

マウス脳におけるデルタ型グルタミン酸受容体 サブユニット構成の定量的解析

中本千尋

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 Delta-type Glutamate Receptor Subunits in Mouse Brain

Chihiro NAKAMOTO

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

別刷り請求先：

〒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

中本千尋

Reprint requests to: Chihiro NAKAMOTO

Department of Cellular Neurobiology Brain Research Institute Niigata University

1-757 Asahimachi-dori Chuo-ku, Niigata 951-8585 Japan

キーワード

デルタ型グルタミン酸受容体, ウェスタンブロット, 免疫沈降, 定量, サブユニット構成

抄録

デルタ型グルタミン酸受容体サブユニット (GluD1, GluD2) は, アミノ酸配列の相同性からイオン透過型グルタミン酸受容体に分類されてきたが, GluD サブユニットにはグルタミン酸結合能がなく, イオンチャネルとして通常機能しない. それゆえ, その生理機能は長い間不明であったが, 近年シナプス接着因子として脳内で働くことが報告されたユニークな分子群である. 2 種のサブユニットは脳内において特徴的なパターンで発現しており, 特に GluD2 は小脳プルキンエ細胞に強く発現し, 平行線維シナプスの形成と維持に必須であることが示されている. ヒトのゲノム解析や変異マウスから得られた知見より, GluD サブユニットが脳の高次機能に関与している可能性が示唆されるが, 小脳以外の脳部位での各サブユニットの機能的重要性は明らかとなっていない. 接着因子としての機能とタンパク質存在量は密接な関連があると考えられるため, キメラタンパク質を用いた定量的なウェスタンブロット法を用いて, 脳内における GluD1 と GluD2 の存在量比を測定した. その結果, 大脳皮質, 海馬の各画分における GluD サブユニット量は GluA2 の 10%以下程度であった. また, 小脳の各画分の GluD1 は GluA2 の 7.6%-16.1%と大脳皮質や海馬と比べて大きく変わらないのに対し, GluD2 は GluA2 の 127%-255%と突出して多かった. GluD サブユニット間の発現比は, 小脳では GluD2 は GluD1 の 10-22 倍と多いが, 大脳皮質や海馬ではその差は 1-2 倍と小さかった. 興

味深いことに、大脳皮質や海馬では GluD2 が GluD1 に匹敵するレベルで発現していることが明らかとなった。さらに、免疫沈降法によりそのサブユニット構成を調べた結果、大脳皮質や海馬では GluD1 と GluD2 がヘテロメリックな構成でも存在していることが強く示唆された。

緒言

デルタ型グルタミン酸受容体(GluD)は GluD1 と GluD2 の 2 つのサブユニットから構成され、アミノ酸配列の相同性からイオン透過型グルタミン酸受容体(iGluRs)に分類されてきた。GluD1 と GluD2 は 56%のアミノ酸の相同性を有し、他の iGluRs である AMPA (α-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionate)型やカイニン酸型、NMDA(N-methyl-D-aspartate)型とは 14-24%の相同性を有する¹⁾⁻³⁾。しかしながら、GluD サブユニットはグルタミン酸に対する結合能がなく¹³⁾、その機能は長らく不明だったが、最近になりシナプス接着因子という他の iGluRs とは異なるユニークな機能をもつことが明らかとなった。小脳平行線維—プルキンエ細胞シナプスにおいて、GluD2 はプルキンエ細胞のポストシナプスに集積し、分泌タンパク質である Cbln1 を介して、プレシナプスのニューレキシンと結合することで、シナプス形成と維持に重要な役割を果たすことが報告された⁴⁾⁵⁾。GluD2 を欠損したマウスは重篤な運動失調、小脳 LTD の消失、シナプス形成異常といった顕著な表現型を呈する⁶⁾⁻¹⁰⁾。また、小脳より発現レベルは低いものの GluD2 が大脳皮質や海馬、線条体、視床などに発現することや¹¹⁾、ヒト GluD2 欠損では重篤な運動失調に加え認知機能障害を呈するという報告から¹²⁾、小脳以外で GluD2 が高次脳機能に関与していることが示唆される。一方、GluD1 は大脳皮質や海馬をはじめ脳全体に広範に発現し³⁾¹¹⁾¹³⁾、その欠損マウスには社会性の低下やうつ様行動、認知機能障害やシナプス形成異常が認められる¹⁴⁾¹⁵⁾。さらに、GluD1 も Cbln と結合しシナプス形成能をもつことが報告されているが⁴⁾¹⁶⁾¹⁷⁾、GluD1 と GluD2 に機能的な差異が存在するのかは明らかとなっていない。GluD サブユニットの役割を明らかにする上で、各サブユニットのタンパク質量を知ることが重要であるが、これまで GluD1 と GluD2 を量的に比較した報告はなかった。そこで本研究にお

いては、キメラタンパク質を用いた定量的なウェスタンブロット法を用いて¹⁸⁾⁻²⁰⁾、脳内における GluD1 と GluD2 の存在量比を測定し、さらに免疫沈降法を用いてそのサブユニット構成を調べた。

材料と方法

抗体

ウサギ抗 GluD2 抗体はマウス GluD2 の C 末端 38 アミノ酸残基 (897-934 aa, NM_008167) に対して作製した。GluD1 の C 末端 38 アミノ酸残基 (895-932 aa, NM_008166) を認識する抗ウサギ GluD1 抗体¹³⁾、GluA2 の N 末端の 256 アミノ酸残基 (175-430 aa, NM_013540; Millipore Corporation, Bedford, MA, USA) を認識する抗マウス GluA2 抗体を用いた。

キメラタンパク質の作製

抗 GluD1 抗体および抗 GluD2 抗体の抗体力価を算出するために、キメラタンパク質を作製した。キメラタンパク質は AMPA 型グルタミン酸サブユニットの GluA2(1-833 aa)の C 末端側細胞内領域を GluD1(851-1009 aa)または GluD2 (851-1007 aa)に置換したものである (図 2A)。これらの領域をコードするマウス cDNA は、pKCR24²¹⁾, pYA91-5¹⁾, pA37-31²⁾からそれぞれ PCR で増幅後 pEF-BOS ベクター²²⁾に連結し、Lipofectamine LTX and plus reagents (ThermoFisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) を用いて HEK293 細胞に導入した。20-24 時間後、細胞を SDS サンプル溶液 (2% sodium dodecyl sulfate (SDS), 62.5 mM Tris-Cl, pH 6.8, 10% Glycerol, 0.002% BPB) にて可溶化し、超音波破碎機 (TERA

CLEANER 500, TERAOKA, Tokyo, Japan)により 1 分間処理後, 12,000 x g で 10 分間遠心分離した上清を標準キメラタンパク質試料とし, SDS-PAGE に使用した.

マウス脳の細胞分画

動物を用いたすべての実験は, 新潟大学動物実験倫理委員会と遺伝子組換え実験安全委員会の許可のもと, そのガイドラインに沿っておこなった.

細胞分画は 4°Cで行い, Carlin らに準じた方法で行った²³⁾. 8-12 週齢の C57BL/6N 系統マウス (Charles River Laboratories Japan)および GluD1-KO, GluD2-KO マウスの大脳皮質, 海馬, 小脳を摘出し, ホモジネート溶液(0.32M ショ糖 5 mM EDTA, complete Mini (Roche, Mannheim, Germany))によりホモジナイズ後, 1,000 x g, 10 分間遠心分離した得られた上清をホモジネート画分(S1)とした. S1 を 12,000 x g, 10 分間遠心分離し, 上清(S2)と沈殿(P2)に分離した. S2 を 200,000 x g, 90 分間遠心分離して得た沈殿を, 溶解液(40mM Tris-Cl, pH 8.0, 1% SDS)で溶解しマイクロソーム画分(P3)とした. P2 画分をホモジネート溶液に懸濁後, 0.8M および 1.2M ショ糖の密度勾配遠心(90,000 x g, 2 時間)によりシナプトソーム画分(Syn)を得た. シナプトソーム画分を等量の Triton 溶液(1% Triton X-100, 0.32M ショ糖, 12mM Tris-Cl, pH 8.0)で 15 分処理後, 200,000 x g, 1 時間遠心分離し得られた沈殿を溶解液で溶解したものを PSD 画分とした.

