
原 著

脳内 AMPA 型グルタミン酸受容体サブユニット 分布の定量的解析

畦地 裕 統

新潟大学大学院医歯学総合研究科
分子細胞医学専攻 細胞神経生物学分野
(主任：崎村建司教授)

Quantitative Analysis of AMPA - type Glutamate Receptor Subunits in Brain

Hirotsugu AZECHI

*Department of Cellular Neurobiology, Brain Research Institute
Graduate School of Medical and Dental Science, Niigata University
(Director: Prof. Kenji SAKIMURA)*

要 旨

AMPA 受容体は 4 つのサブユニット (GluA1-4) がホモ,あるいはヘテロの 4 量体を形成することで機能している。このサブユニット構成 (組み合わせ) の違いによって AMPA 受容体の生理学的特性や受容体輸送が調節されていることが知られている。そのため, AMPA 受容体の役割を明らかにする上で, 各サブユニットの量を知ることは重要であるが, 生体におけるそれらの量の多寡はよく分かっていない。本研究では, ウェスタンブロットを用いて AMPA 受容体サブユニットの定量を行った。まず, 各 AMPA 受容体抗体の相対的な抗体力価を調べるために, 3 つのキメラタンパク質 (GluA2/1, GluA3/1, GluA4/1) を作製した。これらのキメラタンパク質を各 AMPA 受容体サブユニット抗体で検出し, そのシグナル強度を比較することで各抗体の相対的な力価を決定した。そしてこれらの抗体価に基づいて各脳部位の細胞画分における AMPA 受容体の相対量を定量した。その結果, 大脳皮質では GluA2 と GluA3 が多かったのに対し, 海馬では GluA1 と GluA2 が多かった。また, GluA2 の量は GluA1 と GluA3 を合わせた量とほぼ等しく, カルシウム透過型 AMPA 受容体の特性を反映した結果と考えられた。小脳では, 4 つのサブユニットの量に違いはなく, GluA2 を含まない (カルシウム透過型) AMPA 受容体の

Reprint requests to: Hirotsugu AZECHI
Department of Cellular Neurobiology Brain
Research Institute Niigata University
1 - 757 Asahimachi - dori Chuo - ku,
Niigata 951 - 8585 Japan

別刷請求先：〒951 - 8585 新潟市中央区旭町通 1 - 757
新潟大学脳研究所細胞神経生物学分野 畦地 裕 統

存在を示していた。更に、AMPA 受容体量は脳部位や細胞画分によって異なった。これらの結果は脳部位による AMPA 受容体の機能と役割の違いを反映していると考えられる。

キーワード：AMPA 受容体, 定量, 脳領域, 細胞画分, ウエスタンブロット

緒 言

AMPA 型グルタミン酸受容体は中枢神経系において速い興奮性神経伝達を行う主要な分子である。AMPA 受容体は 4 つのサブユニット (GluA1 ~ 4) から構成されており¹⁾²⁾, ヘテロ 4 量体, あるいはホモ 4 量体を形成して機能していることが示されている³⁾⁴⁾。AMPA 受容体の生理学的特性や輸送はこれらのサブユニット構成 (組み合わせ) に依存して変化すると考えられている⁵⁾⁶⁾。例えば GluA2 サブユニットは大部分の AMPA 受容体に含まれており, AMPA 受容体のキネティクス, シングルチャネルコンダクタンス, カルシウム透過性を決定するだけでなく, AMPA 受容体のシナプス表面発現にも重要であると考えられている⁷⁾⁻¹³⁾。例えば, 海馬錐体細胞では GluA1 と GluA2 が多く発現し, これらはほぼ同程度検出されているのに対して, GluA3 はそれらの 5 分の 1 以下の量しか検出されていない⁷⁾¹⁴⁾⁻¹⁶⁾。これらのサブユニットから主に GluA1/A2, GluA2/A3 のヘテロ 4 量体を形成して機能しているが, 特に海馬 CA1 錐体細胞のシナプスの 80 % が GluA1/A2 ヘテロメリック受容体であることが示されている¹⁰⁾¹³⁾。一方, 小脳では細胞種によって異なるサブユニットが発現している。プルキンエ細胞では GluA1, GluA2 及び GluA3 が, 顆粒細胞では GluA2 と GluA4 が発現し, パーグマングリア細胞では主に GluA1 と GluA4 が発現していることが示されている⁷⁾¹⁷⁾。とりわけパーグマングリア細胞の GluA2 を含まない AMPA 受容体は, パーグマングリアとグルタミン酸作動性シナプス間の形態的, 機能的相互作用に必須であることが示されている¹⁸⁾。

これらの知見から海馬と小脳では GluA2 の相対量が異なり, この差は海馬と小脳における

AMPA 受容体の機能的特性や役割の違いを反映していることが示唆される。脳部位によって異なる機能や発達過程の相違を分子レベルで明らかにする上で AMPA 受容体の機能や役割について知ることが重要であり, そのためには各 AMPA 受容体サブユニットの量を正確に知る必要がある。しかし脳部位や細胞画分による AMPA 受容体タンパク質の発現量の違いについては十分解明されていない。本研究では各 AMPA 受容体サブユニットの特異的抗体を用いて 4 つの AMPA 受容体サブユニットの量比を定量した。そのために, 3 種類のキメラ AMPA 受容体タンパク質 (GluA2/1, GluA3/1, GluA4/1) を作製し, 各抗体の相対的な力価を決定した。そしてこの抗体力価に基づいて GluA1 に対する AMPA 受容体サブユニットの相対量を, 大脳皮質, 海馬, 小脳のホモジネート, マイクロソーム, シナプトソーム, PSD の各画分で定量した。

方 法

キメラ AMPA 受容体サブユニットの作製

AMPA 受容体各サブユニットに対する抗体の力価を検定するためにキメラ AMPA 受容体タンパク質を作製した。すなわち 3 つのキメラ AMPA 受容体 cDNA (GluA2/1 (GluA2 の 1-833 アミノ酸と GluA1 の 827-908 アミノ酸), GluA3/1 (GluA3 の 1-838 アミノ酸と GluA1 の 827-908 アミノ酸), GluA4/1 (GluA4 の 1-834 アミノ酸と GluA1 の 827-908 アミノ酸)) を pEF-BOS ベクター¹⁹⁾ に導入し 3 種類の発現ベクター, pBOS-A2/1C, pBOS-A3/1C, pBOS-A4/1C を作製した。この発現ベクターを LIPOFECTA-MINE PLUS Reagent (Life Technologies) を使って HEK293 細胞にトランスフェクションした。ト

ランスフェクションの48時間後にハーベストバッファー (1mM EDTA, 1mM EGTA, 1mM phenyl-methylsulfonyl fluoride (PMSF) in PBS) により細胞を回収し, 12000 × g で30分間遠心分離した. 上清を除き, ハーベストバッファー/1% Triton X-100 を加えソニケーション後に4℃, 30分間ローターで回転させ, 12000 × g で10分間遠心分離し, その上清をキメラタンパク質含有画分として用いた (図1A).

細胞分画

細胞分画は0~4℃にて, Carlin らの方法を参考にして行った²⁰⁾. 8週齢マウス2匹分の大脳皮質, 海馬, 小脳を摘出後プールし, ホモジネートバッファー (0.32M sucrose, 5mM EDTA, 1μM pepstatin, 2μM leupeptin, 0.5mM PMSF) でホモジナイズした. このホモジネートを700 × g で10分間遠心分離しこの上清 (S1) をホモジネート画分とした. このホモジネート画分を更に12,000 × g で10分間遠心分離し, 得られた沈殿 (P2) を0.8M, 1.2Mのショ糖密度勾配遠心 (82,500 × g, 2時間) によりシナプトソーム画分を得た. シナプトソーム画分を更に1% Triton X-100 で15分間処理し, 201,000 × g で1時間遠心分離を行い, 得られた沈殿を40mM Tris-HCl, pH 8.0/1% SDS で溶解し PSD 画分とした. マイクロソーム画分 (P3 画分) は, S2 画分 (S1 を12,000 × g で10分間遠心分離した上清) を266,000 × g で90分間遠心分離し, 得られた沈殿を40mM Tris-HCl, pH 8.0/1% SDS で溶解することで得た. これらのタンパク質濃度は BCA Protein Assay Reagent (Pierce) によって定量した.

