

論文の内容の要旨

論文題目 A novel technique of tracing AMPA receptor endocytosis and recycling in cultured neurons

(AMPA 受容体エンドサイトーシスの新規可視化方法の開発)

氏名 林 亜矢子

細胞が細胞外からの刺激に対し適切に応答する為には、細胞表面にある受容体の数や配置などを調節する必要がある。その調節は受容体の分配機構によって複雑に制御されている。一般的に、受容体は中性条件下にある細胞表面でリガンドと結合する。リガンドと結合した受容体は、細胞内にエンドサイトーシスにより取り込まれる。エンドサイトーシス後、エンドサイトーシス小胞は、V 型 ATPase によって急速に小胞内の pH を減少させる。酸性条件下で受容体とリガンドは解離し、受容体はソーティングを受け、膜上へリサイクリングされるか、細胞内のコンパートメントへと運搬される。受容体の種類によってソーティング経路や運搬経路は異なっており、その分配機構のメカニズムには不明な点が多い。

特に、神経細胞は高度に分岐した構造をもっており、神経伝達物質に応答する受容体動態は非常に複雑に制御されている。シナプス関連タンパク質の適切な局在や運搬によって、複雑な神経ネットワークが形成されている。中でも、AMPA 受容体は記憶の形成や維持に関わり、神経細胞での受容体動態は重要視されている。中枢神経系において、興奮性シナプスにある AMPA 受容体は、シナプス前部から放出されたグルタミン酸に応答するトリガーとして働くことが知られている。成熟した神経細胞では、シナプスの細胞膜上に存在する AMPA 受容体の数がシナプス強度を決定する主要因となっている。この AMPA 受容体の数は、受容体のエンドサイトーシスやエキソサイトーシスのバランスによって保たれていると考えられている。活動に依存したシナプス強度の変化は、神経回路の構築を引き起こすことから、AMPA 受容体動態は注目されてきた。しかしながら、AMPA 受容体の細胞内プールと細胞表面の受容体との間での運搬については不明な点が多い。

これまで、生細胞における膜タンパク質の動態は、蛍光分子でラベルされた抗体によって標識した受容体や蛍光タンパクを融合した受容体などを用いた可視化法で解析されてきた。しかしながら、それらの方法にはプローブの大きさやクロスリンク、特異性、反応時間などいくつかの問題点がある。これらの問題を解決する為に、高い親和性と特異性を有する膜タンパク質の新規可視化技術が求められる。その候補として、本研究では、B-ZIP ロイシンジッパータンパクから人工的に改変された ZIP ペプチドを採用し、膜タンパク質動態の新しい可視化法を開発した。ZIP ペプチドは、2 本の異なる α ヘリックス構造を有す

る 49 アミノ酸からなるペプチドであり、約 150 kDa の IgG 抗体に比べ、6kDa と非常に小さい。膜タンパク質動態の可視化には、ZIP(+)と ZIP(-)とがヘテロメリックに結合することを利用する。ZIP(-)はリガンドとして大腸菌合成系により合成し蛍光標識を行い、ZIP(+)は標的タンパク質と融合させて遺伝子導入し、細胞表面に発現させる。蛍光標識した ZIP(-)は、ZIP(+)を導入された膜タンパク質の表面ラベルとなり、標的タンパク質が可視化される。ZIP(+)は ZIP(-)と $K_d=1.3 \times 10^{-11}M$ と高い親和性で結合する。これは、標識タンパクの可視化を安定的に観察できる可能性を示唆する。また、ZIP ペプチドは分子内にリジンやシステインを含まないことから、ペプチドの末端 1 か所に蛍光ラベルを任意で導入することが可能である。

本研究では、まず、膜タンパク質動態の新しい可視化における ZIP ペプチドの結合の特異性と安定性を検討した。特異性に関しては、ZIP(-)-FITC が ZIP(+)を融合した mGluR1(ZIP(+)-mGluR1)を発現させた細胞でのみで染色されることで観察した。この特異性は、HEK293 細胞や NIH 3T3 細胞のみならず、海馬神経初代分散培養やアストロサイト初代培養でも確認した。安定性に関しては、ZIP(-)/ZIP(+)の結合は 3 時間にわたり細胞膜上で維持されていることを確認した。さらに、ZIP(+)/(-)のヘテロメリックな結合は膜上に発現した受容体とクロスリンクしないことも明らかにした。このことから、ZIP ペプチドを用いた可視化法は受容体動態への影響を最小限にできることが示された。

次に、pH 感受性色素である RhPM を用いて、生細胞で活発に取り込まれる受容体動態の可視化を行った。RhPM は rhodamine をベースとした pH 感受性の官能基としてピペラジン誘導体を有する安定性のある蛍光色素である(Urano et al, nat. med, 2009)。この pH 感受性色素 RhPM で標識した ZIP ペプチドを用いることで酸性小胞に取り込まれた受容体のエンドサイトーシスを可視化することが可能である。NIH 3T3 細胞に発現させた ZIP(+)-mGluR1 を ZIP(-)-RhPM と反応させ、細胞内に取り込まれた受容体を可視化することができた。これらの小胞は Lysotracker と共局在する。このことから、ZIP(-)-RhPM を用いること細胞内に取り込まれる受容体動態に有用であることが示された。