ウェスタンブロッティング

調整した試料のタンパク質濃度は BCA protein assay kit (Thermofisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA)により測定した. 1% メルカプトエタノールを添加した SDS サンプル溶液に試料を添加し, 100°C, 5 分間加熱した. 8% 分離ゲルで SDS-PAGE を行い, 分離したタンパク質をニトロセルロース膜 (GE Healthcare, Piscataway Township, NJ, USA)に電氣的に転写した. メンブレンは 5% スキムミルクを含む TBS-T (20 mM Tris-Cl pH 7.6, 137 mM NaCl, 0.1 % Tween 20)で 1 時間ブロッキング後, TBS-T で 10 分間 3 回洗浄した. 1 次抗体を 1 μ g/ml になるよう TBS-T で希釈し, 室温で 3-4 時間メンブレンと反応させた. メンブレンを TBS-T で 10 分間 3 回洗浄後, ペルオキシダーゼコンジュゲート 2 次抗体に室温で 1 時間反応させた. TBS-T で 10 分間 3 回洗浄後, ECL-prime ウェスタンブロッティング検出システム (GE Healthcare, Piscataway Township, NJ, USA)を用いて発光させ, 冷却 CCD 化学発光イメージアナライザー(EZ capture MG; ATTO, Tokyo, Japan)で検出した. 得られたバンドのシグナル強度を CS Analyzer ver.3.0 (ATTO, Tokyo, Japan)により定量した.

免疫沈降

全長の GluD1 および GluD2 cDNA を pCAGGS ベクターにサブクローニングした発現ベクターを Lipofectamine LTX and plus reagents により HEK293 細胞に導入し, 24 時間培養後, complete Mini を添加した 1% NP40 溶液(1% Nonidet P40 (NP40), 50 mM Tris-Cl, pH 7.4, 250 mM NaCl, 5 mM EDTA, 50 mM NaF, 1 mM Na₃VO₄, and 0.02% NaN₃; Thermofisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA)にて可溶化した. 1 時間回転混合後, 10,000 x g, 10 分間遠心分離し, 上清を得た. マウス脳の大脳皮質と海馬を併せて

調製した P2 画分を，complete Mini を添加した 1% NP40 溶液で可溶化し，4℃で 1 時間回転混合後，540,000 x g, 30 分間遠心分離し上清を得た．脳試料の上清のタンパク質濃度は BCA Protein Assay Reagent で測定し，1mg/ml となるように調製した．Protein G Dynabeads (Thermofisher Scientific Inc.) にコンジュゲートした Normal rabbit IgG, GluD1, GluD2 抗体を，濃度が HEK293 細胞で 1.3μg/ml, 大脳皮質海馬 P2 画分で 2.7μg/ml になるよう添加し 4℃で 1 時間反応させた．抗体ビーズは洗浄液(0.05% Triton X-100, 50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 100 mM NaCl)で 6 回洗浄後，SDS サンプル溶液で溶出し免疫沈降物とした．

結果

抗 GluD 抗体の特異性

抗体の特異性はノックアウトマウスを用いて確認した(図 1)．大脳皮質，海馬，小脳ホモジネート画分において，抗 GluD1 抗体により野生型では GluD1 のバンドが予測分子量位置(113 kDa)に検出され，GluD1-KO マウスではそのバンドは消失した．抗 GluD2 抗体により野生型では GluD2 のバンドが予測分子量位置(114 kDa)に検出され，GluD2-KO マウスでそのバンドは消失した．これら特異的な抗 GluD1 抗体および抗 GluD2 抗体を用いて，以下の実験をおこなった．

キメラタンパク質を用いた抗 GluD 抗体の抗体力価の測定

ウェスタンブロット法でタンパク質の量を比較するためには，抗体の抗体力価を考慮する必要がある．そこで，抗 GluD1 抗体と抗 GluD2 抗体の力価を標準タンパク質に抗原ペプチドを融合したキ

メラタンパク質により決定した。キメラタンパク質は、AMPA 型グルタミン酸サブユニット GluA2 の C 末端側細胞内領域を GluD1 または GluD2 に置換したものである（図 2A）。抗 GluD1 抗体および抗 GluD2 抗体は C 末端側を、抗 GluA2 抗体は N 末端側を認識するため、これらキメラタンパク質を標準物質として用いることで抗 GluA2 抗体を基準とした抗 GluD 抗体の抗体力価を測定することが可能となる。各キメラタンパク質を抗 GluA2 抗体、抗 GluD 抗体で検出し、そのシグナル値から標準曲線を作製した。キメラタンパク質に対して抗 GluA2 抗体と抗 GluD2 抗体のシグナル値が同程度になるようにキメラタンパク質の濃度を調整し、そのタンパク質量とシグナル値が直線的であることを確認し定量に用いた。図 2B を例にとると、各抗体のシグナル値の傾きから得られた抗 GluD1 抗体および抗 GluD2 抗体の抗体力価は GluA2 に対してそれぞれ 14.4 および 30.8 であった。

マウス脳における GluD サブユニットの存在量

ウェスタンブロット時に検出されるサンプルのシグナルは、複雑な実験工程を経るごとに変化するため、キメラタンパク質と脳試料の標準曲線は実験毎に作成した。図 3 に測定例を示す。小脳 PSD 画分における GluD1 の存在量を測定するために、キメラタンパク質 GluA2D1 および小脳 PSD 画分を抗 GluA2 抗体および抗 GluD2 抗体により検出し、バンドのシグナル値から標準曲線を作成した。各抗体で検出されたシグナル値が同じシグナル強度になるようタンパク質濃度を調整した（図 3B）。これら標準曲線から得られた傾きの比を抗体力価で補正することで、GluA2 に対する GluD1 の存在比率を求めた。GluD2 も同様に、キメラタンパク質 GluA2D2 を用いて各脳試料中の GluD2 の存在比率を測定した。