脳内 AMPA 受容体サブユニットの定量

AMPA 受容体相対量の定量方法は先行報告を参考にした²¹⁾. まずキメラタンパク質を用いたウエスタンブロットを行うことで, 4つの抗 AMPA 受容体抗体の相対的な力価を決定した. 今回作製したキメラ AMPA 受容体を用いることで, 異なる2つのサブユニット抗体で検出可能とな

る. この時の抗原数は等しいため, 等しい抗原数に対する2つの抗体のシグナル強度を比較することで相対的な抗体力価を調べることができる. 抗体力価は GluA1 の C 末端領域を認識する抗体 (抗 GluA1C 抗体) を基準に決定し, この抗体力価の違いに基づいて AMPA 受容体サブユニットの相対量を定量した. AMPA 受容体サブユニット相対量は, 大脳皮質, 海馬, 小脳から調製したホモジネート, マイクロソーム, シナプトソーム, PSD 画分で定量した. 各抗体で検出された AMPA 受容体サブユニットのバンドのシグナル強度を NIH Image によって比較し, 抗体力価で標準化することによって GluA1 に対する各サブユニットの相対量を決定した.

免疫組織化学

ペントバルビタール麻酔 (100mg/kg of body weight, i.p.) 下で, 4%パラホルムアルデヒド/0.1M リン酸バッファー (pH 7.2) により灌流固定した. 免疫組織化学の反応は全て室温で行った. まずパラフィン切片 (4μm; SM1000R; Leica Microsystems) をペプシン (0.2N の塩酸で1mg/ml に溶解; DAKO, Carpinteria, CA) による前処理を37℃で10分間行い抗原を露出させた. その後, 10%のロバ血清で20分間, AMPA 受容体サブユニットの一次抗体 (1mg/ml) で一晚, ビオチン化二次抗体で2時間, Histofine SAB-PO (R) kit (ニチレイ, 東京) を用いて1時間反応させ染色した. 免疫反応はチラミッドシグナル増幅キット (Perkin-Elmer, Boston, MA, USA) を用いて可視化し, 脳切片像を顕微鏡により観察した.

抗体

ウエスタンブロットには以下の抗体を使用した. ウサギ抗 GluA1C 末側抗体 (0.75 μg/ml)²²⁾²³⁾, ウサギ抗 PSD-95 抗体 (1 μg/ml)²⁴⁾, モルモット抗 GluA4N 末側抗体 (1 μg/ml)²⁵⁾, モルモット抗シナプトフィジン抗体 (0.1 μg/ml), モルモット抗 GLAST 抗体 (0.5 μg/ml)²⁶⁾, マウス抗 GluA2N 末側抗体 (0.3 μg/ml; Millipore), マウス抗

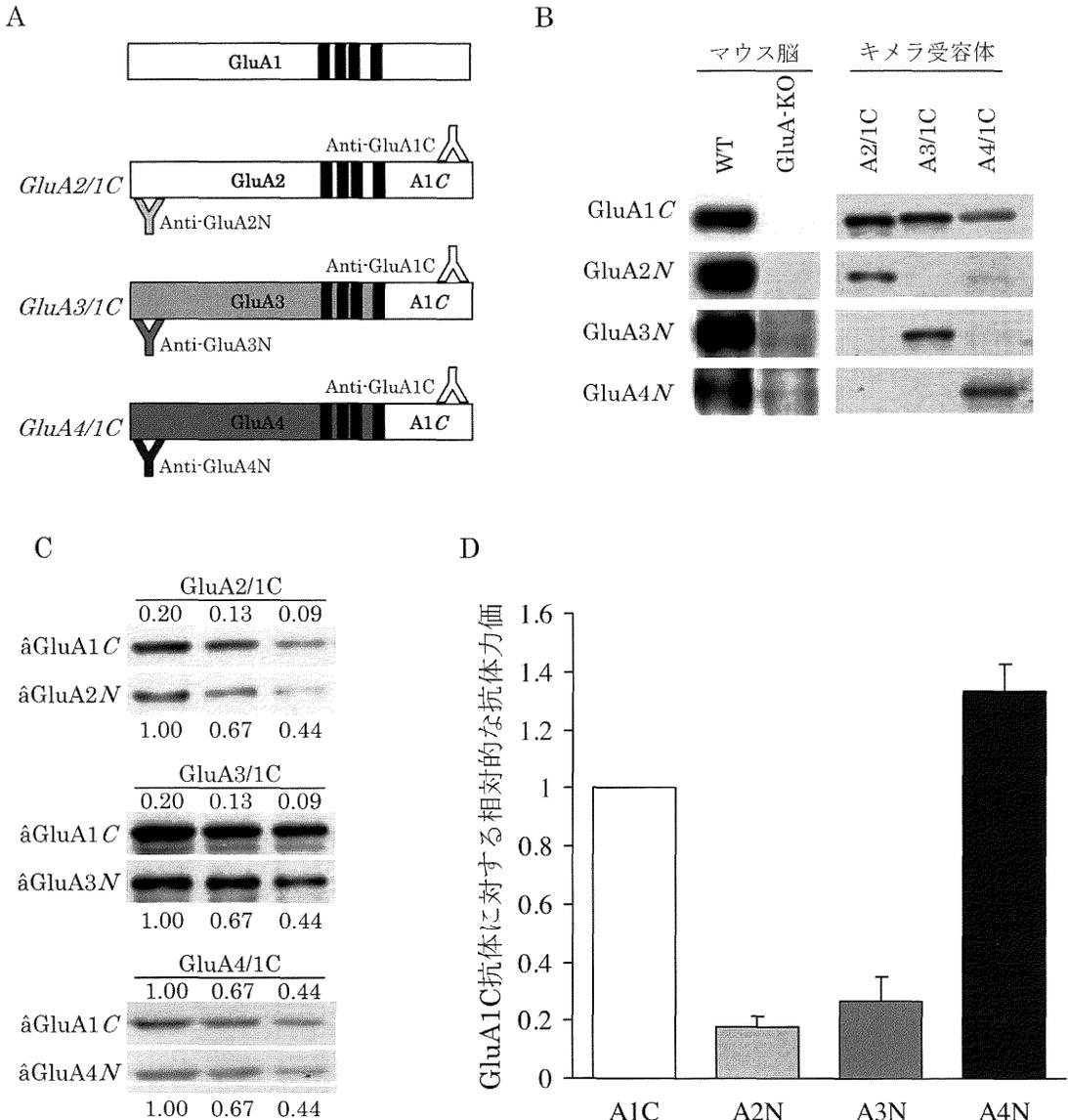


図1 キメラ AMPA 受容体の構造と抗 AMPA 受容体サブユニット抗体の抗体力価決定
 (A) キメラ AMPA 受容体の構造. これらは GluA2, A3, A4 の C 末端領域が GluA1 の C 末端領域に置換してある. また, 各抗体の認識部位を示す.
 (B) 抗 AMPA 受容体サブユニット抗体の特異性. 野生型マウス (WT), 各サブユニットのノックアウトマウス (GluA-KO) から調製したホモジネート画分とキメラタンパク質のウエスタンブロット解析.
 (C) 3つのキメラタンパク質の希釈系列を用いた各サブユニットに対する抗体を用いたウエスタンブロット.
 (D) (C) から得られた抗 AMPA 受容体抗体の相対的力価のグラフ. エラーバーは標準誤差を示す.

