

News Release



令和6年8月26日

各報道機関文教担当記者 殿

脳の記憶と学習の謎に迫る！ ナノスケールで捉えた グルタミン酸受容体の驚きの動き

金沢大学ナノ生命科学研究所 (WPI-NanoLSI) / 新学術創成研究機構の角野 歩助教, 柴田幹大教授, ナノ生命科学研究所 (WPI-NanoLSI) の炭竈享司特任助教らの研究グループは, 中国・復旦大学生命科学学院の服部素之教授らの研究グループとの共同研究で, **脳の記憶や学習に重要な役割を果たす AMPA 型グルタミン酸受容体 (AMPA 受容体, ※1) の細胞外ドメインのナノメートルスケールでの動きを, 高速原子間力顕微鏡 (高速 AFM, ※2) を用いて世界で初めて動画撮影することに成功**しました。

AMPA 受容体は, 脳のシナプスで興奮性神経伝達を担うタンパク質です。これまで, 信号を受け取るとシナプス後部に AMPA 受容体が集合して, 伝達効率を高めると考えられてきました。しかし, AMPA 受容体がシナプスに留まって集合する分子メカニズムは完全には理解されていませんでした。今回の研究では, 高速 AFM を用いて, AMPA 受容体の細胞外ドメインが大きく揺れ動く様子を可視化することに成功しました。さらに, これまで強固と考えられていた二量体 (ダイマー) 構造が, 実際には一つずつに分離し, 分裂と結合を繰り返す様子を観察しました。この「ダイマー分裂」により, 複数の AMPA 受容体が互いに結びつきやすくなり, さらに, シナプスで放出されるシナプスオーガナイザー分子との結合力が高まる可能性が示されました。これにより, 「ダイマー分裂」が AMPA 受容体のシナプスへの集合を促す分子機構の一部であることが明らかになりました。AMPA 受容体はてんかん発作を引き起こす重要な分子であり, その動作を阻害する薬剤が治療方法として重要視されています。**本研究の結果は, 興奮性神経伝達の分子メカニズムに新たな知見を与え, 関連する疾患に対する画期的な治療薬の創出に寄与すると期待されます。**

本研究成果は, 2024 年 8 月 23 日 22 時 (現地時間) に国際学術誌『ACS Nano』のオンライン版に掲載されました。

【研究の背景】

私たちの脳は、1000億個の神経細胞が連結して形成された神経回路で成り立っています。神経細胞同士の接続点にはシナプスと呼ばれる領域があり、シナプス前部の神経細胞からは神経伝達物質が放出され、シナプス後部の神経細胞には、その物資を受け取る受容体があり、信号の伝達が行われます。シナプスは一度作られてからも、環境や学習による神経活動によって変化することが分かっています。この適応性は「シナプスの可塑性(※3)」と呼ばれ、記憶や学習の分子メカニズムを理解する上でとても重要です。また、シナプスの異常が関係するさまざまな神経疾患を解明するためにも、シナプスの可塑性は非常に重要な研究対象となっています。

AMPA型グルタミン酸受容体はGluA1からGluA4の4つのサブユニットからなり、四量体のイオンチャネル型受容体として、中枢神経系の興奮性シナプスの可塑性に重要な役割を果たします。シナプス後部では、神経活動に応じてAMPA受容体の数やサブユニットの組み合わせが変化し、信号伝達の効率に大きく影響を及ぼします。また、AMPA受容体は神経細胞のシナプス外側からシナプス後部に集まることが知られています。そのため、神経活動に応じてシナプス後部へのAMPA受容体の迅速な移動と集合が求められます。これまでに、AMPA受容体の構造は、X線結晶構造解析や低温電子顕微鏡法(cryo-EM)により明らかにされ、縦長の大木のような形をとり、その構造の約半分が細胞外側の大きなドメイン(N末端ドメイン; NTD)として存在することが分かりました(図1)。さらに、さまざまな生化学実験や細胞実験により、NTDが欠損すると、AMPA受容体のイオンチャネル機能は保持されるものの、シナプスへの移動と集合が妨げられることが示されました。しかし、どのようにしてこのNTDがシナプスでの集合を誘導するのか、その詳細な分子メカニズムは依然として謎のままでした。そこで、本研究では、高速AFMという顕微鏡技術を用い、脂質二重膜内に埋め込まれたAMPA受容体のNTDの動きをナノメートルスケール、かつ、リアルタイムで可視化し、シナプス領域への集合に関わる分子メカニズムの解明を試みました。