内在の GluA2 タンパク質を基準として、大脳皮質、海馬、小脳ホモジネート画分、マイクロソーム画分、シナプトソーム画分、PSD 画分における GluD1 と GluD2 の存在比率を算出した (図 4). ホモジネート画分は総タンパク質量、マイクロソーム画分は小胞体やゴルジ体を多く含む画分、シナプトソーム画分はプレおよびポストを含むシナプスを多く含む画分、PSD 画分はシナプトソーム画分から興奮性のポストシナプスに特徴的なシナプス後肥厚(PSD)を多く含む画分である. GluA2 を 100%とした時の GluD1 と GluD2 の存在比率は、大脳皮質のホモジネート画分ではそれぞれ $7.1 \pm 0.8\%$, $3.4 \pm 0.3\%$, マイクロソーム画分では $8.2 \pm 0.9\%$, $3.3 \pm 0.3\%$, シナプトソーム画分では $9.7 \pm 0.6\%$, $4.4 \pm 0.6\%$, PSD 画分では $2.5 \pm 0.3\%$, $2.5 \pm 0.2\%$ であった($n=3$, 数値 \pm SD). 同様に、海馬のホモジネート画分ではそれぞれ $5.0 \pm 0.2\%$, $2.5 \pm 0.5\%$, マイクロソーム画分では $8.3 \pm 0.5\%$, $3.6 \pm 0.8\%$, シナプトソーム画分では $7.6 \pm 0.7\%$, $2.7 \pm 0.3\%$, PSD 画分では $3.1 \pm 0.3\%$, $1.8 \pm 0.4\%$ であった($n=3-5$). 同様に、小脳のホモジネート画分では $16.1 \pm 1.6\%$, $168 \pm 27\%$, マイクロソーム画分では $10.4 \pm 1.8\%$, $127 \pm 15\%$, シナプトソーム画分では $11.6 \pm 1.0\%$, $255 \pm 46\%$, PSD 画分では $7.6 \pm 0.1\%$, $163 \pm 12\%$ であった($n=3$). 各脳画分の GluD1 と GluD2 は、それぞれ GluA2 の 16%以下と少なく、小脳 GluD2 は GluA2 より多いことが明らかとなった. GluD1 と GluD2 の存在量を比較すると、小脳では各画分の GluD2 は GluD1 の 10-22 倍と非常に多く発現していた. 大脳皮質や海馬では、各画分では GluD1 は GluD2 の 1-2 倍発現しており、小脳に比べると GluD サブユニットは等量に発現していることが明らかとなった.

次に、脳領域間の GluD サブユニットの存在比を決定した. まず、各脳領域間の GluA2 の発現比を測定した. 図 3A に示した GluA2 抗体で検出したバンドのシグナル値を用いて、キメラタンパク

質 GluA2D1 を基準に各脳試料中の GluA2 の存在比を算出した。大脳皮質ホモジネート画分の GluA2 を 1.0 とした時の、各脳領域細胞画分の GluA2 の発現パターンを示す (図 5A)。大脳皮質ではホモジネート画分、マイクロソーム画分、シナプトソーム画分、PSD 画分の GluA2 は 1.0 ± 0.39 , 0.9 ± 0.09 , 1.7 ± 0.27 , 6.1 ± 0.42 , 海馬ではそれぞれ 1.9 ± 0.33 , 1.6 ± 0.43 , 2.1 ± 0.15 , 5.1 ± 0.05 , 小脳ではそれぞれ 0.4 ± 0.06 , 0.4 ± 0.07 , 1.7 ± 0.19 , 2.6 ± 0.29 であった(数値 \pm SD)。この数値を各脳領域の細胞画分に当てはめ、大脳皮質の GluD1 を 1.0 としたときの GluD サブユニットの相対的な量比として算出した(図 5B)。大脳皮質ではホモジネート画分、マイクロソーム画分、シナプトソーム画分、PSD 画分の GluD1 は 1.0, 0.9, 2.0, 1.9 であり、GluD2 は 0.5, 0.4, 0.9, 1.9 であった。海馬ではそれぞれの画分で GluD1 は 1.1, 1.1, 2.0, 2.0 であり、GluD2 は 0.6, 0.4, 0.7, 1.2 であった。小脳ではそれぞれの画分で GluD1 は 0.7, 0.5, 2.4, 2.4 であり、GluD2 は 7.7, 5.6, 53.5, 52.0 であった。GluA2 および GluD1, GluD2 ではマイクロソーム画分への濃縮が認められなかったことから、これらの分子は細胞内プールの存在する GluN1 などと異なり¹⁸⁾、細胞内から細胞膜表面へと比較的滞りなく輸送されることが示唆される。GluA2 は各脳領域においてシナプトソームから PSD に濃縮しているのに対し、GluD1 はいずれの領域においても PSD への濃縮がみられなかった。GluD2 も GluA2 に比べるとシナプトソームから PSD への濃縮の程度が弱かった。このことは、GluD サブユニットがエキストラシナプスにも豊富に存在する可能性を示唆する。

免疫沈降法による GluD サブユニットの構成

GluD サブユニットが脳皮質や海馬で同程度に発現することが明らかとなったことから(図 5), GluD サブユニットの存在様式にヘテロメリックな構成があるか免疫沈降法を用いて検証した. HEK293 細胞に GluD1 および GluD2 を強制発現し, 各 GluD 抗体を用いて免疫沈降した. その結果, 抗 GluD1 抗体で免疫沈降すると GluD2 が共沈し, 抗 GluD2 抗体で免疫沈降すると GluD1 が共沈した(図 6A). GluD1 と GluD2 がヘテロマー形成する性質をもつことが *in vitro* で示唆された. 次に, マウス的大脑皮質と海馬の粗膜画分 (P2 画分) を抗 GluD1 抗体で免疫沈降すると, 野生型では GluD2 が共沈し, GluD1-KO マウスではそのバンドは消失した. 同様に抗 GluD2 抗体で免疫沈降したところ野生型では GluD1 が共沈し, GluD2-KO マウスではそのバンドは消失した. 抗ラビット IgG 抗体でも非特異的なバンドは認められなかった(図 6B). 以上のことから, GluD サブユニットがヘテロメリックな構成でマウス脳内に存在することが示唆された.

考察

本研究では, キメラタンパク質を用いた定量的ウェスタンブロット法によりマウス脳内における GluD サブユニットの相対的な量比, ならびに免疫沈降法によりデルタ型受容体のサブユニット構成を明らかにした.

キメラタンパク質を用いたウェスタンブロットは, 複数のタンパク質の量を比較するために有用な方法の一つである¹⁸⁾⁻²⁰⁾. 脳内に広範に発現する GluA2 を標準物質として選択し, 成体マウス的大脑皮質, 海馬, 小脳における GluD サブユニットの存在量を定量した. その結果, 大脑皮質, 海馬の各画分における GluD サブユニット量は GluA2 の 10%以下程度であった. また, 小脳の各画分の

GluD1はGluA2の7.6%-16.1%と大脳皮質や海馬と比べて大きく変わらないのに対し、GluD2はGluA2の127%-255%と突出して多かった。GluDサブユニット間の発現比は、小脳ではGluD2はGluD1の10-22倍と多いが、大脳皮質や海馬ではその差は1-2倍と小さかった。興味深いことに、大脳皮質や海馬のホモジネートにおける総発現量をみるとGluD2はGluD1より少ない傾向にあるものの、PSD画分ではGluD2がGluD1に匹敵するレベルで発現していることが明らかとなった。グルタミン酸受容体を含む、シナプスに集積する膜タンパク質の多くが細胞内領域でのMAGUKS等との結合によりその局在が決定される^{24,25)}。また近年、カイニン酸受容体の海馬CA3領域におけるシナプス局在化はCblnファミリーの類縁分子であるC1ql2/3に依存的であることが示された²⁶⁾。GluD1とGluD2の細胞内結合分子は異なっていることも知られており、シナプス局在化の効率が異なっていることを反映しているのかもしれない。

カイニン酸受容体(GluK2-5)の存在量を同様の手法で測定した報告によると、海馬のPSD画分では、GluA2に対するGluKサブユニット(GluK2-5)の量は少ない順からGluK4(0.47%)-GluK2(7.0%)であり、小脳のPSDの画分では、GluK4(1.1%)-GluK2(9.9%)であった²⁰⁾。本研究から、海馬のPSD画分では、GluD1は3.1%とGluD2は1.8%、小脳GluD1は7.6%であり、興味深いことに、GluDサブユニットの発現量はカイニン酸受容体とも同程度であることが明らかとなった。小脳におけるGluD2を除き、GluDサブユニットの発現量はGluA2より少なく、カイニン酸受容体と同レベルであることが示された。高等哺乳動物の中枢神経系における興奮性シナプス伝達を担う主要な受容体であるAMPA型GluA2サブユニットの約1割、その伝達の調節因子として多様かつ重要な生理機能を有するカイニン酸型と同程度の量でGluDサブユニットが大脳皮質や海馬に発現していることは、これらサブユニットが有する分子機能を発揮するに十分な発現量であることが推測される。さらに、小脳におけるGluD2の非常に高い発現量は、平行線維—プルキンエシナプスという脳内で最も多数存在する特殊なシナプス結合の制御がGluD2依存的であることを反映していると考えられる。本研究で開発されたGluDサブユニットの定量法を用いることで、より限局した脳部位や神経核におけ