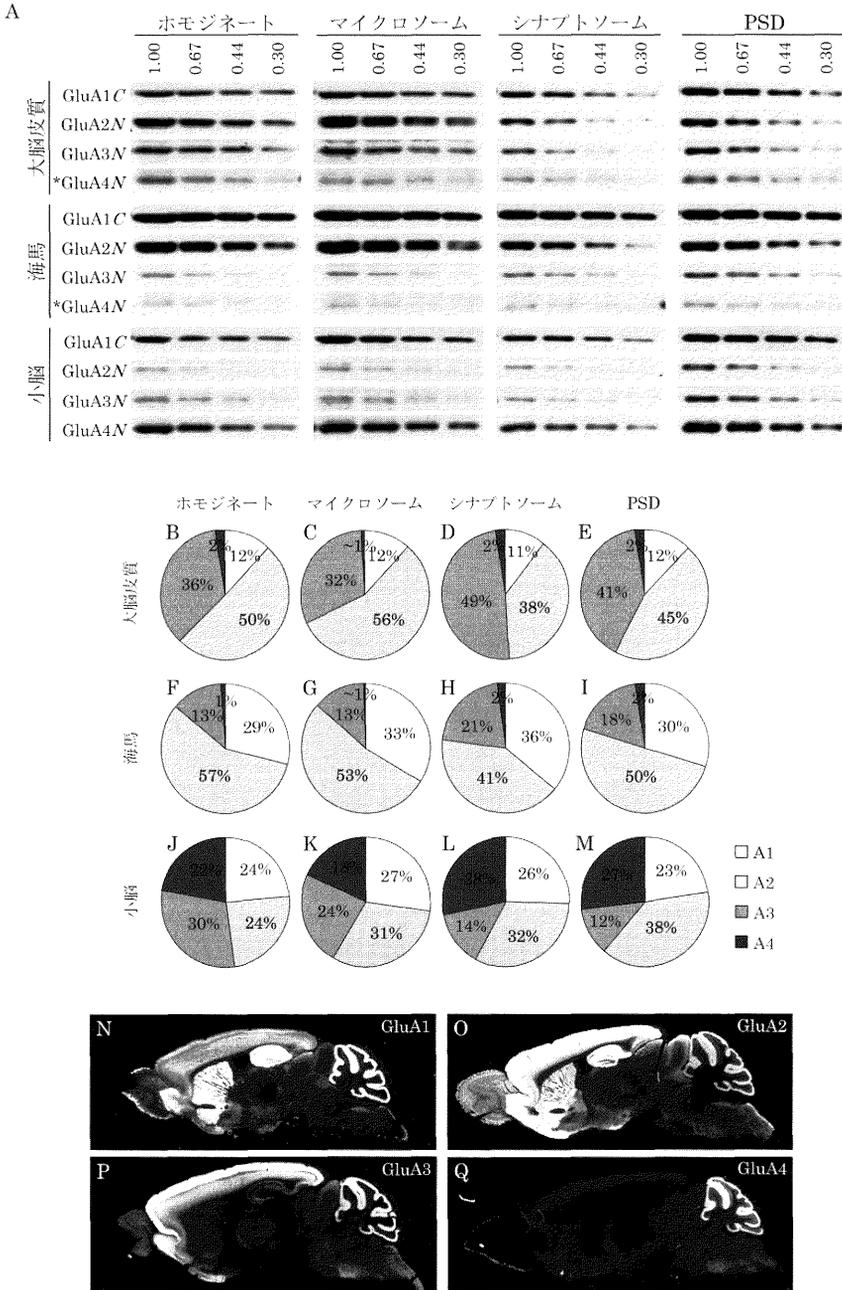


図2 各脳領域と細胞分画におけるAMPA受容体サブユニットの割合

(A) 脳サンプルの希釈系列を用いたウエスタンブロット解析。
 (B-M) GluA1に対する各サブユニットの相対量を抗体価値(図1D)に基づいて定量した。円グラフは各脳領域と細胞分画におけるAMPA受容体各サブユニットの比率。使用した抗体濃度は材料と方法に記載してありである。ただし、大脳皮質と海馬のGluA4に関しては抗体濃度2μg/mlで検出した(*)。
 (N-Q) 脳部位におけるAMPA受容体サブユニットの免疫組織化学。GluA1(N), GluA2(O), GluA3(P), GluA4(Q)。

GluA3N 末側抗体 ($1\mu\text{g/ml}$; Millipore). 免疫組織化学にはウサギ抗 GluA1 抗体, ウサギ抗 GluA2 抗体, ウサギ抗 GluA3 抗体²⁷⁾, モルモット抗 GluA4 抗体²⁵⁾ を使用した.

結 果

抗 AMPA 受容体抗体の抗体力価の測定

最初に使用する抗 AMPA 受容体サブユニット抗体の特異性を確認するために, 野生型マウスと各 AMPA 受容体サブユニットノックアウトマウスの脳ホモジネート画分を用いたウエスタンブロットを行った. その結果, 野生型では約 100kDa にバンドが検出されたが, ノックアウトマウスでは相当するバンドが消失しており, 使用する各抗 AMPA 受容体サブユニット抗体の特異性が確認された (図 1B).

次に抗 GluA1C 末側抗体に対する抗 GluA2N 末側, 抗 GluA3N 末側, 抗 GluA4N 末側抗体の相対的な抗体力価を決定するために, HEK293 細胞から抽出したキメラ AMPA 受容体タンパク質を用いた定量的なウエスタンブロットを行った. 全てのキメラ AMPA 受容体タンパク質は C 末端領域が GluA1 に置換された構造をしているため (図 1A), 抗 GluA1C は全てのキメラタンパク質を認識したが, 抗 GluA2N, GluA3N, GluA4N はそれぞれの断片を持つキメラタンパク質のみを認識した (図 1B). これらのキメラタンパク質の希釈系列を調製しウエスタンブロットを行い, GluA1C で検出されたバンド濃度と同一の強度で検出されるタンパク量から GluA1C に対する GluA2 ~ 4N の抗体力価を算出した (GluA1C : GluA2N = 1 : 0.17 ± 0.04 , GluA1C : GluA3N = 1 : 0.26 ± 0.09 , GluA1C : GluA4N = 1 : 1.33 ± 0.09 , 各 $n = 3$, 平均値 \pm 標準誤差, 図 1C, 1D). この抗体力価に基づいて GluA1 サブユニットに対する各サブユニットの相対量を定量した.

各脳部位と細胞分画における AMPA 受容体サブユニットの割合

GluA1 に対する各 AMPA 受容体サブユニット

の相対量を各脳領域と細胞分画で定量した. 大脳皮質ではホモジネート画分で GluA2 と GluA3 が多く, 特に GluA2 の割合は全 AMPA 受容体サブユニットの約 50 % を占めていた. 一方で GluA1 発現量は相対的に低く, GluA4 に関してはほとんど発現してなかった (ホモジネート画分 (Ho), A1 : $12.09 \pm 1.72 \%$, A2 : $49.97 \pm 5.98 \%$, A3 : $35.79 \pm 4.20 \%$, A4 : $2.16 \pm 0.62 \%$, 各 $n = 5$, 平均値 \pm 95 % 信頼区間, 図 2A - B). これらの量的関係はマイクロソームや PSD 画分でもほぼ同じ傾向を示したが, マイクロソーム画分では GluA2 の割合が僅かに高かった (マイクロソーム画分 (P3), A1 : $11.71 \pm 0.72 \%$, A2 : $55.92 \pm 3.83 \%$, A3 : $31.53 \pm 3.56 \%$, A4 : $0.84 \pm 0.47 \%$, 各 $n = 5$, 図 2A, 2C ; PSD 画分 (PSD), A1 : $12.27 \pm 0.86 \%$, A2 : $45.16 \pm 3.02 \%$, A3 : $40.48 \pm 2.95 \%$, A4 : $2.10 \pm 0.60 \%$, 各 $n = 4$, 図 2A, 2E). 対照的に, シナプトソーム画分では GluA2 の割合が 50 % 以下であり, 代わりに GluA3 の割合が高くなっていた (シナプトソーム画分 (Sy), A1 : $10.60 \pm 1.52 \%$, A2 : $38.40 \pm 4.96 \%$, A3 : $48.59 \pm 5.85 \%$, A4 : $2.41 \pm 0.86 \%$, 各 $n = 4$, 図 2A, 2D).

