27　記憶貯蔵の鍵となるAMPA受容体翻訳後修飾の解明	竹本　研

【目的】動物はいかにして記憶を貯蔵するのだろうか？海馬記憶には、グルタミン酸シナプスに代表される興奮性シナプスの可塑的な変化、すなわちシナプス可塑性が重要である。興奮性シナプス活動に重要な AMPA 受容体のうち、GluA1 を含む複合体は神経活動依存的にシナプス移行するが、GluA2/3 は神経活動非依存的に・恒常的にシナプス移行する。我々はこれまでに、独自の AMPA 受容体光不活化技術・CALI 法（chromophore-assisted light inactivation）を *in vivo* で駆使し、記憶の獲得には学習に伴いシナプス移行した GluA1 ホモマーが重要なことを見出した。さらに我々は最近、GluA2/3 に対する CALI 法の開発にも成功し、GluA2/3 は記憶の獲得ではなく記憶の貯蔵に特異的に機能することも発見した（Jitsuki S et al. 投稿準備中）。一方で前述の通り GluA2/3 は、神経活動非依存的・恒常的にシナプス移行を繰り返すため、従来は学習記憶には無関係な静的な分子と考えられていた。従って、こうした特徴を持つ GluA2/3 が、記憶貯蔵分子として機能するメカニズムは大きな謎である（図）。それに対して我々は、記憶貯蔵期に特異的な翻訳後修飾が GluA2/3 分子に生じることで GluA2/3 複合体のイオンチャネル特性が変化し、記憶貯蔵分子に変換されるとの仮説を立てた。我々はその解明を目指し、GluA2/3 を精製後にプロテオーム解析を行い、記憶貯蔵期に特異的に起こる翻訳後修飾の同定を計画した。そのためにはまず、GluA1/1 と GluA2/3 が記憶後どういった時期に特異的に機能するか、詳細な時間枠を特定する必要がある。

【方法】まず NMDA 電流を陰性対象にした電気生理学的解析や GluA3 ノックダウン細胞における電気生理学的解析を行い、GluA2/3 CALI 法の分子特異性について技術評価を行った。次に *in vivo* において学習後の様々なタイミングで GluA1/1 と GluA2/3 を CALI で不活化し、記憶テストにより記憶の消去を解析することで、GluA2/3 が記憶を担う時間枠の同定を行った。さらに *in vivo* CALI 後の脳スライスで、電気生理学的解析を行い、シナプス発現を確認した。

【結果】電気生理学的解析により、GluA3 抗体を用いた CALI 法は GluA2/3 特異的に不活性化することを明らかにした。さらに *in vivo* で CALI を行ったところ、GluA1/1 は学習後 2 時間まで記憶をコードし、GluA2/3 が学習後 4 時間以降から記憶をコードすることを見出した。即ちこの結果は記憶を担う AMPA 受容体は学習後 2〜4 時間の間にシフトすることを意味する。また学習後 1 時間と 24 時間で *in vivo* CALI 後に海馬急性スライスを作製し、電気生理学的解析をしたところ、両時間ともに CALI による AMPA/NMDA の低下が認められた。これは、学習後 1 時間でも 24 時間でも GluA2/3 はシナプスに発現するが、記憶をコードするのは 24 時間だけということ示す。すなわち学習後 24 時間では GluA2/3 の分子特性が変化していることを発見した。

学習前後の AMPA 受容体動態



27. 記憶貯蔵の鍵となる AMPA 受容体翻訳後修飾の解明

竹本　研

三重大学 大学院医学系研究科 生化学分野

Key words：AMPA 受容体，海馬記憶，CALI 法

緒　言

動物はいかにして記憶を貯蔵するのだろうか？海馬記憶には、グルタミン酸シナプスに代表される興奮性シナプスの可塑的な変化、すなわちシナプス可塑性が重要である。興奮性シナプス活動に重要な AMPA 受容体には、GluA1～4 サブユニットが存在する。成体の海馬ではこれらが組み合わさり、GluA1/1・GluA1/2・GluA2/3 複合体が発現する。その中でも GluA1 を含む複合体は神経活動依存的にシナプス移行するが、GluA2/3 は神経活動非依存的に・恒常的にシナプス移行する［1，2］。