る GluD サブユニット発現量の詳細を調べることが可能である。このような情報は今後、特定の脳領域や神経回路における GluD サブユニットが担う生理機能を解明するために有用であると考えられる。

大脳皮質や海馬で GluD1 と GluD2 が量的に十分に発現することから、次に、GluD サブユニットにヘテロメリックな構成をとりうるか調べた。通常、iGluRs はホモあるいはヘテロ 4 量体を形成し、AMPA 型(GluA1-A4)、NMDA 型(GluN1, GluN2A-2D)、カイニン酸型(GluK1-4)の各サブユニットの構成がチャネルの性質を決定づける²⁷⁾⁻³¹⁾。各 iGluR サブユニットの構成は *in vitro* 発現系と電気生理学を組合せた手法や免疫沈降法などにより証明されている³²⁾⁻³⁷⁾。小脳では GluD2 は GluD1 より多く発現し、4 量体で存在するという報告からも³⁸⁾、GluD サブユニットは主にホモメリックな構成をとることが示唆されている。しかし、GluD サブユニットが他の iGluRs のようにヘテロマーを形成し得るかどうかこれまで検証されていなかった。そこで、HEK293 細胞を用いた強制発現系および大脳皮質海馬の膜画分でのサブユニット構成を調べた結果、その両方において、GluD1 と GluD2 が共沈した。大脳皮質や海馬において GluD1 と GluD2 を共発現する細胞の存在がシングルセル解析でも示されていることから¹¹⁾、両者が部分的にヘテロマーを形成し脳内で機能している可能性は十分考えられる。

GluD1 は脳に大脳皮質や海馬、線条体、扁桃体といった情動や記憶学習に関わる領域に発現しており³¹⁾¹¹⁾¹³⁾、本解析結果からもカイニン酸受容体と同程度と豊富に発現していることが示唆された。また GluD1 遺伝子が統合失調症や自閉症などのリスクファクターといったヒトの報告や³⁹⁾⁻⁴³⁾、その欠損マウスが社会性や認知機能の低下や情動異常を示すことなどが報告されている¹⁴⁾¹⁵⁾。一方、GluD2 はこれまで小脳に着目した研究が主だったが²³⁾⁶⁾⁻¹⁰⁾、本研究から明らかとなった大脳皮質や海馬における GluD2 の高い発現量は、GluD2 を欠損したヒトにおいて運動失調とともに認められる認知機能障害¹²⁾の原因が、小脳以外の GluD2 によるものであることを示唆する。高次脳機能に果たす GluD サブユニットの役割の詳細、ならびに GluD1 と GluD2 の組み合わせに機能的な差異があるかは今後の研究課題の一つといえるだろう。

結論

デルタ型グルタミン酸受容体サブユニット GluD1 および GluD2 のマウス脳内における発現量を定量的ウェスタンブロット法により測定した結果、小脳では GluD2 は GluD1 より 10-22 倍と多く発現した。一方、大脳皮質や海馬では GluD1 は GluD2 の 1-2 倍程度の差であり、GluD2 が GluD2 に匹敵するレベルで発現していることが明らかとなった。さらに、免疫沈降法によりサブユニット構成を調べた結果、GluD1 と GluD2 はヘテロマーを形成することが *in vitro*, *in vivo* で確認できた。本研究で開発した定量法を含めた生化学的情報は GluD サブユニットの高次脳機能に果たす役割を解明する足がかりとなりうる。

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) Yamazaki M, Araki K, Shibata A and Mishina M: Molecular cloning of a cDNA encoding a novel member of the mouse glutamate receptor channel family, *Biochem Biophys Res Commun* 183: 886–892, 1992.

- 2) Araki K, Meguro H, Kushiya E, Takayama C, Inoue Y and Mishina M: Selective expression of the glutamate receptor channel delta 2 subunit in cerebellar purkinje cells. *Biochem Biophys Res Commun* 197: 1267–1276, 1993.
- 3) Lomeli H, Sprengel R, Laurie DJ, Köhr G, Herb A, Seeburg PH and Wisden W: The rat delta-1 and delta-2 subunits extend the excitatory amino acid receptor family. *FEBS Letters* 315: 318–322, 1993.
- 4) Matsuda K, Miura E, Miyazaki T, Kakegawa W, Emi K, Narumi S, Fukazawa Y, Ito-Ishida A, Kondo T, Shigemoto R, Watanabe M and Yuzaki M: Cbln1 is a ligand for an orphan glutamate receptor delta2, a bidirectional synapse organizer. *Science* 328: 363–368, 2010.
- 5) Uemura T, Lee SJ, Yasumura M, Takeuchi T, Yoshida T, Ra M, Taguchi R, Sakimura K and Mishina M: Trans-synaptic interaction of GluRdelta2 and neurexin through Cbln1 mediates synapse formation in the cerebellum, *Cell* 141: 1068–1079, 2010.
- 6) Kashiwabuchi N, Ikeda K, Araki K, Hirano T, Shibuki K, Takayama C, Inoue Y, Kutsuwada T, Yagi T, Kang Y, Aizawa S and Mishina M: Impairment of motor coordination, Purkinje cell synapse formation, and cerebellar long-term depression in GluR δ 2 mutant mice. *Cell* 81: 245–252, 1995.
- 7) Hashimoto K, Ichikawa R, Takechi H, Inoue Y, Aiba A, Sakimura K, Mishina M, Hashikawa T, Konnerth A, Watanabe M and Kano M: Roles of glutamate receptor delta 2 Subunit (GluRdelta 2) and metabotropic glutamate receptor subtype 1 (mGluR1) in climbing fiber synapse elimination during postnatal cerebellar development. *J Neurosci* 21: 9701–9712, 2001.

- 8) Kurihara H, Hashimoto K, Kano M, Takayama C, Sakimura K, Mishina M, Inoue Y and Watanabe M:

Impaired parallel fiber-right arrow purkinje cell synapse stabilization during cerebellar development of

mutant mice lacking the glutamate receptor delta 2 subunit. *J Neurosci* 17: 9613–9623, 1997.
- 9) Lalouette A, Lohof A, Sotelo C, Guénet JL and Mariani J: Neurobiological effects of a null mutation depend

on genetic context: comparison between two hotfoot alleles of the delta-2 ionotropic glutamate receptor.

Neuroscience 105: 443–455, 2001.
- 10) Takeuchi T, Miyazaki T, Watanabe M, Mori H, Sakimura K and Mishina M: Control of synaptic connection

by glutamate receptor delta2 in the adult cerebellum. *J Neurosci* 25: 2146–2156, 2005.
- 11) Hepp R, Hay YA, Aguado C, Lujan R, Dauphinot L, Potier MC, Nomura S, Poirel O, El Mestikawy S,

Lamboleze B and Tricoire L: Glutamate receptors of the delta family are widely expressed in the adult brain.

