

迅速ケミカルラベル化法による AMPA 型グルタミン酸受容体の精密動態解析

曾我 恭平, 清中 茂樹

1. はじめに

我々の脳内では神経細胞どうしが複雑な回路を形成することで高次脳機能を発現する。神経細胞間の情報伝達には神経伝達物質の授受が必須であり、とりわけその受け取りを担う神経伝達物質受容体は多くの研究対象となっている。グルタミン酸は興奮性シグナルを担う神経伝達物質であり、その受容体はイオンチャネル型である AMPA 型グルタミン酸受容体 (AMPA), NMDA 型グルタミン酸受容体 (NMDAR), カイニン酸受容体, および GPCR 型である代謝型グルタミン酸受容体に大別される。近年の研究によって, AMPAR は記憶・学習に深く関与しており, 細胞膜上での発現量変化が記憶の基盤である長期増強・長期抑制に重要であることがわかってきた¹⁾。また, 細胞膜上での発現量の低下はアルツハイマー病等の疾患にも関与するとされ, AMPAR の細胞膜上での精密な動態解析は神経科学における重要課題の一つである。

2. 従来の AMPAR 可視化およびラベル化技術

従来, AMPAR の可視化・動態解析を行う際には, GFP などの蛍光タンパク質を融合する方法が広く用いられる。しかし, 細胞膜上, 細胞内にかかわらず蛍光を発するため, 細胞膜上の AMPAR を定量解析することは困難である。そこで pHluorin や super ecliptic pHluorin (SEP) といった pH 感受性の GFP が頻度高く用いられる²⁾。これらは細胞膜上では強い蛍光を発するが, 細胞内の低 pH 条件では蛍光が弱められるため, 細胞膜上選択的な可視化が可能となる。実際に, シナプス可塑性時に起こる AMPAR のエキサイトーシスやエンドサイーシスの解析に応用される

が³⁾, SEP は細胞内の pH 変化に大きく依存することに留意する必要性も指摘されている⁴⁾。また, これらの蛍光タンパク質は自身のサイズが約 25 kDa と大きく, AMPAR の動態に影響を与えることが懸念される。異なるアプローチとして, ペプチドタグ⁵⁾ や, genetic code expansion により非天然アミノ酸を導入する方法⁶⁾ なども報告されているが, いずれにしる遺伝子工学的な改変が必要となる。遺伝子改変した AMPAR は, 多くの場合において過剰発現系となってしまう, その局在やアクセサリタンパク質との相互作用といった内在の機能が損なわれている懸念がある。そのため, 神経細胞に内在する AMPAR を選択的にラベル化および可視化する方法の開発が求められている。

3. 神経細胞に内在する AMPAR のラベル化・可視化

そのような背景から, 我々は遺伝子操作を行わず AMPAR をラベル化する方法の開発に着手した。リガンドの認識に基づき標的タンパク質を化学ラベルできるリガンド指向性化学⁷⁾に着目し, その中でも細胞膜タンパク質のラベル化に適した ligand-directed acyl imidazole (LDAI) 化学⁸⁾を用いることとした。そのラベル化剤としては, AMPAR の阻害剤である PFQX と蛍光色素を反応部位 (アシルイミダゾール基) を介して連結した小分子化合物である CAM2 reagent を設計した⁹⁾。CAM2 reagent を培地に加えることで, AMPAR と PFQX の相互作用依存的に AMPAR 表面に対して共有結合で蛍光色素を修飾することができる (図 1a)。この手法を用いて HEK293T 細胞に一過的に発現させた AMPAR, および培養神経細胞に内在的に発現する AMPAR の選択的なラベル化に成功している⁹⁾。さらに, 小分子化合物である CAM2 reagent の高い組織浸透性により, 急性脳スライス切片における AMPAR のラベル化も可能である。

