

定量的ウェスタンブロット法の開発と

カイニン酸型グルタミン酸受容体定量への応用

新潟大学医学会雑誌 128 間 12 号

渡辺和泉

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)

Izumi WATANABE

Department of Cellular Neurobiology, Brain Research Institute,

Graduate School of Medical and Dental Science, Niigata University

(Director: Prof. Kenji SAKIMURA)

要旨

イオン透過型グルタミン酸受容体であるカイニン酸型受容体 (KAR) は, GluK1-5 のサブユニットから構成される. これらは, カイニン酸に低親和性の GluK1-3 と, 高親和性の GluK4-5 に分類され, 前者がホモメリック受容体として機能するのに対して, 後者は前者と複合体形成をしないと機能しない. 脳内でこれらサブユニットは様々な組み合わせで発現していると考えられてきたが, 実際のタンパク質量は測定されておらず, その構成は不明であった. 本研究では, KAR 各サブユニットに特異的な抗体を用いてウェスタンブロットにより定量する新たな方法を開発し, 海馬及び小脳の P2 と PSD 画分の KAR サブユニット量を定量した. 海馬 P2 画分では GluK2 : GluK3 : GluK4 : GluK5 が 1 : 0.38 : 0.08 : 0.22 であり, PSD 画分では 1.0 : 0.60 : 0.07 : 0.44, 小脳 P2 画分では GluK2 : GluK3 : GluK4 : GluK5 が 1 : 0.78 : 0.08 : 0.13 であり, PSD 画分では 1.0 : 0.74 : 0.11 : 0.15 であった. これらの結果から, KAR は両領域において, 高親和性サブユニットを含むヘテロメリックのものより, 低親和性サブユニット GluK2 と

GluK3 から構成されるものが主であることが明らかになった。

キーワード：カイニン酸受容体， 定量， サブユニット構成， ウェスタンブロット

はじめに

カイニン酸型グルタミン酸受容体 (KAR) は、イオン透過性グルタミン酸受容体ファミリーのメンバーであり、広く中枢神経系に分布し、興奮性神経伝達を担うことが報告されている¹⁾⁻⁴⁾。KAR は 5 種類のサブユニット GluK1-5 の 4 量体で構成されているが⁵⁾、各サブユニット mRNA の分布は脳領域において異なっている^{4) 6)}。これらのサブユニットは、カイニン酸に低親和性の GluK1-3 と、高親和性の GluK4-5 に分類され⁷⁾、低親和性サブユニットの GluK1-3 は、ホモメリック受容体として機能するが⁷⁾⁻⁹⁾、GluK4-5 は GluK1-3 と組まないと受容体として機能しない^{10) 11)}。KAR サブユニット mRNA は、海馬において CA1-CA3 錐体細胞層、歯状回顆粒細胞層や抑制性神経細胞に発現しイオンチャンネルとして機能している^{12) 13)}。一方小脳では、顆粒細胞、プルキンエ細胞、籠状細胞、星状細胞やグリア細胞など広く発現しており^{14) 15)}、小脳の培養切片のプルキンエ細胞、ゴルジ細胞や培養顆粒細胞を用いた電気生理学的解析により、機能的な KAR がそれぞれに含まれていることが明らかとなっている¹⁶⁾⁻¹⁸⁾。これまで *in situ* ハイブリダイゼーション法や電気生理学的手法を用いて、KAR サブユニットの発現パターンやその生理機能が報告されてきたが、これらサブユニットは脳領域や細胞種特異的に様々な組み合わせで発現していると考えられており、KAR の機能を規定していると考えられてきた。しかしながら脳における KAR サブユニットの量を定量的に解析した報告はなく、その詳細は不明のままである。本研究では、KAR サブユニットに対する特異抗体を作製し、これらの抗体を用いて AMPA 型グルタミン酸受容体サブユニット GluA2 を標準とした定量的なウェスタンブロット法の開発を行なった。

この手法を用いて海馬と小脳の各細胞画分について KAR サブユニットの各量を明らかにすることに成功した。

材料と方法

抗体

ウサギ抗 GluK1 抗体とウサギ抗 GluK3 抗体は、マウス GluK1 の C 末端 11 アミノ酸残基 CHQRRTQRKETVA (922-934, NM 146072.4) と GluK3 の C 末端 17 アミノ酸残基 PGKDSMSCSTSLAPVFP (903-919, NM 001081097.2) に対して作製した。ウサギポリクローナル抗体は以下のものを使用した；GuK2 (Synaptic systems, Goettingen, Germany), GluK4 (参考文献¹⁹), GluK5 (Millipore Corporation, Bedford, MA, USA)。

キメラタンパク質

各抗 KAR サブユニット抗体の力価を検定するために、抗 GluA2 抗体のエピトープと抗 GluK2-5 抗体の各エピトープを同時に持つキメラタンパク質を作製した。このキメラタンパク質は、AMPA 型グルタミン酸受容体 GluA2 サブユニット (1-884) を骨格にして、その細胞内 C 末端領域 (834-884) を GluK2 (841-908), GluK3 (842-919), GluK4 (826-952), GluK5 (825-979) にそれぞれ置換したものである (図 3A)。各 cDNAs を pEF-BOS ベクター²⁰ に挿入し、COS-7 細胞と HEK293 細胞に Plus Regent と Lipofectamine Regent (Invitrogen, USA) を用いてトランスフェクションした。24 時間後、細胞は SDS サンプルバッファー (2% sodium dodecyl sulfate (SDS), 3.3% グルセロール, 125 mM Tris-HCl (pH 7.4)) により 4°C で可溶化し、10,000 × g で 10-20 分間遠心分離した上清をキメラタンパク質試料として SDS-PAGE に使用した。

KAR サブユニットノックアウトマウス

GluK2, GluK5 ノックアウト (KO) マウスは, C57BL/6N 由来 ES 細胞系統 RENKA を使用し作製した (I. Watanabe and K. Sakimura, unpublished data). GluK4KO は以前報告されている¹⁹⁾.