Brain Struct Funct 220: 2797–2815, 2015.
- 12) Hills LB, Masri A, Konno K, Kakegawa W, Lam ATN, Lim-Melia E, Chandy N, Hill RS, Partlow JN, Al-

Saffar M, Nasir R, Stoler JM, Barkovich AJ, Watanabe M, Yuzaki M and Mochida GH: Deletions in GRID2

lead to a recessive syndrome of cerebellar ataxia and tonic upgaze in humans. *Neurology* 81: 1378–1386,

2013.
- 13) Konno K, Matsuda K, Nakamoto C, Uchigashima M, Miyazaki T, Yamasaki M, Sakimura K, Yuzaki M and

Watanabe M: Enriched expression of GluD1 in higher brain regions and its involvement in parallel fiber-

interneuron synapse formation in the cerebellum. *J Neurosci* 34: 7412–7424, 2014.

- 14) Yadav R, Gupta SC, Hillman BG, Bhatt JM, Stairs DJ and Dravid SM: Deletion of glutamate delta-1 receptor in mouse leads to aberrant emotional and social behaviors. *PloS ONE* 7: e32969, 2012.
- 15) Yadav R, Hillman BG, Gupta SC, Suryavanshi P, Bhatt JM, Pavuluri R, Stairs DJ, Dravid SM: Deletion of glutamate delta-1 receptor in mouse leads to enhanced working memory and deficit in fear conditioning. *PLoS ONE* 8: e60785, 2013.
- 16) Ryu K, Yokoyama M, Yamashita M and Hirano T: Induction of excitatory and inhibitory presynaptic differentiation by GluD1. *Biochem Biophys Res Commun* 417: 157–161, 2012.
- 17) Yasumura M, Yoshida T, Lee S, Uemura T, Joo J and Mishina M: Glutamate receptor $\delta 1$ induces preferentially inhibitory presynaptic differentiation of cortical neurons by interacting with neurexins through cerebellin precursor protein subtypes. *J Neurochem* 121: 705–716, 2012.
- 18) 鈴木康浩: NMDA型グルタミン酸受容体の定量的解析. *新潟医学会雑誌* 130: 479-490, 2016.
- 19) 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: 547–552, 2011.
- 20) 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.
- 21) Sakimura K, Bujo H, Kushiya E, Araki K, Yamazaki M, Yamazaki M, Meguro H, Warashina A, Numa S and Mishina M: Functional expression from cloned cDNAs of glutamate receptor species responsive to kainate and quisqualate. *FEBS Letters* 272: 73–80, 1990.

- 22) Mizushima S and Nagata S: pEF-BOS, a powerful mammalian expression vector. *Nucleic Acids Res* 18: 5322, 1990.
- 23) Carlin RK, Grab DJ, Cohen RS, 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.
- 24) Elias GM and Nicoll RA: Synaptic trafficking of glutamate receptors by MAGUK scaffolding proteins. *Trends in Cell Biol* 17: 343–352, 2007.
- 25) Kim E and Sheng M: PDZ domain proteins of synapses. *Nature Rev Neurosci* 5: 771–781, 2004.
- 26) Matsuda K, Budisantoso T, Mitakidis N, Sugaya Y, Miura E, Kakegawa W, Yamasaki M, Konno K, Uchigashima M, Abe M, Watanabe I, Kano M, Watanabe M, Sakimura K, Aricescu AR and Yuzaki M: Transsynaptic modulation of kainate receptor functions by C1q-like proteins. *Neuron* 90: 752–767, 2016.
- 27) Mori H and Mishina M: Structure and function of the NMDA receptor channel. *Neuropharmacology* 34: 1219–1237, 1995.
- 28) 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.
- 29) Mansouri M, Kasugai Y, Fukazawa Y, Bertaso F, Raynaud F, Perroy J, Fagni L, Kaufmann WA, Watanabe M, Shigemoto R and Ferraguti F: Distinct subsynaptic localization of type 1 metabotropic glutamate receptors at glutamatergic and GABAergic synapses in the rodent cerebellar cortex. *Eur J Neurosci* 41: 157–167, 2015.

- 30) Mansour M, Nagarajan N, Nehring RB, Clements JD and Rosenmund C: Heteromeric AMPA receptors assemble with a preferred subunit stoichiometry and spatial arrangement. *Neuron* 32: 841–853, 2001.
- 31) Pinheiro P and Mulle C: Kainate receptors. *Cell Tissue Res* 326: 457–482, 2006.
- 32) 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.
- 33) Coussen F, Normand E, Marchal C, Costet P, Choquet D, Lambert M, Mège RM and Mulle C: Recruitment of the kainate receptor subunit glutamate receptor 6 by cadherin/catenin complexes. *J Neurosci* 22: 6426–6436, 2002.
- 34) 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.
- 35) Leuschner WD and Hoch W: Subtype-specific assembly of alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionic acid receptor subunits is mediated by their n-terminal domains. *J Biol Chem* 274: 16907–16916, 1999.
- 36) Wenthold R, Petralia R, Blahos II and Niedzielski A: Evidence for multiple AMPA receptor complexes in hippocampal CA1/CA2 neurons. *J Neurosci* 16: 1982–1989, 1996.
- 37) Sheng M, Cummings J, Roldan LA, Jan YN and Jan LY: Changing subunit composition of heteromeric NMDA receptors during development of rat cortex. *Nature* 368: 144–147, 1994.

- 38) Lee SJ, Uemura T, Yoshida T and Mishina M: GluRδ2 assembles four neuroligins into trans-synaptic triad to trigger synapse formation. *J Neurosci* 32: 4688-4701, 2012.
- 39) Fallin MD, Lasseter VK, Avramopoulos D, Nicodemus KK, Wolynec PS, McGrath JA, Steel G, Nestadt G, Liang KY, Hagan RL, Valle D and Pulver AE: Bipolar I disorder and schizophrenia: A 440–single-nucleotide polymorphism screen of 64 candidate genes among ashkenazi jewish case-parent trios. *American J Human Genetics* 77: 918–936, 2005.
- 40) Guo SZ, Huang K, Shi YY, Tang W, Zhou J, Feng GY, Zhu SM, Liu HJ, Chen Y, Sun XD and He L: A case-control association study between the GRID1 gene and schizophrenia in the Chinese Northern Han population. *Schizophrenia Res* 93: 385–390, 2007.
- 41) Greenwood TA, Lazzeroni LC, Murray SS, Cadenhead KS, Calkins ME, Dobie DJ, Green MF, Gur RE, Gur RC, Hardiman G, Kelsoe JR, Leonard S, Light GA, Nuechterlein KH, Olincy A, Radant AD, Schork NJ, Seidman LJ, Siever LJ, Silverman JM, Stone WS, Swerdlow NR, Tsuang DW, Tsuang MT, Turetsky BI, Freedman R and Braff DL: Analysis of 94 candidate genes and 12 endophenotypes for schizophrenia from the consortium on the genetics of schizophrenia. *American J Psychiatry* 168: 930–946, 2011.
- 42) Glessner JT, Wang K, Cai G, Korvatska O, Kim CE, Wood S, Zhang H, Estes A, Brune CW, Bradfield JP, Imielinski M, Frackelton EC, Reichert J, Crawford EL, Munson J, Sleiman PMA, Chiavacci R, Annaiah K, Thomas K, Hou C, Glaberson W, Flory J, Otieno F, Garriss M, Soorya L, Klei L, Piven J, Meyer KJ, Anagnostou E, Sakurai T, M. Game R, Rudd DS, Zurawiecki D, McDougale CJ, Davis LK, Miller J, Posey DJ, Michaels S, Klevzon A, Silverman JM, Bernier R, Levy SE, Schultz RT, Dawson G, Owley T,

McMahon WM, Wassink TH, Sweeney JA, Nurnberger JI, Coon H, Sutcliffe JS, Minshew NJ, Grant SFA,

Bucan M, Cook EH, Buxbaum JD, Devlin B, Schellenberg GD and Hakonarson H: Autism genome-wide

copy number variation reveals ubiquitin and neuronal genes. *Nature* 459: 569–573, 2009.