【研究成果の概要】

本研究では、HEK293細胞にAMPA受容体のサブユニットGluA2とその補助サブユニットTARP- γ 2を融合させたタンパク質を発現させ、単離・精製してGluA2- γ 2の可溶化試料を作成しました。その後、GluA2- γ 2を脂質ナノディスクへ再構成することで、脂質二重膜内に埋め込まれた環境を再現し、0.3秒の時間分解能で高速AFM観察を行いました。TARP- γ 2との融合、脂質ナノディスクへの再構成、そして観察バッファーにフルオロ系界面活性剤を加える工夫により、GluA2- γ 2のNTDのナノスケールでの動きを高速AFMで観察することができました。

高速AFMによる一分子イメージングにより、休止状態(リガンド非結合状態)とオープン/活性化状態(グルタミン酸結合状態)のGluA2- γ 2のNTDが、脂質に対して水平方向に大きく揺れる動きをすることが明らかになりました(図2,3)。具体的には、GluA2- γ 2は四量体で構成され、その中の2つがペアとなりダイマー構造を作ります。このダイマー

構造が 2 つ集まることで、GluA2- γ 2 四量体（ダイマーオブダイマー）を形成します。高速 AFM 動画では、脂質ナノディスクから突き出た 2 つの NTD ダイマーが見えており、それらが互いに開閉する動きを示しました。過去の cryo-EM 構造解析では、AMPA 受容体の NTD は多様な構造をとり、クラス平均化が難しく、高い空間分解能での構造解析が困難とされています。高速 AFM では、室温下で溶液中の AMPA 受容体一分子の動きを映し出していることから、NTD の大きな揺らぎ（フレームごとの多様な構造）が明確に観察でき、cryo-EM の解析結果と一致しています。

さらに、GluA2- γ 2 はオープン/活性化状態の後、リガンドが結合しているもののチャンネルが閉じている脱感作状態へと移行します。この脱感作状態での GluA2- γ 2 の動きを可視化するため、過去の論文に倣い、キスカル酸を観察バッファーに加えて高速 AFM 観察を行いました。その結果、2 つの NTD ダイマーが脂質に接近し、ダイマー間の距離が広がり、揺れが制限されてほとんど動かない構造をとることが分かりました（図 4）。この構造は、過去に電子顕微鏡で報告されたものとよく似ていますが、揺らぎや動きが抑制されていることをはっきり示したのは高速 AFM が初めてです。本研究グループは、GluA2- γ 2 の NTD ダイマーが休止状態、オープン状態、脱感作状態で大きく構造変化し、これがチャンネルの開閉と連動していると考えています。

興味深いことに、高速 AFM で GluA2- γ 2 を観察中に、時折、NTD ダイマーが 1 つ（モノマー）に分かれたり、再び元のダイマーに戻ったりする様子が観察されました（図 5）。この「ダイマー分裂」現象は全ての状態で見られましたが、特に、オープン/活性化状態では、分裂している時間が長いことが分かりました。従来、AMPA 受容体の NTD ダイマーは非常に強固なものと考えられていましたが、溶液中の GluA2- γ 2 の NTD ダイマーは、実際には、ダイマーとモノマーを遷移することが高速 AFM によって明らかとなりました。さらに、分裂後の GluA2- γ 2 の四量体構造、および、NTD モノマー構造の安定性は、分子動力学（MD）シミュレーションを用いて確かめられました。

では、この「ダイマー分裂」は AMPA 受容体にとってどのような機能を生み出すのでしょうか。本研究グループは、この「ダイマー分裂」が AMPA 受容体のシナプス領域への集合に深く関与している可能性を考えました。これまでは、孤立した 1 つの GluA2- γ 2 を含む脂質ナノディスクの高速 AFM 観察を行っていましたが、複数の AMPA 受容体が隣接している部分にも焦点を当てて高速 AFM 観察を行いました。その結果、近くに存在する 2 つの GluA2- γ 2 がそれぞれダイマー分裂を起こし、再び元のダイマーに戻る際に、もともとの四量体内で組み直すのではなく、隣の GluA2- γ 2 とサブユニットを交換して新たなダイマーを形成することが分かりました（NTD ダイマー交換、図 6）。シナプス領域には AMPA 受容体が高濃度で存在することが過去の研究から示されており、そのため NTD ダイマー交換が頻繁に起こりえる環境が整っているといえます。本研究で明らかとなった「ダイマー分裂」が引き金となり、NTD ダイマーが交換されることで、他の AMPA 受容体同士で手をつなぐように結びつき、結果的に AMPA 受容体がシナプス領域に集まるとどまるというメカニズムが考えられます。

