

139. アミロイド β のグルタミン酸受容体への作用の可視化

田中 洋光

京都大学 大学院理学研究科 生物科学専攻

Key words : アルツハイマー病, アミロイドベータ, シナプス可塑性, グルタミン酸受容体, 全反射顕微鏡

緒言

現在大きな社会問題の1つとして、認知症の患者数増加が挙げられる。その代表例であるアルツハイマー病は、42残基のアミロイドベータ ($A\beta$) 蓄積による老人斑の形成、過剰リン酸化タウタンパク質蓄積による神経原線維変化、神経変性 (神経細胞死) が順に起こると考えられており、その発症までに約30年の長い潜伏期間がある^{1,2)}。そのため、神経細胞の脱落がすでに進行している重度のアルツハイマー病患者では、 $A\beta$ ワクチン療法により蓄積型 $A\beta$ を除去しても、明確な神経機能の改善が認められていない³⁾。従って現在、新たな根本的治療法や発症予防法の開発を目指して、 $A\beta$ が蓄積する前の早期病態解明が求められている。そこで本研究は、老人斑形成前に既に存在し、蓄積型 $A\beta$ より毒性が高いのではないかという見方が最近強まっている低分子重合体 ($A\beta$ オリゴマー) に焦点を当てた。

アルツハイマー病の初期症状に、記憶・学習障害がある。これは $A\beta$ オリゴマーが、何らかの作用で海馬神経細胞のシナプス関連分子に動態異常を及ぼし、長期増強現象 (LTP: long-term potentiation) の発現を抑制することが一因と考えられている。LTPは、記憶・学習の細胞基盤として考えられており、100 Hz 1秒間などの一過性の高頻度刺激をシナプス前細胞に加えると、シナプス後細胞から記録されるシナプス応答が、その後持続的に増強する現象である^{4,5)}。しかしながら従来の実験系では、 $A\beta$ オリゴマーが作用する神経伝達物質受容体などの候補分子の動態をリアルタイムでモニターし、LTP発現時における受容体動態の変化を定量的に把握できていなかった。そこで本研究では、中枢神経内の主要な興奮性シナプス伝達を担うAMPA型グルタミン酸受容体 (AMPA受容体) に注目し、独自の可視化実験系を用いて、AMPA受容体の動態異常をリアルタイムかつ定量的に観察した。

方法および結果

最初に、本研究で用いた実験系について説明する。これまでの研究で、シナプス後膜内外における受容体を効率良く、安定的に可視化するために、全反射顕微鏡を用いた独自の実験系を構築した^{6,7)}。全反射顕微鏡は背景光を極端に減らすことにより、ガラス面の極近傍 (約100 nm) にある蛍光分子のみを観察できる⁸⁾。条件によっては、蛍光1分子をも観察可能で定量性に優れている。しかしながら培養下でも、概してシナプス後膜は全反射顕微鏡の観察領域外にあるために、ガラス面直上に目的の細胞膜構造を形成させる必要があった。そこで、シナプス接着分子であるニューレキシンとニューロリジンが結合するとシナプス形成が誘導される点を利用した⁹⁾。実際に、ニューレキシンをガラス面にコートし、その上にラット海馬神経細胞を初代培養すると、樹状突起上にPSD95やHomerといった興奮性シナプス後膜の足場タンパク質が集積し、シナプス後膜様構造が形成された (図1)。そして、蛍光標識したAMPA受容体の動態を高シグナルノイズ比、高時空間分解能でライブイメージングできた。本研究もこの手法を応用して、以下の実験を行った。

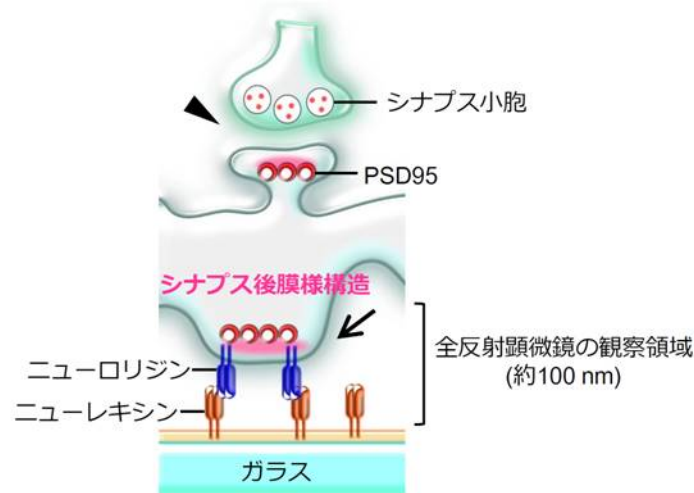


図1. 本研究で用いた可視化実験系の模式図

ガラス面にニューレキシシンをコートすることで、通常のシナプス（矢頭）の他に、ガラス面直上にシナプス後膜様構造（矢印）が形成される^{6,7)}。全反射顕微鏡を用いると、このシナプス後膜のみを観察できる。