43) Smith M, Spence MA and Flodman P: Nuclear and mitochondrial genome defects in autisms. *Ann N Y*

Acad Sci 1151: 102–132, 2009.

図の説明

図 1 抗 GluD 抗体の特異性の確認

野生型と各ノックアウトマウス的大脑皮質, 海馬, 小脳ホモジネート画分(20 μ g/lane)を抗 GluD1 抗体, 抗 GluD2 抗体, 抗 Actin 抗体で検出した.

図 2 キメラタンパク質を用いた抗体力価の測定

(A) キメラタンパク質(GluA2D1, GluA2D2)の模式図. GluA2 を基本骨格とし, 細胞内 C 末端を GluD1 または GluD2 に置換し作製した.

(B) 抗 GluA1 抗体を基準にした各抗 GluD 抗体の抗体力価測定法. 各キメラタンパク質のタンパク質量とウェスタンブロットのシグナル値から標準曲線を作成した.

図 3 脳試料中の GluD サブユニットの定量法

(A) GluA2D1 と小脳 PSD 画分を同一メンブレン上にブロットし, 抗 GluD1 抗体および抗 GluD2 抗体で検出した.

(B) 各バンドのシグナル値をプロットし作成した標準曲線. GluA2D1 の標準曲線(\square GluD1, \blacksquare GluA2), 脳試料の標準曲線(\circ GluD1, \bullet GluA2).

(C) 抗体力価の計算式(上段)および, 脳試料中の GluA2 に対する GluD1 の存在量の計算式(下段).

図 4 GluA2 に対する各領域画分における GluD サブユニットの発現比率

大脳皮質, 海馬, 小脳のホモジネート画分, マイクロソーム画分, シナプトソーム画分, PSD 画分において, GluA2 を 100%とした時の GluD1 と GluD2 の発現比率.

図 5 各脳領域画分間の GluA2 および GluD サブユニットの発現量

(A) 大脳皮質ホモジネート画分を 1 としたときの各脳領域画分における GluA2 の発現比.

(B) 大脳皮質ホモジネート画分の GluD1 を 1 としたときの各脳領域画分における GluD1 および GluD2 の発現比.

図 6 免疫沈降による GluD サブユニットの構成

(A) HEK293 細胞に GluD1 および GluD2 を強制発現し, 各 GluD 抗体で免疫沈降した(10% input).

(B) 大脳皮質海馬の粗膜画分を各 GluD 抗体で免疫沈降した(5% input). GluD1-KO マウスおよび GluD2-KO マウスをコントロールとして用いた.

