



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	NMDA型グルタミン酸受容体の局在制御におけるX11とX11Lの役割
Author(s)	本館, 利佳
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(薬科学)
Dissertation Number	甲第13180号
Issue Date	2018-03-22
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k13180
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/78896
Type	doctoral thesis
File Information	Rika_Motodate.pdf



博士学位論文

**NMDA 型グルタミン酸受容体の局在制御における
X11 と X11L の役割**

The role of X11 and X11L in the regulation of NMDA receptor localization

本館 利佳

北海道大学 大学院生命科学院
生命科学専攻 生命医薬科学コース
神経科学研究室

2018 年 3 月

目次

1. 略語一覧	P. 2
2. 序論	P. 4
2-1. グルタミン酸受容体の構成ならびに特徴	
2-2. グルタミン酸受容体の膜輸送制御	
2-3. シナプス外グルタミン酸受容体	
2-4. X11 ファミリータンパク質	
2-5. 本研究の目的	
3. 実験結果	P. 9
3-1. X11 および X11L KO マウスにおけるグルタミン酸受容体の局在解析	
3-2. non-PSD 画分におけるグルタミン酸受容体と X11 および X11L の相互作用解析	
3-3. X11 および X11L と NMDA 受容体の結合様式ならびに結合制御機構の解析	
3-4. Double-KO neuron におけるグルタミン酸受容体エンドサイトーシス効率の検証	
3-5. Double-KO neuron における NMDA 受容体の局在解析	
3-6. X11 および X11L KO マウスにおけるシナプス外 NMDA 受容体下流因子の解析	
3-7. Double-KO neuron における NMDA 受容体依存的神経細胞死に対する抵抗性の検証	
4. 考察	P. 16
5. 材料と方法	P. 21
6. 参考文献	P. 31
7. 図表	P. 37
8. 謝辞	P. 61

1. 略語一覧

aa: amino acid

ACSF: artificial cerebrospinal fluid

AMPA: α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionate

APP: Amyloid β -protein precursor

bp: base pairs

C 末端: carboxy terminal

D-APV: D-(-)-2-amino-5-phosphonopentanoic acid

dER: dendritic endoplasmic reticulum

DIV: day *in vitro*

Double-KO: double gene knockout (本論文においては X11/X11L 二重欠損マウスのこととする)

dNTP: deoxynucleotide 5'-triphosphate

EDTA: ethylenediaminetetraacetic acid

ER: endoplasmic reticulum

Fr.: fraction

FBS: fetal bovine serum

HRP: horseradish peroxidase

IgG: immunoglobulin G

IP: immunoprecipitation

kDa: kilodalton

KIF: kinesin super family

KO: homozygous type knockout

LTD: long term depression

LTP: long term potentiation

Mint: Munc18-1 interacting protein

NMDA: N-methyl-D-aspartic acid

NP-40: polyoxyethylene (9) octylphenyl ether

N 末端: amino terminal

OA: okadaic acid

PBS: phosphate-buffered saline

PCR: polymerase chain reaction

PDZ domain: postsynaptic density-95/discs large/zona occludens-1 domain

PNS: post nuclear supernatant

PSD: postsynaptic density

PTB domain: phosphotyrosine binding domain

SDS: sodium dodecyl sulfate

SDS-PAGE: sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis

TBS: tris-buffered saline

TBS-T: tris-buffered saline with Tween 20

Tris: Tris-(hydroxymethyl)-aminomethane

Triton X-100: polyoxyethylene (10) octylphenyl ether

WT: wild type

X11-KO: X11 gene knockout

X11L-KO: X11L gene knockout

X11L: X11-like

X11L2: X11-like 2

グルタミン酸受容体: グルタミン酸作動性受容体

2. 序論

2-1. グルタミン酸受容体の構成ならびに特徴

神経細胞はシナプスと呼ばれる接合部位においてプレシナプスから放出された神経伝達物質をポストシナプスの受容体が受容することでシグナルを伝達する。グルタミン酸作動性受容体(グルタミン酸受容体)は興奮性シナプスで機能する主要な受容体であり、 α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionate (AMPA) 型グルタミン酸受容体 (AMPA 受容体) と N-methyl-D-aspartic acid (NMDA) 型グルタミン酸受容体 (NMDA 受容体) がよく知られている。AMPA 受容体は GluR1-4 の 4 種類のサブユニットがホモまたはヘテロ 4 量体を構成して機能する。一方 NMDA 受容体は NR1 サブユニット 2 分子 (ホモ) と NR2A-2D または NR3A、3B サブユニット 2 分子 (ホモまたはヘテロ) が集合しヘテロ 4 量体を構成することで機能する (Fig. 1A)。各サブユニットの構成は脳の成熟の程度ならびに領域によって異なることが知られており、成体の海馬ならびに大脳皮質では主に GluR1、GluR2、GluR3 が AMPA 受容体を、NR1、NR2A、NR2B が NMDA 受容体を構成することが知られている (Monyer *et al.*, 1994; Sheng *et al.*, 1994; Zhu *et al.*, 2000)。グルタミン酸受容体は長期増強 (long term potentiation: LTP) や長期抑圧 (long term depression: LTD) の実態を担う分子であると考えられており、記憶や学習などの高次脳機能の発現との関連がよく研究されている (Lee *et al.*, 2003; Mulkey *et al.*, 1992; Malenka *et al.*, 1993)。

2-2. グルタミン酸受容体の膜輸送制御

グルタミン酸受容体はプレシナプスと接する部位に集積することでポストシナプスを形成する。さらにプレシナプスからの刺激依存的にポストシナプスにおける局在が動的に制御され LTP や LTD などのシナプス可塑性を引き起こす。そのためグルタミン酸受容体の局在はさまざまな分子によって複雑かつ厳密に制御されている。

グルタミン酸受容体は細胞体からシナプス近傍へと輸送され、シナプス近傍において定常的または活性依存的にその局在が制御される。細胞体からシナプスへの輸送は主にキネシン (kinesin super family: KIF) とよばれるモータータンパク質によって担われる。NR2B を含む NMDA 受容体は KIF17 によってシナプス近傍へと輸送され、CaMKII による KIF17 のリン酸化依存的に輸送が終了するというメカニズムの存在が示唆されている (Setou *et al.*, 2000; Guillaud *et al.*, 2008)。また AMPA 受容体は GluR2 interacting protein 1 (GRIP1) を介して KIF5 と結合しシナプス近傍へと輸送されることが報告されている (Setou *et al.*, 2002)。モータータンパク質による典型的な膜輸送に加えて、近年 NMDA 受容体が樹状突起中に入り込んだ小胞体 (dendritic endoplasmic reticulum: dER) を経由し golgi outposts を介してシナプス膜へと輸送されるメカニズムの存在が報告された (Jeyifous *et al.*, 2009)。dER を介した経路は局所的な NMDA 受容体量の調節に適しており、シナプスにおける NMDA 受容体の需要

を効率的に反映できるメカニズムであると考えられている。

シナプス近傍へと輸送されたグルタミン酸受容体はさらにエキソサイトーシス、エンドサイトーシス、リサイクリングなどの膜輸送によって細胞内の受容体プールとシナプスおよびシナプス外領域膜とを活発に行き来する。

NMDA 受容体および AMPA 受容体はどちらも clathrin 依存的なエンドサイトーシスを受ける (Roche *et al.*, 2001; Carroll *et al.*, 1999)。clathrin のシナプスにおける挙動の解析から clathrin がシナプス後肥厚 (postsynaptic density: PSD) の近傍でエンドサイトーシススポットを形成していることが明らかとなり、NMDA 受容体および AMPA 受容体が PSD とエンドサイトーシススポットの間を側方拡散によって移動していることが示唆された (Blanpied *et al.*, 2002)。さらに、NMDA 受容体および AMPA 受容体が PSD 近傍でエキソサイトーシスされたのち側方拡散によってシナプスへと移行していることが近年報告され (Gu *et al.*, 2016; Yudowski *et al.*, 2007) グルタミン酸受容体が樹状突起の細胞膜上を活発に移動していることが示されている。

側方拡散に加え、リサイクリングもグルタミン酸受容体の局在制御に重要な役割を果たしている。興味深いことに、NR2A を含む NMDA 受容体は分解経路へ、NR2B を含む NMDA 受容体はリサイクリング経路へ優先的に移行することが示唆されている (Tang *et al.*, 2010)。さらに、PDZ タンパク質である Scribble1 が NR2A と相互作用することで NR2A を分解経路からリサイクリング経路へと移行させ、NR2A のシナプスでの局在量を増加させることも報告されており (Piguel *et al.*, 2014)、リサイクリングがサブユニット特異的な NMDA 受容体の局在制御に寄与している可能性が示されている。AMPA 受容体においては Protein interacting with C kinase 1 (PICK1) が GluR2 特異的に結合し、リサイクリングを制御することで、AMPA 受容体のシナプス外領域プールならびに細胞内領域プールの行き来を制御していることが報告されている (Gardner *et al.*, 2005)。

シナプスに局在する NMDA 受容体および AMPA 受容体はそれぞれ特定の足場タンパク質と相互作用することでシナプスに係留されており、シナプスの活性に応じてその相互作用が制御されることでシナプスでの局在量が調節されている。NR2B は PSD95 と結合することで PSD に安定的に局在しているが、NR2B のリン酸化依存的にその結合が解離し、エンドサイトーシスが促進することが示されている (Chung *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2008)。AMPA 受容体は transmembrane AMPA receptor regulatory proteins (TARP) を介して PSD95 と結合することで PSD への局在が安定化されること、さらに TARP のリン酸化亢進によって AMPA 受容体活性が亢進することが報告されている (Tomita *et al.*, 2005; Sumioka *et al.*, 2011)。