海馬でも GluA2 が多く, 全 AMPA 受容体サブユニットの 50 % 以上が GluA2 であったが, 大脳皮質とは対照的に, GluA1 が多く GluA3 が少なかった (Ho, A1 : $29.04 \pm 2.16 \%$, A2 : $57.22 \pm 3.39 \%$, A3 : $12.63 \pm 5.71 \%$, A4 : $1.11 \pm 0.84 \%$, 各 $n = 5$, 図 2A, 2F). そして大脳皮質と同様に, これらの割合はマイクロソームや PSD 画分でもほぼ同じで, マイクロソーム画分では 50 % 以上が GluA2 であった (P3, A1 : $33.51 \pm 1.26 \%$, A2 : $53.18 \pm 5.15 \%$, A3 : $12.86 \pm 4.69 \%$, A4 : $0.46 \pm 0.12 \%$, 各 $n = 5$, 図 2A, 2G ; PSD, A1 : $30.01 \pm 3.04 \%$, A2 : $49.92 \pm 3.20 \%$, A3 : $17.65 \pm 3.92 \%$, A4 : $2.42 \pm 0.91 \%$, 各 $n = 5$, 図 2A, 2I). 更に, シナプトソーム画分では他の画分に比べて GluA2 の割合が小さいという点も大脳皮質と類似していた (Sy, A1 : $35.93 \pm 1.27 \%$, A2 : $40.90 \pm 4.77 \%$, A3 : $21.17 \pm 3.59 \%$, A4 : $2.00 \pm 1.14 \%$, 各

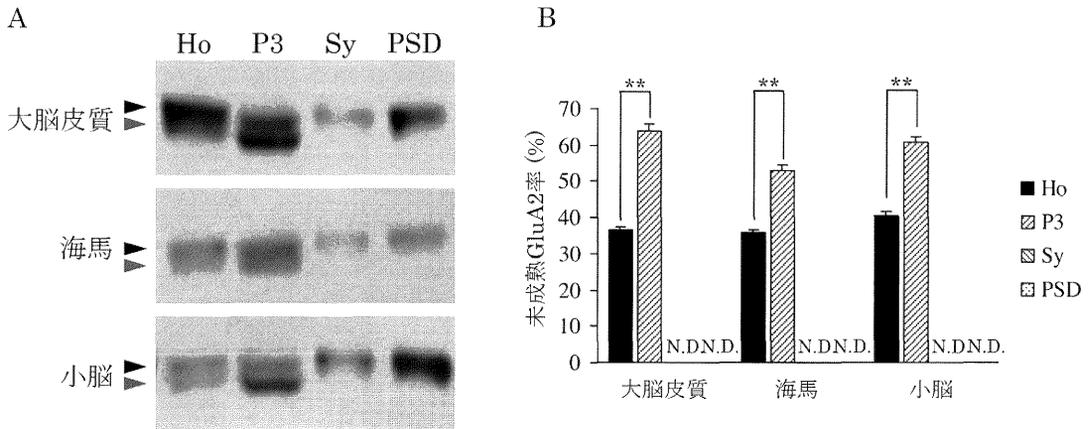


図3 2つのタイプの GluA2

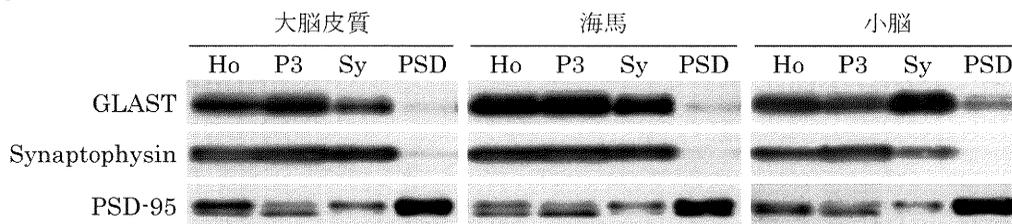
- (A) 抗 GluA2 抗体を用いたウエスタンブロットの写真. 高分子量 (成熟型) と低分子量 (未成熟型) の2つの型がホモジネート画分とマイクロソーム画分で検出された. 成熟型 GluA2 と未成熟型 GluA2 はそれぞれ黒矢頭, 灰矢頭で指し示してある. 各レーンのタンパク質量はホモジネート画分とマイクロソーム画分で $20 \mu\text{g}$, シナプトソーム画分では $5 \mu\text{g}$, PSD 画分では $3 \mu\text{g}$ である.
- (B) 未成熟型 GluA2 率のグラフ. シナプトソーム画分と PSD 画分では未成熟型 GluA2 は検出されなかった (N.D.). エラーバーは標準誤差を示す. ** $p < 0.01$.

$n = 5$, 図 2A, 2H).

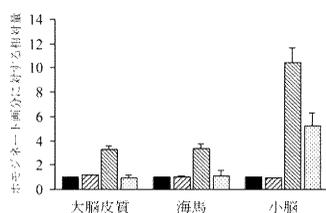
小脳では, AMPA 受容体サブユニットの割合は大脳皮質や海馬とは大きく異なり, ホモジネート画分やマイクロソーム画分では4つのサブユニットがほぼ同程度存在していた (Ho, A1: $24.00 \pm 4.68\%$, A2: $23.83 \pm 3.76\%$, A3: $29.86 \pm 5.40\%$, A4: $22.32 \pm 4.35\%$, 各 $n = 5$, 図 2A, 2J; P3, A1: $27.35 \pm 2.84\%$, A2: $30.88 \pm 6.71\%$, A3: $23.31 \pm 6.05\%$, A4: $18.46 \pm 9.50\%$, 各 $n = 5$, 図 2A, 2K). 一方でシナプトソームや PSD 画分における GluA2 の割合は高かったが, 大脳皮質や海馬に比べるとその割合は低く 40%程度であり, GluA2 を含まないカルシウム透過型の AMPA 受容体が存在していることが示された (Sy, A1: $26.38 \pm 6.07\%$, A2: $31.38 \pm 7.44\%$, A3: $14.35 \pm 3.71\%$, A4: $27.89 \pm 6.62\%$, $n = 5$, 図 2A, 2L; PSD, A1: $22.85 \pm 3.79\%$, A2: $37.92 \pm 8.49\%$, A3: $12.17 \pm 8.91\%$, A4: $27.06 \pm 8.38\%$,

$n = 5$, 図 2A, 2M). 小脳バグマンングリアには多くの AMPA 受容体が発現していることが示されている⁷⁾. そこで, シナプトソーム画分や PSD 画分に存在する GluA2 を含まない AMPA 受容体がバグマンングリア由来である可能性を調べるために, グリア細胞のマーカー分子として GLAST の発現量を調べた. GLAST は特にバグマンングリアの細胞膜上に多く発現していることが知られている²⁶⁾. ホモジネート画分に対するタンパク質あたりの含量を調べた結果, 大脳皮質や海馬に比べて小脳ではシナプトソーム画分や PSD 画分でより多くの GLAST を含んでおり, 小脳のシナプス画分にはバグマンングリア由来の成分が多く含まれていることが示唆された. このことは, GluA2 を含まない AMPA 受容体はこの細胞由来であることを想定させる (図 4A-B). 一方, この結果から小脳のシナプトソーム画分や PSD 画分には他の成分の混入が多く, シナプス部位が濃縮されていない可能性も考えられた. そこでこれ

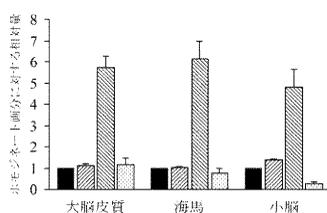
A



B. GLAST



C. synaptophysin



D. PSD-95

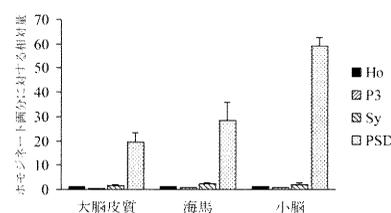


図4 マーカー分子のウエスタンブロット

- (A) 抗 GLAST, シナプトフィジン, PSD-95 抗体で検出した各分子のウエスタンブロット. GLAST, シナプトフィジン, PSD-95 をそれぞれ, グリア細胞, シナプトソーム画分, PSD 画分のマーカー分子とした. 各レーンのタンパク質量は, 大脳皮質と海馬は, ホモジネート画分とマイクロソーム画分は 20 μg, シナプトソーム画分は 5 μg, PSD 画分は 3 μg である. 小脳は, ホモジネート画分とマイクロソーム画分は 30 μg, シナプトソーム画分は 6 μg, PSD 画分は 5 μg である.
- (B-D) グラフの値はホモジネート画分に対するタンパク質量あたりの量として示してある. GLAST (B), シナプトフィジン (C), PSD-95 (D). エラーバーは標準誤差を示す.