マウス脳の細胞分画

細胞分画は 0-4°Cにて, Carlin らの方法を参考にして行った²¹⁾. 8-12 週齢成体雄 C57BL/6N 系統マウス (Charles River Laboratories Japan) 及び GluK2KO, GluK4KO, GluK5KO マウスの海馬と小脳を取り出し, ホモジネートバッファー (0.32 M ショ糖, 5 mM EDTA, 5 mM HEPES-NaOH (pH 7.4), complete protease inhibitor cocktail tablet (Roche, Germany)) によりホモジネートし, 1,000×g で 10 分間遠心分離した. さらにその上清を 10,000×g で 10 分間遠心分離し得られた沈殿を 1% Triton X-100/ ホモジネートバッファーで 30 分間可溶化後, 10,000×g で 10 分間遠心分離し, その上清を P2 画分とした. PSD 画分は, P2 画分を 0.8 M, 1.2 M のショ糖密度勾配遠心 (90,000×g, 2 時間) により得たシナプトソーム画分をさらに 1% Triton X-100 で 15 分間処理後, 20,100×g で遠心分離し, 得られた沈殿を 40 mM Tris-HCl (pH 8.0) / 1% SDS で溶解したものを用いた.

ウェスタンブロット

試料のタンパク質は前述の SDS サンプルバッファーに 1%メルカプトエタノールを添加し, 100°C, 5 分間還元後, 8% SDS-PAGE を行い, ニトロセルロースメンブレン (Amersham, UK) へ電氣的に転写した. メンブレンは 5%スキムミルク/ TBS-T (137 mM NaCl, 0.1% Tween 20, 20 mM Tris-HCl (pH 7.6)) で 1 時間室温でブロッキング後, TBS-T で 10 分間 3 回洗浄し, 1 µg/ ml の 1 次抗体/ TBS-T で 3-4 時間室温で反

応させた。TBS-T で 10 分間 3 回洗浄後、メンブレンはペルオキシダーゼコンジュゲート 2 次抗体で 1 時間室温で反応させた。TBS-T で洗浄後、ECL (Amersham) を用いて、医療用 X 線フィルム (FUJIFILM, Japan) または冷却 CCD カメラ内蔵化学発光イメージアナライザー (LAS-4000 mini, GE, USA, EZ capture MG, ATTO, Japan) で検出した。

ウェスタンブロットの定量解析

ウェスタンブロットで得られたバンドのシグナル強度は、ImageJ software, imageQuant TL (GE Healthcare) と CS Analyzer ver.3.0 (ATTO) を使用して測定した。

結果

KAR サブユニット抗体の特異性

定量解析の前に、抗 GluK 抗体の特異性を確認した。抗 GluK2, GluK4, GluK5 抗体の特異性は、野生型マウス, GluK2KO, GluK4KO, GluK5KO マウスの海馬試料を用いて検討した (図 1A)。また、当研究室では GluK1KO 及び GluK3KO マウスを保持していないため、抗 GluK1, GluK3 抗体の特異性は、各分子を COS-7 細胞に発現させた抽出物を用いて行った (図 1B, C)。抗 GluK2, 抗 GluK4, 抗 GluK5 抗体は、予測分子量位置にバンドが認められ、ノックアウトマウスでこのバンドが消失することが確認できた (GluK2, 102 kDa; GluK4, 107 kDa; GluK5, 109 kDa; 図 2A)。抗 GluK3 抗体は、GluK3 タンパク質のみを認識した (GluK3, 104 kDa; 図 1B)。これまで抗 GluK3 抗体は、GluK2 に交差して認識するものが使われていたが、本研究で GluK1 と GluK2 に交差しない抗 GluK3 抗体を作製することができた。次に抗 GluK1 抗体 (Upstate 及び自作抗体) の特異性を調べた (図

1C). Upstate の抗体では野生型マウスの P2 画分において当該分子量部位にバンドを認識したが、このバンドは GluK2KO マウスの P2 画分では消失してしまった(GluK1, 95 kDa). さらにこの抗 GluK1 抗体は COS-7 細胞に発現させた GluK1 と GluK2 両者を認識したことから、GluK2 を認識していることが明白であった. これに対し、本研究で作製した抗 GluK1 抗体は、COS-7 細胞に発現させた GluK1 には反応したが、海馬 P2 画分において GluK1 バンドを検出できなかった. 抗体の特異性から、GluK1 タンパク質の定量を断念し、本研究では GluK2-5 のみ定量解析した.

抗カイニン酸受容体抗体力価の測定

GluK2-5 タンパク質の定量をするにあたって、まず各抗 KAR サブユニット抗体の力価を、AMPA 型グルタミン酸受容体 (AMPA) とカイニン酸受容体 (KAR) のキメラタンパク質を用いて補正することにした. AMPAR サブユニットの GluA2 は脳内で多く発現していることから、GluA2 を 4 つの KAR サブユニット量を比較する標準タンパク質に選んだ. そこで、GluA2 の細胞内 C 末端領域を KAR サブユニットのものと置換したキメラタンパク質 (GluA2K2-5) を設計し、キメラタンパク質発現ベクターを作製した (図 2A). GluA2K2-5 キメラタンパク質は GluA2 と GluK2-5 の各 2 つのエピトープを持つことから、抗 GluA2 N 末端抗体の力価を標準として抗 GluK2-5 C 末端抗体の力価を求めることができる. 本研究では、ウェスタンブロットのバンド強度をこの力価比で補正し、脳の GluK2-5 サブユニット量を測定した. 模式図で力価の計算の基本となる考え方を示した (図 2B). GluA2K タンパクに対する抗 GluA2 抗体とそれぞれの抗 GluK 抗体のシグナル強度は、各エピトープへの結合親和性に依存する. 図 2B の条件では、抗 GluA2 抗体で認識された 20 μ g の GluA2K のバンドと抗 GluK 抗体で認識された 10 μ g の GluA2K のバンドのシグナル強度が同じであるので、抗 GluK 抗体の力価は抗 GluA2 抗体の 2 倍となる. このように、抗 GluA2 抗体に対する抗 GluK2-5