さらに、本研究グループはシナプス領域で分泌される神経ペントラキシン NP1 というシナプスオーガナイザータンパク質にも注目しました。AlphaFold2 を用いて GluA2- γ 2 と NP1 の複合体を予測し、高速 AFM で NP1 の八量体構造と GluA2- γ 2 との結合を実際に可視化しました。興味深いことに、「ダイマー分裂」によって NP1 と GluA2- γ 2 の間に、新しい結合部位が現れる可能性が示唆されました。GluA2- γ 2 がダイマーを形成している場合、この部位はサブユニット同士の結合面となるため、NP1 が結合する余地はありません。しかし、「ダイマー分裂」によってモノマー化し、結合面が露出することで、新たな結合部位が出現します。高速 AFM 観察から、GluA2- γ 2 がグルタミン酸を結合したオープン/活性化状態では、モノマー状態が長く続くことが確認されました。これらを踏まえると、GluA2- γ 2 の NTD ダイマーの分裂は、NP1 との新しい結合部位を生み出し、シナプス領域での結合力を強化すると考えられます。しかし、さらなる検証実験が必要であり、GluA2- γ 2 と NP1、その他のシナプスオーガナイザータンパク質との結合様式や結合動態を今後も明らかにしていく必要があります。

本研究の結果をまとめると、高速 AFM を用いた AMPA 受容体一分子イメージングにより、異なるリガンド結合状態における脂質二重膜中の GluA2- γ 2 の NTD のナノ動態を直接可視化することに成功しました。特に、NTD の「ダイマー分裂」を発見し、AMPA 受容体間のサブユニットが交換される様子を初めて可視化しました。さらに、NP1 の八量体と AMPA 受容体との結合様式、ダイマー分裂による結合親和性の向上の可能性も見出しました。これらの発見から、シナプス領域における AMPA 受容体の集合を説明する新しい仮説を提唱しました (図 7)。

【今後の展開】

AMPA 受容体を介した神経伝達は、さまざまな脳の機能にとって非常に重要です。これまで、多くの研究が生化学的分析、構造生物学、動物実験といった手法で行われてきました。今回の高速 AFM による GluA2- γ 2 の一分子イメージングでは、溶液環境で GluA2- γ 2 の NTD がどのように動いて機能するかを直感的に理解する手助けを提供できたと考えています。このような分子のリアルな動きを可視化することは、例えばダイマー分裂を適切に制御する新しい治療薬の開発に新たな道を開くかもしれません。今後は、ダイマー分裂が細胞膜上で起こっているのか、他のシナプスオーガナイザータンパク質との結合、さらには、記憶や学習に関与する他のグルタミン酸受容体のナノ動態観察を通じて、記憶を分子レベルで解明していきたいと考えています。また、本研究で活用した高速 AFM の手法は、他の真核生物の大きな細胞内外ドメインのナノ動態解析にも応用可能です。今後は、脂質二重膜から突き出たドメインのナノダイナミクスを基に、機能の解明がさらに進むことが期待されます。

本研究は、文部科学省の世界トップレベル研究拠点プログラム (WPI)、日本学術振興会科学研究費助成事業 (挑戦的研究萌芽 20K21122, 基盤研究(B) 21H01771)、二国間交流事業 120247404, 持田記念医学薬学振興財団, 上原記念生命科学財団 [代表: 柴田幹大], 中国 National Natural Science Foundation of China (32071234, 32271244, 32250610205, and 32411540020), an innovative research team of high-level local universities in Shanghai and a key laboratory program of the Education Commission of Shanghai Municipality (ZDSYS14005) [代表: 服部素之]の支援を受けて行われました。

