

NMDA 型グルタミン酸受容体の定量的解析

鈴木 康浩

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 NMDA receptor channel subunits in mouse brain
Yasuhiro Suzuki

Niigata University Graduate School of Medical and Dental Science
Course for Molecular and Cellular Medicine
Cellular Neurobiology
(Director. Prof. Kenji Sakimura)

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
鈴木 康浩

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

キーワード：NMDA 受容体. ウェスタンブロット. タンパク質定量

要旨

NMDA 型グルタミン酸受容体 (NMDAR) は、中枢神経系においてシナプス形成やシナプス可塑性など脳機能に関わる分子群である。NMDAR は、単一遺伝子にコードされスプライスにより多様性を持つ GluN1 サブユニットと、4 種類の GluN2 サブユニットが 2 分子ずつ会合して構成されており、それらの組み合わせがチャネル特性を決定する。しかし、脳における GluN サブユニットタンパク質の定量的な解析はなく、その構成比率は明らかにされていない。そこで脳各部位における NMDAR サブユニットを定量するために、AMPA 型グルタミン酸受容体サブユニット GluA1 を標準物質とした定量的ウエスタンブロットを行った。その結果、大脳皮質、海馬、小脳いずれにおいても GluN1 が GluN2 より多く存在していたが、NMDAR が機能していると考えられているシナプトソーム画分では、ほぼ等量の割合になっていた。また、GluN1 の C 末端の形状は、C2型が C2'型よりも多かった、これは小脳でとりわけ顕著で、約 10 倍多いと算定された。

はじめに

NMDA 型グルタミン酸受容体 (NMDAR) は、イオン透過型グルタミン酸受容体の一種であり、中枢神経系においてシナプス形成、シナプス可塑性などの鍵になる分子群である^{1,2)}。NMDAR は、グリシン結合部位をもつ GluN1 とグルタミン酸結合部位をもつ GluN2 が 2 分子ずつ会合して機能していると考えられている^{1,3)}。このうち GluN1 は、単一の遺伝子にコードされているが、選択的スプライシングにより C 末端側に C2 または C2'カセットを含む GluN1-1~N1-4 の 4 種類が存在しており、シナプスへのターゲティングや安定性に関与することが報告されている⁴⁻⁶⁾。一方 GluN2 は、GluN2A, 2B, 2C, 2D の 4 種類のサブユニットが存在しており、この分子的な多様性はこの受容体の機能的な多様性の基盤となっている事が示されている^{1,7-11)}。したがって、脳の各部位における NMDA 受容体の性質を分子レベルで解析するには、各サブユニットタンパク質の量を知る必要がある。これまでに各分子に対する抗体を用いた免疫組織化学解析により、GluN1 が脳の広い範囲に発現している一方で、4 種類の GluN2 は発生段階や脳領域によって分布が変化することが示されてきたが¹¹⁾、その量的な関係は明らかではなかった。mRNA レベルの定量的な解析としては、nuclease protection assay による報告があり、GluN2 より GluN1 が多いことや、脳領域によって GluN2 の発現が異なることが示されている¹²⁾。さらにウエスタンブロットによって、各サブユニットの発現量の違いが報告されているが、これらの解析はいずれも同一分子の多寡であり、サブユニット間の量的な検討は、海馬の CA3 領域で GluN2B が N2A の約 2 倍多いことを報告しているのみであった¹³⁾。

タンパク質の同定や定量法には、質量分析法¹⁴⁾やウエスタンブロットなどの方法が

あるが、前者に比べ後者は実験方法が簡便であり、脳部位や細胞画分などの異なった試料間の同一分子解析には適した方法である。一方この手法は、使用する抗体の反応性（抗体力価）が異なるために分子間の量的な比較をすることができない。この問題を克服するため、同一分子に標準タンパク質と比較する他のグルタミン酸受容体サブユニットを持つキメラ分子を作製し、抗体力価を補正することによりカイニン酸型サブユニットの定量をした報告がある^{15,16)}。本研究では、NMDAR 構成サブユニットの量を脳部位と各細胞画分において調べるために、AMPA 型グルタミン酸受容体サブユニット GluA1^{17,18)}を標準物質として、各 NMDAR サブユニット抗体の力価を測定し、ウエスタンブロット法を用いて定量を行うことにした。

材料と方法

キメラタンパク質

各抗 GluN 抗体力価を抗 GluA1 抗体力価と比較して算定するために、GluA1 抗体と GluN 抗体両者が認識するエピトープを同一分子上にもつキメラタンパク質を作製した。キメラタンパク質は、GluA1 (1-907) の C 末端側を、GluN1-1 (834-938), GluN1-4 (834-885), GluN2A (838-1464), GluN2B (839-1482), GluN2C (836-1239), GluN2D (863-1323) に置換したものである。これらのキメラタンパク質をコードする cDNA を pEF-BOS ベクター¹⁹⁾に連結し、Lipofectamine と Plus Reagent (Invitrogen) を用いて HEK293 細胞に導入した。20-24 時間後、細胞を溶解液 (1 mM phenylmethylsulfonylfluoride, cOmplete Tablets mini (Roche, Germany) in 10ml PBS) により回収し、超音波破碎機で処理した。これを 12,000 x g, 30 分, 4°C で遠心して得た沈殿を溶解液に 1% Triton X-100 を加えたもので懸濁しさらに超音波破碎機で処理した。この懸濁液を 30 分間, 2°C ローテーターで攪拌させた後, 12,000 x g で 10 分間遠心した上清を標準キメラタンパク質試料とした。なおタンパク質濃度は、BCA protein assay kit (Thermo Scientific) で測定した。