抗体それぞれの力価を求め、各サブユニットの定量に用いた。抗 GluA2 抗体と抗 GluK 抗体により認識されたバンドのシグナル強度に極端な差がある場合、定量の誤差が大きくなるので、それぞれのバンドのシグナル強度が近い範囲で比較した。各 GluA2K2-5 の標準曲線から、抗 GluA2 抗体と抗 GluK 抗体のバンドのシグナルが同程度の強度であることがわかる (図 2C)。各抗体力価比は後述する。

ウェスタンブロットによる定量方法

本研究で用いた定量方法を、海馬 PSD 画分の GluK2 の定量を例にして示す。この方法では、①抗体力価比の測定、②試料のサブユニット量の測定を同時に行う。そのために①GluA2K2 キメラタンパクと②海馬 PSD 画分を同一ゲルで泳動し、それぞれ抗 GluA2 抗体と抗 GluK2 抗体により検出した (図 3A)。①各抗体で認識された GluA2K2 のバンドのシグナル値から標準曲線を描き直線性を確認した (図 3B 左)、次にバンドのシグナル値で近い範囲のもののみ (GluA2; 7955, 12233, 16266, 20311, GluK2; 7648, 15925, 22496) を図 3C 上に示した計算式にそれぞれ導入し力価比を求め平均力価を算出した。②海馬 PSD 画分の GluA2 と GluK2 のバンドのシグナル値から標準曲線を描き直線性を確認した (図 3B 右)。そして、バンドのシグナル値全て (GluA2; 11712, 17735, 21658, GluK2; 7600, 13937, 18415)と①で求めた平均力価比 (10.3 倍) を図 3C 下の式に導入し計算値を平均化し、海馬 PSD 画分の GluA2 に対する GluK2 量 (7.3%) を求めた。同様に図 2C の抗 GluA2 抗体への抗 GluK2, GluK3, GluK4, GluK5 抗体の力価比を計算すると、8.4, 2.4, 33, 31 倍となる。

海馬及び小脳における各カイニン酸受容体サブユニット量

海馬 P2 画分, PSD 画分と小脳 P2 画分, PSD 画分において、前述の方法で GluK2-5 の GluA2 に対する相対的割合を定量した。電気泳動するタンパク質量は、各抗体の力

価と各サブユニットの組織に含まれる量によって変えた。GluA2 に対する相対量を図 4 に示した。海馬 P2 画分では、GluK2, GluK3, GluK4, GluK5 はそれぞれ GluA2 に対して、 $9.2 \pm 0.77\%$, $3.5 \pm 0.92\%$, $0.77 \pm 0.30\%$, $2.0 \pm 0.31\%$ (各 $n=3$, 平均値 \pm 標準誤差, 図 4A) であった。海馬 PSD 画分では、 $7.0 \pm 0.55\%$, $4.2 \pm 0.78\%$, $0.47 \pm 0.09\%$, $3.1 \pm 0.16\%$ ($n=3$, 図 4A)。小脳 P2 画分では、 $22 \pm 2.14\%$, $17 \pm 3.78\%$, $1.9 \pm 0.44\%$, $2.8 \pm 0.51\%$ であった ($n=3$, 図 4B)。小脳 PSD 画分は、 $9.9 \pm 2.4\%$, $7.3 \pm 0.97\%$, $1.1 \pm 0.14\%$, $1.4 \pm 0.17\%$ ($n=3$, 図 6B)。これらの結果から、海馬と小脳において KAR は AMPAR よりも少ないことが示され、このことは KAR を介した興奮性シナプス後電流 (EPSC) が AMPAR のものに比べ非常に少ないという報告を支持している^{22) 23)}。また全ての画分で GluK2-5 の中で最も発現量が多いのは GluK2 であることがわかり、脳領域や細胞画分によって KAR サブユニットの量及び構成に差があることが明らかとなった。

海馬及び小脳における KAR サブユニットの定量解析は、GluK2 がどの領域においても発現量が高いのに加え、KAR サブユニットの構成が異なることを示唆した。このことを理解しやすくするために、各領域と画分の GluK2 を 1 とした時の割合を算出しサブユニットの量比を単純化した (図 6A)。各サブユニット発現レベルは、海馬と小脳のどの画分でも GluK2, GluK3, GluK5, GluK4 の順になっていた。P2 画分では、海馬 GluK2 が他の GluK3-5 を合わせたものの 2 倍近く多く、 $\text{GluK2} : \text{GluK3} : \text{GluK4} : \text{GluK5} = 1.0 : 0.38 : 0.08 : 0.22$ となる。一方小脳では GluK2 と GluK3 が GluK4 と GluK5 を合わせた 8 倍以上多く発現しており、 $\text{GluK2} : \text{GluK3} : \text{GluK4} : \text{GluK5} = 1.0 : 0.78 : 0.08 : 0.13$ であった。PSD 画分では、海馬 GluK2 の量は GluK2-5 の約 50% となり、 $\text{GluK2} : \text{GluK3} : \text{GluK4} : \text{GluK5} = 1.0 : 0.6 : 0.07 : 0.44$ だった。小脳では $\text{GluK2} : \text{GluK3} : \text{GluK4} : \text{GluK5} = 1.0 : 0.74 : 0.11 : 0.15$ となった。また、他の目立つ特徴として GluK4 は全ての領域と画分で非常に量が少なく、GluK5 は小脳より海馬に

において発現量が高かった。

低親和性 GluK2, GluK3 サブユニットが海馬と小脳の主要成分である

次に各脳領域間の KAR サブユニットのタンパク量を比較することにした。標準とした GluA2 の含有が海馬と小脳の各画分で異なっている²⁴⁾。そこで海馬 P2 画分の GluK2 を 1 とした時の各画分の GluK2 の量比を求めることにした。GluA2K2 (1.25 μ g) を基準に、このシグナル強度と一致する各画分のタンパク量を抗 GluK2 抗体で認識された脳試料の標準曲線から計算した (図 5B テーブル GluK2 列)。各画分の GluK2 の量比をもとに補正し、他の KAR サブユニットの割合を求めた。