我々はこれまでに、CALI 法（chromophore-assisted light inactivation）［3］を利用し AMPA 受容体光不活化技術を独自に開発している。またこれまでにこれを *in vivo* で駆使することで、記憶の獲得には学習に伴いシナプス移行した GluA1 ホモマーが重要なことを見出した［4］。さらに我々は 2020 年に独立後、GluA2/3 を光で特異的に不活性化する CALI 法の開発にも成功し、GluA2/3 は記憶の獲得ではなく記憶の貯蔵に特異的に機能することも発見した（Jitsuki S et al. 投稿準備中）。一方で前述の通り GluA2/3 は、神経活動非依存的・恒常的にシナプス移行を繰り返すため、従来は学習記憶には無関係な静的な分子と考えられていた。従って、こうした特徴を持つ GluA2/3 が、記憶貯蔵分子として機能するメカニズムは大きな謎である（図 1）。



図 1．学習前後の AMPA 受容体動態

それに対して我々は、記憶貯蔵期に特異的な結合分子が GluA2/3 分子に生じることで GluA2/3 複合体のイオンチャネル特性が変化し、記憶貯蔵分子に変換されるとの仮説を立てた。我々はその解明を目指し、学習前と記憶獲得期・記憶貯蔵期の 3 点において GluA2/3 を精製後にプロテオーム解析を行い、記憶貯蔵期に特異的に起こる PTM の同定する計画を立てている。この計画を実行するには、GluA1/1 と GluA2/3 が記憶後どういった時期に特異的に機能するか、時間枠を特定する必要がある。

本研究ではまず電気生理学的解析により、CALI 法の分子特異性を確認した。さらに *in vivo* で CALI を行ったところ、GluA1/1 は学習後 2 時間まで記憶をコードし、GluA2/3 が学習後 4 時間以降から記憶をコードすることを見出した。また CALI 後に電気生理学的解析を行い、学習後 1 時間でも 24 時間でも GluA2/3 はシナプスに発現するが、記憶をコードするのは 24 時間だけということを見出した。すなわち学習後 24 時間では GluA2/3 の分子特性が変化していることを発見した。

方　法

1. 海馬初代培養ニューロンにおける GluA2/3 CALI 法に関する分子特異性の評価

一般的に CALI 法で用いる ROS の拡散半径は約 3～4 nm 以下であり［5］、極めて高い分子特異性があることが知られているものの、実験ごとにそれを示すことも重要である。まず本項では、海馬初代培養ニューロンにおいて CALI 前後の AMPA 電流と NMDA 電流の変化をホールセルパッチクランプで解析した。

2. *in vivo* における GluA2/3 CALI 法に関する分子特異性の評価

GluA3 のノックダウンを行うレンチウイルスを作製し、海馬 CA1 領域に感染後に *in vivo* CALI（60 mW、2 min,）を行い、海馬急性スライスを作製した。作製した急性スライスの GFP 陽性（＝GluA3 ノックダウン）CA1 錐体ニューロンにおいて AMPA/NMDA 比をホールセルパッチクランプにより記録し、光照射有り無しで比較解析した。

3. *in vivo* CALI 実験におけるタイムコース解析

受動的回避学習後に様々なタイミングで、我々の既報に従い *in vivo* CALI を行った。学習後 20～24 時間において CALI により記憶が消去されたかを確認した。

4. *in vivo* CALI 実験後の電気生理学的解析

受動的回避学習後 1 時間及び 24 時間において、我々の既報に従い *in vivo* CALI を行った。CALI 後ただちに海馬急性スライスを作製し、CA1 錐体ニューロンにおいて AMPA/NMDA 比をホールセルパッチクランプにより記録し、光照射有り無しで比較解析した。

結果および考察

1. 海馬初代培養ニューロンにおける GluA2/3 CALI 法に関する分子特異性の評価

図 2A には参考のため、GluA2/3CALI 法の概要を示した。図 2B に示す通り、抗 GluA3 抗体を用いた CALI により AMPA 電流は顕著に抑制されたが、NMDA 電流は光照射により変化しなかった。AMPA 受容体と NMDA 受容体はともにシナプスに発現するグルタミン酸受容体であり、両分子の局在はよく一致することが知られている。従って我々が開発した抗 GluA3 抗体を用いた CALI 法は、分子が非常に込み合うと考えられているシナプスにおいても、高い分子特性があることがわかった。