このように、シナプス近傍におけるグルタミン酸受容体の局在は恒常的または活性依存的にさまざまなタンパク質との相互作用を介して厳密に制御されていることが示唆されているが、現在も不明な点が数多く残されている。以下に例をあげる。

- ① NMDA 受容体は NR2A を含むものがシナプス部位に、NR2B を含むものがシナプス外領域に多く局在しているが、なぜシナプス近傍における NR2A と NR2B の局在が異なるのか、局在制御機構の本質的な違いは何か。
- ② シナプス外に局在するグルタミン酸受容体がどのように膜に安定的に局在し、どのようなメカニズムでシナプスへと移行するのか。
- ③ エンドサイトーシスやエキソサイトーシスが PSD 以外の領域で生じることが観察されているが、そのスポットが何によって規定されるのか。エキソサイトーシス後の受容体の動きは何によって制御されるのか。

本項で述べてきた様々な制御分子の knockdown や knockout では制御する現象の有意な変化が認められるものの、その変化は部分的である。このことはグルタミン酸受容体のそれぞれの局在が複数の分子によって複雑に制御されていることを示しており、未だ同定されていない機能分子や制御機構の存在が示唆される。グルタミン酸受容体は高次脳機能や神経変性疾患などとの関連が深いことから、その局在制御機構の詳細を解明することは重要であり、現在も活発に研究が行われている。

2-3. シナプス外グルタミン酸受容体

シナプスにおけるグルタミン酸受容体の局在解析を通じて、シナプス外領域にも多くのグルタミン酸受容体が局在しシナプス部位と相互に行き来していることがわかってきた (Fig. 1B)。シナプス外グルタミン酸受容体の主な役割は必要に応じてシナプス部位へと受容体を供給するためのプールであるという認識が強かったが、近年の研究でシナプス外グルタミン酸受容体はシナプスグルタミン酸受容体と異なる機能を担っていることが明らかになってきた。

シナプス受容体は「プレシナプスに接する PSD に局在し、プレシナプスから放出された神経伝達物質を受容する受容体」であり、シナプス外受容体は「PSD 以外の細胞膜に局在する受容体」である (Fig. 1B)。シナプス外グルタミン酸受容体は、プレシナプスから放出されたグルタミン酸のうち、シナプス外へ漏れ出たグルタミン酸やトランスポーターによって再取り込みされなかったグルタミン酸、またグリア細胞から放出されたグルタミン酸によって活性化すると考えられており、シナプス受容体と比較し低濃度のグルタミン酸で活性化する。なお、シナプス外受容体には「PSD にはふくまれないがスパインに局在するもの」と「スパイン以外に局在するもの」の 2 種類が存在する。本論文においては単にシナプス外グルタミン酸受容体と呼ぶ場合には両者を区別しないものとする。

近年、シナプス外グルタミン酸受容体のうち特にシナプス外 NMDA 受容体について多くの報告がなされている。シナプス外 NMDA 受容体が神経細胞の感受性調整を担うという報

告や LTD の誘導に必要であるという報告があり (Garcia-Munoz *et al.*, 2015; Papurin *et al.*, 2012)、神経細胞の機能発現に重要な役割を担っていることが示唆されている。その一方で過剰な活性化が神経細胞死を引き起こし、アルツハイマー病やハンチントン病などの神経変性疾患の発症に関与しうることが複数報告されている (Bordji *et al.*, 2010; Snyder *et al.*, 2005; Milnerwood *et al.*, 2010)。これらの知見より神経細胞内においてシナプス外 NMDA 受容体の局在が厳密に制御されていることが予想されるが、詳細な局在制御機構は不明でありその解明が望まれている。

2-4. X11 ファミリータンパク質

X11 ファミリータンパク質は X11、X11-like (X11L)、X11-like 2 (X11L2) からなる進化上高度に保存された足場タンパク質ファミリーである。カルボキシル (C) 末端側にタンパク質相互作用ドメインである phosphotyrosine binding (PTB) ドメインと 2 つの postsynaptic density-95/discs large/zona occludens-1 (PDZ) ドメインを有する。PTB ドメインおよび PDZ ドメインを含む C 末端側はファミリー内で高度に保存されている一方、アミノ (N) 末端側の相同性は低い。X11 ファミリータンパク質のうち X11 および X11L は脳に主要または特異的な発現を示す一方、X11L2 はユビキタスな発現パターンを示す (Tomita *et al.*, 1999; Motodate *et al.*, 2016) ことから、X11 ファミリータンパク質のうち特に X11 と X11L が神経細胞の機能発現に重要な役割を担っていると考えられている (Fig. 2)。

X11 ははじめに常染色体劣性遺伝フリードライヒ運動失調症の候補遺伝子として報告された (Duclos *et al.*, 1993)。その後、アミロイド前駆体タンパク質 (Amyloid β -protein precursor: APP) の結合タンパク質 (Borg *et al.*, 1996) ならびにプレシナプスにおける神経伝達物質放出を制御する Munc18-1 結合タンパク質として単離同定された (Okamoto and Südhof, 1997)。Munc18-1 interacting proteins (Mints) は X11 ファミリータンパク質と同一分子である (X11/Mint1、X11L/Mint2、X11L2/Mint3)。一方 X11L は APP の結合分子として当研究室で単離同定された分子であり (Tomita *et al.*, 1999)、X11 と同様に Munc18-1 と相互作用する。電気生理学的解析から X11/X11L 二重欠損マウス (Double-KO) の海馬 CA1 におけるプレシナプスの放出確率が低下していることが報告され、X11 および X11L がプレシナプスで機能していることが示唆されている (Ho *et al.*, 2006)。

一方、ポストシナプス側における機能として X11 および X11L がグルタミン酸受容体の局在制御に関与しうることが示唆されている。AMPA 受容体については、これまでに X11 ファミリータンパク質の線虫オルソログである Lin-10 が AMPA 受容体サブユニットである GLR-1 のシナプスへの局在を制御するという報告や (Glodowski *et al.*, 2005, 2007)、マウス脳において X11L が GluR1 および GluR2/3 と結合し、AMPA 受容体のゴルジ体からの出芽を抑制するという報告がある (Stricker and Huganir, 2003)。NMDA 受容体に関しては X11 が

KIF17 と結合し NR2B を含む NMDA 受容体の輸送制御に関与するという報告がなされている (Setou *et al.*, 2000)。しかしながら、X11 および X11L が生体内において実際にグルタミン酸受容体の局在制御に寄与しているのかは検証されておらず、X11 および X11L がグルタミン酸受容体の局在制御において相補的に機能しうるのかも未解明である。

2-5. 本研究の目的

グルタミン酸受容体は記憶や学習といった神経細胞の高次脳機能発現に重要な受容体であるとともに、神経変性疾患とも密接に関与している。グルタミン酸受容体の局在制御機構は、構成サブユニットの違いやシナプスの活性状態ならびに定常状態などによって異なり、その複雑さゆえ全貌は未だ明らかではない。X11 および X11L はグルタミン酸受容体の局在制御を担う候補分子であり、生体内においてその機能を実証し詳細なメカニズムを明らかにすることでグルタミン酸受容体の局在制御機構解明に貢献できると考えられる。

本研究は以上の背景から、X11 および X11L の単一または二重欠損マウスを解析することで、生体内でのグルタミン酸受容体細胞内局在制御における X11 および X11L の役割を解明することを目的とする。

3. 実験結果

3-1. X11 および X11L KO マウスにおけるグルタミン酸受容体の局在解析

これまでの報告から X11 および X11L がグルタミン酸受容体の細胞膜表面への輸送を制御している可能性が考えられた (Setou *et al.*, 2000; Stricker *et al.*, 2003)。そこで、野生型マウス (WT)、X11 欠損マウス (X11-KO)、X11L 欠損マウス (X11L-KO)、X11/X11L 二重欠損マウス (Double-KO) におけるグルタミン酸受容体サブユニットの細胞膜表面局在量を解析することとした。なお、以降の解析では成体のマウスの海馬ならびに大脳皮質で NMDA 受容体を構成する NR1、NR2A、NR2B ならびに AMPA 受容体を構成する GluR1、GluR2/3 サブユニットの解析をおこなった (Monyer *et al.*, 1994; Sheng *et al.*, 1994; Zhu *et al.*, 2000)。

解析にあたり海馬ならびに大脳皮質全体のグルタミン酸受容体サブユニット量に変化がないか確認した。各遺伝子型マウスの海馬ならびに大脳皮質を buffer 中で homogenize することで total lysate を調製し、total lysate 中のグルタミン酸受容体サブユニット量をウェスタンブロッティングによって解析した。その結果、各遺伝子型マウス間で total lysate 中に含まれる各種グルタミン酸受容体サブユニット量に有意な変化は認められなかった (Fig. 3)。

海馬ならびに大脳皮質全体におけるグルタミン酸受容体サブユニット量に変化がないことが確認できたため、次に急性スライスビオチン標識法によって細胞膜表面に局在する受容体サブユニット量を解析した。各遺伝子型マウスから Fig. 4A に示す方法を用いて surface sample を調製した。ウェスタンブロッティングによって surface sample に細胞膜タンパク質である N-Cadherin が濃縮された一方、細胞内オルガネラマーカーや細胞質マーカーの混入が少ないことが確認できたため、解析に用いることとした (Fig. 4B)。解析の結果、Double-KO で NR1 が、X11L-KO で NR1 および GluR2/3 が有意に減少していた。また、NR2A、NR2B ならびに GluR1 についても X11L-KO および Double-KO で減少傾向を示した (Fig. 4C, D)。これらの結果から、X11 および X11L が生体内においてグルタミン酸受容体の細胞膜表面への局在を制御していることが示唆された。