PSD 画分と P2 画分で GluK2-5 のタンパク量を比較すると、GluK2-5 全てで P2 画分から PSD 画分へサブユニットが濃縮されていることがわかった (図 5B)。低親和性サブユニットの GluK2 と特に GluK3 は、海馬 (GluK2 : GluK3 : GluK4 : GluK5 = 1.0 : 0.38 : 0.08 : 0.22) よりも小脳 (GluK2 : GluK3 : GluK4 : GluK5 = 1.28 : 0.99 : 0.11 : 0.16) で割合として高い。海馬 PSD 画分の GluK5 の割合は小脳 PSD 画分よりも 3 倍高い。一方 GluK2, GluK3, GluK5 の割合は両領域で同じであった。海馬 PSD 画分で (GluK2 : GluK3 : GluK4 : GluK5 = 3.57 : 2.13 : 0.24 : 1.57)、小脳 PSD 画分では (GluK2 : GluK3 : GluK4 : GluK5 = 3.83 : 2.83 : 0.43 : 0.56) となった。GluK2 と GluK4 はそれほど海馬 PSD 画分で濃縮していないのに対して、GluK3 と GluK5 は濃縮していた。さらに、GluK2-5 の 4 つの KAR サブユニットは小脳 PSD 画分に 3-4 倍濃縮していた。そして GluK4 が海馬と小脳どちらの領域でも発現割合が低いことが明らかになった。また GluK5 は小脳 PSD 画分よりも海馬 PSD 画分により多く発現していることが、定量的に明らかになった。これらの結果から、GluK2, GluK3, GluK5 は海馬 PSD 画分に主要に発現し、さらに小脳 PSD 画分では低親和性の GluK2 と GluK3 が主要に発現していることが示された。

考察

本研究で開発した定量的ウェスタンブロット法は、標準タンパク質と比較したい分子類を融合した同一分子上に 2 つのエピトープを持つキメラタンパク質を複数作ることにより、異なった力価を持つ抗体を用いても、バンドの濃さを比較するという簡便な手法で、特定の画分に含まれる異なった分子のタンパク量の多寡を測定することが可能である。これまで質量解析法など大がかりな装置が無いとできなかった²⁵⁾、特定分子間の量の比較が簡便にできることは画期的なことである。本研究では、この手法を興奮性神経伝達を担うカイニン酸型グルタミン酸受容体サブユニット量の測定に応用し、新たな知見を得ることができた。この手法は他にも応用可能であり、適当な標準タンパク質を選べば、同一の画分に存在する様々な分子の量の比較が可能になる。

カイニン酸受容体は中枢神経系に広く分布しており、構成する 5 つのサブユニットの mRNA の発現から、脳部位や細胞によってホモメリック及びヘテロリックな組み合わせが多数存在すると考えられてきた。本研究では、低親和性サブユニットの GluK2 と GluK3 が海馬と小脳で多く発現していること、またそれに対し高親和性サブユニットの GluK4 と GluK5 は、特に小脳において低親和性サブユニットより極めて少ないことを明らかにした。

GluK1 は海馬では抑制性神経細胞と少数の錐体細胞に発現されることが知られているが^{13) 26)}、本研究では高い力価の抗 GluK1 抗体が得られず測定できなかった。さらに、*in vitro* 合成 GluK1 に強く反応するが GluK2 に交差してしまう Upstate の抗 GluK1 抗体でも GluK2KO マウス海馬 P2 画分でバンドが検出できないことから、GluK1 は GluK2 よりも相当少ないことが予想される。さらなる KAR サブユニット構成を明らかにするためには、特異性と力価の高い抗 GluK1 抗体の作製が必要となる。

高親和性サブユニットの GluK4 の発現は海馬で非常に少なかったが、GluK5 は多く

発現していた。一方、低親和性サブユニットの GluK2 と GluK3 は海馬で非常に多く発現していた。GluK4/GluK5 ダブルノックアウトマウスでは、高親和性サブユニットの欠損により苔状線維と CA3 間シナプスでの KAR-EPSC が消失する²⁷⁾。一方 GluK2KO マウスの同部位における KA-EPSC は消失し、さらに苔状線維での長期増強 (LTP) は障害された^{15) 28)}。免疫沈降実験において、GluK2/GluK3, GluK4 と GluK5 は共沈する²⁹⁾⁻³¹⁾ ことから、海馬 CA3 透明層の KAR はこれらサブユニットのヘテロマーとして存在することが示唆されてきた³²⁾。しかし本研究で、海馬 PSD 画分において低親和性サブユニット GluK2 と GluK3 は高親和性サブユニット GluK4 と GluK5 の 3 倍高い発現量であることが分かった (図 5)。このことは高親和性サブユニットと組まない低親和性サブユニットの存在を示唆するが、これらはチャネル形成に寄与していないことが想定され、その生理的役割は今後解明すべき課題である。

P2 画分から PSD 画分への濃縮の差は細胞内での KAR サブユニットの局在を反映しており、海馬において GluK2 と GluK4 はシナプス後肥厚以外やプレシナプスにも多数存在し、GluK3 と GluK5 はシナプス後肥厚に多く局在することが予想される。

これまでの研究では抗 GluK2/GluK3 抗体を使用したものが多く、特異的な抗 GluK3 抗体を使用して内在の GluK3 を調べた報告はない。本研究では、特異的な抗体を用いてマウス脳において初めて GluK3 が確認でき、さらに GluK3 は海馬と小脳において予想以上に多く発現していることを見出せた。

本研究において最も興味深い点は、小脳において高親和性サブユニット GluK4 と GluK5 の発現が非常に少ないことである (図 5)。これまで、GluK4 と GluK5 両方共が小脳において少ないことは予想されていなかった。ラット小脳顆粒細胞において GluK5 mRNA は強く発現しているにもかかわらず^{6) 12)}、免疫組織化学の報告³³⁾ と一致して、小脳での GluK5 タンパクの発現量は非常に少なく、これらの領域では翻訳レベルでの調節が行われているのかもしれない。アフリカツメガエル卵母細胞¹¹⁾ や

HEK293 細胞³⁴⁾において, GluK5 を含む KAR は低親和性サブユニットにより構成される KAR よりもグルタミン酸に対して高いチャンネル活性を持つことが *in vitro* の実験で示されており, 高親和性サブユニットを持つヘテロマーがチャンネル機能の中心だと考えられてきた. このことは, GluK4/GluK5 ダブルノックアウトマウス海馬での観察²⁷⁾からも支持されている. それゆえ小脳において, 高親和性サブユニットを持たない多量の低親和性サブユニット GluK2 と GluK3 の存在は, KAR がイオンチャンネル以外にも働いているのではないかという考えを起こさせる.