しかし, この手法にはいくつかの課題も残された。一つ目が, ラベル化に 1~4 時間かかるため, 生理的な温度である 37°C では膜表層でラベル化された AMPAR の一部はエンドサイーシスによって細胞内に取り込まれてしまうことである。そのため, 膜表層の AMPAR を定量的に解析するためには, エンドサイーシスを抑制できる 17°C 下でラベル化をする必要がある。もう一つの課題が, 疎水的な

名古屋大学大学院工学研究科生命分子工学専攻 (〒464-8603 名古屋市中種区不老町)

Two-step chemical labeling to quantify AMPA receptor trafficking in neuron

Kyohei Soga and Shigeki Kiyonaka (Department of Biomolecular Engineering, Graduate School of Engineering, Nagoya University, Furo-cho, Chikusa-ku, Nagoya 464-8603, Japan)

DOI: 10.14952/SEIKAGAKU.2022.940292

© 2022 公益社団法人日本生化学会

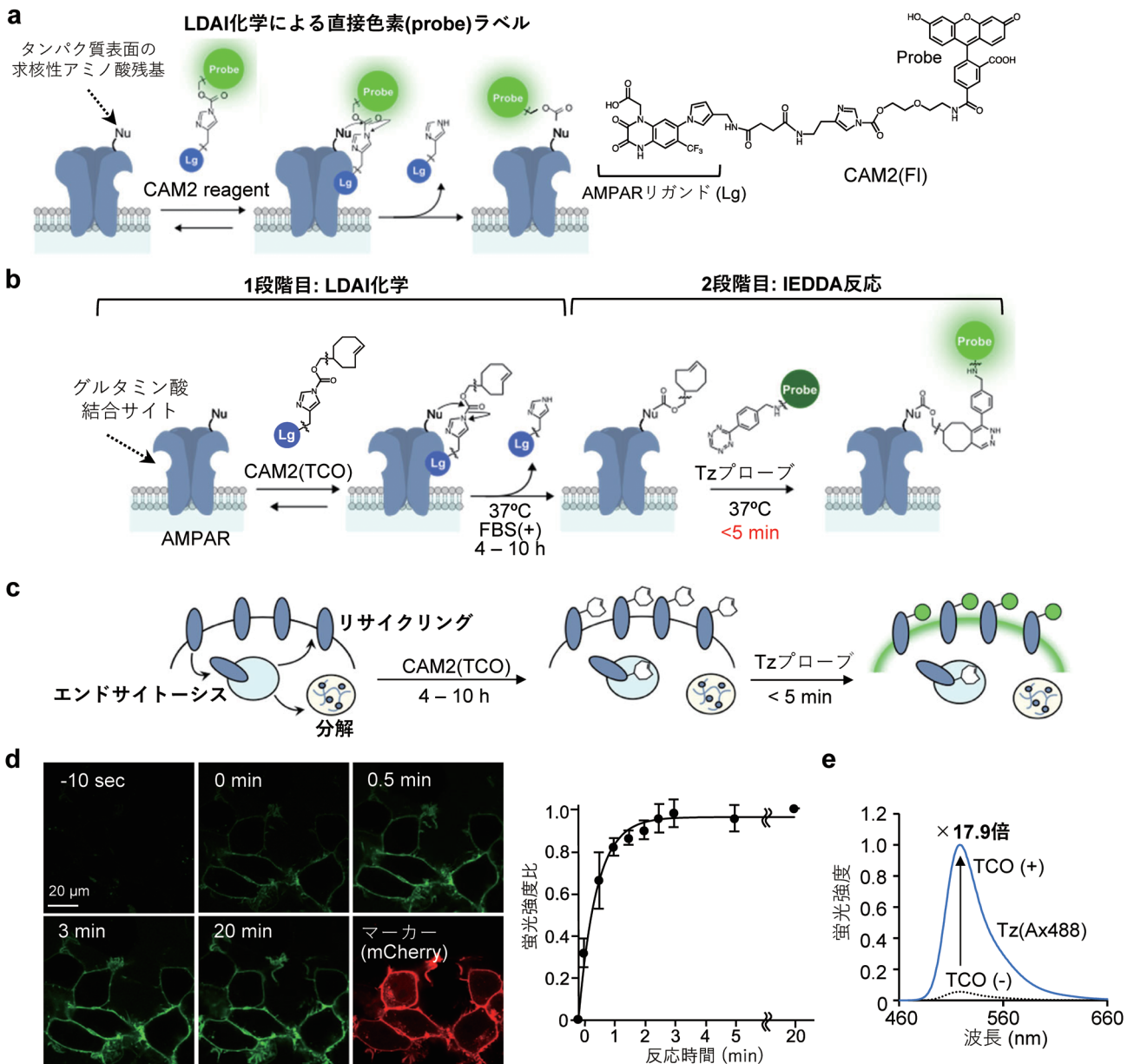


図1 リガンド指向性2段階ラベル化法による細胞膜表層 AMPAR のラベル化
 (a) LDAI化学による色素の直接ラベル化の模式図およびCAM2 reagentの構造式. (b) リガンド指向性2段階ラベル化法の模式図. (c) 生細胞における細胞膜表層 AMPAR の2段階ラベル化の模式図. (d) 共焦点レーザー顕微鏡によるIEDDA反応の反応時間解析. ラベル化後の各時間の共焦点レーザー顕微鏡のイメージング像 (左図), および細胞表面の蛍光強度の定量結果 (右図). (e) TzプローブのTCO依存的な蛍光turn-on性の評価. 文献10より引用改変.

色素が血清中のアルブミンに非特異的に吸着してしまうため, 血清を除いた培地中あるいは緩衝液中でラベル化を行う必要がある点である. このような非生理的な条件下で細胞を長時間インキュベーションすることは AMPAR の挙動に影響を与えるだけでなく, 神経細胞へのダメージにつながるため, 長時間の動態解析は困難であった.