脳組織の細胞分画

細胞分画は、Carlin ら²⁰⁾の方法に準拠して行った。8~12 週齢の C57BL/6N 系統マウス (Charles River, Japan) の大脳皮質、海馬、小脳を摘出し、ホモジネートバッファー (0.32M ショ糖, 5mM EDTA, Tris-HCl pH7.5, cOmplete Tablets mini) でポッター型ホモジナイザーを用いてホモジナイズした後, 1,000 x g, 10 分間遠心した上清 (S1) を細胞粗画分とした (以降ホモジネート画分と呼ぶ)。ホモジネート画分の一部を 12,000 x g, 2°C で 10 分間遠心分離し上清 (S2) と沈殿 (P2) に分離する。マイクロソーム画分は、S2 を 2°C, 200,000 x g で 90 分間遠心して得た沈殿を 40mM Tris-Cl, 1% SDS に溶解し使用した。シナプトソーム画分は、P2 画分をホモジネートバッファーに懸濁した後, 0.8M と 1.2M ショ糖を用いた密度勾配遠心を 74,000 x g で 130 分行うことで得た。調製した試料は、タンパク定量した後, -80°C で保管した。

ウエスタンブロット

調製した試料に最終濃度 1xSample Buffer (63 mM Tris-Cl, 2 % SDS, 10% グリセロール, 1%メルカプトエタノール) になるように加え加熱した (キメラタンパク質: 37°C, 60 min, 脳サンプル: 100°C, 5 min). SDS-PAGE は, 4% 濃縮ゲルと 7~7.5% 分離ゲルで行い, 分離したタンパク質をニトロセルロース膜 (GE ヘルスケア・ジャパン) に電氣的に転写した. この膜を 5% スキムミルクを含む TBS-T (20mM Tris-Cl pH7.6, 137mM NaCl, 0.1% Tween20) で 1 時間ブロッキングし, その後 TBS-T で 15 分 × 1 回, 5 分 × 2 回洗浄した. 1 次抗体反応 (条件は後述) を室温で 2 時間または 4°C で一晩反応させた後, メンブレンを TBS-T で 15 分 × 1 回, 5 分 × 2 回洗浄し, ペルオキシダーゼコンジュゲート 2 次抗体に 1 時間室温で反応させた. TBS-T で 15 分 × 1 回, 5 分 × 3 回洗浄した後, ECL-Prime ウエスタンブロッティング検出システム (GE Healthcare) を用いて発光させ, 冷却 CCD カメラ内蔵化学発光イメージアナライザー (EZ Capture MG, ATTO) で検出した.

抗体

ウエスタンブロットには, 以下の抗体を使用した. 1 次抗体; マウス抗 GluA1 抗体 (0.5 µg/ml)(Millipore), ウサギ抗 GluN1-C2 抗体 (0.5µg/ml), モルモット抗 GluN1-C2' 抗体 (0.2µg/ml), ウサギ抗 GluN2A 抗体 (0.2µg/ml), ウサギ抗 GluN2B 抗体 (0.2µg/ml), ウサギ抗 GluN2C 抗体 (1.0µg/ml) (以上北海道大学渡辺雅彦教授より分与), マウス抗 GluN2D 抗体 (0.5 µg/ml)(Millipore). 2 次抗体; HRP 抗マウス抗体 (GE healthcare)(×10,000 希釈), HRP 抗ウサギ抗体 (Amersham)(GluN1-C2 抗体, GluN2A 抗体, GluN2B 抗体: ×10,000 希釈, GluN2C 抗体: ×4,000 希釈), HRP モルモット抗体 (Dako) (×8,000 希釈).

ウエスタンブロットの定量解析

ウエスタンブロットで得られたバンドのシグナルは, Image J software を用いて測定した.

結果

抗 NMDAR 抗体の特異性

まず, 本研究で使用する抗 GluA1 と各抗 GluN 抗体の特異性の確認をそれぞれのノックアウト (KO) を用いて行った. GluN1KO マウスは, 新生児致死であったため, 出生直後のマウスを用いた²¹⁾. GluN2D はタンパク質発現の時期を考慮し生後 7 日前後のマウスを用いた. 抗 GluN2B 抗体の特異性は HEK293 細胞に発現させた GluN2 キメラタンパク質を用いて行った. 抗 GluA1, GluN1-C2, GluN1-C2', GluN2A, GluN2C, GluN2D 抗体では, 予測分子量位置にバンドが認められ, KO マウスではバンドが消失すること

が確認された (予測分子量: GluA1; 100kDa, GluN1-C2; 103 kDa, GluN2A; 163 kDa, GluN2C; 134 kDa, GluN2D; 140 kDa). 抗 GluN1-C2'抗体は, バンドが 2 本検出されたが, ノックアウトマウスではこれらのバンドが消失したので, 両バンドを定量の対象とした (図 1A). また, 抗 GluN2B 抗体は GluA1N2B タンパク質を特異的に検出した (図 1B). なお, 小脳における GluN2B と, 大脳皮質と海馬における GluN2C は, 8~12 週齢マウスにおいて検出限界以下であったので定量は断念した (図 2A, B).

抗 NMDA 型受容体の抗体力価の測定

各サブユニットタンパク質の定量をウエスタンブロット法で行うために, GluA1 の C 末端を GluN の C 末端に置換した 6 種類の GluA1N キメラタンパク質 (GluA1N1-C2, GluA1N1-C2', GluA1N2A-D) を設計し, これらをコードする発現ベクターを構築した (図 3). このベクターを HEK293 細胞に導入して発現させキメラタンパク質を標準タンパク質とした. これらのキメラタンパク質は, 抗 GluA1 抗体と各抗 GluN 抗体が認識するエピトープを同一分子上にもつので, 抗 GluA1-N 末端抗体力価と各抗 GluN-C 末端抗体の力価がウエスタンブロットのバンドの濃度として比較することが可能になる. これらのキメラタンパク質 GluA1N を用いて, 各抗 GluN 抗体の力価を測定した (図 4).