グルタミン酸受容体は神経細胞内を小胞体、ゴルジ体を経由してシナプス細胞膜へと輸送される。そこでグルタミン酸受容体の神経細胞全体における輸送過程に変化がないか検証するため、Iodixanol 密度勾配遠心法によって細胞内オルガネラを分離し、受容体サブユニットの分布をウェスタンブロッティングによって解析した。小胞体マーカーである GRP78 は Fraction (Fr.) 13–20 に、*trans*-Golgi マーカーである Syntaxin 6 は Fr. 9–14 に、*cis*-Golgi マーカーである GM130 は Fr. 8–12 分布しており、各遺伝子型マウス間で変化はなかった (data not shown)。ポストシナプスマーカーである PSD95 は Fr. 7–10 に、NR1、NR2A、NR2B はおもに Fr. 7–12 に、GluR1、GluR2/3 はおもに Fr. 7–14 に分布していた。Fr. 1–20 に

における各サブユニットのシグナル強度の総和を 100%としたときの、各画分におけるサブユニットのシグナル強度を回収率として定量した結果、すべてのサブユニットにおいて、各遺伝子型マウス間で分布に有意な変化は認められなかった (Fig. 5)。この結果から、X11 および X11L 欠損下においてもグルタミン酸受容体の細胞内輸送過程は正常であることが示唆された。

グルタミン酸受容体は主にシナプス近傍で細胞膜表面へと露出することから、X11 および X11L がシナプス近傍においてグルタミン酸受容体の局在を制御している可能性が考えられた。そこで、シナプスにおけるグルタミン酸受容体の局在を詳細に解析することとした。グルタミン酸受容体にはシナプス直下の PSD に局在するシナプスグルタミン酸受容体と PSD 以外に局在するシナプス外グルタミン酸受容体が存在する (Fig. 1B)。Double-KO で認められた受容体の局在変化がシナプスまたはシナプス外、どちらの受容体の局在変化を反映したものか検討することとした。

はじめに WT マウスの海馬および大脳皮質からショ糖密度勾配遠心法によって synaptosome 画分を分取後、0.5 % Triton X-100 可溶性の non-PSD 画分ならびに不溶性の PSD 画分を調製し、各画分中にふくまれる受容体サブユニットならびに X11 および X11L の局在を解析した (Fig. 6A, B)。解析の結果、PSD および non-PSD 両画分に各受容体サブユニットならびに X11 および X11L が局在していることを確認した (Fig. 6C)。さらに PSD ならびに non-PSD 画分に回収された受容体サブユニットならびに X11 および X11L の total lysate に対する回収率を定量した (Fig. 6D, E)。non-PSD および PSD 画分に回収されたグルタミン酸受容体サブユニットの合計は total lysate にたいして 5-10%程度であり、X11 および X11L は 4%程度であった。non-PSD 画分および PSD 画分に回収された量の合計を 100%とした際の両画分への分布割合を計算した結果、各サブユニットで異なる傾向を示した。NR1 の non-PSD 画分への分布割合は 50%であったのに対し、NR2A は 37 %、NR2B は 59%の分布割合であった。GluR1 は 80%、GluR2/3 は 57%が non-PSD 画分に分布し、X11 および X11L は 90%以上が non-PSD 画分に分布していた (Fig. 6E)。この結果は、NMDA 受容体のうち NR2A はシナプス部位に、NR2B はシナプス外領域に多く局在しているという報告と合致しており、生体内のグルタミン酸受容体の分布を反映した画分を調製できたと判断した。

次に各遺伝子型マウスから non-PSD および PSD 画分を調製し、各画分中に局在するグルタミン酸受容体サブユニット量をウェスタンブロッティングによって解析した。その結果、PSD 画分に局在するグルタミン酸受容体サブユニット量に各遺伝子型マウス間で有意な変化は認められなかった (Fig. 7A, B)。一方、non-PSD 画分においては Double-KO で NR1、NR2B ならびに GluR2/3 が、X11L-KO で GluR2/3 が有意に減少していた (Fig. 7C, D)。この結果より、X11 および X11L はシナプス外領域に局在するグルタミン酸受容体の局在を特異的に制御していることが示唆された。

3-2. non-PSD 画分におけるグルタミン酸受容体と X11 および X11L の相互作用解析

X11 および X11L がグルタミン酸受容体の局在を直接的に制御しているか検証することを目的に、グルタミン酸受容体量の減少が認められた non-PSD 画分において X11 および X11L がグルタミン酸受容体と相互作用するか検証した。前述したとおりに non-PSD 画分を調製し、抗 X11 抗体または抗 X11L 抗体をもちいて共役免疫沈降（共沈）実験をおこないウェスタンブロッティングによって解析した。その結果、X11 および X11L 両分子から NMDA 受容体サブユニットである NR1、NR2A ならびに NR2B の共沈が確認できたのに対し、AMPA 受容体サブユニットである GluR1 および GluR2/3 の共沈は認められなかった (Fig. 8)。この結果から、X11 および X11L はシナプス外領域において NMDA 受容体および AMPA 受容体どちらの受容体の局在制御にも寄与しているものの、その制御機構は異なっていることが示唆された。とくに NMDA 受容体の局在については X11 および X11L が直接的に制御している可能性が示された。

3-3. X11 および X11L と NMDA 受容体の結合様式ならびに結合制御機構の解析

序論において前述したとおりシナプス外 NMDA 受容体は神経変性疾患の発症と関連することが報告されていることからその制御機構の解明が望まれているものの、詳細なメカニズムは不明である。私は X11 および X11L がシナプス外領域において NMDA 受容体と相互作用していたことから、シナプス外グルタミン酸受容体のうち特にシナプス外 NMDA 受容体の局在制御における X11 および X11L の機能について詳細な解析をおこなうこととした。

X11 および X11L が NMDA 受容体と相互作用していたことから X11 および X11L が結合を介して NMDA 受容体の局在を制御している可能性が考えられた。これまでに X11 は CASK ならびに Velis という 2 分子を介して NR2B を含む NMDA 受容体と複合体を形成することが報告されているが (Setou *et al.*, 2000)、NR2B との結合に複合体の形成が必要であるかは検証されていない。X11L と NMDA 受容体との相互作用はこれまでに報告がなく本研究が初めての報告である。そこで X11 および X11L と NMDA 受容体の結合様式について詳細な解析をおこなった。

なお、相互作用解析は Double-KO で顕著な減少を示した NR1 および NR2B サブユニットを共発現させておこなった。そのため「3-3」においては「NMDA 受容体」とは NR1 と NR2B から構成された NMDA 受容体を想定したものとして記述する。

3-3-1. 過剰発現系における X11 および X11L と NMDA 受容体の相互作用解析

X11 および X11L と NMDA 受容体が直接的に相互作用しているのか検証することを目的にマウス神経芽細胞腫由来である N2a 細胞に FLAG-X11 または FLAG-X11L と NR1 および EGFP-NR2B を共発現させ、抗 FLAG 抗体をもちいて共沈実験をおこなった。その結果、FLAG-X11 および FLAG-X11L 両分子から EGFP-NR2B ならびに NR1 が共沈された (Fig. 9A)。さらに FLAG-X11 および FLAG-X11L から共沈された EGFP-NR2B ならびに NR1 量を

定量した結果、X11L から共沈される NR2B および NR1 量が X11 と比較し有意に多いことが明らかとなった (Fig. 9B)。完全な精製系ではないものの、過剰発現条件下において X11 および X11L と NMDA 受容体の相互作用が確認されたことから、両者が直接的に相互作用している可能性が高いことが示された。さらに同条件下において X11 と比較し X11L のほうが NMDA 受容体と強く相互作用することが明らかとなった。

3-3-2. X11 および X11L との結合における NMDA 受容体結合領域探索

NMDA 受容体側の結合領域探索をおこなった。NMDA 受容体を構成する NR1 および NR2B はどちらも 4 回膜貫通型のタンパク質である (Fig. 10A, B)。細胞質領域には 3 か所露出しているが、多くの細胞質タンパク質との相互作用が C 末端側の細胞質ドメインを介しておこなわれていることから、X11 および X11L と NMDA 受容体との結合もこの領域が重要であることが予想された。そこで NR1 および NR2B の C 末端欠失体である NR1 Δ 834–938 および EGFP-NR2B Δ 839–1482 を作製し、同様に相互作用解析をおこなった。

解析の結果、NR1 または NR2B どちらか一方の細胞質領域を有する NR1/EGFP-NR2B Δ 839–1482 および NR1 Δ 834–938/EGFP-NR2B 発現時には X11 および X11L から共沈が認められたのに対し、両分子の細胞質領域を欠失した NR1 Δ 834–938/EGFP-NR2B Δ 839–1482 発現時には X11 および X11L からの共沈がほぼ認められなかった (Fig. 11A)。X11 および X11L との結合量を定量した結果、両方の細胞質領域を欠失した場合にはどちらか一方を有する場合と比較して、X11 および X11L との結合量が 10–20%程度にまで有意に減少することが明らかとなった (Fig. 11B)。この結果より、X11 および X11L が NR1 および NR2B 両サブユニットの C 末端側の細胞質領域で相互作用することが示唆された。

NR2B の細胞質領域中の結合ドメインを絞り込むため、NR1 の C 末端側の細胞質領域を欠失した NR1 Δ 834–938 と Fig. 10B に示す NR2B の細胞質領域部分欠失体をもちいて同様に相互作用解析をおこなった。その結果、NR2B の細胞質領域の長さ依存的に X11 および X11L との結合強度が減弱傾向を示し、細胞質領域を完全に欠失することで有意な減弱を示すことが明らかとなった (Fig. 12)。