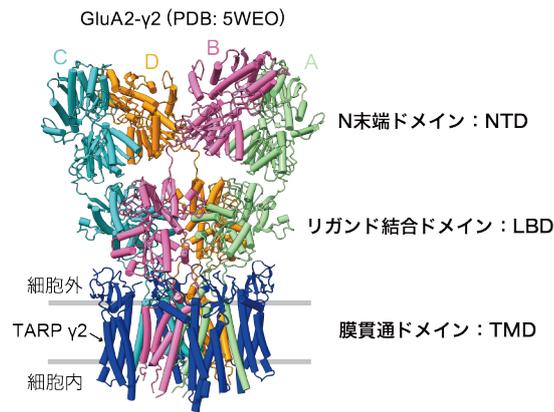


図 1 : GluA2- γ 2 の電子顕微鏡画像。A~D の 4 つのサブユニットで構成される四量体で, A と B, C と D が二量体 (ダイマー) ペアを形成する。

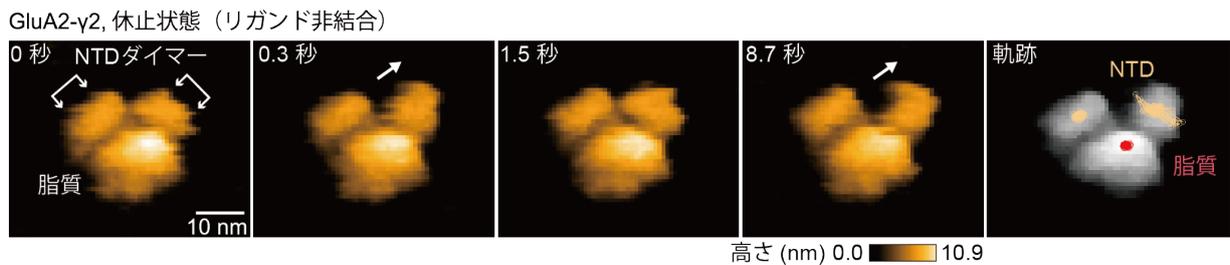


図 2 : 休止状態 (リガンドが存在しない状態) で, 脂質ナノディスクへ埋め込まれた GluA2- γ 2 の連続した高速 AFM 画像。右の画像は, NTD と脂質の軌跡を示す。以下の図 2~6 は, 原著論文では動画を見ることができる。

GluA2- γ 2, オープン/活性化状態 (グルタミン酸結合)

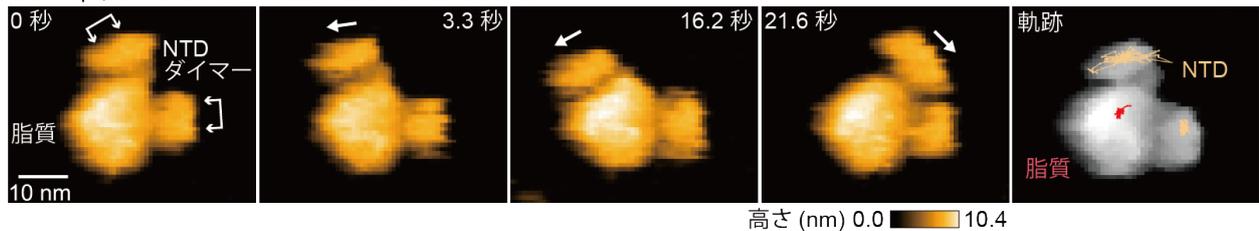


図 3 : オープン/活性化状態 (グルタミン酸が存在する状態) で, 脂質ナノディスクへ埋め込まれた GluA2- γ 2 の連続した高速 AFM 画像。右の画像は, NTD と脂質の軌跡を示す。

GluA2- γ 2, 脱感作状態 (キスカル酸結合)

