

Title	神経機能障害をもたらすAMPA受容体サブユニットタンパク異常の検討
Sub Title	Study of AMPA receptor dysfunctions in CNS diseases
Author	鈴木, 岳之(SUZUKI, TAKESHI) 郭, 伸(KWAK, SHIN) 増野, 匡彦(MASHINO, TADAHIKO) 飯島, 史朗(IIJIMA, SHIRO)
Publisher	
Publication year	2009
Jtitle	科学研究費補助金研究成果報告書 (2008.)
JaLC DOI	
Abstract	イオンチャネル型グルタミン酸受容体の機能異常が孤発性筋萎縮性側索硬化症の発症要因であるという仮説から、AMPA受容体のイオン選択透過性が生じる原因の解明と、人工的にイオン透過性を変化させた病体モデルの作成を行った。その結果、in vitro系での病態モデル系および、遺伝子改変マウスの作成に成功し、疾患治療研究への足がかりが出来た。
Notes	研究種目：基盤研究(C) 研究期間：2006～2008 課題番号：18590239 研究分野：医歯薬学 科研費の分科・細目：基礎医学・薬理学一般
Genre	Research Paper
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KAKEN_18590239seika

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the KeiO Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

平成 21 年 6 月 16 日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2006～2008
 課題番号：18590239
 研究課題名（和文） 神経機能障害をもたらす AMPA 受容体サブユニットタンパク異常の検討
 研究課題名（英文） Study of AMPA receptor dysfunctions in CNS diseases

研究代表者：
 鈴木 岳之（SUZUKI TAKESHI）
 慶應義塾大学・薬学部・准教授
 研究者番号：90187740

研究成果の概要：

イオンチャンネル型グルタミン酸受容体の機能異常が孤発性筋萎縮性側索硬化症の発症要因であるという仮説から、AMPA 受容体のイオン選択透過性が生じる原因の解明と、人工的にイオン透過性を変化させた病体モデルの作成を行った。その結果、*in vitro* 系での病態モデル系および、遺伝子改変マウスの作成に成功し、疾患治療研究への足がかりが出来た。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	1,500,000	0	1,500,000
2007 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2008 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	600,000	4,100,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・薬理学一般

キーワード：中枢・末梢神経、グルタミン酸受容体、AMPA 受容体、神経変性疾患、筋萎縮性側索硬化症、カルシウム、

1. 研究開始当初の背景

筋萎縮性側索硬化症 (amyotrophic lateral sclerosis, ALS) は大脳皮質運動野から下行して脊髄にいたる上位運動神経および脊髄前角運動神経が選択的に障害される原因不明の進行性神経変性疾患である。遺伝性 ALS に関する研究は進んできているが、疾患の大多数 (90%以上) を占める孤発性 ALS の発症機序は不明であり、治療方法もない。治療戦略の開発のためには発症機序の解明が

不可欠である。その発症機序に関して、我々の研究グループ、AMPA 受容体を介した情報伝達の異常という可能性を示した。

2. 研究の目的

本研究においてはグルタミン酸受容体のうち、特に孤発性 ALS の疾患発症に重要な役割を持っていると考えられるグルタミン酸作動性神経伝達、特にカルシウム透過性グルタミン酸 AMPA 受容体に関して注目した。AMPA 受容体サブユニットのうち、GluR2 と呼ばれるサブユニットタンパクは adenosine deaminase acting on RNA type2 (ADAR2) という酵素により RNA 編集を受けることが知られている。ALS において、この GluR2 が正常な RNA 編集を受けられなくなった場合にカルシウム透過性が異常に上昇し、細胞死が生じる、という仮説を筆者らをはじめとする何人かの研究者が提唱した。その仮説を明らかにするため、本研究を計画した。