3-3-3. NMDA 受容体との結合における X11 および X11L の結合領域探索

X11 および X11L 側の結合領域探索をおこなった。Fig. 10C に示す欠失変異体と EGFP-NR2B ならびに NR1 を N2a 細胞に共発現させ、抗 FLAG 抗体をもちいて共沈をおこなった。はじめに X11 の解析結果について述べる。解析の結果、結合強度の違いはあるものの、すべての欠失体が NMDA 受容体と結合した。とくに Δ N においては NMDA 受容体との結合が有意に増加した (Fig. 13)。次に X11L の結果について述べる。X11 と同様にすべての欠失体が NMDA 受容体と結合し、 Δ N と NMDA 受容体との結合は WT と比較し有意に増強した (Fig. 14)。

X11 および X11L の Δ N、 Δ C 両欠失体が NMDA 受容体と結合したことから、N 末端側お

よび C 末端側それぞれに NMDA 受容体との相互作用部位を有することが示唆された。さらに ΔN では NMDA 受容体との結合が有意に増強したことから N 末端側には NMDA 受容体との結合を負に制御する領域があることが示唆された。

3-3-4. X11 および X11L と NMDA 受容体の結合制御機構の解析

「3-3-3」の結果より、X11 および X11L に NMDA 受容体との結合を制御する領域が存在することが明らかとなった。このことから、なんらかの結合制御機構が存在する可能性が考えられた。NMDA 受容体と多くの細胞質タンパク質との結合は様々な翻訳後修飾によって制御されていることが知られている (Lavezzari *et al.*, 2003; Chung *et al.*, 2004)。そこではじめに一般的な翻訳後修飾の一つであるリン酸化に着目して解析をおこなった。N2a 細胞に FLAG-X11 または FLAG-X11L と EGFP-NR2B および NR1 を共発現させ phosphatase 阻害剤であるオカダ酸 (OA) を添加することで細胞全体のリン酸化レベルを亢進させ結合に変化がないか解析した。

解析の結果、OA 処理によるリン酸化亢進時に X11 および X11L から共沈する NMDA 受容体量が有意に減少することが明らかとなった (Fig. 15)。この結果は X11 および X11L と NMDA 受容体との結合がリン酸化によって制御されていることを示唆している。

X11 および X11L の欠失変異体をもちいた結合領域探索の結果から、N 末端が結合を負に制御していることが示唆された。そこで N 末端側がリン酸化による結合制御に関与しているのか検証をおこなった。N2a 細胞に Fig. 10C に示す各欠失変異体と EGFP-NR2B および NR1 を共発現させ、OA 処理によるリン酸化亢進の有無で結合に変化が生じるか解析した。はじめに X11 の結果を述べる。解析の結果、 ΔC では OA 処理依存的な NMDA 受容体との結合減弱がみられたのに対し、 ΔN では結合の減弱は認められなかった。さらに C 末端側に含まれる PTB および PDZ の各領域の欠失体においてもリン酸化依存的な結合減弱が認められなくなった (Fig. 16)。次に X11L の結果について述べる。X11 と同様に ΔC では OA 処理依存的な NMDA 受容体との結合減弱が認められたのに対し、 ΔN では結合の減弱が認められなかった。さらに、X11L においては ΔN 以外のすべての欠失体において、NMDA 受容体との OA 処理依存的な結合の有意な減弱または減弱傾向が認められた (Fig. 17)。

これらの結果から、X11 および X11L の N 末端側が NMDA 受容体との結合をリン酸化依存的に制御している可能性が示唆された。

3-4. Double-KO neuron におけるグルタミン酸受容体エンドサイトーシス効率の検証

樹状突起において NMDA 受容体はエンドサイトーシスやリサイクリングなどの局所的な膜輸送制御を介してその局在が制御されていることが予想される。そこで X11 および X11L がこれらの膜輸送を制御している可能性を検証した。

WT ならびに Double-KO マウス胎児脳より調製した初代培養神経細胞をもちいて、Sulfo-

NHS-SS-biotin 標識法により細胞膜表面サンプルならびにエンドサイトーシスサンプルを調製し、ウェスタンブロッティングによって解析した (Fig. 19)。解析の結果、細胞膜表面に局在する NR1、NR2A、NR2B および GluR2/3 が Double-KO で有意に減少していることを明らかにした (Fig. 19D)。この結果は、マウス脳の表現型と一致する結果であると考えられる。さらにエンドサイトーシスされた NR2A および NR2B 量も Double-KO で有意な減少を示したが (Fig. 19E)、細胞膜表面局在量に対するエンドサイトーシス量においてはすべてのサブユニットで有意な変化は認められなかった (Fig. 19C)。この結果より、Double-KO neuron において細胞膜表面に局在するグルタミン酸受容体量が減少しているものの、その原因はエンドサイトーシス効率の変化ではないことが示唆された。

3-5. Double-KO neuron における NMDA 受容体の局在解析

X11 および X11L が NMDA 受容体のエンドサイトーシスやリサイクリングを制御している場合、Double-KO neuron において NMDA 受容体の初期エンドソームやリサイクリングエンドソームへの局在が変化する可能性が考えられた。そこで、WT ならびに Double-KO マウス由来の初代培養神経細胞を調製し、これらオルガネラへの NMDA 受容体の局在に変化がないか蛍光二重免疫染色法によって解析した (Fig. 20)。

NR2A および NR2B の全 puncta 面積にたいする EEA1 (初期エンドソームマーカー) または TfR (リサイクリングエンドソームマーカー) との共局在面積を共局在率として定量した結果、NR2A および NR2B どちらのサブユニットにおいても各オルガネラマーカーとの共局在率に有意な変化は認められなかった (Fig. 20B)。この結果より、Double-KO neuron において NMDA 受容体のエンドサイトーシスおよびリサイクリングは正常であることが示唆された。

3-6. X11 および X11L KO マウスにおけるシナプス外 NMDA 受容体下流因子の解析

シナプス NMDA 受容体は転写因子である CREB のリン酸化を亢進する一方 (Hardingham *et al.*, 2001a; Hardingham *et al.*, 2001b)、シナプス外 NMDA 受容体は逆にリン酸化を抑制することが報告されている (Hardingham *et al.*, 2002)。シナプス外 NMDA 受容体と CREB をつなぐ経路の全貌は明らかではないが、シナプス外 NMDA 受容体が CREB の上流に位置する ERK のリン酸化を抑制するという報告もあり、これらのカスケードを制御することで神経細胞死を誘発することが示唆されている (Paul *et al.*, 2002; Ivanov *et al.*, 2006; Karpova *et al.*, 2013; Dieterich *et al.*, 2008)。X11 および X11L がシナプス外 NMDA 受容体の局在制御を介してその機能発現に寄与している場合、シナプス外 NMDA 受容体量の減少が認められた Double-KO において CREB ならびに ERK のリン酸化レベルが亢進していることが予想される。そこでこれらを検証することとした。

各遺伝子型マウスの大脳皮質および海馬から核画分を調製し、CREB ならびに ERK とそれぞれのリン酸化体量をウェスタンブロッティングによって解析した (Fig. 21)。その結果、

Double-KO において CREB のリン酸化レベルが有意に亢進していることが明らかとなった (Fig. 21B)。また、ERK のリン酸化レベルについても Double-KO で亢進傾向が認められた (Fig. 21C)。これらの結果は Double-KO におけるシナプス外 NMDA 受容体量の減少と一致する結果である。

3-7. Double-KO neuron における NMDA 受容体依存的神経細胞死に対する抵抗性の検証

シナプス外 NMDA 受容体の過剰な活性化は神経細胞死を引き起こすことが知られている (Hardingham *et al.*, 2002)。そこで、Double-KO neuron が NMDA 受容体依存的な神経細胞死に抵抗性を示すのか検証をおこなった。

はじめに WT neuron をもちいて実験条件の検討をおこなった。終濃度が 0、2、5、20 μ M になるように NMDA を添加し 24 時間培養したのち MTT assay によって生細胞活性を、LDH assay によって細胞傷害率をそれぞれ解析した。その結果、NMDA 20 μ M 添加時に生細胞活性の有意な減少ならびに細胞傷害率の有意な増加がみとめられた。さらに NMDA 受容体阻害剤である D-(-)-2-amino-5-phosphonopentanic acid (D-APV) を 100 μ M 添加することでそれぞれの応答がレスキューされたことから、NMDA 20 μ M 添加によって NMDA 受容体依存的な神経細胞死を誘発できることを確認した (Fig. 22A, C)。そこで、この条件下において生細胞活性ならびに細胞傷害率が Double-KO neuron で変化するか解析した。その結果、Double-KO において生細胞活性の増加傾向ならびに細胞傷害率の有意な低下が認められ、NMDA 受容体依存的な神経細胞死が抑制されていることが示唆された (Fig. 22B, D)。

4. 考察

グルタミン酸受容体は神経細胞の機能発現に重要な受容体であり、さまざまな分子によって厳密にその局在および機能が制御されている。神経細胞で機能する足場タンパク質ファミリーである X11 および X11L は *in vitro* 解析からグルタミン酸受容体の局在制御に関与することが示唆されていたものの、生体内において実際に局在制御に寄与しているのかはこれまで不明であった。本研究では X11 および X11L の欠損マウスを解析することで、生体内でのグルタミン酸受容体局在制御における X11 および X11L の役割を解明することを目的として、以下のことを明らかにした。