4. リガンド指向性2段階ラベル化法の開発

そこで我々は, 生理的条件下で迅速かつ特異的に細胞膜表層の AMPAR をラベル化できる手法として, LDAI化学と生体直交化学として知られる逆電子要請型ディールス・アルダー (IEDDA) 反応を組み合わせた2段階ラベル化法を考案した¹⁰⁾ (図1b). この方法では, 1段階目の反応で, LDAIラベル化剤であるCAM2 (TCO) を用いて, AMPAR にトランスシクロオクテン (TCO) 基を標識する. ここ

では血清を含む培地中、37°Cで4~10時間ラベル化を行い、そのとき膜上にいた成分のみならず、リサイクリングされて再度膜上に出てきた成分など、1回細胞膜上に発現したAMPARをすべてTCOラベル化する(図1c)。続いて2段階目として、色素を修飾したテトラジン(Tz)プローブで処置すると、TCOとTz間で非常に速いIEDDA反応¹¹⁾が起こる。細胞膜透過性を持たないTzプローブを用いることで、細胞膜表層に存在するAMPARのみをラベル化することができる。AMPARを一過的に発現させたHEK293T細胞を用いたウェスタンブロッティング、および蛍光イメージングにより、細胞膜表層のAMPARを3分以内で選択的にラベル化できることを確認した(図1d)¹⁰⁾。

この方法は、以下の三つの観点において、前述(3項)のLDAI化学による色素の直接ラベル化に比べて優れる。一つ目は、ラベル化条件である、CAM2(TCO)を用いた場合、疎水的な色素を含まず血清成分への吸着が抑えられるため、血清を含む培地中でラベル化を行える。この2段階ラベル化においても1段階目のラベル化では長時間のインキュベーションが必要であり、エンドサイトーシスによってTCOラベルされたAMPARの一部は細胞内に取り込まれる。しかし、2段階目の迅速な色素ラベルにより細胞膜表層選択性が達成されるため、エンドサイトーシスを抑制するための非生理的条件下(17°C)にする必要がない。実際に、細胞にとって生理的な条件と考えられる37°Cでラベル化でき、細胞に与えるダメージは最小限に抑えられるようになった。