まず、合成 $A\beta$ を遠心エバポレーターで遠心処理後、 4°C で一晩静置した。そして、この調製した $A\beta$ が主に 10 mer を含むオリゴマーであることを、ウエスタンブロッティング法により確認した（図 2a）。次に、海馬神経細胞にこの $A\beta$ を投与すると、PSD95 のクラスター集積度合いが減弱する、スパイン密度が減少することを免疫染色法により明らかにした（図 2b）。これらの結果より、本研究で作製した $A\beta$ オリゴマーが毒性を有することが確認できた。

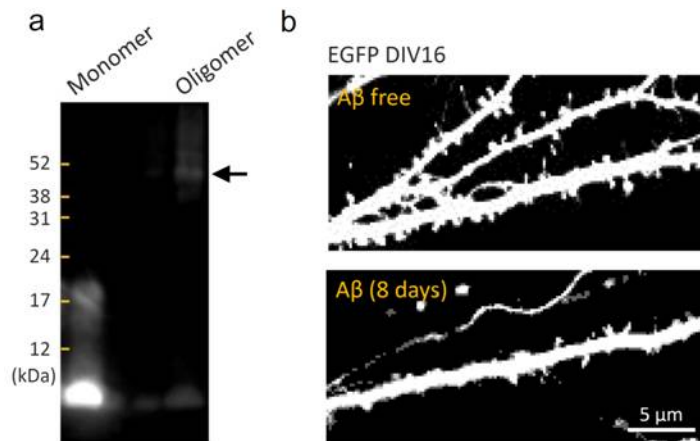


図2. 調製した $A\beta$ のオリゴマー化と毒性確認

(a) 調製した $A\beta$ のウエスタンブロッティング。オリゴマー化をしなかった場合には、主にモノマー（4.2 kDa）のバンドが確認された一方、オリゴマー化をした場合には、主に 10 mer 程度のバンドが確認された（矢印）。(b) EGFP を発現させた神経細胞の免疫染色図。 $A\beta$ オリゴマーを 8 日間投与する（下）と、投与しなかった場合（上）と比べ、スパインの消失がより多く観察された。

次に、super-ecliptic pHluorin (SEP) で蛍光標識した AMPA 受容体サブユニット GluA1、または GluA2 を神経細胞に遺伝子導入した。SEP は、pH 感受性 GFP の 1 つで、細胞膜表面などの中性 pH 下で緑色蛍光を発し、エンドソームなどの酸性下では蛍光が著しく減弱する¹⁰⁾。この蛍光タンパク質を用いることで、シナプス後膜上での受容体数の変化を定量でき、エキソサイトーシスの可視化もできる。GluA1-SEP または GluA2-SEP が発現した神経細胞に $A\beta$

を投与した後に、LTP 誘導刺激である電場刺激を加えた (図 3a)。刺激後の蛍光輝度変化を解析した結果、GluA1 の輝度は増加しなかった一方、GluA2 の輝度はやや増加した。また、 $A\beta$ を投与しないコントロール実験では、GluA1、GluA2 共に輝度が増加した。次に、 $A\beta$ 投与後に GluA1 の輝度が増加しなかった動態要因が、何であるかを明らかにするために、GluA1 のエキソサイトーシスを観察した (図 3b)。解析の結果、エキソサイトーシスの頻度がコントロールに比べ減少することが明らかとなった。以上の結果より、 $A\beta$ オリゴマーは LTP 発現に際して、GluA1 サブユニットを含む AMPA 受容体のエキソサイトーシスを障害し、その数の増加を阻害することが示唆された。

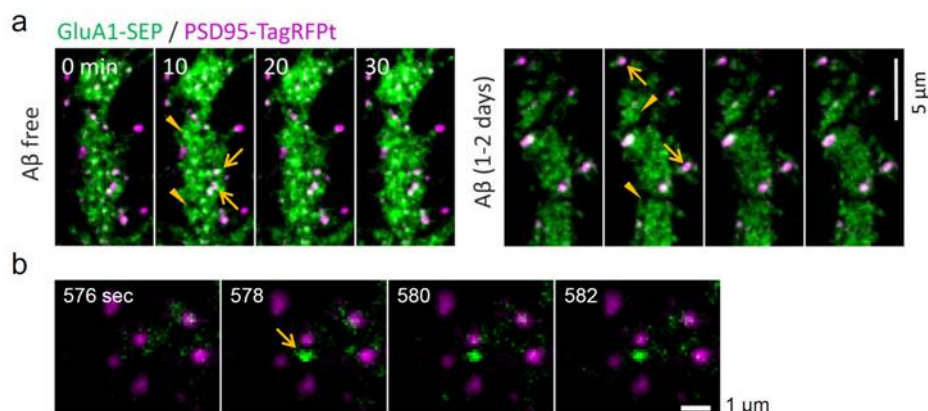


図 3. $A\beta$ を非投与、または投与した場合での LTP 誘導刺激後における樹状突起の観察例

(a) 刺激から 10 分ごとの GluA1-SEP の輝度変化例。赤色蛍光タンパク質 TagRFpT で標識した PSD95 は、シナプス後膜マーカーとして共発現させた。シナプス後膜領域 (矢印)、シナプス外 (矢頭) において共に $A\beta$ を投与した場合 (右) では、投与しなかった場合 (左) と比べ SEP の蛍光輝度が増加しなかった。(b) GluA1-SEP のエキソサイトーシス例 (矢印)。 $A\beta$ を投与した場合には、PSD95 近傍におけるエキソサイトーシスは、刺激後ほとんど観察されなかった。なお、数字は刺激開始からの経過時間を示す。