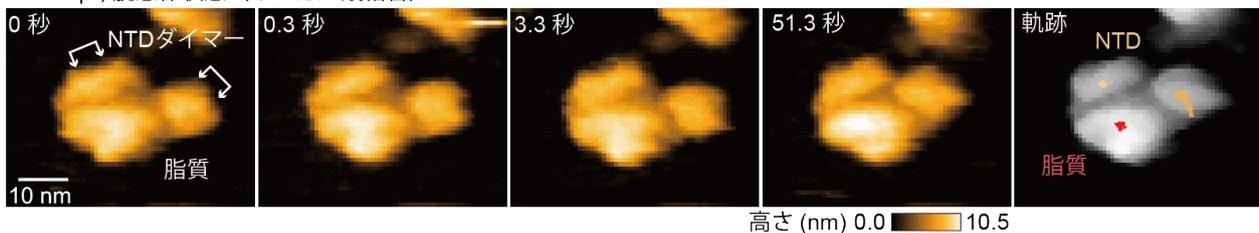


図 4 : 脱感作状態 (キスカル酸が存在する状態) で, 脂質ナノディスクへ埋め込まれた GluA2- γ 2 の連続した高速 AFM 画像。右の画像は, NTD と脂質の軌跡を示す。

GluA2- γ 2, オープン/活性化状態 (グルタミン酸結合)

