

<研究課題> 脳老化に伴う AMPA 受容体翻訳後修飾の同定と生理機能の解明

代表研究者 三重大学大学院医学系研究科 准教授 實木 亨
共同研究者 三重大学大学院医学系研究科 教授 竹本 研
三重大学大学院医学系研究科 助教 設楽 久志

【抄録】

我々は老化に伴い記憶力が低下するが、そのメカニズムはほとんど分かっていない。申請者らはこれまでに AMPA 受容体は記憶の獲得や貯蔵において重要な役割を担うことを示してきた。この知見を元に申請者は、老化脳では AMPA 受容体が老化特異的な翻訳後修飾 (AMPA-PTM) が生じ、その記憶貯蔵機能が低下するとの仮説を立てた。そこで本研究では、まず老化する前の脳 (若年脳) における AMPA 受容体のサブユニット特異的な動態の詳細を明らかにし、老化脳から AMPA 受容体のサブユニットについてのプロテオーム解析を行い、老化脳特異的に生じる AMPAR-PTM の同定と本仮説の証明を目指す。本研究では若年脳において記憶機能の獲得と維持における AMPA 受容体のサブユニット特異的な役割を明らかにした。本研究結果を元として今後は記憶の獲得期や維持期におけるサブユニット特異的な AMPAR-PTM を若年脳・老化脳について解明する。

1. 研究の目的

老化に伴う記憶力の低下は、認知機能の変化として最も顕著に現れる現象の一つである。記憶の形成および保持に関わる神経メカニズムの研究は進展しているものの、老化脳における分子レベルでの記憶機能低下の原因については多くの未解明な要素が残されている。これらの理解の不足により老化による記憶障害の治療法や予防法の開発が困難となっている。記憶の分子基盤として、興奮性伝達を担う AMPA 受容体が中心的な分子であることが知られている。

これまでの研究から AMPA 受容体のサブユニット構成や動態が脳の可塑性の調節に密接に関連することが示されている。申請者らの先行研究において、光依存的分子機能操作法を用いて特定の AMPA 受容体サブユニットによる記憶の形成機構が明らかにされたが、老化脳において AMPA 受容体の機能がどのように変化し、記憶機能低下に寄与するのかは依然として未解明の課題である。

近年の研究により、タンパク質の翻訳後修飾 (post-translational modification, PTM) がその機能や動態を大きく規定することが分かってきた。特に老化脳では PTM が特異的に変化し、それが神経機能の変調を引き起こす可能性が示されている。申請者らは老化脳において AMPA 受容体に特異的な翻訳後修飾 (AMPA-PTM) が生じ、それが記憶機能の低下に関与するという仮説を立てた。本研究では、まず若年脳における AMPA 受容体サブユニットの動態と役割を光依存的分子機能操作法である CALI 法 (chromophore-assisted

light inactivation) を用いて明らかにし、次に老化脳における AMPA 受容体サブユニットの動態とその異常をプロテオーム解析を通じて老化特有の AMPAR-PTM を同定する。これらにより老化に伴う記憶機能低下のメカニズムを解明することを目指す。

2. 研究方法と経過

2-1 動物

ICR マウス (4 週齢 雄) を使用した。マウスは 12 時間明暗サイクルで飼育し、水と餌は自由摂取とした。

2-2 抗体精製と eosin による標識

CALI に用いる抗体は、Hitrap rProteinA FF カラム (GE ヘルスケア) を用いて製造元の指示に従って精製し、先行研究と同様の方法で光増感色素である eosin を標識した。200 μ g の IgG を 0.5 M NaHCO₃ (pH 9.5) 中で、eosin-5- isothiocyanate とともに室温で 30 分間インキュベートした。その後、NAP-5 カラム (GE ヘルスケア) を使用して HBSS に溶液を交換し、遊離色素を除去した。色素の標識の割合 (抗体のモルあたりの色素のモル数) は、GluA1 では 0.9~1.1、GluA1 では 1.8~2.2 とした。

2-3 In vivo CALI 実験

マウスは 2~3% のイソフルランで麻酔し、脳定位固定装置 (KOPF) 内に固定した。標的部位の上部を歯科用ドリルで穴を開け、eosin を標識した AMPA 受容体抗体を脳定位注入装置 (Stoelting) を用いて海馬 CA1 領域に投与した。その後、光学カニユーレ (MFC_200/240-0.22_3.0mm_