結語

本研究は定量的ウェスタンブロット法を開発し, その技術を応用してカイニン酸型グルタミン酸受容体の定量を行った. その結果, これまで mRNA 量から推定されていた結果とは異なり, 低親和性サブユニットが KAR の主要な構成成分であることがわかった. 今後, 低親和性サブユニットの生理的役割は遺伝子改変マウスの解析を進展させ解明していきたい.

文献

- 1) Lerma J: Roles and rules of kainate receptors in synaptic transmission. *Nat. Rev. Neurosci.* **4**: 481–495, 2003.
- 2) Lerma J: Kainate receptor physiology. *Curr. Opin. Pharmacol.* **6**: 89–97, 2006.
- 3) Pinheiro P and Mulle C: Kainate receptors. *Cell Tissue Res.* **326**: 457–482, 2006.
- 4) Contractor A, Mulle C and Swanson GT: Kainate receptors coming of age: milestones of two decades of research. *Trends Neurosci.* **34**: 154–163, 2011.

- 5) Ayalon G and Stern-Bach Y: Functional Assembly of AMPA and Kainate Receptors Is Mediated by Several Discrete Protein-Protein Interactions. *Neuron* **31**: 103–113, 2001.
- 6) Wisden W and Seeburg PH: A complex mosaic of high-affinity kainate receptors in rat brain. *J. Neurosci.* **13**: 3582–3598, 1993.
- 7) Bettler B, Egebjerg J, Sharma G, Pecht G, Hermans-Borgmeyer I, Moll C, Stevens CF, Heinemann S: Cloning of a putative glutamate receptor: a low affinity kainate-binding subunit. *Neuron* **8**: 257–265, 1992.
- 8) Bettler B, Boulter J, Hermans-Borgmeyer I, O'Shea-Greenfield A, Deneris ES, Moll C, Borgmeyer U, Hollmann M, Heinemann S: Cloning of a novel glutamate receptor subunit, GluR5: Expression in the nervous system during development. *Neuron* **5**: 583–595, 1990.
- 9) Egebjerg J., Bettler B., Hermans-Borgmeyer I. & Heinemann S: Cloning of a cDNA for a glutamate receptor subunit activated by kainate but not AMPA. *Nature* **351**: 745–748, 1991.
- 10) Herb A, Burnashev N, Werner P, Sakmann B, Wisden W, Seeburg PH: The KA-2 subunit of excitatory amino acid receptors shows widespread expression in brain and forms ion channels with distantly related subunits. *Neuron* **8**: 775–785, 1992.
- 11) Sakimura K, Morita T, Kushiya E and Mishina M: Primary structure and expression of the γ 2 subunit of the glutamate receptor channel selective for kainate. *Neuron* **8**: 267–274, 1992.
- 12) Bahn S, Volk B and Wisden W: Kainate receptor gene expression in the developing rat brain. *J. Neurosci.* **14**: 5525–5547, 1994.
- 13) Bureau I, Bischoff S, Heinemann SF and Mulle C: Kainate receptor-mediated responses in the CA1 field of wild-type and GluR6-deficient mice. *J. Neurosci.* **19**: 653–663, 1999.

- 14) Castillo PE, Malenka RC and Nicoll RA: Kainate receptors mediate a slow postsynaptic current in hippocampal CA3 neurons. *Nature* **388**: 182–186, 1997.
- 15) Mulle C, Sailer A, Pérez-Otaño I, Dickinson-Anson H, Castillo PE, Bureau I, Maron C, Gage FH, Mann JR, Bettler B, Heinemann SF: Altered synaptic physiology and reduced susceptibility to kainate-induced seizures in GluR6-deficient mice. *Nature* **392**: 601–605, 1998.
- 16) Renard A, Crépel F and Audinat E: Evidence for two types of non-NMDA receptors in rat cerebellar Purkinje cells maintained in slice cultures. *Neuropharmacology* **34**: 335–346, 1995.
- 17) Savidge JR, Sturgess NC, Bristow DR and Lock EA: Characterisation of kainate receptor mediated whole-cell currents in rat cultured cerebellar granule cells. *Neuropharmacology* **38**: 375–382, 1999.
- 18) Bureau I, Dieudonne S, Coussen F and Mulle C: Kainate receptor-mediated synaptic currents in cerebellar Golgi cells are not shaped by diffusion of glutamate. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**: 6838–6843, 2000.
- 19) Akashi K, Kakizaki T, Kamiya H, Fukaya M, Yamasaki M, Abe M, Natsume R, Watanabe M, Sakimura K: NMDA receptor GluN2B (GluR epsilon 2/NR2B) subunit is crucial for channel function, postsynaptic macromolecular organization, and actin cytoskeleton at hippocampal CA3 synapses. *J. Neurosci.* **29**: 10869–10882, 2009.
- 20) Mizushima S and Nagata S: pEF-BOS, a powerful mammalian expression vector. *Nucleic Acids Res.* **18**: 5322, 1990.
- 21) 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.
- 22) Vignes M and Collingridge GL: The synaptic activation of kainate receptors. *Nature* **388**: 179–182, 1997.