- (1) 生体内において X11 および X11L がグルタミン酸受容体の局在を制御していることを実証し、その主要な機能がシナプス外領域におけるグルタミン酸受容体の局在制御であることを初めて見いだした。さらに、Double-KO において有意な変化が認められることから、シナプス外グルタミン酸受容体の局在制御においては X11 および X11L が補償的に機能していることを示唆した (Fig. 7)。
- (2) X11 および X11L がシナプス外領域において NMDA 受容体と相互作用する一方、AMPA 受容体とは相互作用しないことを明らかにし、両受容体に対する局在制御機構が異なることを示唆した (Fig. 8)。さらに X11 および X11L と NMDA 受容体との相互作用がリン酸化によって制御されている可能性を見いだした (Fig. 15)。
- (3) X11 および X11L 欠損下において NMDA 受容体の細胞膜表面局在量が減少している一方、NMDA 受容体のエンドサイトーシスならびにリサイクリングに異常が見られないことを明らかにし、X11 および X11L は NMDA 受容体の局在をエンドサイトーシスならびにリサイクリングの制御以外のメカニズムで制御していることを示唆した (Fig. 19, 20)。
- (4) Double-KO においてシナプス外 NMDA 受容体が負に制御する CREB ならびに ERK のリン酸化レベルが亢進していること、ならびに NMDA 受容体依存的な神経細胞死に抵抗性を示すことを明らかにし、X11 および X11L がシナプス外 NMDA 受容体の局在制御を介してその機能発現に寄与していることを示唆した (Fig. 21, 22, 23)。

シナプス外グルタミン酸受容体の局在について、Double-KO において有意な変化が見られたことからシナプス外グルタミン酸受容体の局在制御において X11 および X11L が相補的に機能していることが示唆された (Fig. 7C, D)。X11-KO と比較し X11L-KO で表現型が顕著であることから、X11L の寄与がより大きいと考えられる。*In vitro* の結合実験では、X11L

の NMDA 受容体との相互作用は、X11 と比較して有意に強固であることを明らかとしており (Fig. 9)、この結合強度の違いが NMDA 受容体の局在制御への影響力の差を生み出していると考えられる。

相互作用解析から、X11 および X11L が NR1、NR2B 両サブユニットの C 末端側の細胞質ドメインと主に相互作用していることを明らかとした。NR2B サブユニットの C 末端 4 残基は PDZ ドメイン結合モチーフを構成していることから、当初はこのモチーフを介して X11 および X11L と相互作用していることを予想していた。しかしながら、X11 および X11L の PDZ ドメインを欠失しても結合の消失がみられないこと (Fig. 13, 14)、NR2B の C 末端 4 残基を欠失した変異体とも X11 および X11L が結合することから (Fig. 12)、PDZ ドメインを介した結合様式ではないことが示唆された。また、NR2B の細胞質領域の長さ依存的に X11 および X11L との相互作用が減弱することから、特定のモチーフではなく NR2B の細胞質領域の立体構造等に依存した相互作用をしている可能性が考えられる (Fig. 12)。今後、構造解析も含めた詳細な解析をすることで結合様式を検討する必要がある。

X11 および X11L と NMDA 受容体との結合が ΔN で有意に増強したこと、さらに ΔN では OA 処理による結合の減弱が認められなくなったことから、X11 および X11L は C 末端側でより強く NMDA 受容体と相互作用し、その結合が N 末端側によってリン酸化依存的に制御されていることが明らかとなった。一方、 ΔC においても NMDA 受容体との結合が認められ、OA 処理依存的に結合が減弱することから N 末端側と NMDA 受容体との結合は N 末端側自身によって制御されていることが明らかとなった。さらに、X11 においては PTB および PDZ ドメインを欠失することでも OA 処理依存的な結合減弱が認められなくなった。この結果から、X11 の N 末端側による C 末端側と NMDA 受容体との結合制御には PTB および PDZ ドメインが必要であることが示唆された (Fig. 18)。X11 と X11L の C 末端側の相溶性は 85% と非常に高い一方、N 末端側の相溶性は 25% と低くなっており X11 と X11L の性質の違いは N 末端側の違いによると考えられる (Fig. 2)。これらより、X11 および X11L と NMDA 受容体との結合性の違いは C 末端側の結合領域の親和性の違いではなく、結合制御領域の N 末端側の違いによるものである可能性が高いと考えられる。

本研究では X11 および X11L の欠損によって細胞膜表面に局在するグルタミン酸受容体量が減少するものの、エンドサイトーシスやリサイクリングは正常であることを示した (Fig. 19, 20)。特にエンドサイトーシス効率に変化がみられなかったことから、X11 および X11L はグルタミン酸受容体のシナプス外領域膜からの取り込みには関与せず、むしろグルタミン酸受容体のシナプス外領域膜への優先的な供給機能を担っている可能性が考えられる。NMDA 受容体はキネシンなどのモータータンパク質または樹状突起中に入りこんだ小胞体である dER によってシナプス近傍まで輸送される。スパイン内にはアクチンフィラメントが多く存在し、NMDA 受容体はミオシンによって PSD 近傍の細胞膜へと輸送されることが考えられている。近年、NMDA 受容体のエキソサイトーシスを SNAP25-VAMP1-Syntaxin 4

複合体が担うことが報告された。さらに、NMDA 受容体のエキソサイトーシスには細胞膜上の受容体量を維持するための定常的なエキソサイトーシスと、シナプス入力に応じたエキソサイトーシスがあることが示された (Gu and Huganir, 2016)。これらの報告は、NMDA 受容体がエキソサイトーシスによって刺激依存的に必要な場所へと供給されるメカニズムがあることを示唆している。AMPA 受容体がシナプス外領域でエキソサイトーシスされ PSD 部位へと側方拡散によって移行することが報告されていることから (Yudowski *et al.*, 2007; Passafaro *et al.*, 2001)、NMDA 受容体もシナプス外でエキソサイトーシスされると考えられている。しかしながら、NMDA 受容体のエキソサイトーシスゾーンが PSD の近傍なのか、スパイン以外の樹状突起細胞膜なのかなど詳細は未解明である。AMPA 受容体サブユニットのうち GluR1 と GluR2 はエキソサイトーシスされるスポットが異なることも示唆されており (Passafaro *et al.*, 2001)、NMDA 受容体においてもサブユニット特異的な制御機構が存在している可能性がある。シナプス外へと NMDA 受容体を優先的に移行させ、その場にとどめるメカニズムについてはこれまで報告がない。X11 および X11L が実際にこのメカニズムを担っていることを実証することは、NMDA 受容体の局在制御機構に新たな概念を提示するものになると考えられる (Fig. 24)。

上述した分子機構を仮定した場合、Double-KO では本来シナプス外領域に供給される NMDA 受容体が供給されないことになる。この供給されなかった分の NMDA 受容体の局在には次の 2 つの可能性が考えられる。1 つ目は樹状突起中の dER や golgi outposts などの分泌オルガネラにたまっている可能性、2 つ目は PSD へと移行している可能性である。しかしながら、本解析では想定される変化を検出することはできなかった。この原因として X11 と X11L が関与する分子機構とは独立して、PSD に局在する NMDA 受容体量を調節するなんらかの分子機構が存在している可能性がある。すなわち、ポストシナプスに NMDA 受容体が十分に供給されている状態であれば dER における NMDA 受容体の合成や細胞体からの輸送を停滞させるような仕組みである。Total lysate における NMDA 受容体量が変化していないのは神経細胞全体に存在する NMDA 受容体量に対する変化量が少ないためと考えられる。non-PSD に回収される NMDA 受容体量は 5%弱であり、このうちの 20%、すなわち Total lysate に対して 1%程度が減少していたとしても、生化学的な解析方法では有意な変化の検出は困難である。今後、仮説の検証方法について検討する必要がある。

X11 および X11L がシナプス外 NMDA 受容体の局在を制御していることを示したが、その機能の生理的意義について考察する。

シナプス外 NMDA 受容体の機能としては、活動電位の感受性を調整し必要な時に即時に応答できるよう準備するという報告や LTD に必要であるという報告があり (Garcia-Munoz *et al.*, 2015; Papouin *et al.*, 2012)、シナプス外 NMDA 受容体が成体の神経細胞において重要な機能を担っていることが示唆されている。WT マウスはオープンフィールドテストにおいて時間経過とともに活動量が低下するのに対し、Double-KO は活動量が低下しないという

表現型を示すことが当研究室の解析から明らかとなっている (佐藤学士研究, unpublished)。同様の表現型を示す変異マウスとしては、LTD の誘導に重要な役割を担う Calcineurin の KO マウスや Glutamate Transporter の一つである GLAST の KO マウスなどが報告されている (Miyakawa *et al.*, 2003; Karlsson *et al.*, 2008)。Calcineurin-KO マウスの表現型が類似していることから共通の関連メカニズムである LTD の関与が考えられる。LTD が正常に誘導されない場合には環境的なノイズに常に反応してしまい、過興奮状態が維持されることが考えられ、結果的に行動の鎮静化がみられないという表現型が生じている可能性がある。一方、GLAST-KO マウスはプレシナプスから放出されたグルタミン酸の取り込みが減少することで、シナプス外 NMDA 受容体が過剰活性化しやすいと想定されるマウスである。Double-KO とは逆の表現型が想定されるにも関わらず、実際には行動解析で類似した表現型を示す。これらよりシナプス外 NMDA 受容体の活性と行動は単純な増減だけでは説明できず、シナプスならびにシナプス外 NMDA 受容体の厳密な活性調節のバランスが崩れた結果である可能性も考えられる。Double-KO のグルタミン酸受容体に関する表現型と行動解析の表現型との関係については今後詳細に検証していく必要がある。

また、シナプス新生時には AMPA 受容体ではなく NMDA 受容体が樹状突起上を移動し axodendritic contact に集積することが報告されており (Washbourne *et al.*, 2002)、シナプス外 NMDA 受容体の制御機構が関与している可能性がある。X11 および X11L は成体においても発現しているが、出生後 7 日～14 日目に発現レベルがピークとなる (data not shown)。この結果から X11 および X11L がシナプスを形成していく幼少期に機能している可能性は大きいと考えられる。