ZF1.25_FLT、RWD) を抗体注入部位の上部両側に歯科用セメントを用いて留置した。CALI を行うための光照射は、機械式シャッター (Doric Lenses) と分岐型光ファイバー (BFP 2 00/220/900-0.22 × 1.0 m、FC-2xZF1.25、Doric Lenses) をジルコニアスリーブ (Doric Lenses) により光カニューレに接続してファイバー結合型 532nm DPSS レーザー (Activeray Scientific) により、50mW で 2 分間照射した。同じレーザー出力を両側で導入するために、分岐ファイバーの前にマルチモードファイバー (NA 0.22、550 μm コア、RWD) を挿入した。in vivo CALI 中、動物は 2~3% のイソフルランで麻酔され、ヒートパッドで加温した。in vivo CALI 実験後、脳スライスを準備し、海馬および皮質における出血の有無を確認した。出血が側脳室で確認された動物は、結果から除外した。出血により光照射が妨げられ、動物の学習に影響を及ぼす可能性があるためである。in vivo CALI 後の電気生理学実験を行うため、急性脳スライスの準備前にカニューレを静かに引き抜いた。

2-4 スライスパッチクランプ電気生理学

In vivo CALI 導入後、動物にイソフルランで麻酔をかけ、脳を取り出して直ちに解剖用緩衝液に移した。脳の切片は解剖用緩衝液中で、ビブラトーム (400 μm ; Leica VT1200) を用いて作成した。脳の切片は人工脳脊髄液 (ACSF) 中に 1 時間インキュベート後に記録チャンバーに移した。記録チャンバーは、22°C~25°C で 0.1 mM のピクロトキシシンと 4 mM の 2-クロロアデノシンを含む ACSF で灌流した。細胞内溶液で満たしたホールセル記録用のパッチピペット (4~8 MΩ) を用い、パッチクランプアンプ

(MultiClamp 700B) を使用して、マウス海馬の CA1 錐体ニューロンからシナプス応答を記録した。刺激電極は Schaffer 側枝に配置した。AMPA/NMDA 比は -60mV におけるピーク電流を AMPA 受容体を介したシナプス電流とし、+40mV における刺激開始後 50ms の電流を NMDA 受容体を介したシナプス電流の比として算出した。

2-5 受動的回避学習試験

海馬依存的学习を行うため小原医科産業のマウス用受動的回避学習装置を用いた。装置はギロチン式ドアで仕切られた明室と暗室から構成されている。実験にマウスを慣らすため、条件付けの 2 日前から 1 日あたり 5 分間マウスを実験者によるハンドリングと装置馴化を行なった。学習セッションにおいて、マウスを装置の明室に入れて 30 秒後にギロチ

ン式ドアの仕切りを外し、その後マウスが暗室に入った際に電気ショック (0.4mA、2 秒間) を与えた。電気ショックから 30 秒後にマウスを元のケージに戻した。電気ショックによる学習後の様々なタイミングにおいて動物は再び装置の明室に入れられ、暗室に入るまでの時間を 300 秒をカットオフとして記憶機能として評価した。

3. 研究の成果

3-1 サブユニット特異的な CALI によるシナプス伝達の阻害

GluA1 抗体を用いた CALI もしくは GluA3 抗体を用いた CALI が IA 学習課題によってシナプスに移行した AMPA 受容体を不活化することを検証するために、我々は IA 学習を施した動物から海馬急性脳スライスを作成し、CA1 領域の錐体細胞から whole-cell 記録を行った。シナプスにおける AMPA 受容体の量の指標となる AMPA/NMDA 比について解析した。GluA1 抗体を用いた CALI により学習後 1 時間の海馬 CA1 領域の錐体細胞の AMPA/NMDA 比の減少がみられ、GluA3 抗体を用いた CALI により学習後 24 時間の海馬 CA1 領域の錐体細胞の AMPA/NMDA 比の減少についても確認することができた。これらの結果から AMPA 受容体のサブユニット特異的な CALI により AMPA 受容体を介したシナプス伝達が抑制されたことが示された。

3-2 学習における各 AMPA 受容体サブユニットの役割

CALI 法 (chromophore-assisted light inactivation) を用いて GluA1 サブユニットにより構成された AMPA 受容体の学習における役割を調べた。4 週齢のマウスに eosin をラベルした GluA1 抗体 (eosin-GluA1 抗体) または eosin をラベルした抗 Myc (eosin-Myc 抗体) を定位注入装置で海馬 CA1 領域背側に注入し、光学カニューレの先端を両背側海馬 CA1 領域に向けて埋め込んだ。カニューレの手術後、マウスを受動的回避学習 (IA 学習) で条件付けし、条件付けからそれぞれ 1 時間・2 時間・4 時間・24 時間後にカニューレを通して 532 nm のレーザーを海馬に照射した。その後翌日に記憶機能の評価のために行動テストを行った。IA 学習から 1 時間・2 時間に CALI を実施した実験において、eosin-Myc 抗体を注入した動物では、暗室に入るまでの潜時に光照射は影響なかったが、eosin-GluA1 抗体を注入したマウスでは光照射により暗室に入るまでの潜時が有意に短縮した。一方、学習から 4 時間・24 時間において、eosin-GluA1 抗体を注入したマウスでは光照射による暗室に入るまでの潜時の減少は