ZIP ペプチドを用いた可視化システムを用いて AMPA 受容体動態を解析した。AMPA 受容体の GluA1 サブユニットに ZIP(+)タグを融合させた ZIP(+)-GluA1 を海馬神経初代培養に発現させ、ZIP(-)-RhPM でラベルすることで AMPA 受容体の取り込みを可視化した。RhPM は pH 感受性色素であるので、ZIP(-)-RhPM でラベルした ZIP(+)-GluA1 (RhPM-GluA1) は、細胞膜上など pH7.4 環境下で輝度は低いですが、エンドサイトーシス後エンドソーム内で酸性化を受けることで、輝度が上昇すると考えられる。RhPM-GluA1 陽性エンドソームはスパイン内で観察され、これらのシグナルはクラスリン依存的エンドサイトーシスを阻害することや固定細胞では観察されなかった。また、RhPM-GluA1 は Lysotracker 陽性エンドソームと共局在する。これらの結果は ZIP ペプチドによって生細胞で GluA1 の取り込みを特異的に観察することができることを示した。さらに詳細に RhPM-GluA1 の分布を調べると、多くのマッシュルーム型のスパインで RhPM-GluA1 を

持つ傾向にあった。シナプス後部のマーカーである PSD95-GFP との RhPM-GluA1 の局在を調べると、両者は近接しているが、異なる動態を示した。従来用いられてきた蛍光標識をしたトランスフェリンでリサイクリングエンドソームを染色すると、RhPM-GluA1 と局在は完全には一致しない。以上のことから、複雑に制御を受ける受容体動態を観察する際には、直接標的受容体を可視化する ZIP ペプチドを用いた可視化システムが有効であることがしめされた。

さらに、ZIP システムを用いて、受容体の取り込みを連続的に可視化した。RhPM-ZIP を用いて、GluA1 の internalization rate を測定した。蛍光輝度は dye 添加直後から増大し、dye 添加後 10 分で飽和した。この結果から、AMPA 受容体のエンドサイトーシスが恒常的に起きており、スパイン内で取り込まれ酸性化をうけることを明らかにした。また輝度の立ちあがりのタイミングを解析することで、0.2-0.03Hz で取り込みが起きていることがわかった。

一方、SEP-GluA1 を用いることで、エキソサイトーシスした受容体を観察することも試みた。中性付近で蛍光輝度が上昇する pH 感受性タンパク質である SEP を付加した GluA1 を用い、広範囲をブリーチした後リカバリーした蛍光輝度を測定することで新しくエキソサイトーシスした受容体の割合を算出した。10 分後のリカバリーは 10%程度であり、従来の報告と一致した。さらに、個々のエキソサイトーシスを検出する為に、検出感度を上げて観察すると、リカバリースポットは、シャフトやスパインで観察され、それぞれのスポットの蛍光輝度は段階的な蛍光輝度の上昇が観察された。リカバリースポットの局在は、細胞体からの距離に依存せず、樹状突起で連続的に観察された。これらの観察は、AMPA 受容体のエンドサイトーシスがシナプスに近い場所で起き、表面にある AMPA 受容体の数を調整に細胞内にある AMPA 受容体のリサイクリングプールが重要である可能性を示した。

本研究において、膜タンパク質の新規可視化方法としてペプチドタグを用いた可視化法を確立した。ペプチドによる可視化法は、ラベリングまでの時間が短時間であることから、高速に取り込みが起きている受容体に適応することにおいて優れている。ZIP の利点として、ZIP ペプチドは 49 アミノ酸からなり、抗体や蛍光タンパク質、 α -bungarotoxin など他の標識法に比べ非常に小さい。ZIP ペプチドは、安定性と親和性が優れており、pH 感受性色素を用いることで取り込まれた受容体を可視化することが可能となった。受容体のみならず、接着分子やチャネルタンパクなどは、細胞外ドメインが小さい事から、このようなタンパク質への蛍光タンパク質などの相対的に大きなタグの融合は、機能解析の際に問題になることが報告されている。ZIP のように小さいタグは、このような問題を回避し、タグによる影響を最小にする事ができる。

また、ZIP タグは B-ZIP タンパクから人工的な改変されたヘテロダイマーである。ZIP ペプチドは HEK293 細胞や NIH 3T3 細胞、アストロサイトや海馬の分散培養で非特異的な結合が少なく、抗体のように 2 価の結合サイトを有していないため、クロスリンクによる受容体の取り込みの阻害や受容体の人為的活性化などが起こらないと考えられる。最後

に、ZIP ペプチドの親和性はペプチドタグの中で高く、短い反応時間で染色が可能である。これは、エンドサイトーシスやエキソサイトーシスが起こるなど様々な状況下で膜タンパク質の長時間可視化を可能とする。短い反応時間は、特に、パルスチェイスを行う際に有用であると考えられる。さらに、ZIP に pH 感受性色素である RhPM 付加することで受容体エンドサイトーシスの可視化が可能となった。

本研究は、ZIP ペプチドが親和性、安定性に優れることを確認し、海馬神経初代培養の生細胞において、AMPA 受容体の早い取り込みの可視化を可能にした。複雑に制御をうける受容体エンドサイトーシスにおいて、標的受容体を直接可視化することは、受容体ごとに異なるとりこみのタイミングやとりこみ経路の区別を可能とする。神経細胞において、特に AMPA 受容体動態を観察することは、記憶の形成や維持を理解する上で重要である。ZIP システムを用いて AMPA 受容体動態を観察する事で、多くのマッシュルームタイプの成熟したスパインにエンドソームがあり、AMPA 受容体は定常状態で恒常的にスパインやシャフトで取り込まれていることが観察された。以上の結果は、スパイン内のエンドソームがどのような時間変化で制御を受けているかを解析できるツールとなる可能性がある。さらに、このシステムを用いることで、シナプス可塑性などの刺激条件下において GluA 1 を含んだエンドソームを持つスパインと含まないスパインの詳細な応答を検討することが可能となる。