シナプス外 NMDA 受容体は過剰に活性化することで神経細胞死を誘発する。とくにアルツハイマー病やハンチントン病などの神経変性疾患の発症原因となりうることを示唆されている (Bordji *et al.*, 2010; Snyder *et al.*, 2005; Milnerwood *et al.*, 2010)。生体内においては X11 および X11L が刺激依存的なリン酸化修飾によってシナプス外 NMDA 受容体の局在を制御していると考えられる。これらの神経変性疾患患者において X11 および X11L の遺伝子変異などの報告はないものの、リン酸化カスケードが異常をきたすことで X11 および X11L によるシナプス外 NMDA 受容体局在制御機構が破綻し、神経変性疾患の発症につながる可能性がある。本研究では結合制御にかかわるリン酸化が NMDA 受容体、X11 および X11L どちら側に生じているのか、またそのリン酸化を制御するカスケードが何であるかを明らかにすることはできなかった。今後、リン酸化部位ならびにカスケードを同定することで、アルツハイマー病やハンチントン病の発症機構の理解に貢献できると考えられる。

シナプス外 NMDA 受容体量が特異的に変化しているマウスは、ハンチントン病モデルマウスにおいてシナプス外 NMDA 受容体が増加するという一例が知られているのみである (Milnerwood *et al.*, 2010)。X11 および X11L の Double-KO はシナプス外 NMDA 受容体の特異的に減少する初めてのマウスであり、シナプス外 NMDA 受容体の機能解析に貢献すること

ができると考えられる。シナプス外 NMDA 受容体の機能の検証方法としては非競合的オープンチャネル阻害剤である MK-801 を使用方法がよく知られている。MK-801 は活性状態の NMDA 受容体に選択的に結合しその機能を阻害する。GABA 受容体阻害剤添加によってシナプス NMDA 受容体の活性を亢進させると同時に MK-801 を添加することでシナプス NMDA 受容体のみを阻害したのち、NMDA を全体に添加することでシナプス外 NMDA 受容体を活性化することができる。また、シナプス外 NMDA 受容体を優先的に阻害すると考えられているメマンチンの添加または投与による方法もよく用いられてきた。しかしながら、シナプス外 NMDA 受容体が *in vivo* でマウスの行動などの制御に関与しているのか、神経細胞ならびに個体の成熟過程に関与しているのか、などを検討するには不十分である。電気生理学的手法によって、Double-KO のシナプス外 NMDA 受容体活性が特異的に低下していることを証明することができれば、シナプス外 NMDA 受容体の機能を検証する有用なモデルマウスになりうると考えられる。

本研究では詳細な解析をおこなうことができなかったが Double-KO においてはシナプス外 AMPA 受容体量も減少しており、X11 および X11L がシナプス外 AMPA 受容体の局在を制御していることを明らかとした。統計学的な有意差はつかなかったものの、PSD 画分における AMPA 受容体量が WT と比較し Double-KO では増加傾向を示した (Fig. 7)。この結果から、X11 および X11L は間接的に AMPA 受容体の側方拡散を制御している可能性が考えられる。

シナプス外 NMDA 受容体の活性と AMPA 受容体の側方拡散の関係を直接的に検証した報告はないが、LTP や LTD では NMDA 受容体による Ca^{2+} の流入によって AMPA 受容体の側方拡散が生じることは広く知られており、Double-KO における AMPA 受容体の局在変化はシナプス外 NMDA 受容体の局在変化の結果である可能性がある。NMDA 受容体阻害剤や Ca^{2+} チャンネル阻害剤などを添加した際の AMPA 受容体の挙動を調べることで NMDA 受容体の活性依存性を検証する必要があると考えられる。

本研究では生体内において X11 および X11L が相補的にシナプス外グルタミン酸受容体の局在を制御していることを初めて明らかとした。生体内においてシナプス外グルタミン酸受容体の局在を特異的に制御している分子はこれまで報告がなく、X11 および X11L が初めてである。Double-KO においてシナプス外 NMDA 受容体の機能低下を示唆する表現型が得られたことから、NMDA 受容体のシナプス外領域への局在を制御することでその機能発現を制御するメカニズムが存在していることが示唆された。X11 および X11L がシナプス外 NMDA 受容体の局在を特異的に制御する分子機構を解明することで、関連する神経変性疾患の発症機構解明に貢献できることが期待される。

5. 材料と方法

マウス

実験に用いたマウスは「北海道大学薬学部」SPF 飼育施設において維持、繁殖した。飼育環境は温度 $23 \pm 3^{\circ}\text{C}$ 、湿度 $50 \pm 10\%$ 、換気回数 10 回/hr に調節されている。12/12 hr (照明 7:00–19:00) の明/暗サイクルで飼育し、餌および水は自由に摂取できるものとした。動物の取り扱いについては「北海道大学動物実験に関する規定」に従った。

Tail DNA の調製

マウスの尻尾を 0.5 cm ほど採取し、300 μl の Tail lysis buffer を加え、 55°C で一晩 incubate した。完全に溶解していることを確認後、 $19,000 \times g$ 、10 min、 4°C で遠心し、上清全量を 1 mL の ethanol に加え DNA を沈殿させた。 $19,000 \times g$ 、5 min、 4°C で遠心し、上清を除去したのち 70% ethanol を用いて洗浄した。 $19,000 \times g$ 、5 min、 4°C で遠心後、乾燥させ 200 μl の TE で溶解した。

Genotyping PCR

生まれてきた仔マウスの X11 および X11L の遺伝子型は PCR で同定した。反応は Tail DNA 1 μl と reaction mixture (1 $\times$ Ex Taq buffer, 200 μM dNTP mix, each primer 0.5 μM , 0.5U/ μL Ex Taq (Takara)) を混合し以下の条件でおこなった。反応後 2%アガロースゲルにて電気泳動し FAS-III (TOYOBO) によって検出し遺伝子型を同定した。

① X11

intact mice は 250 bp、mutant mice は 540 bp の PCR 産物ができるように設計されている。Primer の塩基配列は T1b (5'-tgaggagggtgaacgtatac-3')、T2b (5'-ctcactgcgcgtcattttg-3')、T5 (5'-ggaatgtttccacccaatgtcg-3')、L2 (5'-aggtgagatgacaggagatc-3') である。PCR 反応は 95°C を 3 分、 94°C - 65°C - 72°C を各 30 秒で 30 サイクル、 72°C を 7 分でおこなった。

② X11L

intact mice は 550 bp、mutant mice は 310 bp の PCR 産物ができるように設計されている。Primer の塩基配列は L19 (5'-gtcgacgggtatcgataagct-3')、L20 (5'-tgagtctctctggagggtct-3')、L22 (5'-acatagcacacgggtgcacat-3') である。PCR 反応は 95°C を 3 分、 94°C - 60°C - 72°C を各 30 秒で 35 サイクル、 72°C を 7 分でおこなった。

ウェスタンブロッティング

5 $\times$ Tris-Glycine Sample buffer (final conc. 1 $\times$) を加え 熱処理 (100°C 、5 min) したサンプルを Tris-Glycine gel にアプライし、電気泳動によりタンパク質を分離し、Pure Nitrocellulose

Blotting Membrane (Pall corporation) へ転写した。Membrane を 5% skim milk in TBS-T で 1 hr、室温 で incubate することで blocking をおこなった。TBS-T で洗浄後、各種一次抗体と一晩、4°C で incubate した。Membrane を TBS-T で洗浄後、各種二次抗体と 3 hr 以上室温で incubate した。TBS-T で洗浄後、Clarity™ Western ECL Substrate (Bio-Rad) を用いて化学発光させ、LAS-4000 mini (富士フイルム株式会社) または Hyperfilm (GE Healthcare) で検出をおこなった。定量は LAS-4000 mini で取得した画像にたいし multi gage (富士フイルム株式会社) によっておこなった。

・ウェスタンブロッティングに用いた一次抗体とその希釈率

mouse anti-FLAG M2 monoclonal antibody (SIGMA): 希釈率 1/2000

rabbit anti-GFP polyclonal antibody (MBL, #598): 希釈率 1/1000

mouse anti- α -Tubulin monoclonal antibody (Santa Cruz Biotechnology): 希釈率 1/2000

mouse anti- α -Tubulin monoclonal antibody (WAKO): 希釈率 1/1000

mouse anti-Flotillin-1 monoclonal antibody (BD Biosciences, #610820): 希釈率 1/1000

mouse anti-PSD-95 monoclonal antibody (BD Biosciences, #610495): 希釈率 1/1000

mouse anti-GM130 monoclonal antibody (BD Biosciences, #610822): 希釈率 1/250

mouse anti-Bip/GRP78 monoclonal antibody (BD Biosciences, #610978): 希釈率 1/1000

mouse anti-Syntaxin 6 monoclonal antibody (BD Biosciences, #610636): 希釈率 1/1000

mouse anti-N-Cadherin monoclonal antibody (BD Biosciences, #610920): 希釈率 1/2500

mouse anti-Synaptophysin monoclonal antibody (Santa Crua, #sc-17750): 希釈率 1/1000

rabbit anti-Calnexin polyclonal antibody (Stressgen, #spa-860): 希釈率 1/1000

mouse anti-NMDAR1 monoclonal antibody (BD Biosciences, #556308): 希釈率 1/1000

rabbit anti-NMDAR2A polyclonal antibody (Invitrogen, #480031): 希釈率 1/1000

mouse anti-NR2B monoclonal antibody (BD Biosciences, #610416): 希釈率 1/250

rabbit anti-Glutamate Receptor 1 polyclonal antibody (Millipore, #AB1504): 希釈率 1/1000

rabbit anti-Glutamate Receptor 2&3 polyclonal antibody (Millipore, #AB1506): 希釈率 1/1000

rabbit anti-X11 antibody (#153, Saito *et al.*, 2008): 希釈率 1/1000

rabbit anti-APBA2 (X11L) monoclonal antibody (D8A6) (Cell Signaling, #12731): 希釈率 1/1000

mouse anti-Mint1 (X11) monoclonal antibody (BD Biosciences, #611028): 希釈率 1/500

mouse anti-Mint2 (X11L) monoclonal antibody (BD Biosciences, #M76120): 希釈率 1/1000

rabbit anti-Histone H3 antibody (Cell Signaling, #9715): 1/1000

mouse anti-CREB monoclonal antibody (86B10) (Cell Signaling, #9104): 希釈率 1/1000

rabbit anti-phospho CREB (Ser133) monoclonal antibody (87G3) (Cell Signaling, #9198): 希釈率 1/1000

rabbit anti-ERK1+ERK2 antibody (abcam, #ab17942): 1/1000

rabbit anti-phospho ERK1/2 (Thr202/Tyr204) (Cell Signaling, #4370): 希釈率 1/1000

・ウェスタンブロッティングに用いた二次抗体とその希釈率

anti-mouse IgG HRP-linked species-specific whole antibody (GE Healthcare): 希釈率 1/10000

anti-rabbit IgG HRP-linked species-specific whole antibody (GE Healthcare): 希釈率 1/10000