みられなかった。これらの結果から eosin-GluA1 抗体を用いた CALI により学習後 1~2 時間においてのみ獲得した恐怖記憶を消去したことを示している。

次に CALI を用いて GluA2/3 サブユニットにより構成された AMPA 受容体(GluA3 は基本的に GluA2 サブユニットと結合し受容体を形成する)の学習における役割を調べた。4 週齢のマウスに eosin をラベルした GluA3 抗体(eosin-GluA3 抗体)または eosin をラベルした抗 Myc(eosin-Myc 抗体)を定位注入装置で海馬 CA1 領域背側に注入し、光学カニューレの先端を両背側海馬 CA1 領域に向けて埋め込んだ。カニューレの手術後、マウスを受動的回避学習 (IA 学習) で条件付けし、条件付けからそれぞれ 1 時間・2 時間・4 時間・24 時間後にカニューレを通して 532 nm のレーザーを海馬に照射した。その後翌日に記憶機能を評価するために行動テストを行った。eosin-Myc 抗体を注入した動物では、IA 学習からどの時間に光照射を実施した実験においても暗室に入るまでの潜時に光照射は影響なかった。一方、eosin-GluA3 抗体を注入したマウスでは学習後 4 時間・24 時間における光照射により暗室に入るまで潜時が有意に短縮したが、学習から 1 時間・2 時間においては、eosin-GluA3 抗体を注入したマウスでは光照射による暗室に入るまでの潜時の減少はみられなかった。これらの結果から eosin-GluA1 抗体を用いた CALI により学習後 4~24 時間における維持された恐怖記憶を消去したことを示している。本実験により、GluA1 は学習後 2 時間までの記憶の獲得を担い、GluA 3 は学習後 4 時間以降の記憶の維持を担うことが示唆された。

4. 今後の課題

本研究により、若年脳における記憶の獲得と維持に対する AMPA 受容体のサブユニット特異的な役割が明らかになった。この成果を基盤に老化に伴う記憶機能低下のメカニズム解明に向けたさらなる研究が必要である。まず、老化脳において AMPA 受容体サブユニットに特異的な翻訳後修飾 (AMPA-PTM) がどのように変化するかを詳細に解析する必要がある。次に、これらの AMPA-PTM が記憶の獲得や維持に与える影響を、若年脳との比較を通じて明確化することが求められる。これらの課題に取り組むことで老化に伴う記憶力低下の基盤となる分子機構の全容解明が見込まれるとともに、認知症等の新たな治療戦略の開発に向けた一助となることが期待される。

5. 研究成果の公表方法

本研究成果については、国内外の学会で発表し、さらには国際学術雑誌へ投稿する。

【学会発表】日本神経科学会、日本生理学会、北米神経科学会など

【論文】 投稿雑誌未定

以上

Post-Translational Regulation of AMPA Receptors: A Key to Aging-Associated Cognitive Decline

Primary Researcher: (Susumu Jitsuki)
(Associate Professor), (Mie University Graduate School of Medicine)

Co-researchers: (Kiwamu Takemoto)
(Professor), (Mie University Graduate School of Medicine)
(Hisashi Shidara)
(Assistant Professor), (Mie University Graduate School of Medicine)

Memory decline is a hallmark of aging, yet the underlying molecular mechanisms remain largely elusive. Previous studies have established that AMPA receptors (AMPA receptors) play a pivotal role in memory acquisition and storage. Based on these findings, we hypothesize that in the aging brain, AMPARs undergo aging-specific post-translational modifications (AMPA-PTMs), which compromise their ability to support memory storage. To test this hypothesis, we first delineated the subunit-specific dynamics of AMPARs in young brains, elucidating their distinct roles in memory acquisition and retention. In this study, we first aim to clarify the detailed dynamics of AMPA receptor subunits in the brain before aging (young brain), and then to perform proteomic analysis of AMPA receptor subunits in the aging brain, with the aim of identifying AMPAR-PTM that occurs specifically in the aging brain and proving this hypothesis. In this study, we clarified the role of AMPA receptor subunits in the acquisition and maintenance of memory function in the young brain. These insights lay the groundwork for uncovering the molecular basis of age-related memory decline and identifying potential therapeutic targets.