らの画分におけるシナプトフィジンと PSD-95 の含量を測定した結果, 大脳皮質と海馬と同様に全例 (各 n = 5) で顕著に濃縮されていることが確認され, これらの画分では確かにシナプス部位が濃縮されていることが示された (図 4A, 4C, 4D). このことは, バグマングリアに存在する AMPA 受容体がシナプトソーム画分へ移行する形状と形質を持つことを想定させる.

免疫組織化学とウエスタンブロット解析の比較

AMPA 受容体の免疫組織化学を行い, ウエスタンブロットから得られた相対量との比較を行った (図 2N-Q). 免疫組織化学では, GluA1, GluA2, GluA3 は脳全体に分布しているのに対して, GluA4 は小脳に非常に限局していた. つまり, 小脳では 4 つのサブユニット全てが十分発現してい

た. 一方で大脳皮質では, GluA2, GluA3 の免疫反応が GluA1 に比べて強かった. 対照的に海馬では GluA1 と GluA2 の免疫反応が強く, GluA3 の反応は非常に弱かった. これらの結果はウエスタンブロット解析から得られた大脳皮質, 海馬, 小脳の AMPA 受容体発現量とよく一致している.

糖鎖修飾による 2 つのタイプの GluA2

図 2A に示されるウエスタンブロットで 2 つのサイズの GluA2 が検出されているが, これらは糖鎖修飾の違いによるものであることが知られている²⁸⁾. 1 つは高分子量に検出され, 主にシナプス画分に濃縮している (成熟型). もう 1 つは低分子量で検出され, ER を含む画分に存在するがシナプス画分には見られない (未成熟型). 本研究でもホモジネート画分, マイクロソーム画分でこ

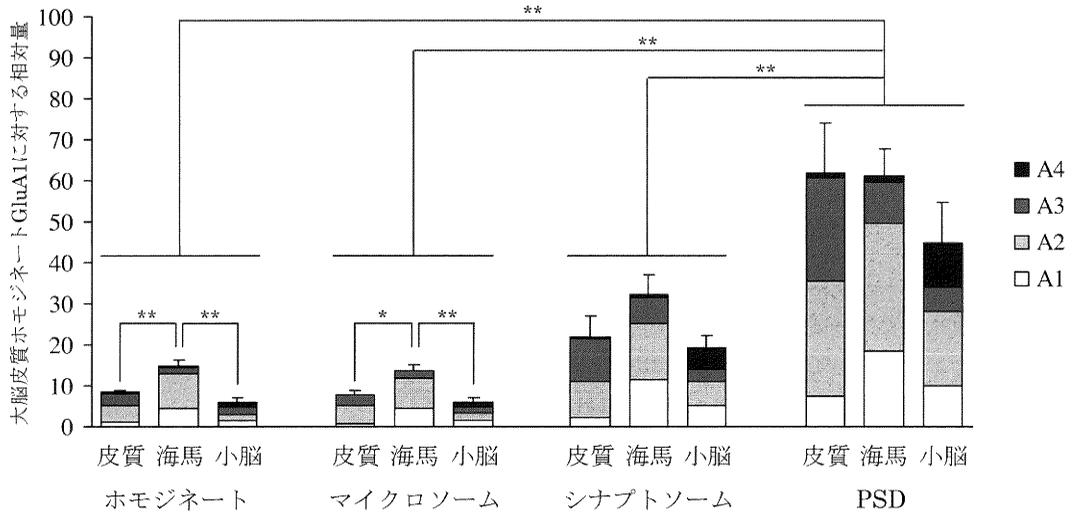


図5 脳領域、細胞画分ごとのAMPA受容体の相対量

大脳皮質ホモジネート画分のGluA1に対する相対量。各定量値は表1に示してある。エラーバーは標準誤差を示す。

の2つのタイプのGluA2が共に検出され、特にマイクロソーム画分ではいずれの脳部位でもGluA2の50%以上が未成熟型であり、ホモジネート画分と比較しても未成熟型GluA2の比率は有意に高かった(大脳皮質： $t(4) = 12.906, p < 0.01$ ；海馬： $t(4) = 11.424, p < 0.01$ ；小脳： $t(4) = 9.330, p < 0.01$, 図3)。また、未成熟型GluA2はシナプトソーム、PSD画分では検出されなかったが、この結果は先行研究と一致している²⁸⁾。

脳部位間によるAMPA受容体量の違い

脳部位や細胞画分によるAMPA受容体の量的な違いははっきり分かっていない。大脳皮質ホモジネート画分のGluA1量を基準に、相対的なAMPA受容体量を比較した(図5, 表1)。各画分を比較すると、AMPA受容体はどの脳部位でもPSD画分に有意に濃縮していた(大脳皮質： $F(3, 14) = 18.496, p < 0.01$ ；海馬： $F(3, 16) = 14.657, p < 0.01$ ；小脳： $F(3, 14) = 14.657,$

$p < 0.01$, 図5, 表1)。脳部位による比較では、ホモジネート画分やマイクロソーム画分では海馬のAMPA受容体量が大脳皮質や小脳の約2倍多いことが示された($F(2, 12) = 8.836, p < 0.01$)が、シナプトソーム画分とPSD画分では統計的に有意な差は見られなかった(Sy： $F(2, 9) = 1.446, n.s$ ；PSD： $F(2, 10) = 0.805, n.s$, 図5, 表1)。これらの結果は、AMPA受容体の含量は脳部位や細胞画分によって異なるものの、シナプスで非常に高密度に存在していることを示している。

考 察

本研究ではウエスタンブロッティングによってAMPA受容体タンパク質の量を定量した。これまでに、RT-PCRによるAMPA受容体サブユニットのmRNAの定量解析⁷⁾¹⁵⁾や、プロテオミクスによる前脳PSD画分での定量解析は行われてい

表1 大脳皮質ホモジネート画分 GluA1 に対する AMPA 受容体の相対量

	GluA1	GluA2	GluA3	GluA4	全体
大脳皮質					
ホモジネート	1	4.21 ± 0.39	2.98 ± 0.14	0.18 ± 0.01	8.37 ± 0.46
マイクロソーム	0.91 ± 0.11	4.43 ± 0.68	2.43 ± 0.27	0.07 ± 0.02	7.84 ± 1.06
シナプトソーム	2.36 ± 0.58	8.58 ± 2.16	10.54 ± 2.40	0.55 ± 0.16	22.01 ± 5.19
PSD	7.58 ± 1.43	28.14 ± 5.58	24.89 ± 4.79	1.30 ± 0.32	61.90 ± 12.04
海馬					
ホモジネート	4.37 ± 0.35	8.54 ± 0.53	1.60 ± 0.25	0.18 ± 0.03	13.19 ± 1.71
マイクロソーム	4.59 ± 0.44	7.15 ± 0.57	1.84 ± 0.28	0.06 ± 0.01	12.16 ± 1.70
シナプトソーム	11.39 ± 1.91	13.81 ± 3.43	6.27 ± 0.75	0.74 ± 0.12	29.65 ± 4.94
PSD	18.67 ± 2.20	30.91 ± 4.12	9.94 ± 1.25	1.48 ± 0.14	57.16 ± 6.85
小脳					
ホモジネート	1.38 ± 0.21	1.48 ± 0.35	1.81 ± 0.38	1.36 ± 0.28	6.03 ± 1.19
マイクロソーム	1.57 ± 0.23	1.90 ± 0.43	1.45 ± 0.34	0.95 ± 0.05	5.86 ± 1.00
シナプトソーム	5.25 ± 1.06	6.01 ± 0.55	2.68 ± 0.52	5.28 ± 1.25	19.23 ± 3.00
PSD	10.02 ± 1.69	18.13 ± 5.71	5.75 ± 2.08	10.92 ± 2.42	44.82 ± 10.10