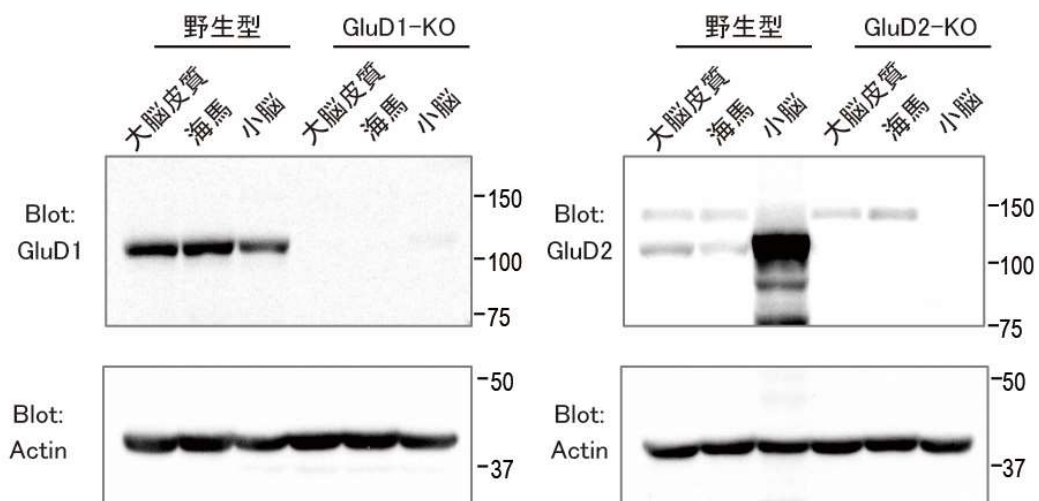


図1 抗 GluD 抗体の特異性の確認

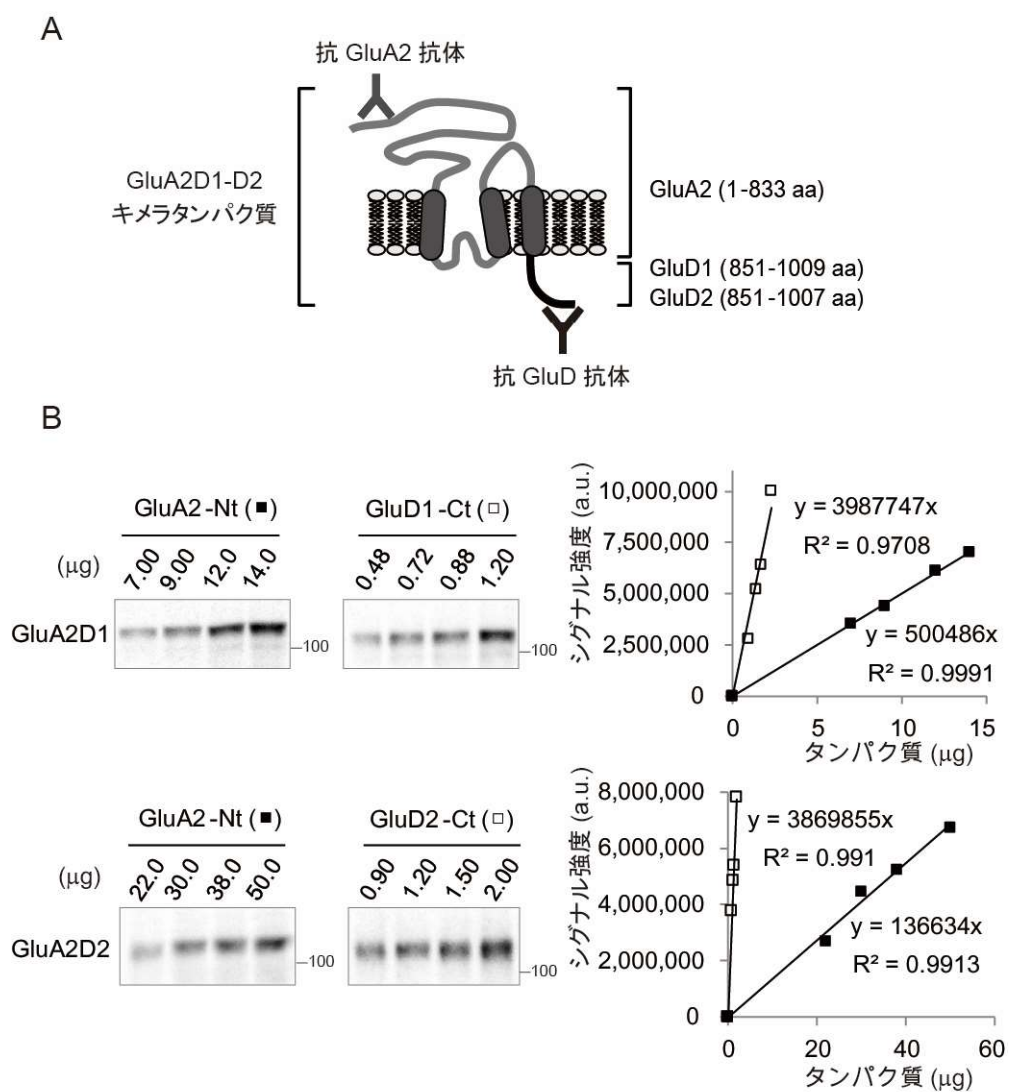


図2 キメラタンパク質を用いた抗体力価の測定

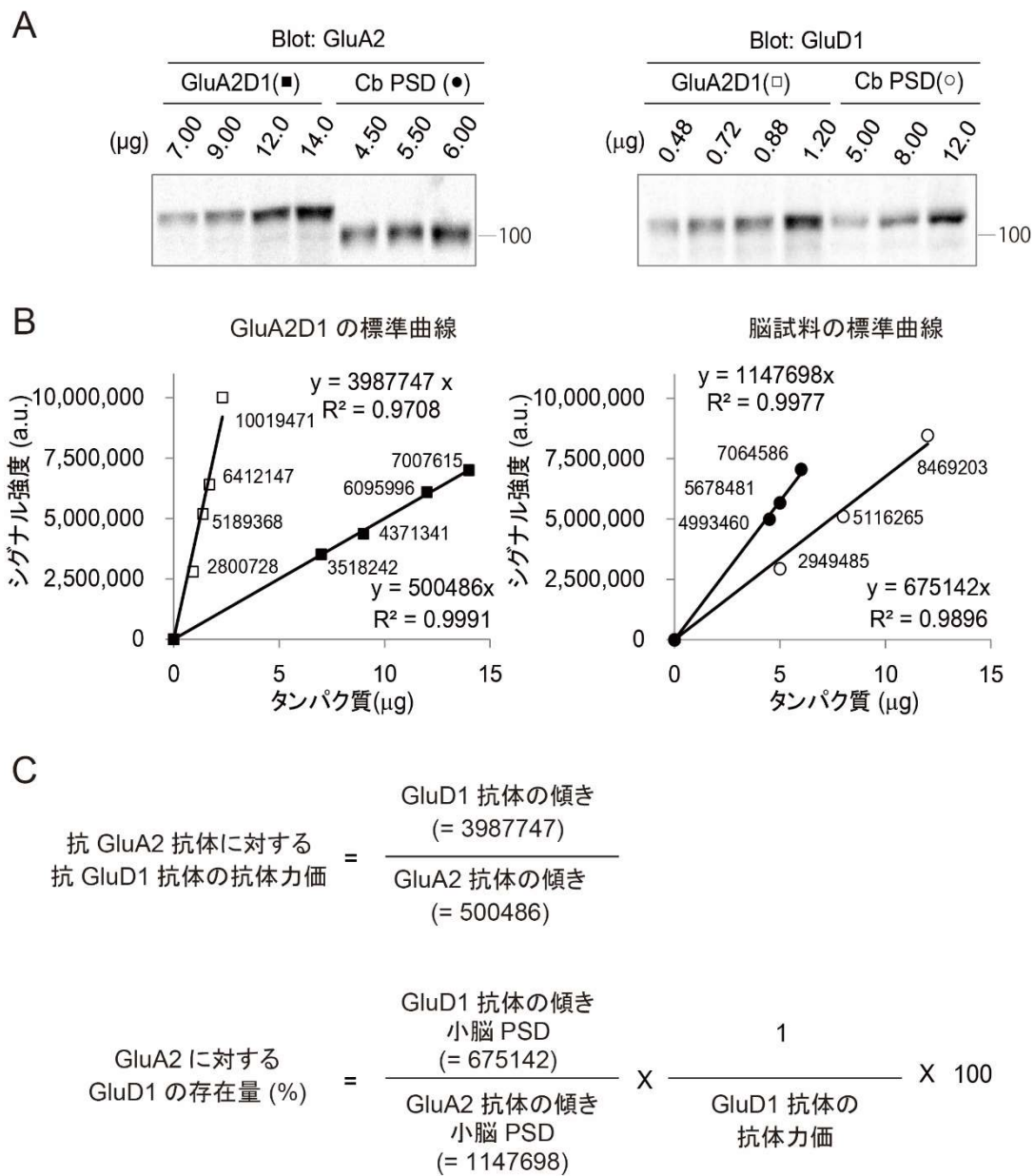


図3 脳試料中の GluD サブユニットの定量法