二つ目は、Tzプローブの色素部分を変えることでさまざまな色素をその特徴にかかわらずラベル化できる点である。LDAI化学による色素の直接ラベル化では、色素ごとにCAM2 reagentを合成しなければならないという煩雑さがあったが、Tzプローブは合成も簡便であり、いくつかは市販でも手に入る。また、2段階目のIEDDA反応を用いることで、小分子に限らず、中分子に分類されるSeTau-647もラベル化することができた。特に、SeTau-647は退色に強く、蛍光寿命が長いことが特徴の蛍光色素であり、蛍光寿命顕微鏡や1分子イメージングにも用いることができる。また、ビオチンのような機能性分子をラベル化することも可能であり、用途に応じてさまざまな種類のプローブをラベル化できる。

三つ目の利点として、Tzプローブの蛍光のturn-on性があげられる。Tzに修飾された色素は蛍光がクエンチされるが、TCO基と反応することでその消光が回復することが知られている¹²⁾。実際に、Alexa488色素を有するTz(Ax488)は、TCO基と反応することにより蛍光強度が17.9倍増大した(図1e)。この現象はライブイメージングの際に非常に有用である。Tzプローブは加えたままでもバックグラウンドがほとんどなく、細胞膜表層でTCO基

と反応したときのみ蛍光強度が増大するため、S/N比が非常に高い蛍光イメージングが可能となる。

5. 2段階ラベル化によるAMPARの精密動態解析

AMPARの動態解析に関しては、蛍光タンパク質の導入、細胞表面ビオチン化アッセイ、放射性同位体を用いた代謝ラベルなどにより、側方拡散速度、リサイクリングの過程、タンパク質寿命(半減期)が報告されている。これらの方法は有用であるが、それぞれで解析できる現象は限定的である。一方で、我々の2段階ラベル化法は、生理的条件下で迅速に膜表層のAMPARをラベル化でき、短時間および長時間の動態解析が可能である。

そこで、初代培養神経細胞を用いて、神経細胞に内在的に発現するAMPARのラベル化を検討した。共焦点レーザー顕微鏡では、樹状突起に沿った粒上のラベル化シグナルが得られ、興奮性シナプスの足場タンパク質として知られるPSD95と局在が一致した(図2a)。数分という蛍光ラベル化時間を考えると、細胞表層のAMPARをラベル化できたと考えられる。次に、神経細胞表面におけるAMPARの分布について蛍光寿命顕微鏡を用いて調べた。一般的に、イメージングでみえている蛍光には目的の色素由来のものだけではなく、自家蛍光が混在しているが、それぞれの色素が有する蛍光寿命は異なる。修飾した蛍光色素が特徴的な蛍光寿命を有する場合には色素由来の蛍光を抽出して観察できるため、2段階目にラベル化する蛍光色素としてSeTau-647を採用した。SeTau-647は蛍光寿命が長く、光退色に強いいため蛍光寿命顕微鏡を用いた方法に適している。実際にSeTau-647を有するTz(ST647)を用いてラベル化を行い、そこから樹状突起とスパインにおけるAMPARの割合を算出すると、スパインの方が約3.3倍存在割合が高いことがわかった(図2b)。また、SeTau-647を用いることで、1分子イメージングや超解像顕微鏡によるさらに詳細な動態解析につながると期待される。

次に、AMPARタンパク質の寿命解析を行った。蛍光顕微鏡を用いたイメージングではシナプスの200~500nmという微小空間で細胞の内外を区別することは困難であるため、ウェスタンブロッティングにより評価を行った。その結果、神経細胞に内在するAMPARの半減期は33.2時間と算出でき(図3a)、過去の代謝ラベルで得られた結果と同等の値であった。同じ解析をHEK293T細胞に強制発現させたAMPARに適用したところ、半減期が5.3時間であった。すなわち、神経細胞に内在するAMPARのタンパク質寿命は、HEK293T細胞に発現させた場合と比べて約6倍長いことが示された。