定量的ウエスタンブロット法

図 5 に GluA1N1-C2 キメラタンパク質を用いて, 抗 GluA1 抗体と抗 GluN1-C2 抗体の力価比を求め, 脳試料における GluA1 と GluN1-C2 の定量をした例を示す. GluA1N1-C2 キメラタンパク質及び脳試料 (大脳皮質マイクロソーム画分) を同一ゲルで泳動し, それぞれ抗 GluA1 抗体と抗 GluN1-C2 抗体により検出した (図 5A). GluA1N1-C2 キメラタンパク質の, GluA1 のバンドのシグナル値 4 点 (20783, 13466, 8293, 5011) と GluN1-C2 のバンドのシグナル値 4 点 (21093, 13560, 8908, 5018) から標準曲線を描いた (図 5B 左). これらのシグナル値とタンパク質量の比から, 抗 GluN1-C2 抗体力価は抗 GluA1 抗体の 1.55 倍とわかった (図 5C 上段式). 続いて脳試料において, GluA1 のバンドのシグナル値 3 点 (18355, 9997, 5762) と GluN1-C2 のシグナル値 3 点 (16002, 10560, 6010) から標準曲線を描いた (図 5B 右). 脳試料の GluA1 と GluN1-C2 のシグナル値とタンパク質量の比を, 上で求めた力価比で補正すると, GluN1-C2 は GluA1 の 0.65 倍と算定された (図 5C 下段式).

このように, 脳試料のウエスタンブロットのバンドシグナル強度率を抗体力価比で補正することで, 各脳部位と細胞画分における各 GluN サブユニットの定量を行った. 抗 GluA1 抗体と各抗 GluN 抗体によって検出されたシグナル値の極端な差は定量誤差を大きくするため, 各バンドのシグナル値が近い範囲においてのみ, 定量を行った. またウエスタンブロットで検出されるバンドのシグナルは, 同一試料でも反応ごとに異なるため, GluA1N キメラタンパク質と解析試料を同一のゲルに電気泳動し, それぞれを抗

GluA1 抗体と各抗 GluN 抗体で検出した。上記の方法で求めた、抗 GluA1 抗体に対する抗 GluN1-C2', GluN2A, GluN2B, GluN2C, GluN2D 抗体の各力価は、それぞれ 0.07, 0.57, 0.43, 0.35, 1.48 であった (図 4)。

GluN サブユニットの定量

GluN サブユニットの各脳領域と細胞内における分布を解析するために、大脳皮質、海馬、小脳を細胞分画し、ホモジネート、マイクロソーム、シナプトソーム画分に含まれる GluN サブユニットを算定した (図 6)。

大脳皮質における GluA1 に対する各 GluN の比率を算定した (図 7)。ホモジネート画分での GluN1-C2, GluN1-C2', GluN2A, GluN2B, GluN2C, GluN2D は、それぞれ GluA1 に対して、 0.79 ± 0.11 , 1.88 ± 0.06 , 0.65 ± 0.1 , 0.98 ± 0.07 , ND, 0.04 ± 0.01 であった (各 $n=3$, 平均値 \pm 標準誤差)。マイクロソーム画分では、 0.67 ± 0.02 , 1.39 ± 0.16 , 0.59 ± 0.02 , 1.0 ± 0.05 , ND, 0.07 ± 0.01 であった ($n=3$)。シナプトソーム画分では、 0.83 ± 0.04 , 1.33 ± 0.1 , 0.97 ± 0.19 , 1.51 ± 0.07 , ND, 0.05 ± 0.01 であった (図 7 上段)。海馬ホモジネート画分においては、 0.32 ± 0.04 , 1.22 ± 0.11 , 0.34 ± 0.03 , 0.57 ± 0.12 , ND, 0.03 ± 0.004 であり ($n=3$)、マイクロソーム画分では 0.3 ± 0.04 , 0.99 ± 0.13 , 0.46 ± 0.08 , 0.5 ± 0.05 , ND, 0.03 ± 0.01 であった ($n=3$)。シナプトソーム画分では 0.46 ± 0.02 , 0.86 ± 0.08 , 0.65 ± 0.05 , 0.56 ± 0.02 , ND, 0.04 ± 0.01 であった (図 7 中段)。小脳ホモジネート画分においては、 0.08 ± 0.01 , 0.82 ± 0.06 , 0.12 ± 0.01 , ND, 0.24 ± 0.03 , 0.05 ± 0.02 であった ($n=3$)。マイクロソーム画分においては、 0.08 ± 0.001 , 0.66 ± 0.16 , 0.09 ± 0.01 , ND, 0.16 ± 0.03 , 0.06 ± 0.01 であった。シナプトソーム画分では 0.08 ± 0.01 , 0.49 ± 0.05 , 0.22 ± 0.05 , ND, 0.24 ± 0.04 , 0.06 ± 0.02 であった (図 7 下段)。

脳領域間細胞画分における GluN の比較

各脳領域の細胞画分における NMDAR サブユニット量を調べるため、大脳皮質ホモジネートに含まれる GluA1 を基準とし、各脳領域の細胞画分における GluN の比率を比較した。まず、同一のメンブレンに大脳皮質、海馬、小脳のホモジネート、マイクロソーム、シナプトソーム画分試料をのせて抗 GluA1 抗体によってウエスタンブロットを行い、検出したバンド強度から、各画分の GluA1 量を算定した。大脳皮質ホモジネートに含有される GluA1 量を基準 (1.00) とすると、大脳皮質、マイクロソーム、大脳皮質シナプトソーム、海馬ホモジネート、海馬マイクロソーム、海馬シナプトソーム、小脳ホモジネート、小脳マイクロソーム、小脳シナプトソームにおける GluA1 の量はそれぞれ、1.29, 1.52, 2.32, 3.08, 4.05, 0.90, 1.19, 1.88 であった。次に、これらの比率を各脳領域の細胞画分に当てはめ、GluN サブユニットの相対的な量比を算出した (図 8)。

大脳皮質のホモジネート画分における、GluN1-C2, GluN1-C2', GluN2A, GluN2B, GluN2C, GluN2D は、0.79, 1.88, 0.65, 0.98, ND, 0.04 であった(各 $n=3$ 平均値)。マイクロ