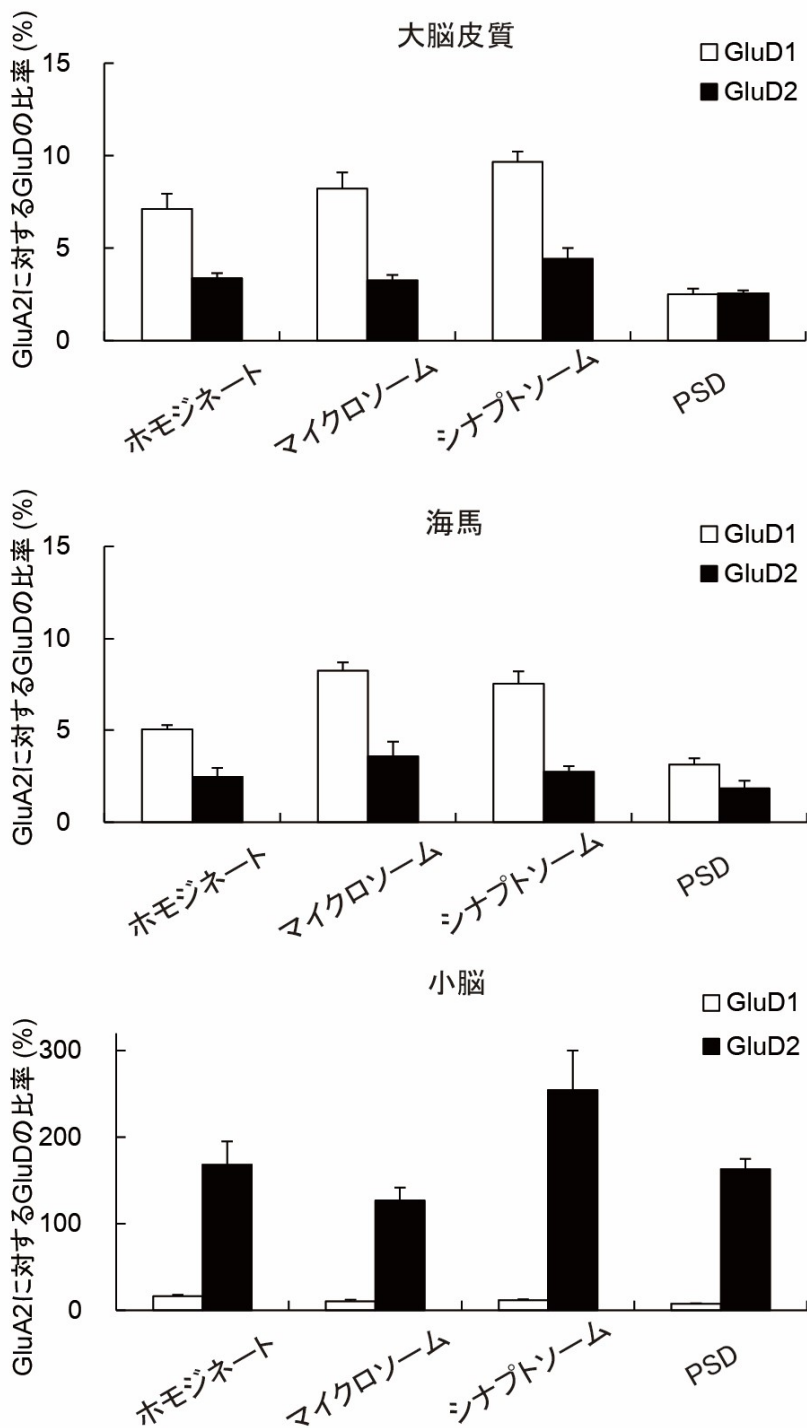


図4 GluA2 に対する各領域画分における GluD サブユニットの発現比率

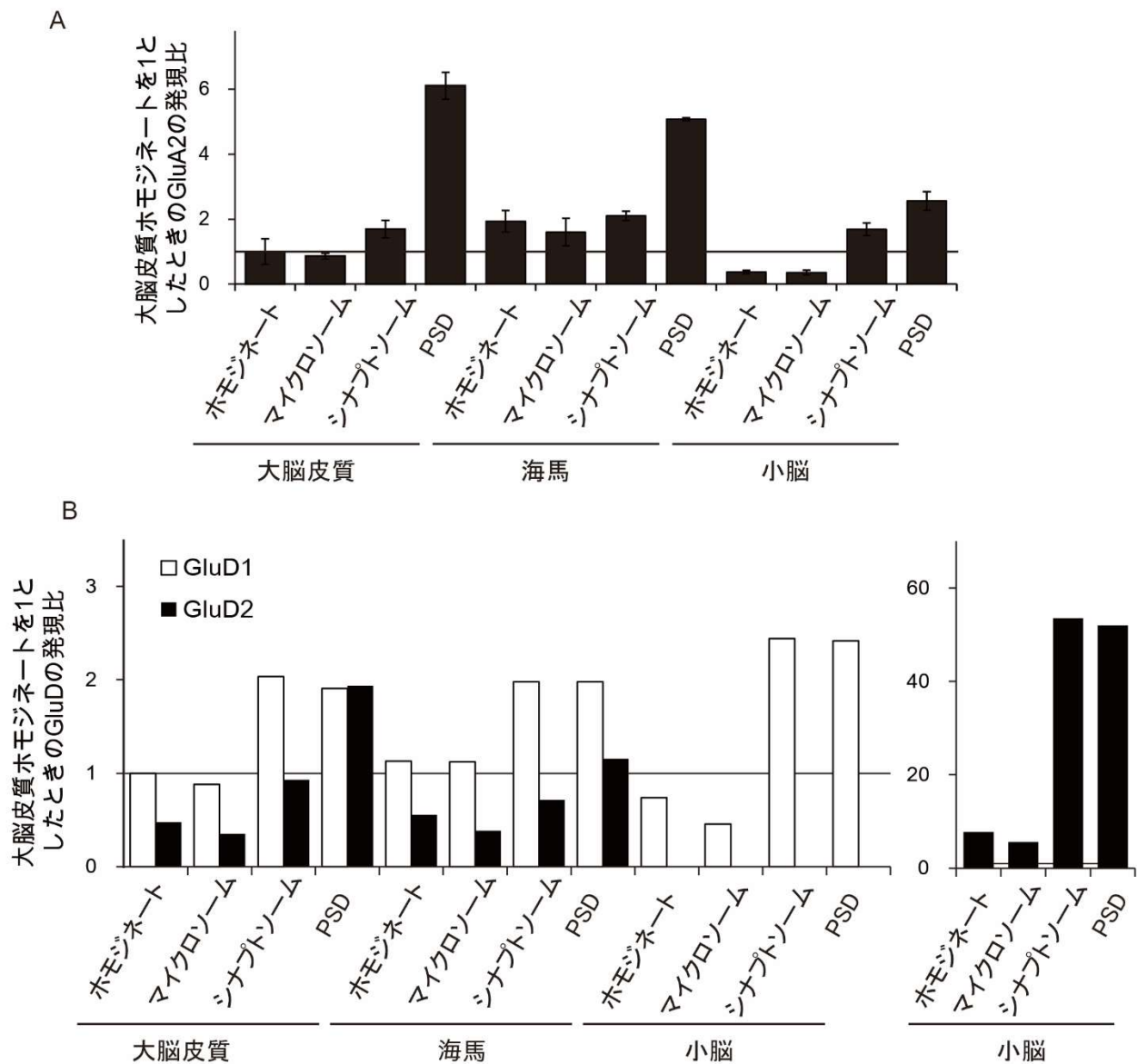


図5 各脳領域画分間の GluA2 および GluD サブユニットの発現量

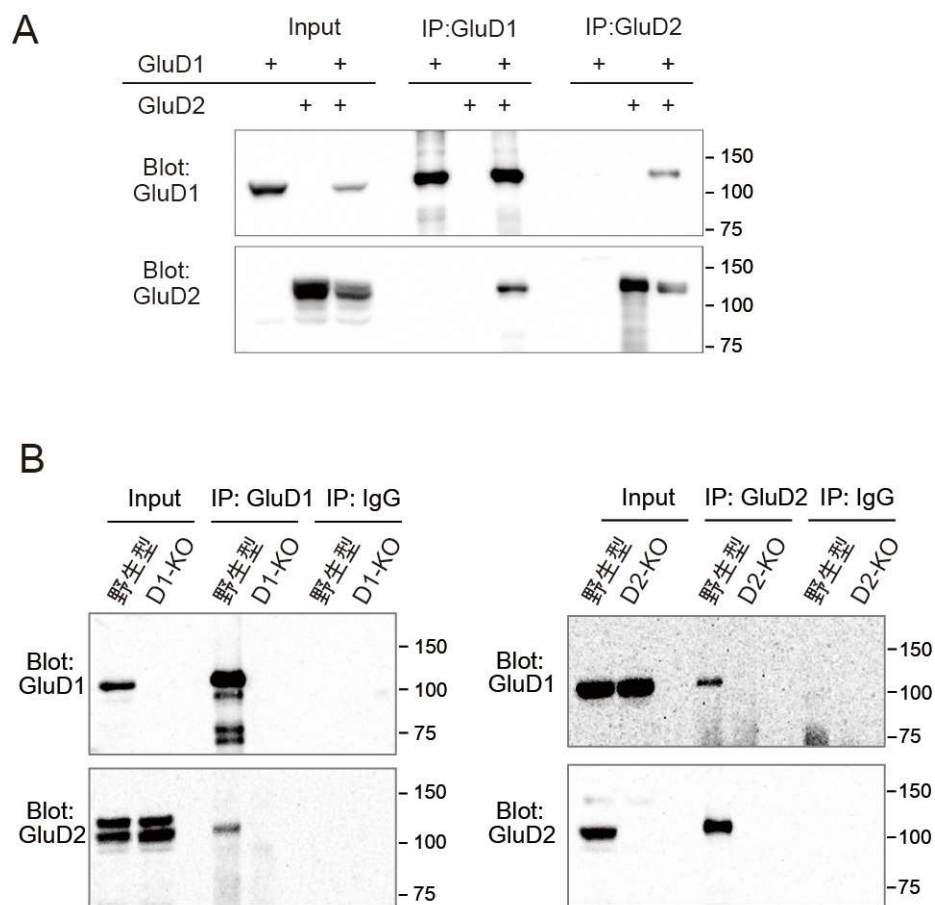


図 6 免疫沈降による GluD サブユニットの構成