平均値 ± 標準誤差

る¹⁶⁾が、AMPA 受容体タンパク質を脳各部位、細胞画分で定量的に会席した報告はなかった。AMPA 受容体タンパク質を定量するために、ウエスタンブロットは最も簡単な方法であるが、異なった分子を定量するためには、それぞれの抗体の力価を知らなければならない。そこでまず、抗原数を揃えることを目的としてキメラ AMPA 受容体タンパク質を作製し、このタンパク質のウエスタンブロットにより各抗体の力価を調べた。そして抗体力価の違いに基づいて脳内 AMPA 受容体サブユニットの相対量を定量することに成功した。

GluA2 は主要サブユニットである

GluA2 は AMPA 受容体機能を決定する上で重要なサブユニットであり、ほとんどの AMPA 受容体が GluA2 を含むヘテロメリック AMPA 受容体を形成していることが電気生理学的な研究から示されている⁸⁾¹¹⁾¹³⁾。海馬神経細胞では GluA1 と GluA2 が多く、この2つのサブユニットに比べると GluA3 は少ないため、大部分が GluA1/A2 ヘテ

ロメリック受容体である⁷⁾¹²⁾¹⁴⁾⁻¹⁶⁾。RT-PCR による定量解析では大脳皮質の GluA1 は海馬に比べると少ないことが示されている⁷⁾。今回、ホモジネート画分において大脳皮質では GluA2 と GluA3 が多いのに対して、海馬では GluA1 と GluA2 が多いことを示した。興味深いのは、GluA2 の量が GluA1 と GluA3 を合わせた量とほぼ等しかったことである。この関係は PSD 画分でも見られ、これらの脳部位のシナプスでのカルシウム非透過型 AMPA 受容体の存在を反映していると考えられる。そしてこれらの結果は、海馬では GluA1/A2、大脳皮質では GluA2/A3 というヘテロメリック AMPA 受容体を中心となって機能していることを示唆する。

また、マイクロソーム画分でも GluA2 が多いことが示されたが、これは細胞内 GluA2 プールの存在を反映しているかもしれない。AMPA 受容体は小胞体で会合するが、この過程は主に GluA2 の Q/R 編集部位によって調節されている。そして、小胞体では大量の GluA2 プールが存在しており、この GluA2 はウエスタンブロットにおいて低分

子量サイズとして検出される²⁸⁾。本研究でもマイクロソーム画分において低分子量サイズのGluA2が50%以上検出されており、小胞体における細胞内GluA2プールを反映していると考えられる。

対照的に、GluA2を含まないAMPA受容体は特定の細胞や条件で存在し、この受容体はカルシウム透過性を示す。小脳では、パーグマングリア細胞においてGluA1とGluA4のmRNAが主に検出されるが、GluA2とGluA3のmRNAは検出されることが報告されていることから、GluA2を含まないAMPA受容体が発現している⁷⁾¹⁴⁾²⁹⁾³⁰⁾。実際に、小脳ホモジネート画分では4つのサブユニット量に差はなく、GluA2を含まないAMPA受容体の存在を示している。また、大脳皮質と海馬のシナプトソーム画分でもGluA1、GluA3を合わせた量がGluA2より多くGluA2を含まないAMPA受容体が存在していることが示唆されたが、これらのAMPA受容体もGluA2が発現していない細胞に発現しているAMPA受容体と考えられる。例えば、インターニューロンやグリア細胞ではGluA2が発現していない細胞があることが知られている⁸⁾³¹⁾⁻³⁴⁾が、実際にシナプトソーム画分では大脳皮質や海馬でもGLASTが相対的に多く検出されており、少なくともグリア細胞がこの画分に含まれていることを示している。

脳部位によるAMPA受容体量の違いと機能差

大脳皮質ではGluA3を含むAMPA受容体が多いのに対して、海馬ではGluA1を含むAMPA受容体が多い。そして小脳ではGluA2を含まないAMPA受容体が多い。これらの違いからAMPA受容体の輸送や機能的特性が脳部位によって異なることが示唆される。

Passafaroらは、GluA1/A2受容体は最初シナプス外に挿入された後、側方移動によってシナプスに取り込まれるのに対し、GluA2/A3受容体はシナプスにより直接取り込まれることを示している³⁵⁾。異なる研究でも、海馬培養細胞においてGluA3は樹状突起に濃縮するが細胞体等には見られない³⁶⁾。本研究では、海馬シナプトソーム画分

ではホモジネート画分に比べて有意に濃縮しているものの、大脳皮質での濃縮は有意ではなかった。この結果はGluA1を含むAMPA受容体の膜発現効率が低いことを反映しているように思われる。一方でPSD画分のAMPA受容体量は大脳皮質と海馬で差がないことから、大脳皮質のAMPA受容体(主にGluA2/A3受容体)はシナプスにより直接挿入されているというPassafaroらの報告と矛盾しない。しかし、明らかにGluA1が少ない大脳皮質でも、シナプトソーム画分のAMPA受容体量は海馬と有意に異ならなかった。つまりGluA1を含むAMPA受容体の方が膜表面輸送効率は高いかもしれないが、AMPA受容体輸送は必ずしもサブユニットに依存していないように思われる。AMPA受容体は様々なタンパク質の修飾を受けて膜表面発現調節が行われているが³⁷⁾⁻⁴⁰⁾、最も強く調節しているタンパク質はTARPsであろう⁴¹⁾⁴²⁾。TARPsサブユニットは脳部位、細胞種によって発現分布が異なるだけでなく、サブユニットによってその役割も少しずつ異なる²⁷⁾⁴³⁾⁻⁴⁸⁾。そしてTARPsの発現レベルやTARPs/AMPA受容体の量的関係の違いがAMPA受容体機能の調節メカニズムの1つであることが示唆されている⁴⁹⁾⁵⁰⁾。従って、AMPA受容体の輸送を考えるにはTARPsとの相互作用も考慮する必要があると考えられる。

ノックアウトマウスの解析からGluA1とGluA3の役割の違いが示されている。例えば、GluA1ノックアウトマウスでは海馬CA3-CA1シナプスの長期増強(Long-term potentiation: LTP)が消失するものの、大脳皮質でのLTPは正常であることが示されている⁵¹⁾⁵²⁾。一方GluA3ノックアウトマウスでは海馬LTPが亢進するのに対して、皮質-外側扁桃体経路でのLTPの減弱が見られる⁵³⁾⁵⁴⁾。そしてこれらのノックアウトマウスでは行動学的表現型にも違いが見られる⁵⁴⁾⁻⁵⁷⁾。これらの違いは各サブユニットの機能的特性だけではなく、脳部位による量の違いも反映していると考えられ、脳部位によって各サブユニットの機能的意義が異なることを示唆する。すなわち、AMPA受容体の役割を明らかにするためには各