ソーム画分では, 0.86, 1.79, 0.76, 1.29, ND, 0.09 であり, シナプトソームでは, 1.26, 2.02, 1.47, 2.30, ND, 0.08 であった. また, 海馬ホモジネート画分では, 0.74, 2.83, 0.79, 1.32, ND, 0.07 であり, マイクロソーム画分では, 0.92, 3.05, 1.42, 1.54, ND, 0.09 であり. シナプトソーム画分では 1.86, 3.48, 2.63, 2.63, ND, 0.16 であった. そして, 小脳ホモジネート画分では, 0.07, 0.74, 0.11, ND, 0.22, 0.05 であった. また, マイクロソーム画分において算定したところ, 0.10, 0.79, 0.11, ND, 0.19, 0.07 であり, シナプトソーム画分では 0.15, 0.92, 0.41, ND, 0.45, 0.11 であった. 算定結果より, 細胞画分間で比較したときの海馬の GluN は大脳皮質よりも多いことが示された. また, 小脳での比率は, 大脳皮質や海馬に比べて少ないことも示された.

考察

本研究では, GluN サブユニットの量をウエスタンブロットによるバンドのシグナル値を比較することで算定した. そのために抗 GluA1 抗体と各抗 GluN 抗体のエピトープを同一分子上にもつ GluA1N キメラタンパク質を標準物質とすることで, 力価の異なる抗体を用いても分子間の量的比較が可能となった. この手法の優れている点は, 煩雑な試料の処理過程と高価な機器を必要とする質量分析法などと違い, 簡便な手法で定量的な解析が可能になることである.

mRNA の発現量と今回の研究で明らかとなったタンパク質量を比較すると, 前者で想定されていた各サブユニット多寡はおおよそタンパク量と一致する. しかし, 海馬において nuclease protection assay による mRNA 定量では, GluN2A が GluN 2B よりも多いと報告されているが¹²⁾, タンパク質量では逆である. したがって, mRNA 量とタンパク質量の関係は部位によって異なっており, それは翻訳後の調節機構に依存すると推察される.

本定量の結果, NMDAR の全体量は海馬で最も量が多く, 大脳皮質, 小脳の順であり, 小脳の含有量はホモジネート画分で海馬の 21% であった. それぞれの部位で程度の差はあるが, いずれもシナプトソーム画分に NMDAR は濃縮している事がわかった. また, NMDAR は, GluN1 と GluN2 が等モルで会合し機能するが, シナプトソーム画分ではいずれの部位でも GluN1 と GluN2 の量比はほぼ等量であった. 一方, ホモジネート画分の大脳皮質 GluN1 と GluN2 の量比は, 大脳皮質と海馬が 1.6 倍, 小脳が 2.1 倍 GluN1 の量が多い. また, マイクロソーム画分では, 大脳皮質, 海馬, 小脳各部位で GluN1 と GluN2 の量比はそれぞれ 1.2 倍, 1.3 倍, 2.4 倍となっており, 合成過程とサブユニット分子移送過程でも GluN1 は過剰に存在していた. このことは, 細胞内には非会合型の GluN1 が過剰に存在しており, それがどのように調節されているのかは興味ある問題である. なお, 小脳においては 2 倍以上存在する GluN1 は, プルキンエ細胞に GluN2 が存在しないことを反映しているのかもしれない^{10, 23, 24)}.

サブユニットの分布特性からみると, いずれの部位においてもホモジネート画分の

GluN1-C2'は GluN1-C2 より多く、ホモジネート画分で大脳皮質 2.4 倍、海馬 3.8 倍、小脳 10.6 倍であった。GluN1 は、選択的スプライシングにより、C 末端側は C2 または C2'をもつ 4 種類のサブタイプが存在しているが、*in vitro* における GluN1 の細胞表面への発現は、C2'型が C2 型より有利であることが報告されている⁵⁾。しかし、ホモジネート画分で C2'型が C2 型より相当高いのに対して、シナプトソーム画分では、それぞれ 1.6 倍、1.9 倍、6.1 倍に減少することから、C 末端側の選択制は単純に膜への移行性だけで決まっているのではないと思われる。

一方、NMDAR の機能的特性を決める GluN2 の分布は部位と細胞画分により大きな違いがある。大脳皮質ホモジネート画分では GluN2B が GluN2A の 1.5 倍多く、シナプス画分でも 1.6 倍ある。これに対して海馬ではホモジネート画分では 1.7 倍 GluN2B が多いが、シナプス画分では GluN2A と GluN2B はほぼ同量になっていた。同様のこのことは小脳でも認められ、ホモジネート画分では GluN2C は GluN2A の 2.0 倍存在するが、シナプトソーム画分では 1.1 倍になる。これらのことは、シナプスで機能する NMDAR の組成は、合成されてから移送される間に調節されることを示唆する。

結語

AMPA 型受容体サブユニット GluA1 を標準物質として、定量的ウエスタンブロット法により 6 種類の NMDAR サブユニット量を算出した。その結果、大脳皮質、海馬、小脳における当該サブユニットの構成が明らかになった。また、本方法が、膜結合性受容体などシナプス機能分子の定量的な解析に有用である事が示された。

謝辞

本研究を進めるにあたり、様々なご指導をいただいた新潟大学脳研究所細胞神経生物学分野の崎村建司教授をはじめ、実験に用いた抗体を分与してくださった北海道大学の渡辺雅彦教授、研究にご協力いただいた当研究室の皆様に深謝いたします。