3. 研究の方法

(1) 培養細胞系を用いてグルタミン酸 AMPA 受容体の神経伝達を in vitro で解析できる実験系をまず確立させた。

その系を用いて AMPA 受容体の発現様式および、GluR2 サブユニットにおける特定領域の RNA 編集の効率を、定量的強制発現法などを用いて検討する。

(2) GluR2Q/R 部位編集責任酵素である ADAR2 の条件的ノックアウトマウスを作成する。

4. 研究成果

(1) グルタミン酸 AMPA 受容体は 4 つのサブユニットタンパク質からなる 4 量体タンパク質である。本研究において、まず培養細胞において定量的に遺伝子を導入し、定量的にタンパク質を発現させる方法を確認した(図1)。

その結果、タンパク質の発現量から数学的に算出されるタンパク質の会合状態と、実際のタンパク質の機能から算出される会合状態とを比較検討することが可能となった。その結果、AMPA 受容体サブユニットタンパク質は異なるサブユニット間での会合確率が、同一サブユニット間よりも圧倒的に高いことが初めて明らかとなった。これにより、GluR2 サブユニットが AMPA 受容体に組み込まれやすいことが明らかとなった(図2)。

Expression of GluR1 and GluR2 protein in transfected HEK293 cells

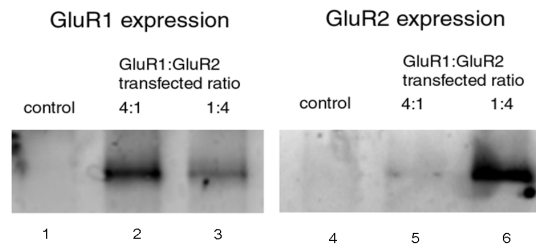


図1 AMPA 受容体サブユニットの定量的強制発現(ウエスタンブロットリング)

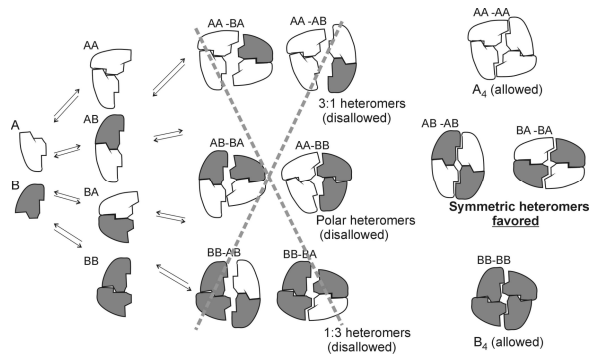


図2 AMPA 受容体 4 量体形成の際のサブユニット会合のシミュレーション
ヘテロ 2 量体形成から 4 量体形成が生じる経路がメインである。

(2) AMPA 受容体のカルシウム透過性が孤発性 ALS の発症の重要な要因であると考えられることから、そのカルシウム透過性を制御する GluR2 サブユニットタンパク質に対して RNA 編集を行う酵素である ADAR2 の機能を検討した。この酵素は比活性が強く、細胞内での発現量はそれほど多くはない。この酵素による反応が基質・酵素の量的比率によって影響を受けることを明らかにした。これは、ADAR2 の酵素活性の変動に関する初めての知見である。

(3) ALS の病態解析、治療薬開発のためには病体モデル動物が必要である。本研究では 2 種類の病態モデル動物を作成した。

脊髄運動神経選択的 ADAR2 ノックアウトマウスの作成に成功した。

これにより、脊髄運動神経細胞において選択的な AMPA 受容体 GluR2 サブユニットタンパク質の RNA 編集の低下を生じさせることが可能となった。なお、本結果に関しては現在論文投稿中である。

生体内における ADAR2 による RNA 編集の役割、さらにはその調節因子の検討のために、任意の時点で全身的に ADAR2 をノックアウトできるマウスの作成を試み、それに成功した。この ADAR2 ノックアウトはエストロゲン受容体作用薬であるタモキシフェンにより惹起されるものである。