- 23) Frerking M, Malenka RC and Nicoll RA: Synaptic activation of kainate receptors on hippocampal interneurons. *Nat. Neurosci.* **1**: 479–486, 1998.
- 24) 畦地裕統: 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. 新潟医学会雑誌 **125**: 532–546, 2011.
- 25) Cheng D, Hoogenraad CC, Rush J, Ramm E, Schlager MA, Duong DM, Xu P, Wijayawardana SR, Hanfelt J, Nakagawa T, Sheng M, Peng J: Relative and absolute quantification of postsynaptic density proteome isolated from rat forebrain and cerebellum. *Mol. Cell. Proteomics* **5**: 1158–1170, 2006.
- 26) Paternain AV, Herrera MT, Nieto MA and Lerma J: GluR5 and GluR6 kainate receptor subunits coexist in hippocampal neurons and coassemble to form functional receptors. *J. Neurosci.* **20**: 196–205, 2000.
- 27) Fernandes HB, Catches JS, Petralia RS, Copits BA, Xu J, Russell TA, Swanson GT, Contractor A: High-affinity kainate receptor subunits are necessary for ionotropic but not metabotropic signaling. *Neuron* **63**: 818–829, 2009.
- 28) Contractor A, Swanson G and Heinemann SF: Kainate Receptors Are Involved in Short- and Long-Term Plasticity at Mossy Fiber Synapses in the Hippocampus. *Neuron* **29**: 209–216, 2001.
- 29) Wenthold RJ, Trumpy VA, Zhu WS and Petralia RS: Biochemical and assembly properties of GluR6 and KA2, two members of the kainate receptor family, determined with subunit-specific antibodies. *J. Biol. Chem.* **269**: 1332–1339, 1994.
- 30) Coussen F, Normand E, Marchal C, Costet P, Choquet D, Lambert M, Mège RM, Mulle C: Recruitment of the Kainate Receptor Subunit Glutamate Receptor 6 by Cadherin/Catenin Complexes. *J. Neurosci.* **22**: 6426–6436, 2002.
- 31) Darstein M, Petralia RS, Swanson GT, Wenthold RJ and Heinemann SF: Distribution of kainate receptor subunits at hippocampal mossy fiber synapses. *J. Neurosci.* **23**: 8013–8019, 2003.

- 32) Ruiz A, Sachidhanandam S, Utvik JK, Coussen F and Mulle C: Distinct subunits in heteromeric kainate receptors mediate ionotropic and metabotropic function at hippocampal mossy fiber synapses. *J. Neurosci.* **25**: 11710–11718, 2005.
- 33) Gallyas F, Ball SM and Molnar E: Assembly and cell surface expression of KA-2 subunit-containing kainate receptors. *J. Neurochem.* **86**: 1414–1427, 2003.
- 34) Fisher JL and Mott DD: Distinct functional roles of subunits within the heteromeric kainate receptor. *J. Neurosci.* **31**: 17113–17122, 2011.

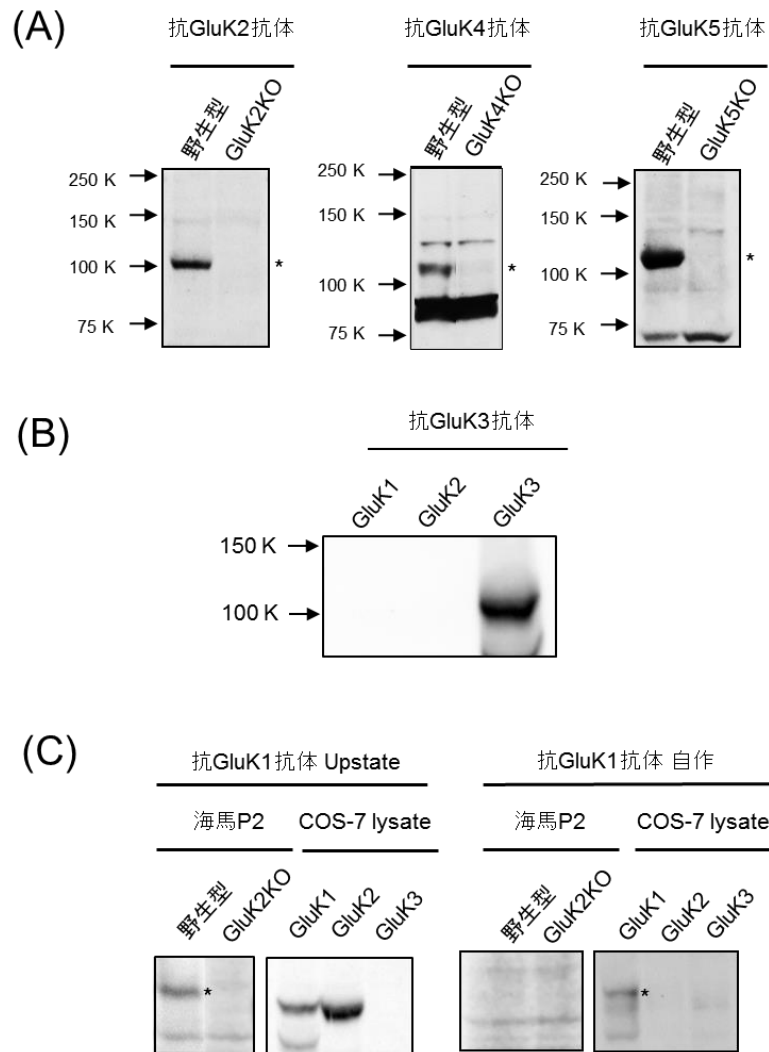


図 1 抗体の特異性の確認

- (A) 野生型と各ノックアウトマウスの海馬試料(30-40 μ g)を用いて、抗GluK2抗体、抗GluK4抗体、抗GluK5抗体の特異性を確認した。星印は目的のバンド位置を示す。
- (B) COS-7細胞にGluK1-GluK3を発現させ回収した可溶化液(40 μ g)を用いて抗GluK3抗体の特異性を確認した。
- (C) 野生型及びGluK2KOマウスの海馬P2画分(100 μ g)を用いた、抗GluK1抗体の交差反応の確認。(B)と同様にCOS-7細胞可溶化液を用いて抗GluK1抗体の特異性を確認した。

