受容体の動きの定量的な観察には問題を抱えていました。もし、迅速に蛍光標識することができれば、受容体の動きを定量的に観察することが可能となります。

2. 研究成果

(1) 細胞膜の AMPA 受容体だけを迅速に蛍光標識することに成功

本研究では、AMPA 受容体を迅速に蛍光標識できる新たな方法を開発しました。この方法では、初めに AMPA 受容体への目印づけが可能な小分子化合物を細胞に振りかけます。続いて AMPA 受容体に付与した目印に対して迅速かつ選択的に反応する蛍光性の小分子化合物を振りかけることで AMPA 受容体への迅速な蛍光修飾が可能となります (図 1 A)。AMPA 受容体を発現させたモデル細胞に対して本手法を適用したところ、細胞膜上の AMPA 受容体を 2~3 分以内という極めて短い時間で蛍光標識が可能であることを、顕微鏡観察により確認しました (図 1 B)。さらに、AMPA 受容体を天然に発現している神経細胞においても迅速な蛍光標識が可能であり、蛍光寿命顕微鏡という特殊な顕微鏡を用いることで、神経細胞内での AMPA 受容体の分布を定量的に解析することにも成功しました。

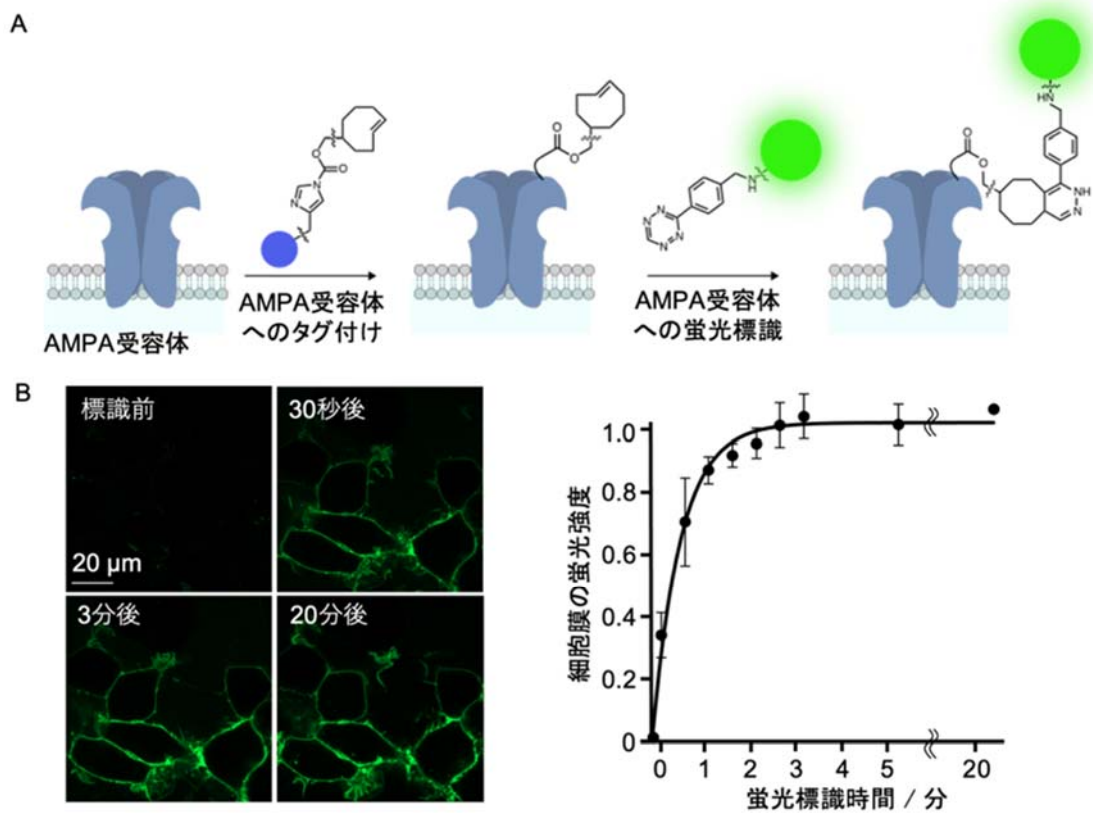


図1 AMPA受容体の迅速な蛍光標識法の開発 (A) AMPA受容体の迅速な蛍光標識法の模式図 (B) AMPA受容体を発現させたモデル細胞における蛍光標識の顕微鏡観察

(2) AMPA 受容体が神経細胞内で長寿命であることを見いだした

最近の研究成果から、AMPA 受容体は細胞表層と細胞内を行き来 (リサイクリング) すると考えられています。AMPA 受容体が存在する後シナプスは、そのサイズはわずか数百ナノメートルの微小空間であり、細胞内外を区別することは困難です。そこで、本手法を用いて迅速に標識し、AMPA 受容体の動きをタンパク質の解析方法であるウェスタンブロットティング法で解析したところ、AMPA 受容体を強制的に発現させた動物由来のモデル細胞 (HEK293T 細胞) においては、AMPA 受容体は細胞膜上に発現すると細胞内に取り込まれ、数時間でほとんどが分解されてしまうことがわかりました。一方、神経細胞において同様の解析を行ったところ、分解されにくく数十時間にわたって残存することがわかり、AMPA 受容体の寿命は神経細胞で約 6 倍と大幅に長くなることを明らかにしました (図 2)。