AMPARの寿命の違いのメカニズムを探る上で、リサイクリングに着目した。神経細胞に発現するAMPARはいっ

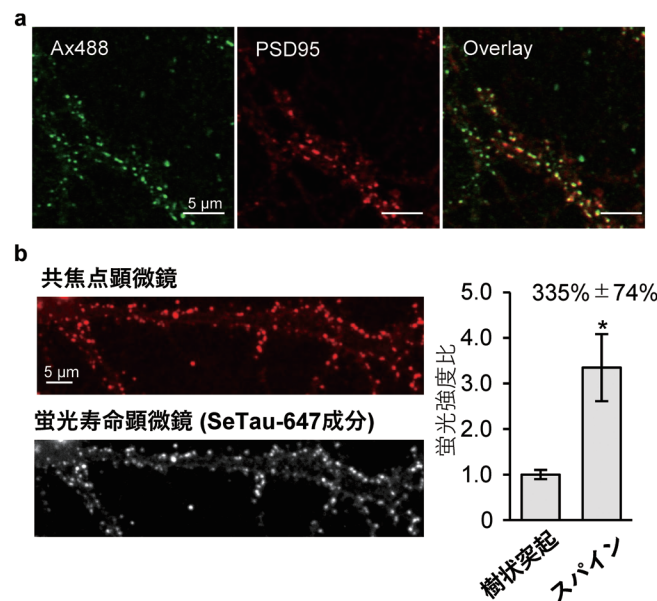


図2 初代培養神経細胞を用いた内在性 AMPAR の2段階ラベル化

(a) 初代培養神経細胞の免疫染色. 2段階ラベル化法で Alexa488 をラベル化した後, 免疫染色により興奮性シナプスの足場タンパク質として知られる PSD95 を染色. (b) 蛍光寿命顕微鏡による細胞膜表層 AMPAR のイメージング像. 共焦点顕微鏡 (左上図) と蛍光寿命顕微鏡 (左下図). 蛍光寿命顕微鏡で SeTau-647 由来の蛍光を抽出し, 樹状突起とスパインにおける AMPAR の割合を算出 (右図). 文献10 より引用改変.

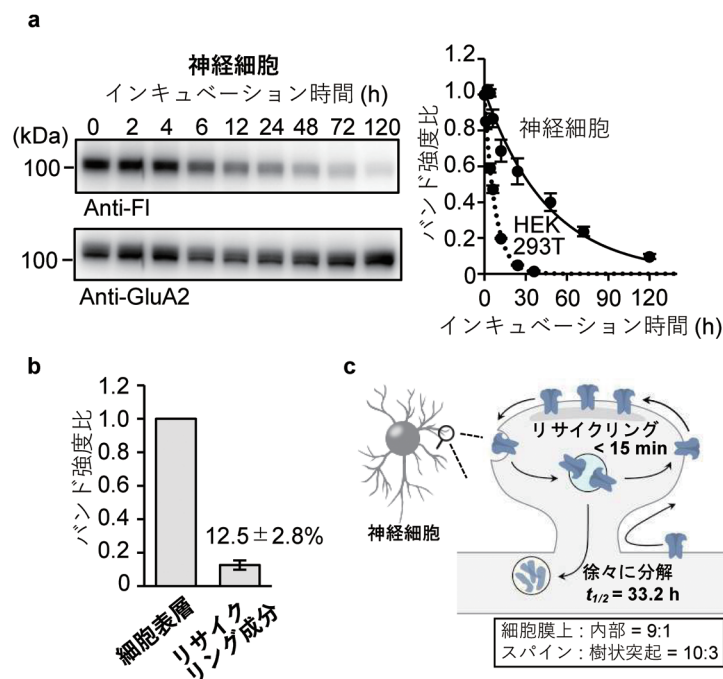


図3 2段階ラベルによる AMPAR の精密動態解析

(a) ウェスタンブロッティングによる AMPAR の寿命の解析. ウェスタンブロッティングの結果 (左図), およびバンド強度の定量解析結果 (右図). (b) AMPAR のリサイクリングの解析結果. (c) 本研究で明らかにした神経細胞における AMPAR の動態の模式図. 文献10 より引用改変.