急性スライスビオチン標識法

マウス脳を摘出し、小脳をおとし半脳にしたのち氷上で 3 min、bubbling (95% O₂, 5% CO₂) した sucrose sol で incubate した。さらに bregma でトリミングし、氷冷した bubbling sucrose sol で 3min、incubate した。Vibratome (Leica) をもちいて mouse brain の側面から 800–3200 μ m の区間を sagittal にスライスした (速度: 0.16 μ m/s、振れ幅: 1.0 mm、厚さ: 400 μ m)。Slice を回収し、32 °C で 30 min、bubbling ACSF 中で incubate し、つづいて氷上で 30 min、bubbling ACSF 中で incubate した。氷冷した 1 mg/mL Sulfo-NHS-LC-biotin in oxygenated ACSF 中で 20 min、incubate した。100 mM Glycine in ACSF で 5 min $\times$ 3 洗浄し、slice 中から hippocampus を分取した。hippocampus に 500 μ L の RIPA buffer を加え、10 sec sonication し、可溶化させた。19,000 $\times$ g、10 min、4°C で遠心した上清を crude とした。crude 全量に 30 μ L の Neutravidin agarose (Thermo Scientific) を加え、4°C で一晩 rotate した。RIPA buffer で 3 回洗浄後 sample buffer mix (8 M Urea : 5 $\times$ S.B. = 2:1) 105 μ L を加え 5 min 煮沸し、19,000 $\times$ g で 2 min 遠心したものを cell surface sample とした。

PSD/non-PSD 画分の調製

マウス脳を摘出し大脳皮質および海馬をサンプルとした。大脳皮質および海馬に 2 mL の buffer A を加え homogenize し、1,000 $\times$ g、4°C で 10 min 遠心した。Sup (S1) をさらに 13,800 $\times$ g、4°C で 20 min 遠心し、上清を S2、buffer A で再懸濁した沈殿を P2 とした。1.2 M sucrose、1.0 M sucrose、0.85 M sucrose (各 3 mL、PI mix を含む) を重層した上に P2 を apply し、SW41 Ti Rotor (Beckman) をもちいて 82,500 $\times$ g、4°C で 2hr 遠心し、1.0 M sucrose と 1.2 M sucrose の境目を回収し、synaptosome 画分とした。Synaptosome 画分に 2 倍量の 6 mM Tris-HCl (pH 8.0) および 20% Triton X-100 (final conc. 0.5 %) を加え、氷冷下で 15 min incubate し、TLA-55 Rotor で 32,000 $\times$ g、4°C で 20 min 遠心し、上清を non-PSD 画分とした。ppt に 0.5 % Triton X-100 in 6 mM Tris-HCl (pH 8.0) を加え、氷冷下で 15 min incubate し、TLA-55 Rotor で 32,000 $\times$ g、4°C で 20 min 遠心し、沈殿を回収後 0.5 % Triton X-100, 0.5 % SDS in 6 mM Tris-HCl (pH 8.0) で可溶化し PSD 画分とした。

non-PSD 画分から共役免疫沈降をおこなうさいには分取した Synaptosome 画分に 2.75 倍量の 5 mM HEPES 溶液を加えることで sucrose 濃度を 0.32 M に調製し、13,800 $\times$ g、4 °C で 20 min 遠心した。沈殿に 120 μ L の 6 mM Tris-HCl (pH8.0) を加えて再懸濁し高濃度の Synaptosome 画分を調製した。高濃度 Synaptosome 画分 100 μ L に 6 mM Tris-HCl (pH 8.0) 100 μ L、1.2 M sucrose 100 μ L、20 % Triton X-100 7.7 μ L (終濃度 0.5 %) を加え 4 °C で 30 min、rotate することで可溶化した。TLA-55 Rotor で 32,000 $\times$ g、4°C で 20 min 遠心し、上清を高濃

度 non-PSD 画分とした。高濃度 non-PSD 画分 750–1000 μg に IP 用抗体を添加 (anti-X11 antibody (#153, Saito *et al.*, 2008) 7.2 μg , anti-APBA2 (X11L) antibody (Cell Signaling, #12731) 1 μg) し、4 $^{\circ}\text{C}$ で一晩 rotate した。その後、50% Dynabeads (Thermo Fiscer Scientific) in 0.5 % Triton X-100, 6 mM Tris-HCl (pH 8.0) を 30 μL 添加し 4 $^{\circ}\text{C}$ で 2 hr、rotate したのち、0.5 % Triton X-100, 6 mM Tris-HCl (pH 8.0) で 3 回洗浄した。Resin に sample buffer mix を加え 5 min、煮沸し 19,000 $\times\text{g}$ 、4 $^{\circ}\text{C}$ で 2 min 遠心した上清をサンプルとした。

Iodixanol 密度勾配遠心法

マウス脳を摘出し、大脳皮質および海馬をサンプルとした。大脳皮質および海馬に 2 mL の Homogenization buffer を加え homogenize したのち 21 G needle で破碎した lysate を 1,000 $\times\text{g}$ 、4 $^{\circ}\text{C}$ で遠心し上清を PNS として回収した。PNS と 50 % Iodixanol を等量混和し、最終濃度 25% Iodixanol としたものを遠心管に入れ、その上に 20 %、18.5 %、16.5 %、14.5 %、12.5 %、10.5 %、8.5 %、6.5 %、5 % Iodixanol を重層し、SW41Ti rotor (Beckman) をもちいて 125,000 $\times\text{g}$ 、4 $^{\circ}\text{C}$ で 20hr 遠心した。遠心後、上層から 500 μL ずつ回収し、サンプルとした。各濃度の Iodixanol 溶液は OptiPrep™ (60% Iodixanol) と Homogenization buffer を混和して、調製した。

核画分の調製

マウス脳を摘出し、大脳皮質および海馬をサンプルとした。大脳皮質および海馬に 2 mL の buffer A (5 mM NaF, 1 mM Na_3VO_4 を含む) を加え 25 回 homogenize し Total lysate とした。Total lysate を 1,000 $\times\text{g}$ 、4 $^{\circ}\text{C}$ で 10 min 遠心し上清 (PNS) および核をふくむ沈殿を得た。沈殿に 1 匹あたり 800 μL の buffer HB を加え氷上で 15 min、incubate した。10% NP-40 を終濃度 0.625%になるように添加し、10 秒間 vortex したのち 11,000 $\times\text{g}$ 、4 $^{\circ}\text{C}$ で 1 min 遠心した。0.625% NP-40 を含む buffer HB で 3 回同様の操作をし得られた沈殿に 1% SDS, 10mM Tris-HCl (pH7.6) 溶液 100 μL を加え sonication したのち 13,000 $\times\text{g}$ 、4 $^{\circ}\text{C}$ で 10 min 遠心し得られた上清を核画分とした。

タンパク質定量

BCA Protein Assay Kit (Pierce™ または TaKaRa) をもちいて BCA 法により定量をおこなった。Standard として 1 mg/mL bovine serum albumin 溶液を用いた。

サンプルを添加した 96 well plate (アズワン) に 100 μL の BCA reagent (Asol : Bsol = 50:1) を加え、37 $^{\circ}\text{C}$ で 30 min、incubate した。OD570 をプレートリーダー (Bio-Rad)で測定した。

Plasmid

以下の plasmid は当研究室保有のものを使用した。

FLAG-X11/pcDNA3.1

FLAG-X11ΔN/pcDNA3.1
FLAG-X11ΔPTB/pcDNA3.1
FLAG-X11ΔPDZ1/pcDNA3.1
FLAG-X11ΔPDZ2/pcDNA3.1
FLAG-X11ΔPDZ1+2/pcDNA3.1
FLAG-X11ΔC/pcDNA3.1
FLAG-X11L/pcDNA3.1
FLAG-X11LΔN/pcDNA3.1
FLAG-X11LΔPTB/pcDNA3.1
FLAG-X11LΔPDZ1/pcDNA3.1
FLAG-X11LΔPDZ2/pcDNA3.1
FLAG-X11LΔPDZ1+2/pcDNA3.1
FLAG-X11LΔC/pcDNA3.1

以下の plasmid は Dr. Haganir から供与いただいた。

NR1-EGFP

NR2A-EGFP

EGFP-NR2B/pRK5

なお plasmid の精製には FastGene Plasmid mini kit (日本ジェネティクス) を使用した。配列の確認には BigDye Terminator Cycle Sequencing に基づきサンプル調製を行い、3100 Data Collection (Applied Biosystem) を使用した。