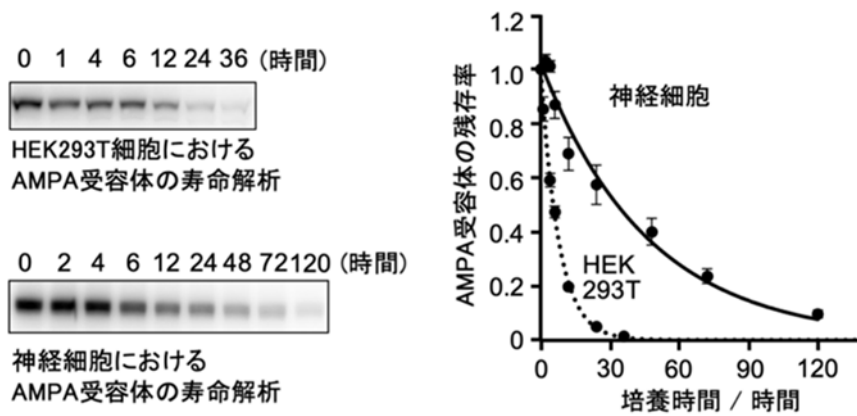


図2 神経細胞のAMPA受容体はHEK293Tに発現させたものよりも長寿命である

(3) 迅速な蛍光の目印づけは AMPA 受容体の長寿命のメカニズムを明らかにした

次に、本手法を用い、神経細胞に発現する AMPA 受容体が長寿命であるメカニズムの解明を行いました。神経細胞と HEK293T 細胞では、細胞内外の AMPA 受容体の存在比はあまり変わらないことがわかりました。一方、AMPA 受容体の細胞表層と細胞内の行き来に関しては、神経細胞においては数十分の時間スケールでリサイクルされるのに対して、HEK293T 細胞ではほとんどリサイクルされないことを見いだしました (図3)。すなわち、神経細胞における AMPA 受容体の高寿命はその効率的なリサイクルにあると考えられます。

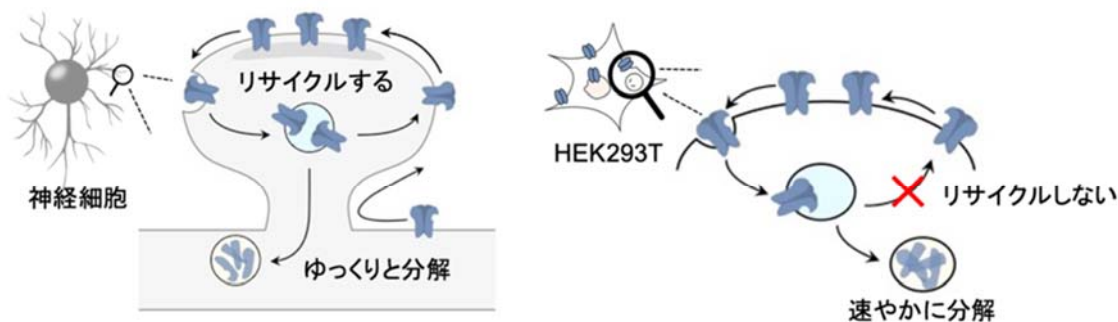


図3 神経細胞ではAMPA受容体は速やかにリサイクルし、HEK293T細胞ではリサイクルしない

(4) NMDA 受容体に対しても、迅速な蛍光標識を実現した

次に本手法の適用範囲を拡大し、新たな小分子化合物を設計、合成することで NMDA 受容体の迅速な蛍光標識にも成功しました。NMDA 受容体においても、HEK293T 細胞と比較し神経細胞では寿命が約5倍と幅が長くなっていることを見いだしました。また、神経細胞内においては、NMDA 受容体の寿命は AMPA 受容体よりも少し短くなっていることも明らかにしました。

3. 今後の予定および波及効果

今回の方法により、記憶や学習時に起こる AMPA 受容体および NMDA 受容体の動きを任意のタイミングで定量的に評価することができ、記憶の分子メカニズム解明に大きく貢献することが期待されます。本手法の特筆すべき点は、遺伝子改変などが一切必要なく、小分子化合物を加えるだけで解析できる点です。したがって、今後、神経疾患、精神疾患に対する新たな診断方法として応用展開できることが期待されます。特に、NMDA 受容体の異常などをいち早く検出することができれば、脳卒中など重大な神経疾患の新たな診断方法につながります。

また、脳内には、グルタミン酸受容体だけでなく、他にも複数の神経伝達物質受容体が存在し、それらの活性が密に連携することで、脳の極めて複雑な機能が制御されています。本手法は他の神経伝達物質受容体に対しても広く適用できると考えられ、脳機能解明を革新することが期待されます。

4. 研究プロジェクトについて

本研究成果は、慶應義塾大学 医学部 柚崎 通介 教授との共同研究の成果であり、科学技術振興機構 (JST) 戦略的創造研究推進事業 総括実施型 (ERATO) の研究領域「浜地ニューロ分子技術」(研究総括: 浜地 格 京都大学 教授) の一環として行われました。

<研究者のコメント>

いろいろな種類の蛍光色素を任意のタイミングでグルタミン酸受容体に修飾できる化学的方法を開発しました。グルタミン酸受容体は記憶や学習などの高次脳機能に不可欠なタンパク質であり、その異常は様々な疾患と直結します。今回の方法では、そのタンパク質の動きを精密に解析および追跡することができます。今後、未解明なことが多い脳機能の解明や疾患の診断につながればと思います (清中 教授)。

<論文タイトルと著者>

タイトル Ligand-directed two-step labeling to quantify neuronal glutamate receptor trafficking (グルタミン酸受容体の動態の定量化を可能とするリガンド指向性 2 ステップラベル化法)

著者 小島 憲人、白岩 和樹、曾我 恭平、堂浦 智裕、高遠 美貴子、小松 和弘、柚崎 通介、浜地 格、清中 茂樹

掲載誌 Nature Communications

DOI 10.1038/s41467-021-21082-x