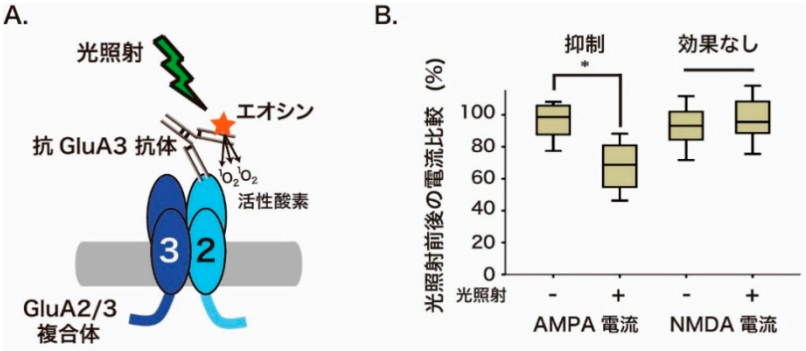


図 2. 海馬初代培養ニューロンにおける GluA2/3 CALI 法の分子特異性

A) GluA2/3 CALI 法の模式図。これまでの研究で、抗 GluA3 細胞外領域抗体を 76 種類作製し、最も CALI 効率が高いものを同定した。

B) 海馬シナプスにおける CALI。光照射依存的に AMPA 電流は低下するが、NMDA 電流は変化しない。n≧8 cells、*p＜0.001（student's t-test）。

2. *in vivo* における GluA2/3 CALI 法に関する分子特異性の評価

図 3 に示す通り、コントロールの miRNA（スクランブル配列）では光照射で AMPA 電流は低下した（CALI の効果があった）ものの、GluA3 ノックダウン用の miRNA に感染した細胞では、AMPA 電流の低下は認められなかった。

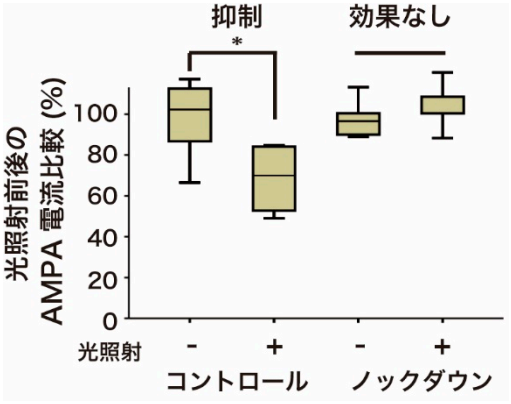


図 3. *in vivo* 海馬 CA1 領域の錐体細胞における GluA2/3 CALI 法の分子特異性
GluA3 ノックダウン細胞では CALI の効果はない。n≧6 cells、*p＜0.05（student's t-test）。

3. *in vivo* CALI 実験におけるタイムコース解析

受動的回避学習後、*in vivo* CALI を学習後 1、2、4、24 時間に行い、翌日記憶が消えたかを確認した。縦軸は記憶テストの際にボックスに入るまでの時間（秒）を表し、学習成績の指標となる。図 4 の通り、GluA1/1 は学習後 2 時間まで記憶に機能し、GluA2/3 は学習後 4 時間～24 時間に機能することを見出した。即ちこの結果は記憶を担う AMPA 受容体は学習後 2～4 時間の間にシフトすると考えられた。