たん細胞内にエンドサイトーシスされた後, 再び細胞膜上にリサイクリングされることが知られる. その生理的意義は, 細胞内に一定数の AMPAR を蓄えておくことで, 刺

激に対して細胞表層の発現量増加という迅速な応答を可能にすることにあると考えられている¹³⁾. 2段階ラベル化法によるリサイクリングの解析にはパルスチェイスの戦略

を採用した。最初に2段階ラベル化法により細胞膜表層のAMPAをある色素でラベル化しておく。15分のインキュベーション後再度別の色素で2段階目のラベル化を行うことで、15分間でリサイクリングされ細胞膜に出てきた成分の定量が可能となる。その結果、神経細胞では12.5%がリサイクリングで膜上に発現してくることが明らかとなった(図3b)。一方で、HEK293T細胞ではリサイクリングは確認されなかった。すなわち、神経細胞ではリサイクリングが効率よく行われることが明らかとなり、HEK293T細胞よりも神経細胞の方がAMPAの寿命が大幅に長い分子メカニズムと考えられる。神経細胞においては、TARP, SAP97, GRIPといった種々のAMPA相互作用タンパク質が存在する¹³⁾。AMPAに対するキナーゼも含めて、これらのタンパク質が高効率なリサイクリングやシナプス上での安定性に寄与すると考えられている。一方、蛍光タンパク質を融合させたAMPAを過剰発現させる場合は、これらのタンパク質との相互作用を損なう懸念があり、小分子プローブで神経細胞に内在するAMPAをラベル化することが有用だと示す結果ともいえる。

6. おわりに

我々は、細胞表層AMPAの迅速かつ特異的なラベル化が可能な2段階ラベル化法の開発に成功した¹⁰⁾。従来の遺伝子工学を用いたラベル化法と比較して、受容体への摂動を最小限に抑え、120時間という長時間のインキュベーションでも細胞にダメージを与えない、生理的な条件下で行えることが示された。将来展望として、記憶・学習時のAMPAの定量的な解析が可能となり、その分子メカニズムの解析につながると期待される。小分子プローブのみでラベル化が可能であるため、神経疾患の診断にも応用可能であると期待される。また、本手法はリガンド部位を変えることで他の受容体にも適用可能な方法である。実際に我々はNMDARに対するラベル化および動態解析にも成功しており¹⁰⁾、海外のグループではリガンド指向性化学によるオピオイド受容体の標識に成功している¹⁴⁾。中枢神経系には他にもさまざまな神経伝達物質受容体が存在するので、それらも同時に可視化し、動態を解析することができれば、脳機能の解析が飛躍的に進むと期待される。

謝辞

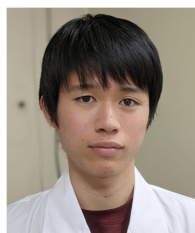
最後に、本研究は、著者(清中)が京都大学大学院工学研究科・浜地研究室在籍時に開始したものであり、浜地格教授をはじめとして、中心的に研究を行ってくれた若山氏、小島氏に心よりお礼申し上げます。また、慶応大学医学部生理学教室・柚崎研究室との共同研究の成果であり、柚崎通介教授および関係者の皆様に心よりお礼申し上げます。