文献

- 1) Paoletti P: Molecular basis of NMDA receptor functional diversity. *Eur J Neurosci* 33: 1351-1365, 2011.
- 2) Unoki T, Matsuda S, Kakegawa W, Van NT, Kohda K, Suzuki A, Funakoshi Y, Hasegawa H, Yuzaki M and Kanaho Y: NMDA receptor-mediated PIP5K activation to produce PI(4,5)P₂ is essential for AMPA receptor endocytosis during LTD. *Neuron* 73: 135-148, 2012.
- 3) Yamazaki M, Mori H, Araki K, Mori KJ and Mishina M: Cloning, expression and modulation of a mouse NMDA receptor subunit. *FEBS Lett* 300: 39-45, 1992.
- 4) Hollmann M, Boulter J, Maron C, Beasley L, Sullivan J, Pecht G and Heinemann S: Zinc potentiates agonist-induced currents at certain splice variants of the NMDA receptor. *Neuron* 10: 943-954, 1993.
- 5) Okabe S, Miwa A and Okado H: Alternative splicing of the C-terminal domain regulates cell surface expression of the NMDA receptor NR1 subunit. *J Neurosci* 19: 7781-7792, 1999.
- 6) Mu Y, Otsuka T, Horton AC, Scott DB and Ehlers MD: Activity-dependent mRNA splicing controls ER export and synaptic delivery of NMDA receptors. *Neuron* 40: 581-594, 2003.
- 7) Mori H, Masaki H, Yamakura T and Mishina M: Identification by mutagenesis of a Mg²⁺-block site of the NMDA receptor channel. *Nature* 358: 673-675, 1992.
- 8) Watanabe M, Inoue Y, Sakimura K and Mishina M: Developmental changes in distribution of NMDA receptor channel subunit mRNAs. *Neuroreport* 3: 1338-1340, 1992.
- 9) Wagner DA and Leonard JP: Effect of protein kinase-C activation on the Mg²⁺-sensitivity of cloned NMDA receptors. *Neuropharmacology* 35: 29-36, 1996.
- 10) Abe M, Fukaya M, Yagi T, Mishina M, Watanabe M and Sakimura K: NMDA receptor GluR ϵ /NR2 subunits are essential for postsynaptic localization and protein stability of GluR ζ 1/NR1 subunit. *J Neurosci* 24: 7292-7304, 2004.
- 11) Yamasaki M, Okada R, Takasaki C, Toki S, Fukaya M, Natsume R, Sakimura K, Mishina M, Shirakawa T and Watanabe M: Opposing role of NMDA receptor GluN2B and GluN2D in somatosensory development and maturation. *J Neurosci* 34: 11534-11548, 2014.
- 12) Goebel DJ and Pooch MS: NMDA receptor subunit gene expression in the rat brain: a quantitative analysis of endogenous mRNA levels of NR1_{Com}, NR2A, NR2B, NR2C, NR2D and NR3A. *Brain Res Mol Brain Res* 69: 164-170, 1999.
- 13) 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.
- 14) 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 postsynaptic density proteome isolated from rat forebrain and cerebellum. *Mol Cell Proteomics* 5: 1158-1170, 2006.
 - 15) 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と定量的解析. *新潟医学会誌* 125: 532-546, 2011.
 - 16) Watanabe-Iida I, Konno K, Akashi K, Abe M, Natsume R, Watanabe M and Sakimura K: Determination of kainate receptor subunit ratios in mouse brain using novel chimeric protein standards. *J Neurochem* 136: 295-305, 2016.
 - 17) Huganir RL and Nicoll RA: AMPARs and synaptic plasticity: the last 25 years. *Neuron* 80: 704-717, 2013.
 - 18) Shibata T, Watanabe M, Ichikawa R, Inoue Y and Koyanagi T: Different expressions of alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionic acid and N-methyl-D-aspartate receptor subunit mRNAs between visceromotor and somatomotor neurons of the rat lumbosacral spinal cord. *J Comp Neurol* 404: 172-182, 1999.
 - 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) Forrest D, Yuzaki M, Soares HD, Ng L, Luk DC, Sheng M, Stewart CL, Morgan JI, Connor JA and Curran T: Targeted disruption of NMDA receptor 1 gene abolishes NMDA response and results in neonatal death. *Neuron* 13: 325-338, 1994.
 - 22) Horak M, Petralia RS, Kaniakova M and Sans N.: ER to synapse trafficking of NMDA receptors. *Front Cell Neurosci* 8: 394, 2014.
 - 23) Yamada K, Fukaya M, Shimizu H, Sakimura K and Watanabe M: NMDA receptor subunits GluR ϵ 1, GluR ϵ 3 and GluR ζ 1 are enriched at the mossy fibre-granule cell synapse in the adult mouse cerebellum. *Eur J Neurosci* 13: 2025-2036, 2001.
 - 24) Huh KH and Wenthold RJ: Turnover analysis of glutamate receptors identifies a rapidly degraded pool of the N-methyl-D-aspartate receptor subunit, NR1, in cultured cerebellar granule cells. *J Biol Chem* 274: 151-7, 1999.

図の説明

図 1 抗体特異性の確認

- (A) 野生型と各ノックアウトマウスの脳試料を用いた, 抗 GluA1, GluN1-C2, GluN1-C2', GluN2A, GluN2C, GluN2D 抗体のウエスタンブロット.
- (B) HEK293 細胞に発現させた GluA1N2A~D タンパク質を用いた, 抗 GluN2B 抗体のウエスタンブロット.

図 2 脳部位における GluN2B と GluN2C の発現確認

- (A) 小脳ホモジネート, マイクロソーム, シナプトソーム画分における抗 GluN2B 抗体によるウエスタンブロット.
- (B) 大脳皮質及び海馬画分における抗 GluN2C 抗体によるウエスタンブロット.

図 3 キメラタンパク質 GluA1N の模式図

GluA1 を骨格とし, C 末端側を GluN に置換したキメラタンパク質を設計した.

図 4 抗 GluA1 抗体を基準にした各抗 GluN 抗体の力価測定

GluA1 と GluN1-C2, GluN1-C2', GluN2A, GluN2B, GluN2C, GluN2D のキメラタンパク質の量を変えたウエスタンブロットのシグナル値から各抗 GluN サブユニット抗体の力価を算定した.