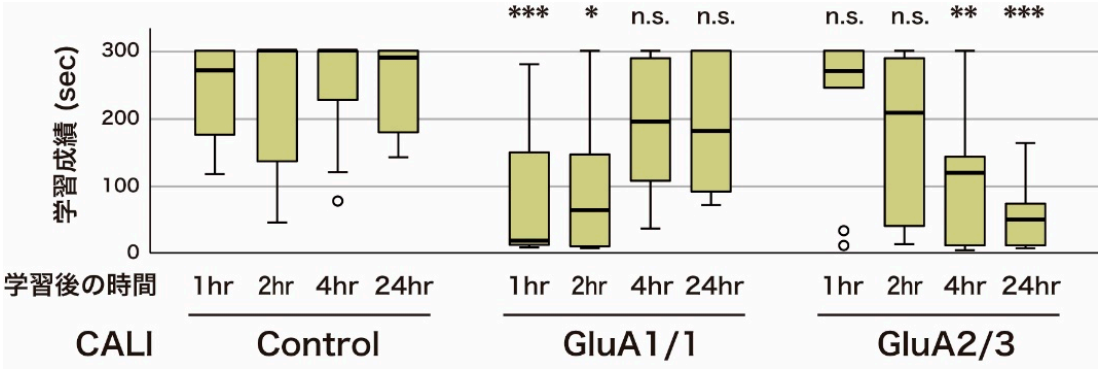


図 4. *in vivo* CALI による記憶消去実験のタイムコース解析
in vivo CALI による記憶に機能する時間枠のタイムコース解析。海馬依存的な課題である受動的回避学習後、各時間において GluA1/1 と GluA2/3 の *in vivo* CALI を行い、学習成績の低下を指標にいつ記憶に機能するかを解析した。記憶に機能する AMPA 受容体が 2～4 時間を境に GluA1/1 から GluA2/3 に置き換わる。Control は抗 Myc 抗体による CALI。n≧9 animals、***p＜0.001、**p＜0.005、*p＜0.05 vs Control at the same timing（Dunnet T3 test）。

4. *in vivo* CALI 実験後の電気生理学的解析

上記実験と同様に *in vivo* CALI を行い、海馬急性スライスにおいて図 5 の通り AMPA/NMDA 比を解析した。学習後 1 時間・24 時間ともに光照射で同程度 AMPA/NMDA 比の低下が認められた。すなわちこれは、学習後 1 時間でも 24 時間でも GluA2/3 はシナプスに発現するが、記憶をコードするのは 24 時間だけということが分かった。以上の結果から、記憶を担う学習後 24 時間では GluA2/3 の分子特性が変化していることを発見した。

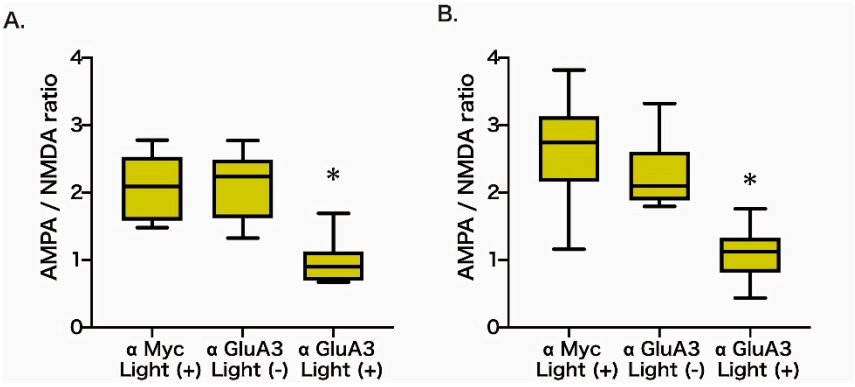


図 5. *in vivo* CALI 後の AMPA/NMDA 解析

A） 学習後 1 時間で CALI を行い、パッチクランプにより AMPA/NMDA 比を解析した。

B） 学習後 24 時間で CALI を行い、パッチクランプにより AMPA/NMDA 比を解析した。

n≧8 cells、*p＜0.05 (One-way ANOVA followed by Dunnet multiple comparisons test)。

謝　辞

本研究は三重大学医学部生化学分野の實木博士、設楽博士の協力のもと行われました。また、本研究の遂行にあたり、三重大学先端科学研究センターの支援を頂きました。謹んでお礼申し上げます。

文　献

1） Shi S, Hayashi Y, Esteban JA, Malinow R. Subunit-specific rules governing AMPA receptor trafficking to synapses in hippocampal pyramidal neurons. Cell. 2001;105(3):331-43. doi: 10.1016/s0092-8674(01)00321-x. PubMed PMID: 11348590.

2） Takahashi T, Svoboda K, Malinow R. Experience strengthening transmission by driving AMPA receptors into synapses. Science. 2003;299(5612):1585-8. doi: 10.1126/science.1079886. PubMed PMID: 12624270.

3） Jay DG. Selective destruction of protein function by chromophore-assisted laser inactivation. Proc Natl Acad Sci U S A. 1988;85(15):5454-8. PubMed PMID: 3399501; PubMed Central PMCID: PMC281775.

4） Takemoto K, Iwanari H, Tada H, Suyama K, Sano A, Nagai T, et al. Optical inactivation of synaptic AMPA receptors erases fear memory. Nat Biotechnol. 2017;35(1):38-47. doi: 10.1038/nbt.3710. PubMed PMID: WOS:000392460800021.

5） Beck S, Sakurai T, Eustace BK, Beste G, Schier R, Rudert F, et al. Fluorophore-assisted light inactivation: a high-throughput tool for direct target validation of proteins. Proteomics. 2002;2(3):247-55. PubMed PMID: 11921440.