文 献

- 1) Huganir, R.L. & Nicoll, R.A. (2013) AMPARs and synaptic plasticity: The last 25 years. *Neuron*, **80**, 704–717.
- 2) Sankaranarayanan, S., Angelis, D.D., Rothman, J.E., & Ryan, T.A. (2000) The use of phluorins for optical measurements of presynaptic activity. *Biophys. J.*, **79**, 199–208.
- 3) Kopec, C.D., Li, B., Wei, W., Boehm, J., & Malinow, R. (2006) Glutamate receptor exocytosis and spine enlargement during chemically induced long-term potentiation. *J. Neurosci.*, **26**, 2000–2009.
- 4) Rathje, M., Fang, H., Bachman, J.L., Anggono, V., Gether, U., Huganir, R.L., & Madsen, K.L. (2013) AMPA receptor pHluorin-GluA2 reports NMDA receptor-induced intracellular acidification in hippocampal neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **110**, 14426–14431.
- 5) Sekine-Aizawa, Y. & Huganir, R.L. (2004) Imaging of receptor trafficking by using α -bungarotoxin-binding-site-tagged receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 17114–17119.
- 6) Neubert, F., Beliu, G., Terpitz, U., Werner, C., Geis, C., Sauer, M., & Dose, S. (2018) Bioorthogonal click chemistry enables site-specific fluorescence labeling of functional NMDA receptors for super-resolution imaging. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **57**, 16364–16369.
- 7) Shiraiwa, K., Cheng, R., Nonaka, H., Tamura, T., & Hamachi, I. (2020) Chemical tools for endogenous protein labeling and profiling. *Cell Chem. Biol.*, **27**, 970–985.
- 8) Fujishima, S.H., Yasui, R., Miki, T., Ojida, A., & Hamachi, I. (2012) Ligand-directed acyl imidazole chemistry for labeling of membrane-bound proteins on live cells. *J. Am. Chem. Soc.*, **134**, 3961–3964.
- 9) Wakayama, S., Kiyonaka, S., Arai, I., Kakegawa, W., Matsuda, S., Ibata, K., Nemoto, Y.L., Kusumi, A., Yuzaki, M., & Hamachi, I. (2017) Chemical labelling for visualizing native AMPA receptors in live neurons. *Nat. Commun.*, **8**, 14850.
- 10) Ojima, K., Shiraiwa, K., Soga, K., Doura, T., Takato, M., Komatsu, K., Yuzaki, M., Hamachi, I., & Kiyonaka, S. (2021) Ligand-directed two-step labeling to quantify neuronal glutamate receptor trafficking. *Nat. Commun.*, **12**, 831.
- 11) Blackman, M.L., Royzen, M., & Fox, J.M. (2008) Tetrazine ligation: Fast bioconjugation based on inverse-electron-demand Diels–Alder reactivity. *J. Am. Chem. Soc.*, **130**, 13518–13519.
- 12) Devaraj, N.K., Hilderbrand, S., Upadhyay, R., Mazitschek, R., & Weissleder, R. (2010) Bioorthogonal turn-on probes for imaging small molecules inside living cells. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **49**, 2869–2872.
- 13) Shepherd, J.D. & Huganir, R.L. (2007) The cell biology of synaptic plasticity: AMPA receptor trafficking. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, **23**, 613–643.
- 14) Arttamangkul, S., Plazek, A., Platt, E., Jin, H., Murray, T.F., Birdsong, W.T., Rice, K.C., Farrens, D.L., & Williams, J. (2019) Visualizing endogenous opioid receptors in living neurons using ligand-directed chemistry. *eLife*, **8**, e49319.

著者寸描

●曾我 恭平（そが きょうへい）



名古屋大学大学院工学研究科生命分子工学専攻博士前期課程2年。

■略歴 1997年三重県に生る。2020年名古屋大学工学部化学・生物工学科卒業。

■研究テーマと抱負 生体に内在するタンパク質の機能を細胞種選択的に操作できるようなケミカルバイオロジーツールの開発を目指す。

■趣味 ダーツ。

●清中 茂樹（きよなか しげき）



名古屋大学大学院工学研究科生命分子工学専攻教授。博士（工学）。

■略歴 1975年山口県に生る。98年九州大学工学部卒業。2002年同大学院工学府博士課程修了。03年日本学術振興会特別研究員（PD）。05年京都大学大学院工学研究科助教。10年京都大学大学院工学研究科准教授。19年より現職。

■研究テーマと抱負 化学的および遺伝子工学的な方法を駆使して、中枢神経を中心に生命機能の本質を明らかにしたいと思っています。

■ウェブサイト <http://www.chembio.nagoya-u.ac.jp/labhp/life1/index.html>

■趣味 たまに家族で行う Amazon prime での映画観賞。