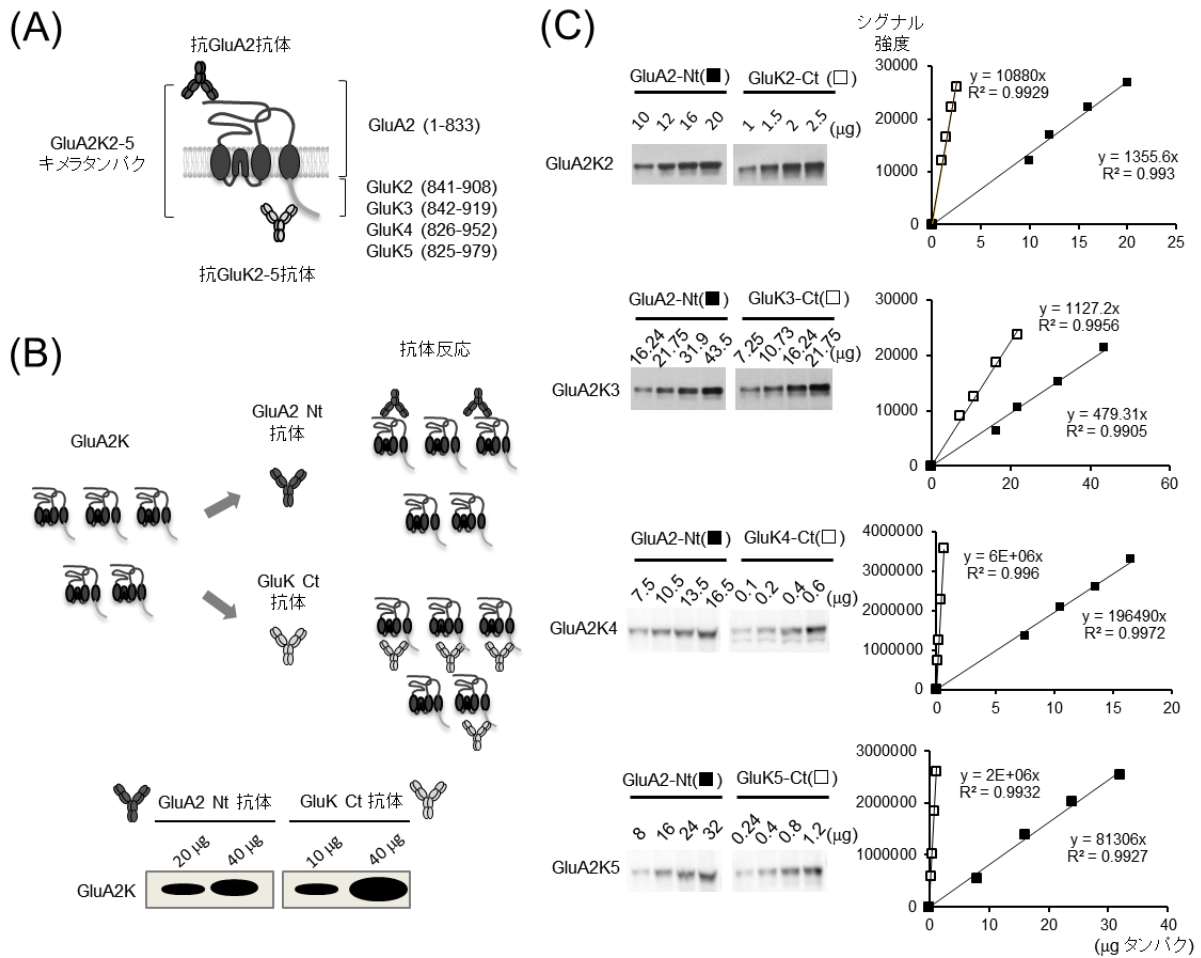
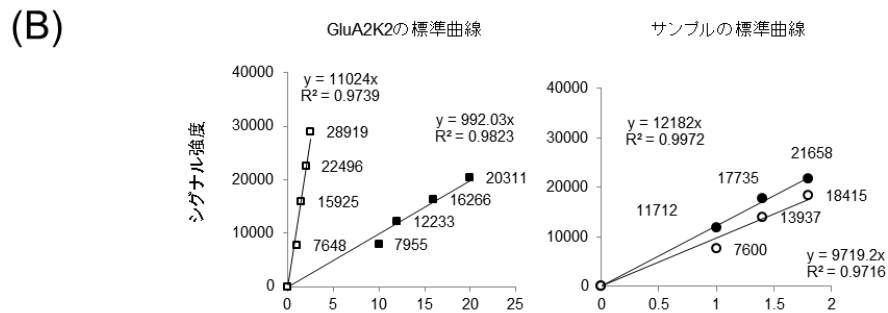


図 2 各抗体の力価定量

(A) キメラタンパク, GluA2Kの構造の模式図.

(B) 抗体力価比較の例. GluA2Kタンパクを抗GluA2抗体と抗GluK2抗体それぞれで検出したときの抗体の力価の比をバンドの濃さから求める. このときのGluA2抗体:GluK2抗体は1:2となる.

(C) GluA2抗体に対するGluK2-GluK5抗体の力価比を標準曲線を描き求めた.



(C)

$$\text{抗GluA2抗体に対する抗GluK2抗体力価} = \frac{\text{GluK2シグナル強度 (GluA2K2)}}{\text{GluA2K2量}} \times \frac{\text{GluA2K2量}}{\text{GluA2シグナル強度 (GluA2K2)}} = 10.3$$

$$\text{GluA2に対するGluK2相対量 (海馬PSD)(\%)} = \frac{\text{GluK2シグナル強度 (海馬PSD)}}{\text{海馬PSD量 (GluK2)}} \times \frac{\text{海馬PSD量 (GluA2)}}{\text{GluA2シグナル強度 (海馬PSD)}} \times \frac{1}{\text{GluK2抗体力価比}} \times 100 = 7.4$$

図3 ウェスタンブロットによるタンパク質の定量
 (A) GluA2K2と海馬PSD画分を同一ゲルでSDS-PAGEした後、抗GluA2抗体と抗GluK2抗体でウェスタンブロットを行った。
 (B) GluA2K2シグナルの標準曲線から抗体力価を求めた (■GluA2, □GluK2). 海馬PSD画分のGluA2とGluK2のバンドシグナルの標準曲線 (●GluA2, ○GluK2). 各バンドの数値を計算に用いる. 力価比とGluK2量を求める計算式.