図 5 定量的ウエスタンブロット法によるタンパク質定量

- (A) GluA1N1-C2 と大脳皮質マイクロソーム画分を, 同一のゲルで SDS-PAGE した後, 抗 GluN1-C2 抗体と抗 GluA1 抗体でウエスタンブロットを行い, バンドを検出した.
- (B) GluA1N1-C2 シグナルから抗体力価を調べた (○GluN1-C2, ●GluA1). 大脳皮質マイクロソーム画分における, GluN1-C2 と GluA1 のバンドのシグナル標準曲線 (◇GluN1-C2, ◆GluA1).
- (C) 各バンドの計測に用いる, 抗体力価と GluN1-C2 量を算定する計算式.

図 6 脳試料の作製過程の模式図

マウスの大脳皮質, 海馬, 小脳を, 細胞分画法を用いて分画し, ホモジネート画分, マイクロソーム画分, シナプトソーム画分を得た.

図 7 各脳領域の各細胞画分における GluA1 を基準にした各 GluN の量比

- (A) 大脳皮質ホモジネート, マイクロソーム, シナプトソーム画分

(B) 海馬ホモジネート, マイクロソーム, シナプトソーム画分

(C) 小脳ホモジネート, マイクロソーム, シナプトソーム画分

図 8 大脳皮質ホモジネートの **GluA1** を基準とした各 **GluN** の比率

各画分中の **GluA1** 量を, 大脳皮質ホモジネート量を基準に算定し, その値で各分画の **NMDAR** サブユニット量を算出した.