これまでに、このようなノックアウトマウスの作成の報告はなく、本研究ではその遺伝子発現制御の効率と、ノックアウトによる表現系発現に関して検討を加えた。

その結果、タモキシフェン適量投与により、成長過程の任意の時期に全身的に ADAR2 がノックアウトされることを確認した。

さらに、ADAR2 ノックアウトによりマウスの運動機能が低下することが確認された。また、脳や脊髄の神経組織において ADAR2 タンパク質発現の減少、GluR2 の RNA 編集効率の低下が確認された。

これにより、初めて生体内で ADAR2 活性の変動を生じさせることが可能となるモデル系が確立した。

5 . 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

Suzuki T, Shimotohno K, Nakamura T, Brorson JR. Quantitative expression of AMPA receptor subunits in HEK293 cells, J Kyoritsu Univ Pharm, 2, 1-8 (2007)、査読あり

[学会発表] (計 9 件)

Suzuki T, Brorson JR, Kwak S. Type 2 (Ca²⁺ permeable) AMPA receptor: Its phenotype expression roles in neuronal vulnerability in neurodegeneration diseases. 10th International Conference on Alzheimer's Disease and Related Disorders, Madrid, Spain, (2006 年 7 月)

郭伸、日出山拓人、西本祥仁、山下雄也、辻省次、高橋良輔、三澤日出巳、鈴木岳之、RNA 編集異常による孤発性 ALS モデルマウスの開発 第 30 回日本神経科学学会 横浜 (2007 年 9 月)

山下雄也、只見智恵子、西本祥仁、木村大輔、鈴木岳之、郭伸、Tet-On システムを利用した RNA 編集活性測定株の確立 第 30 回日本神経科学学会 横浜 (2007 年 9 月)

Suzuki T, Iijima S, Nakamura T, Spontaneous synaptic activities observed in co-cultured conditions of rat sptal and hippocampal neurons. Neuroscience 2007, San Diego, USA (2007 年 11 月)

Yamashita T, Tadami C, Nishimoto Y, Kimura D, Suzuki T, Kwak S, Establishment of a novel Hela cell line atably expressing the half-edited GluR2 transcript. Neuroscience 2007, San Diego, USA (2007 年 11 月)

木村大輔、日出山拓人、鈴木岳之、郭伸、タモキシフェン誘導性ノックアウトマウスを用いた孤発性 ALS の神経細胞死の検討、第 81 回日本薬理学会年会 横浜 (2008 年 3 月)

Hideyama T, Yamashita T, Tsuji S, Misawa H, Takahashi R, Suzuki T, Kwak S, Slow neuronal death of motor neurons

in sporadic ALS mouse model by RNA editing enzyme ADAR2 knockout. The 38th annual meeting of the society for neuroscience, Washington D.C., USA, (2008年11月)

木村大輔、日出山拓人、鈴木岳之、郭伸、タモキシフェン誘導性ADAR2ノックアウトマウスを用いた孤発性ALS神経細胞死の検討、第82回日本薬理学会年会 横浜 (2009年3月)

日出山拓人、山下雄也、鈴木岳之、木村大輔、辻省次、樋口美代子、シーバーク・ペーター、高橋良輔、三澤日出巳、郭伸、孤発性筋萎縮性側索硬化症におけるRNA編集酵素異常、第82回日本薬理学会年会 横浜 (2009年3月)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鈴木 岳之 (SUZUKI TAKESHI)
慶應義塾大学・薬学部・准教授
研究者番号：90187740

(2) 研究分担者

郭 伸 (KWAK SHIN)
東京大学・医学部附属病院・准教授
研究者番号：40160981

増野 匡彦 (MASHINO TADAHIKO)
慶應義塾大学・薬学部・教授
研究者番号：90165697
(平成18～19年度)

飯島 史朗 (IIJIMA SHIRO)
慶應義塾大学・薬学部・講師
研究者番号：30222798
(平成20年度)

(3) 連携研究者

増野 匡彦 (MASHINO TADAHIKO)
慶應義塾大学・薬学部・教授
研究者番号：90165697
(平成20年度)