サブユニットの量的な違いを考慮し、脳部位による各サブユニットの機能的意義を明らかにすることが重要であると考えられる。

本研究ではウエスタンブロットにより AMPA 受容体サブユニットを定量する方法を確立した。その結果、脳部位や細胞画分によって AMPA 受容体サブユニットの相対量が異なることが示された。例えば大脳皮質と海馬では、大部分がカルシウム非透過型 AMPA 受容体であることを反映し、GluA2 が多く発現していたが、大脳皮質では GluA3 を含む AMPA 受容体が多く、海馬では GluA1 を含む AMPA 受容体が多いことが示された。一方で、小脳の AMPA 受容体量は GluA2 を含まないカルシウム透過型の存在を反映するものであった。これらのサブユニット量の違いは各脳部位における AMPA 受容体機能や役割の違いを示唆するものである。

参考文献

- Keinäen K, Wisden W, Sommer B, Werner P, Herb A, Verdoorn TA, Sakmann B and Seeburg PH: A family of AMPA-selective glutamate receptors. *Science* 249: 556 - 560, 1990.
- Collingridge GL, Olsen RW, Peters J and Spedding M: A nomenclature for ligandgated ion channels. *Neuropharmacology* 56: 2 - 5, 2009.
- Wisden W and Seeburg PH: Mammalian ionotropic glutamate receptors. *Curr Opin Neurobiol* 3: 291 - 298, 1993.
- Hollmann M and Heinemann S: Cloned glutamate receptors. *Annu Rev Neurosci* 17: 31 - 108, 1994.
- Cull-Candy S, Kelly L and Farrant M: Regulation of Ca²⁺-permeable AMPA receptors: synaptic plasticity and beyond. *Curr Opin Neurobiol* 16: 288 - 297, 2006.
- Greger IH and Esteban JA: AMPA receptor biogenesis and trafficking. *Curr Opin Neurobiol* 17: 289 - 297, 2007.
- Geiger JR, Melcher T, Koh DS, Sakmann B, Seeburg PH, Jonas P and Monyer H: Relative abundance of subunit mRNAs determines gating and Ca²⁺ permeability of AMPA receptors in principal neurons and interneurons in rat CNS. *Neuron* 15: 193 - 204, 1995.
- Jonas P, Racca C, Sakmann B, Seeburg PH and Monyer H: Differences in Ca²⁺ permeability of AMPA-type glutamate receptor channels in neocortical neurons caused by differential GluR-B subunit expression. *Neuron* 12: 1281 - 1289, 1994.
- Jonas P and Burnashev N: Molecular Mechanisms Controlling Calcium Entry through AMPA-Type Glutamate Receptor Channels. *Neuron* 15: 987 - 990, 1995.
- Wenthold RJ, Petralia RS, Blahos J II and Niedzielski AS: Evidence for multiple AMPA receptor complexes in hippocampal CA1/CA2 neurons. *J Neurosci* 16: 1982 - 1989, 1996.
- Isaac JT, Ashby M and McBain CJ: The role of the GluR2 subunit in AMPA receptor function and synaptic plasticity. *Neuron* 54: 859 - 871, 2007.
- Sans N, Vissel B, Petralia RS, Wang YX, Chang K, Royle GA, Wang CY, O'Gorman S, Heinemann SF and Wenthold RJ: Aberrant formation of glutamate receptor complexes in hippocampal neurons of mice lacking the GluR2 AMPA receptor subunit. *J Neurosci* 23: 9367 - 9373, 2003.
- Lu W, Shi Y, Jackson AC, Bjorgan K, During MJ, Sprengel R, Seeburg PH and Nicoll RA: Subunit composition of synaptic AMPA receptors revealed by a single-cell genetic approach. *Neuron* 62: 254 - 268, 2009.
- Bochet P, Audinat E, Lambolez B, Crépel F, Rossier J, Iino M, Tsuzuki K and Ozawa S: Subunit composition at the single-cell level explains functional properties of a glutamate-gated channel. *Neuron* 12: 383 - 388, 1994.
- Tsuzuki K, Lambolez B, Rossier J and Ozawa S: Absolute quantification of AMPA receptor subunit mRNAs in single hippocampal neurons. *J Neurochem* 77: 1650 - 1659, 2001.
- Cheng D, Hoogenraad CC, Rush J, Ramm E, Schlager MA, Duong DM, Xu P, Wijayawardana SR, Hanfelt J, Nakagawa T, Sheng M and Peng J: Relative and absolute quantification of postsynap-

- tic density proteome isolated from rat forebrain and cerebellum. *Mol Cell Proteomics* 5: 1158 - 1170, 2006.
- 17) Petralia RS, Sans N, Wang YX, Vissel B, Chang K, Noben - Trauth K, Heinemann SF and Wenthold RJ: Loss of GLUR2 α - amino - 3 - hydroxy - 5 - methyl - 4 - isoxazolepropionic acid receptor subunit differentially affects remaining synaptic glutamate receptors in cerebellum and cochlear nuclei. *Eur J Neurosci* 19: 2017 - 2129, 2004.
 - 18) Iino M, Goto K, Kakegawa W, Okado H, Sudo M, Ishiuchi S, Miwa A, Takayasu Y, Saito I, Tsuzuki K and Ozawa S: Glia-synapse interaction through Ca^{2+} - permeable AMPA receptors in Bergmann glia. *Science* 292: 926 - 929, 2001.
 - 19) Mizushima S and Nagata S: pEF-BOS, a powerful mammalian expression vector. *Nucleic Acids Res* 18: 5322, 1990.
 - 20) Carlin RK, Grab DJ, Cohen RS and Siekevitz P: Isolation and characterization of postsynaptic densities from various brain regions: enrichment of different types of postsynaptic densities. *J Cell Biol* 86: 831 - 845, 1980.
 - 21) Akashi K, Kakizaki T, Kamiya H, Fukaya M, Yamasaki M, Abe M, Natsume R, Watanabe M and Sakimura K: NMDA receptor GluN2B (GluR ϵ 2/NR2B) subunit is crucial for channel function, postsynaptic macromolecular organization, and actin cytoskeleton at hippocampal CA3 synapses. *J Neurosci* 29: 10869 - 10882, 2009.
 - 22) Watanabe M, Fukaya M, Sakimura K, Manabe T, Mishina M and Inoue Y: Selective scarcity of NMDA receptor channel subunits in the stratum lucidum (mossy fibre - recipient layer) of the mouse hippocampal CA3 subfield. *Eur J Neurosci* 10: 478 - 487, 1998.
 - 23) Fukaya M, Tsujita M, Yamazaki M, Kushiya E, Abe M, Akashi K, Natsume R, Kano M, Kamiya H, Watanabe M and Sakimura K: Abundant distribution of TARP γ - 8 in synaptic and extrasynaptic surface of hippocampal neurons and its major role in AMPA receptor expression on spines and dendrites. *Eur J Neurosci* 24: 2177 - 2190, 2006.
 - 24) Fukaya M and Watanabe M: Improved immunohistochemical detection of postsynaptically located PSD - 95/SAP90 protein family by protease section pretreatment: a study in the adult mouse brain. *J Comp Neurol* 426: 572 - 586, 2000.
 - 25) Nagy GG, Al - Ayyan M, Andrew D, Fukaya M, Watanabe M and Todd AJ: Widespread expression of the AMPA receptor GluR2 subunit at glutamatergic synapses in the rat spinal cord and phosphorylation of GluR1 in response to noxious stimulation revealed with an antigen - unmasking method. *J Neurosci* 24: 5766 - 5777, 2004.
 - 26) Shibata T, Yamada K, Watanabe M, Ikenaka K, Wada K, Tanaka K and Inoue Y: Glutamate transporter GLAST is expressed in the radial glia - astrocyte lineage of developing mouse spinal cord. *J Neurosci* 17: 9212 - 9219, 1997.
 - 27) Yamazaki M, Fukaya M, Hashimoto K, Yamasaki M, Tsujita M, Itakura M, Abe M, Natsume R, Takahashi M, Kano M, Sakimura K and Watanabe M: TARPs γ - 2 and γ - 7 are essential for AMPA receptor expression in the cerebellum. *Eur J Neurosci* 31: 2204 - 2220, 2010.
 - 28) Greger IH, Khatri L and Ziff EB: RNA editing at Arg607 controls AMPA receptor exit from the endoplasmic reticulum. *Neuron* 34: 759 - 772, 2002.
 - 29) Burnashev N, Khodorova A, Jonas P, Helm PJ, Wisden W, Monyer H, Seeburg PH and Sakmann B: Calcium - permeable AMPA - kainate receptors in fusiform cerebellar glial cells. *Science* 256: 1566 - 1570, 1992.
 - 30) Müller T, Möller T, Berger T, Schnitzer J and Kettenmann H: Calcium entry through kainate receptors and resulting potassium - channel blockade in Bergmann glial cells. *Science* 256: 1563 - 1566, 1992.
 - 31) Koh DS, Geiger JR, Jonas P and Sakmann B: Ca^{2+} - permeable AMPA and NMDA receptor channels in basket cells of rat hippocampal dentate gyrus. *J Physiol* 485: 383 - 402, 1995.
 - 32) Moga DE, Janssen WG, Vissavajhala P, Czelusniak SM, Moran TM, Hof PR and Morrison JH: Glutamate receptor subunit 3 (GluR3) immunoreactivity delineates a subpopulation of