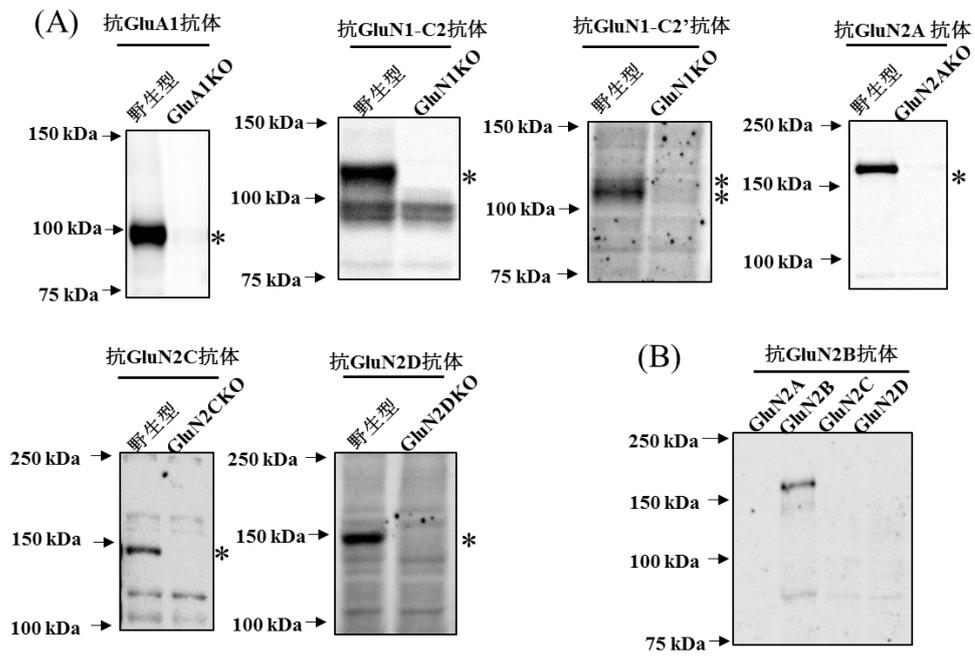


図1 抗体特異性の確認

GluA1Nキメラタンパク質

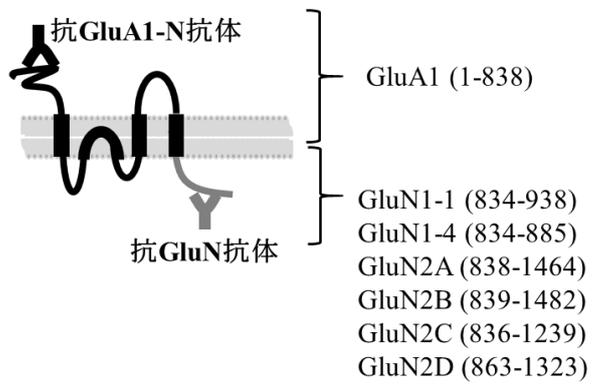


図3 キメラタンパク質, GluA1N の模式図

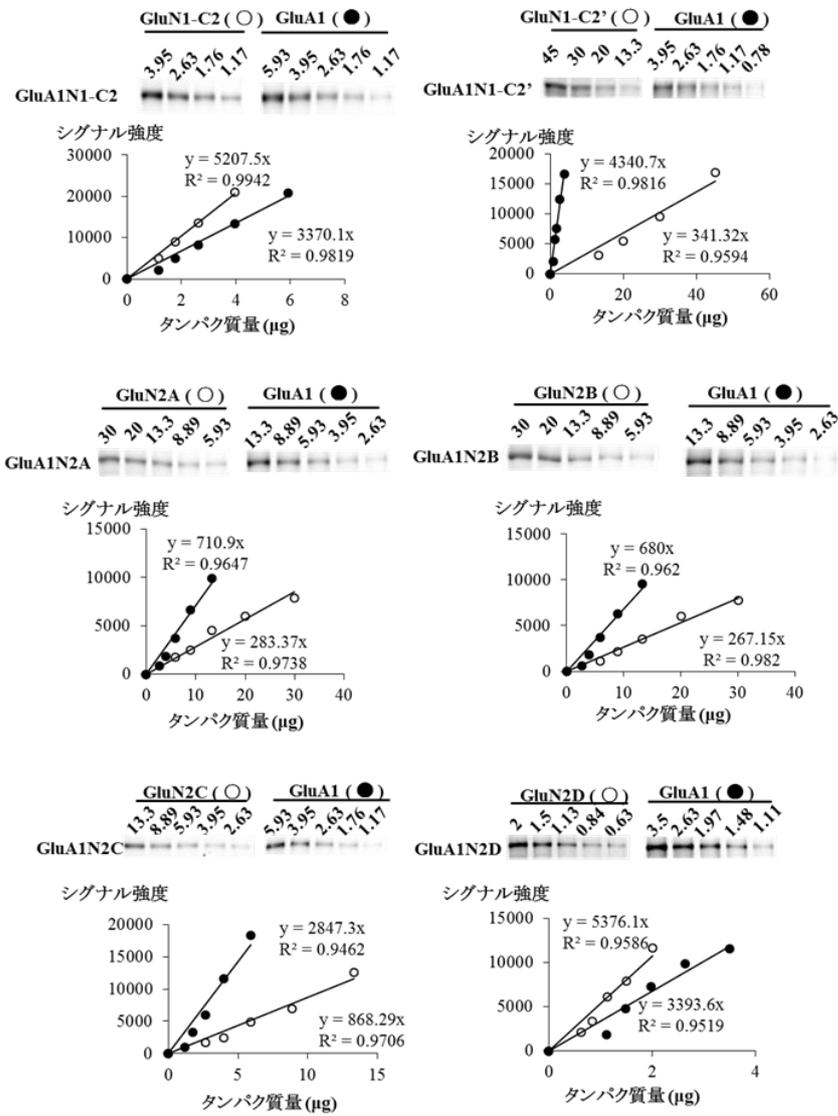


図4 抗 GluA1 抗体を基準にした各抗 GluN 抗体の力価測定

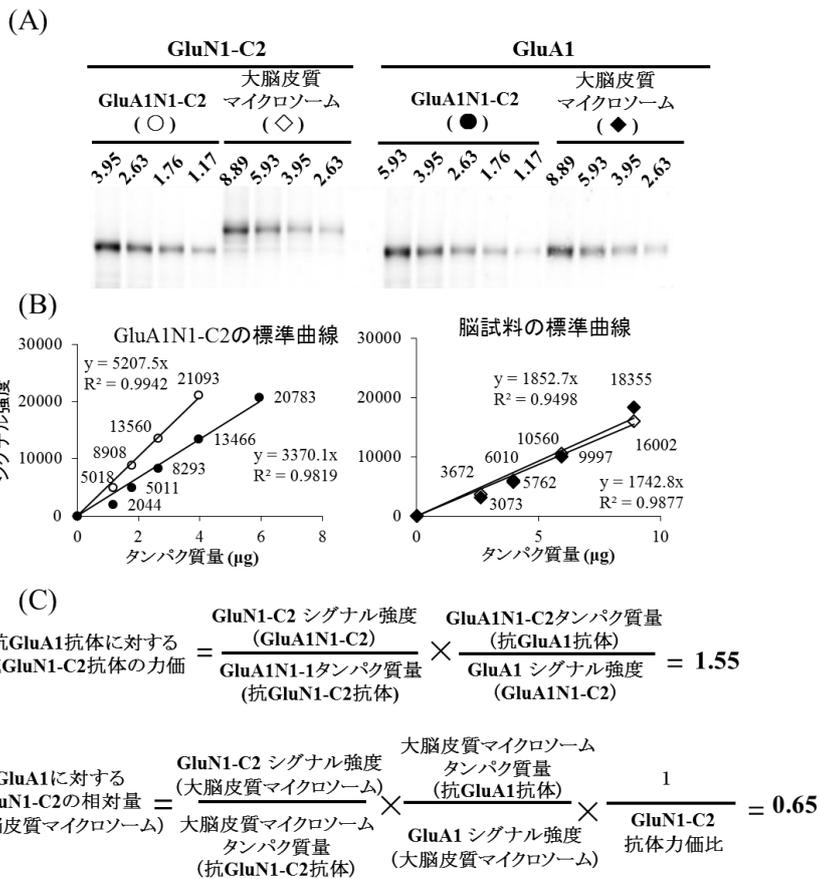


図5 ウェスタンブロットによるタンパク質量

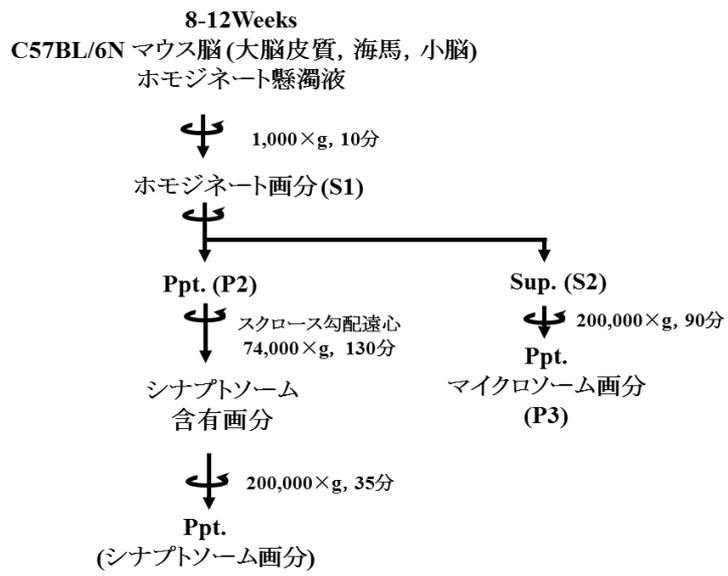


図 6 脳試料の作製過程の模式図

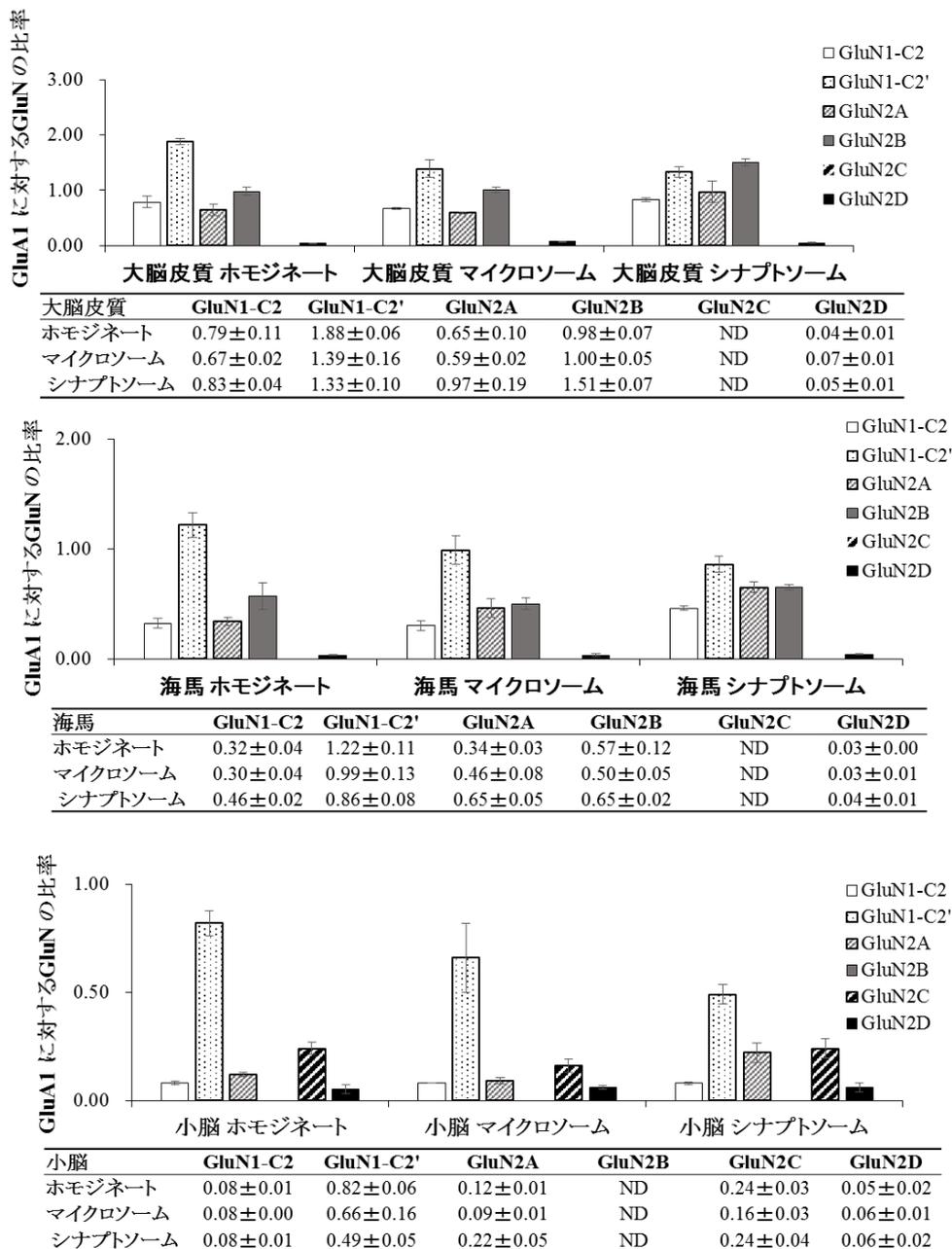
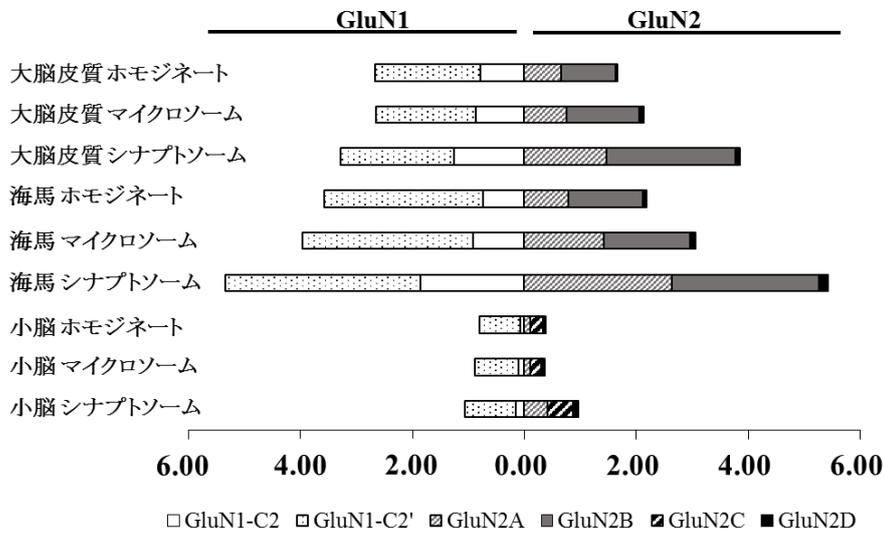


図7 各脳領域の各細胞画分における GluA1 を基準にした各 GluN の量比

大脳皮質ホモジネートを基準としたGluNの比率



	GluN1-C2	GluN1-C2'	GluN2A	GluN2B	GluN2C	GluN2D
大脳皮質 ホモジネート	0.79	1.88	0.65	0.98	ND	0.04
大脳皮質 マイクロソーム	0.86	1.79	0.76	1.29	ND	0.09
大脳皮質 シナプトソーム	1.26	2.02	1.47	2.30	ND	0.08
海馬 ホモジネート	0.74	2.83	0.79	1.32	ND	0.07
海馬 マイクロソーム	0.92	3.05	1.42	1.54	ND	0.09
海馬 シナプトソーム	1.86	3.48	2.63	2.63	ND	0.16
小脳 ホモジネート	0.07	0.74	0.11	ND	0.22	0.05
小脳 マイクロソーム	0.10	0.79	0.11	ND	0.19	0.07
小脳 シナプトソーム	0.15	0.92	0.41	ND	0.45	0.11

図 8 大脳皮質ホモジネートの GluA1 を基準とした GluN の比率