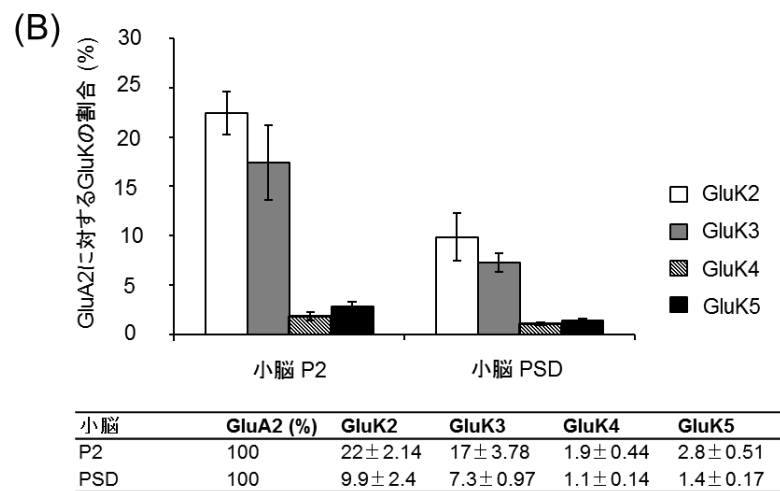
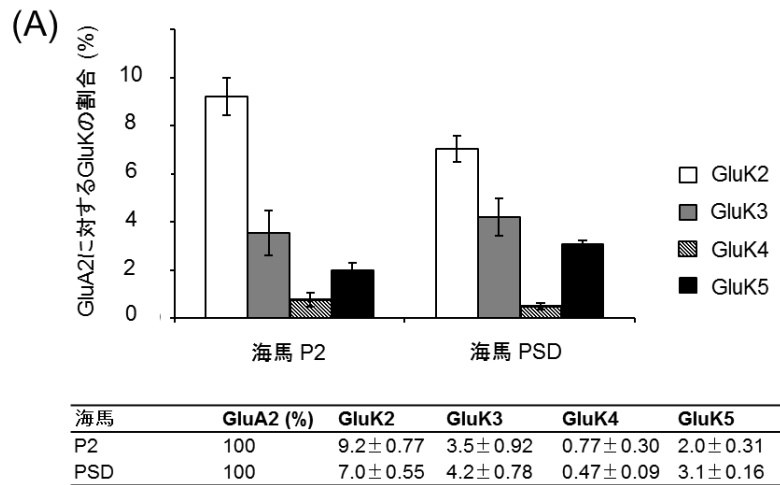
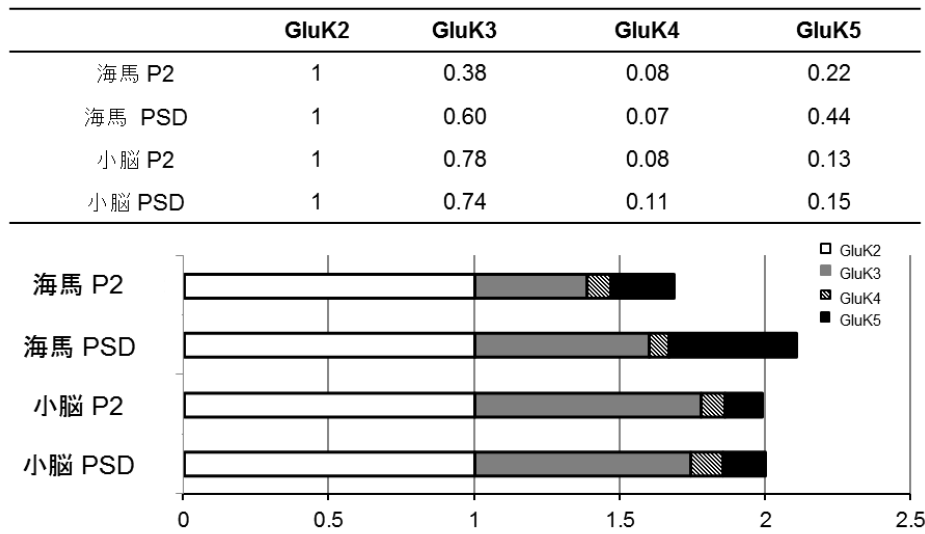


図 4 AMPA受容体GluA2に対するKARサブユニット量

(A) 海馬P2, PSD画分(B) 小脳P2, PSD画分のGluA2 (100%) に対するGluK2-GluK5の割合を求めた。

(A)



(B)

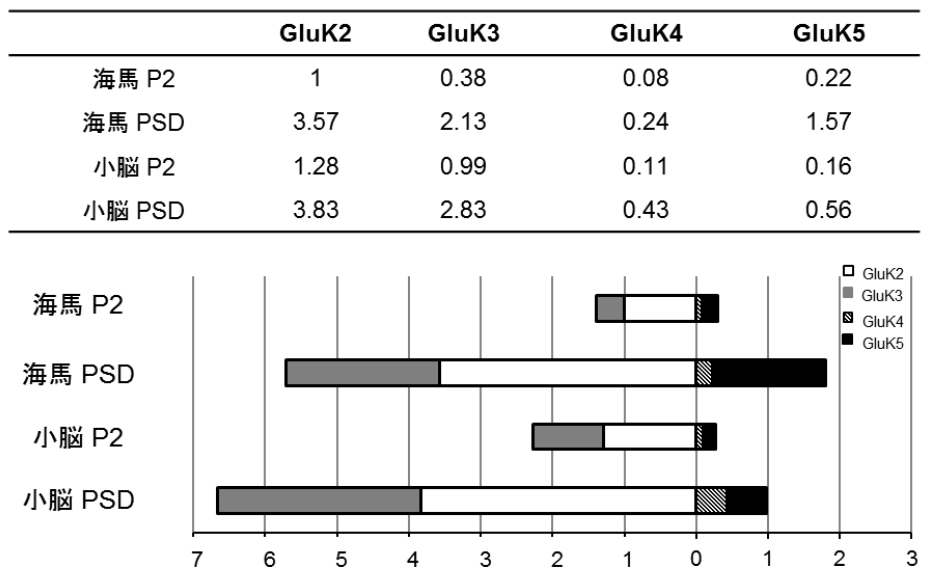


図 5 各画分におけるKARサブユニットの比率

(A) GluK2を基準とした時の各画分のGluK2-GluK5の割合

(B) 海馬P2画分におけるGluK2を基準とした時の各領域と画分のGluK2-GluK5の割合.