考 察

本研究ではアルツハイマー病の早期病態解明を目指して、LTP 発現時に $A\beta$ オリゴマーが AMPA 受容体に及ぼす動態異常について解析した。興味深い事に、GluA1 サブユニット特異的にエキソサイトーシスは障害され、LTP 発現が抑制されることを示唆する結果を得た。これは、初期症状に起こる記憶・学習障害が実験モデルで再現されたのかもしれない。GluA1 は他のサブユニットに比べてカルシウム透過性があることから、LTP を発現するためには重要な分子である。何らかの分子機構で $A\beta$ がエキソサイトーシスを阻害することで、細胞内カルシウム濃度の一過的な上昇を抑えている可能性がある。また、 $A\beta$ 投与によって PSD95 が減少したことから、足場タンパク質の局在が弱まり、GluA1 がシナプス後膜に繫留されにくくなった可能性も考えられる。今後はエンドサイトーシスや側方移動といった他の動態も可視化することで、より詳細な GluA1 の動態異常が明らかとなるであろう。また、成熟した海馬神経細胞に発現する他のサブユニット (GluA2 と GluA3) も同様に調べることで、異なるサブユニット構成の AMPA 受容体の動態全体像を把握できるであろう。今後もこれらの研究を通じて、アルツハイマー病の発症分子機構の解明、及びその治療薬開発に貢献したい。

共同研究者

本研究の共同研究者は、京都大学大学院理学研究科の平野丈夫、坂口大輝である。最後に、本研究を御支援下さった上原記念生命科学財団に心より感謝いたします。

文 献

- 1) Palop JJ, Mucke L. Amyloid-beta-induced neuronal dysfunction in Alzheimer's disease: from synapses toward neural networks. Nat. Neurosci. 2010;13(7):812-8. doi: 10.1038/nn.2583. PubMed PMID:19838821

- 2) Um JW, Nygaard HB, Heiss JK, Kostylev MA, Stagi M, Vortmeyer A, Wisniewski T, Gunther EC, Strittmatter SM. Alzheimer amyloid- β oligomer bound to postsynaptic prion protein activates Fyn to impair neurons. *Nat. Neurosci.* 2012;15(9):1227-35. doi: 10.1038/nn.3178. PubMed PMID:22820466
- 3) Holmes C, Boche D, Wilkinson D, Yadegarfar G, Hopkins V, Bayer A, Jones RW, Bullock R, Love S, Neal JW, Zotova E, Nicoll JA. Long-term effects of Abeta42 immunisation in Alzheimer's disease: follow-up of a randomised, placebo-controlled phase I trial. *Lancet.* 2008;372(9634):216-23. doi: 10.1016/S0140-6736(08)61075-2. PubMed PMID:18640458
- 4) Malinow R, Malenka RC. AMPA receptor trafficking and synaptic plasticity. *Annu. Rev. Neurosci.* 2002;25:103-26. doi: 10.1146/annurev.neuro.25.112701.142758 PubMed PMID:12052905
- 5) Huganir RL, Nicoll RA. AMPARs and synaptic plasticity: the last 25 years. *Neuron.* 2013;80(3):704-17. doi: 10.1016/j.neuron.2013.10.025. PubMed PMID:24183021
- 6) Tanaka H, Hirano T. Visualization of subunit-specific delivery of glutamate receptors to postsynaptic membrane during hippocampal long-term potentiation. *Cell Rep.* 2012;1(4):291-8. doi: 10.1016/j.celrep.2012.02.004. PubMed PMID:22832222
- 7) Tanaka H, Fujii S, Hirano T. Live-cell imaging of receptors around postsynaptic membranes. *Nat. Protoc.* 2014;9(1):76-89. doi: 10.1038/nprot.2013.171. PubMed PMID:24336472
- 8) Toomre D, Manstein DJ. Lighting up the cell surface with evanescent wave microscopy. *Trends Cell Biol.* 2001;11(7):298-303. PubMed PMID:11413041
- 9) Südhof TC. Neuroligins and neuroligins link synaptic function to cognitive disease. *Nature.* 2008;455(7215):903-11. doi: 10.1038/nature07456. PubMed PMID:18923512
- 10) Miesenböck G, De Angelis DA, Rothman JE. Visualizing secretion and synaptic transmission with pH-sensitive green fluorescent proteins. *Nature.* 1998;394(6689):192-5. PubMed PMID:9671304