- parvalbumin - containing interneurons in the rat hippocampus. *J Comp Neurol* 462: 15 - 28, 2003.
- 33) Ge WP, Yang XJ, Zhang Z, Wang HK, Shen W, Deng QD and Duan S: Long - term potentiation of neuron - glia synapses mediated by Ca^{2+} - permeable AMPA receptors. *Science* 312: 1533 - 1537, 2006.
- 34) Fuchs EC, Zivkovic AR, Cunningham MO, Middleton S, Lebeau FE, Bannerman DM, Rozov A, Whittington MA, Traub RD, Rawlins JN and Monyer H: Recruitment of parvalbumin - positive interneurons determines hippocampal function and associated behavior. *Neuron* 53: 591 - 604, 2007.
- 35) Passafaro M, Piëch V and Sheng M: Subunit - specific temporal and spatial patterns of AMPA receptor exocytosis in hippocampal neurons. *Nat Neurosci* 4: 917 - 926, 2001.
- 36) Lee SH, Simonetta A and Sheng M: Subunit rules governing the sorting of internalized AMPA receptors in hippocampal neurons. *Neuron* 43: 221 - 236, 2004.
- 37) Srivastava S, Osten P, Vilim FS, Khatri L, Inman G, States B, Daly C, DeSouza S, Abagyan R, Valtchanoff JG, Weinberg RJ and Ziff EB: Novel anchorage of GluR2/3 to the postsynaptic density by the AMPA receptor - binding protein ABP. *Neuron* 21: 581 - 591, 1998.
- 38) Wyszynski M, Kim E, Yang FC and Sheng M: Biochemical and immunocytochemical characterization of GRIP, a putative AMPA receptor anchoring protein, in rat brain. *Neuropharmacology* 37: 1335 - 1344, 1998.
- 39) Xia J, Zhang X, Staudinger J and Huganir RL: Clustering of AMPA receptors by the synaptic PDZ domain - containing protein PICK1. *Neuron* 22: 179 - 187, 1999.
- 40) Sheng M: Molecular organization of the postsynaptic specialization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 7058 - 7061, 2001.
- 41) Chen L, Chetkovich DM, Petralia RS, Sweeney NT, Kawasaki Y, Wenthold RJ, Brecht DS and Nicoll RA: Stargazin regulates synaptic targeting of AMPA receptors by two distinct mechanisms. *Nature* 408: 936 - 943, 2000.
- 42) Brecht DS and Nicoll RA: AMPA receptor trafficking at excitatory synapses. *Neuron* 40: 361 - 379, 2003.
- 43) Tomita S, Chen L, Kawasaki Y, Petralia RS, Wenthold RJ, Nicoll RA and Brecht DS: Functional studies and distribution define a family of transmembrane AMPA receptor regulatory proteins. *J Cell Biol* 161: 805 - 816, 2003.
- 44) Yamazaki M, Ohno - Shosaku T, Fukaya M, Kano M, Watanabe M and Sakimura K: A novel action of stargazin as an enhancer of AMPA receptor activity. *Neurosci Res* 50: 369 - 374, 2004.
- 45) Rouach N, Byrd K, Petralia RS, Elias GM, Adesnik H, Tomita S, Karimzadegan S, Kealey C, Brecht DS and Nicoll RA: TARP γ - 8 controls hippocampal AMPA receptor number, distribution and synaptic plasticity. *Nat Neurosci* 8: 1525 - 1533, 2005.
- 46) Kott S, Werner M, Körber C and Hollmann M: Electrophysiological properties of AMPA receptors are differentially modulated depending on the associated member of the TARP family. *J Neurosci* 27: 3780 - 3789, 2007.
- 47) Kato AS, Siuda ER, Nisenbaum ES and Brecht DS: AMPA receptor subunit - specific regulation by a distinct family of type II TARPs. *Neuron* 59: 986 - 996, 2008.
- 48) Milstein AD and Nicoll RA: TARP modulation of synaptic AMPA receptor trafficking and gating depends on multiple intracellular domains. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 11348 - 11351, 2009.
- 49) Milstein AD, Zhou W, Karimzadegan S, Brecht DS and Nicoll RA: TARP subtypes differentially and dose-dependently control synaptic AMPA receptor gating. *Neuron* 55: 905 - 918, 2007.
- 50) Shi Y, Lu W, Milstein AD and Nicoll RA: The stoichiometry of AMPA receptors and TARPs varies by neuronal cell type. *Neuron* 62: 633 - 640, 2009.
- 51) Zamanillo D, Sprengel R, Hvalby O, Jensen V, Burnashev N, Rozov A, Kaiser KM, Köster HJ, Borchardt T, Worley P, Lübke J, Frotscher M, Kelly PH, Sommer B, Andersen P, Seeburg PH and Sakmann B: Importance of AMPA receptors

- for hippocampal synaptic plasticity but not for spatial learning. *Science* 284: 1805 - 1811, 1999.
- 52) Frey MC, Sprengel R and Nevian T: Activity pattern - dependent long - term potentiation in neocortex and hippocampus of GluA1 (GluR - A) subunit - deficient mice. *J Neurosci* 29: 5587 - 5596, 2009.
- 53) Meng Y, Zhang Y and Jia Z: Synaptic transmission and plasticity in the absence of AMPA glutamate receptor GluR2 and GluR3. *Neuron* 39: 163 - 176, 2003.
- 54) Humeau Y, Reisel D, Johnson AW, Borchardt T, Jensen V, Gebhardt C, Bosch V, Gass P, Bannerman DM, Good MA, Hvalby Ø, Sprengel R and Lüthi A: A pathway - specific function for different AMPA receptor subunits in amygdala long - term potentiation and fear conditioning. *J Neurosci* 27: 10947 - 10956, 2007.
- 55) Bannerman DM, Deacon RM, Brady S, Bruce A, Sprengel R, Seeburg PH and Rawlins JN: A comparison of GluR - A - deficient and wild - type mice on a test battery assessing sensorimotor, affective, and cognitive behaviors. *Behav Neurosci* 118: 643 - 647, 2004.
- 56) Sanchis - Segura C, Borchardt T, Vengeliene V, Zghoul T, Bachteler D, Gass P, Sprengel R and Spanagel R: Involvement of the AMPA receptor GluR - C subunit in alcohol - seeking behavior and relapse. *J Neurosci* 26: 1231 - 1238, 2006.
- 57) Sanderson DJ, Good MA, Skelton K, Sprengel R, Seeburg PH, Rawlins JN and Bannerman DM: Enhanced long - term and impaired short - term spatial memory in GluA1 AMPA receptor subunit knockout mice: evidence for a dual - process memory model. *Learn Mem* 16: 379 - 386, 2007.

(平成23年1月17日受付)