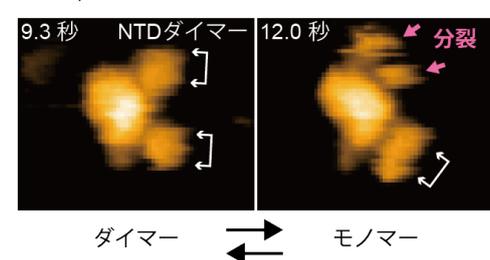


図 5 : GluA2- γ 2 の「ダイマー分裂」を示す連続した高速 AFM 画像。

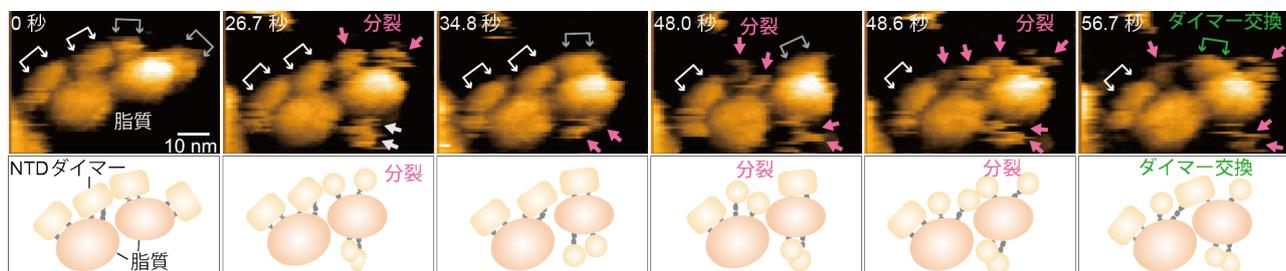


図 6 : 「ダイマー分裂」により生じる NTD ダイマー交換の瞬間を捉えた連続した高速 AFM 画像。

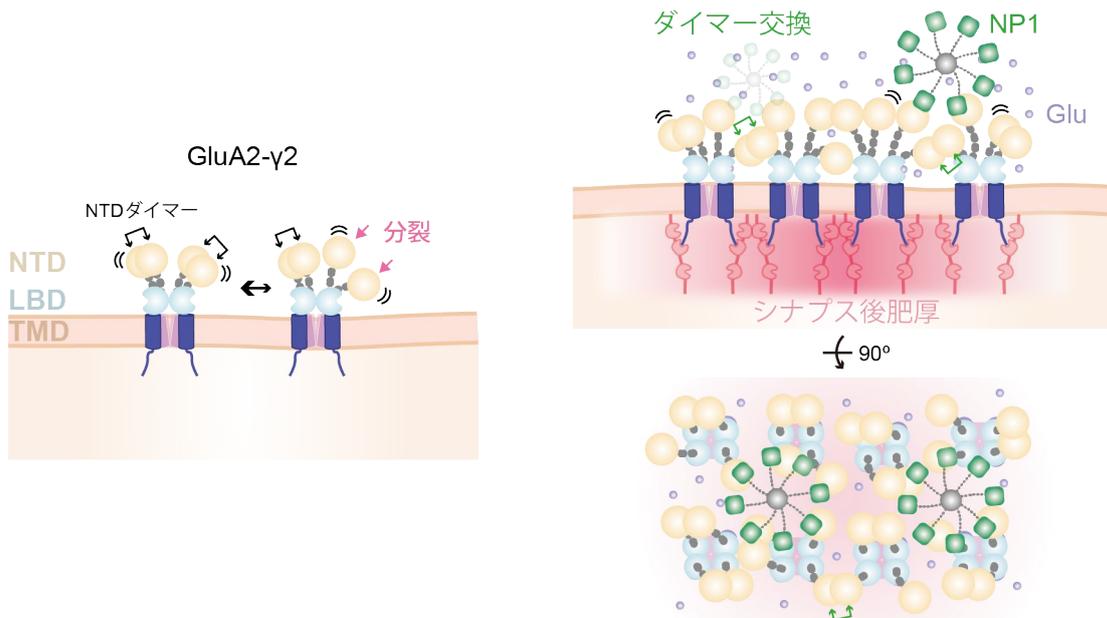


図 7：高速 AFM 観察から明らかとなった NTD のナノダイナミクスに基づく AMPA 受容体のシナプス領域での分子集合メカニズム。GluA2-γ2 の NTD ダイマーは大きく揺れ動き、ダイマー分裂が時折生じる。このダイマー分裂により (i) 隣接する AMPA 受容体とダイマーが交換される (ii) シナプスに分泌されるシナプスオーガナイザー分子 NP1 による橋渡し構造の形成や NTD との親和力の増強といった、さまざまな作用が生じシナプス領域での集合が促進される。

【掲載論文】

雑誌名：ACS Nano

論文名：High-speed atomic force microscopy reveals dynamic dimer splitting of the N-terminal domain of GluA2 ionotropic glutamate receptor-auxiliary subunit complex

(高速原子間力顕微鏡により明らかとなった AMPA 型グルタミン酸受容体 GluA2-γ2 の N 末端ドメインのナノ動態とダイマー分裂)

著者名：Ayumi Sumino, Takashi Sumikama, Yimeng Zhao, Holger Flechsig, Kenichi Umeda, Noriyuki Kodera, Hiroki Konno, Motoyuki Hattori, Mikihiro Shibata

(角野歩, 炭竈享司, イメン・チョウ, ホルガー・フレクシグ, 梅田健一, 古寺哲幸, 紺野宏記, 服部素之, 柴田幹大)

掲載日時：2024 年 8 月 23 日 22 時 (現地時間) にオンライン版に掲載。

DOI：10.1021/acsnano.4c06295

【用語解説】

※1：AMPA 型グルタミン酸受容体（AMPA 受容体）

脳の中樞神経系で信号伝達をつかさどる重要なタンパク質。この受容体は、主に神経細胞のシナプス後部に存在し、グルタミン酸が結合すると、イオンチャンネルが開き、ナトリウムイオンやカリウムイオンといった陽イオンを通過させる。これにより、神経細胞の興奮を引き起こし、情報が次の細胞へ伝わる。AMPA 受容体は学習や記憶の形成に深く関わっており、特にシナプスの可塑性に重要な役割を果たす。

※2：高速原子間力顕微鏡（高速 AFM）

試料の表面を直径数ナノメートルの鋭い針（探針）でなぞることで、探針に加わる力の変化を計測し、試料表面の形状を可視化する接触型顕微鏡。溶液中にある生体分子を、ナノメートルの空間分解能と高い時間分解能（最速 33 フレーム/秒）でスキャンすることが可能であり、試料の構造と動きの両方を可視化することができる。

※3：シナプスの可塑性

脳の神経回路で起こる重要な現象であり、神経細胞間の結合部であるシナプスの強度や性質が変化する能力を指す。学習や記憶形成において中心的な役割を果たし、経験や刺激に応じてシナプスが適応し情報伝達が調整される。このプロセスによって、脳は適切に学習し、環境に合わせて適応することが可能となる。

【本件に関するお問い合わせ先】

■研究内容に関すること

金沢大学ナノ生命科学研究所／新学術創成研究機構 教授

柴田 幹大（しばた みきひろ）

TEL：076-264-5927

E-mail：msshibata@staff.kanazawa-u.ac.jp

復旦大学・生命科学学院 教授

服部 素之（はっとり もとゆき）

E-mail：hattorim@fudan.edu.cn

■広報担当

金沢大学ナノ生命科学研究所 URA

山崎 輝美（やまざき てるみ）

金沢大学ナノ生命科学研究所事務室

西村 公恵 (にしむら きみえ)

TEL : 076-234-4555

E-mail : nanolsi-office@adm.kanazawa-u.ac.jp