下記に template として記した各 plasmid DNA ならびに forward primer、reverse primer をもちいて Ex Taq (Takara) によって PCR 反応をおこなった。PCR 産物をアガロースゲル電気泳動によって分離した後、目的産物に相当する断片をゲルから切り出し、FastGene ゲル/PCR 抽出キット (日本ジェネティクス) を用いて DNA を抽出し insert を調製した。

次いで、insert および vector にたいしてそれぞれ制限酵素による切断をおこなった。反応液は各制限酵素 0.5 μl、推奨 buffer 2 μl、DNA 溶液を加え、DDW で total 20 μl になるように調整した。37°C、1hr incubate することで制限酵素による切断をおこなった後、先述の通りにアガロースゲル電気泳動による分離、目的 DNA の抽出をおこなった。

ついで、vector 0.5 μl、insert 2.0 μl、2× ligation mix (ニッポンジーン) 2.5 μl を混合し、16°C、30 min、incubate することで ligation 反応をおこなった。本反応液に 50 μl の competent E. coli (DH5α) を加え、氷上で 10 min 以上 incubate し、42°Cで 45 秒間 heat shock を加えたあと、氷上で 2 分間 incubate した。LB (50 μg/mL ampicillin) plate に播種し、37°Cで 16 hr 培養した。Single colony から plasmid を精製し、制限酵素処理によって insert を確認したのち

配列を確認した。

plasmid name: NR1/pcDNA3.1 (*Hind*III/*Bam*HI)
template: NR1-EGFP
forward primer: cccaagcttgccaccatgatgagcaccatgcacctg
reverse primer: cgcggtatcctcagctctccctatgacg
vector: pcDNA3.1

plasmid name: NR1Δ834–938/pcDNA3.1 (*Kpn*I/*Bam*HI)
template: NR1/pcDNA3.1
forward primer: ctacaatgtaccatgtca
reverse primer: cgcggtatcctcaaatgaaatgaggaaatcccag
vector: NR1/pcDNA3.1

plasmid name: EGFP-NR2BΔ1316–1482/pRK5 (*Xho*I/*Bam*HI)
template: EGFP-NR2B/pRK5
forward primer: catggacgagctgtacaag (EGFP-C-terminal for)
reverse primer: cgcggtatcctcaggctcctcctctgcag
vector: EGFP-NR2B/pRK5

plasmid name: EGFP-NR2BΔ1141–1482/pRK5 (*Xho*I/*Bam*HI)
template: EGFP-NR2B/pRK5
forward primer: catggacgagctgtacaag (EGFP-C-terminal for)
reverse primer: cgcggtatcctcacttggtcggaactggtc
vector: EGFP-NR2B/pRK5

plasmid name: EGFP-NR2BΔ1011–1482/pRK5 (*Xho*I/*Bam*HI)
template: EGFP-NR2B/pRK5
forward primer: catggacgagctgtacaag (EGFP-C-terminal for)
reverse primer: cgcggtatcctcagggtgggtgtcacagtc
vector: EGFP-NR2B/pRK5

plasmid name: EGFP-NR2BΔ839–1482/pRK5 (*Xho*I/*Bam*HI)
template: EGFP-NR2B/pRK5
forward primer: catggacgagctgtacaag (EGFP-C-terminal for)
reverse primer: cgcggtatcctcaacagatgaagtgatgag

vector: EGFP-NR2B/pRK5

細胞培養

N2a 細胞は 56°C で 30 分間処理し非動化した Fatal Bovine Serum (FBS) (MP biomedical) を 5% (v/v) 含む DMEM (WAKO) 中で 37°C、5% CO₂ の条件下で培養した。

培養細胞への発現 plasmid の transfection

6 well dish (Corning) に培地総量 1mL にて N2a 細胞を播種し、80–90 % confluent の状態で transfection を行った。発現 plasmid を 90 µL の OPTI-MEM (GIBCO) で希釈した溶液と、plasmid 量 1 µg あたり 2 µL の Lipofecamine 2000 (Invitrogen) を 75 µL の OPTI-MEM で希釈し室温で 5 min incubate した溶液を混和し、20 min 室温で incubate した。これを 1 mL の 5% FBS/DMEM 培地に添加し、37°C、5% CO₂ の条件下で 24 hr 培養した。

共役免疫沈降法

Transfection から 24hr 後に培養上清を除去し、PBS で洗浄した細胞を回収した。800 ×g、4°C で 3 min 遠心することで細胞を ppt に集め 1200 µL の HBS-T を加えたのち 1 hr、4°C で rotate することで細胞を可溶化した。19,000 ×g、16 min 遠心した上清を crude 溶液とした。オカダ酸 (Okadaic acid: OA、WAKO) 処理は遺伝子導入から 21 hr 経過後に終濃度 400 nM となるように添加した。3 hr、37°C、5% CO₂ 条件下で培養したのち培地ごと細胞を回収し、上述のとおり可溶化をおこなった。

共役免疫沈降は M2 agarose beads (SIGMA) をもちいておこなった。1100 µL の cell lysate に 10 µL の M2 agarose beads を加え、4°C で一晩 rotate した。その後、resin を HBS-T で 2 回洗浄し、80 µL の sample buffer mix を加え、5 分間煮沸し、sample とした。

マウス大脳皮質初代培養神経細胞の調製および培養

WT および X11-KO neuron は [X11+/-, X11L+/-] マウスの交配から、X11L-KO および Double-KO neuron は [X11+/-, X11L-/-] マウスの交配によって得られた胎児脳をもちいた。胎生 15.5 日目のマウス胎児を妊娠マウスの子宮から取り出し、氷冷した HBSS (+) において胎児から脳を摘出し、さらに大脳皮質を取り出した。胎児脳を 1 匹分ずつエッペンチューブにいれ 2% B27 (Gibco) および 4 mM Glutamax (Gibco) を含む Hibernate E (Brain bits) を 1 mL 加え、4°C で 3 日から 5 日保存した。各胎児から尻尾を採取し、前述の通り Tail DNA を調製し genotyping PCR をおこなうことで遺伝子型を確認した。保存した胎児脳を HBSS (+) で洗浄後、20 U/mL Papain (Worthington) in Papain dilute solution を添加し 37°C で 15 min incubate することで細胞を分散した。20 % Horse serum/HBSS (+) で 1 回、HBSS (+) で 2 回洗浄したのち CM (+) を加えてピペッティングによって懸濁し、セルストレーナー (ファルコン) で濾過した。濾過液を 1,940 ×g、室温で 3 min 遠心し、上清に含まれる死細胞を除去

したのち沈殿を再度 CM (+) で懸濁し、播種した。

6 well plate ならびに 96 well plate (Corning) は 0.1 mg/mL Poly-L-Lysine (Sigma) で coating したものを使用した。8 well grass chamber (Nunc) は 0.04 % Polyethyleneimine Max (PSI) で 2hr 以上、1 mg/mL Poly-L-Lysine で 2hr 以上 coating したものを使用した。なお、播種数は下記の通りである。

6 well dish: 8×10^5 cells/well

96 well dish: 4×10^4 cells/well

8 well grass chamber: 4×10^4 cells/well

蛍光二重免疫染色法

8 well grass chamber に播種した Div. 14–16 のマウス初代培養神経細胞を PBS で洗浄後、4% paraformaldehyde/PBS を加え室温で 20 min、incubate することで細胞を固定した。0.1% Triton X-100/PBS で洗浄したのち 0.1% Triton X-100/PBS を加え、30 min、室温で incubate することで細胞透過処理をおこなった。PBS で洗浄後、3% serum / PBS (3% normal goat serum, 3% normal horse serum in PBS) を加え室温で 1hr、incubate することで blocking をおこなった。一次抗体を 3% serum で希釈し、細胞に添加して 4°Cで一晩 incubate した。0.1% Triton X-100/PBS で 2 回、PBS で 3 回洗浄したのち Alexa 標識 2 次抗体を 3% serum で希釈し、細胞に添加した。室温で 3 hr、incubate したのち、0.1% Triton X-100/PBS で 1 回、PBS で 3 回洗浄し PBS を添加して蛍光顕微鏡 (BZ-X710, KEYENCE) で観察した。画像解析は ImageJ でおこなった。

免疫染色でもちいた一次抗体

rabbit anti-NMDAR2A polyclonal antibody (Invitrogen, #480031) : 希釈率 1/500

rabbit anti-NMDAR2B polyclonal antibody (Invitrogen, #71-8600) : 希釈率 1/500

mouse anti-EEA1 monoclonal antibody (BD Biosciences, #610457) : 希釈率 1/100

mouse anti-Transferrin receptor monoclonal antibody (Thermo scientific, #13-6800) : 希釈率 1/500

免疫染色でもちいた 2 次抗体

Alexa Fluoro 488 donkey anti-rabbit IgG antibody (Life technologies) : 希釈率 1/1000

Alexa Fluoro 546 goat anti-mouse IgG antibody (Invitrogen) : 希釈率 1/1000

Sulfo-NHS-SS-biotin 標識法

6 well dish に播種した Div. 14 の初代培養神経細胞を氷上にて PBS で 1 回洗浄し、0.75 mg/mL Sulfo-NHS-SS-biotin in PBS (Thermo Scientific) を 1 mL 加えた。氷上で 20 min、incubate することで細胞表面上のタンパク質をラベルした。Neurobasal medium (Gibco) で 1 回洗浄後、CM (+) を加え、30min、37°C、5 % CO₂ 条件下で incubate することでエンドサイトーシ

スを誘導した。氷上にて Stripping buffer (+) または Stripping buffer (-) で細胞を洗浄したのちそれぞれの buffer を再度加え 5 min、incubate した。PBS で 1 回洗浄したのち、500 μ L の RIPA buffer を加え、sonication 後、30 min、4°C で rotate することで可溶化した。19,000 $\times$ g、4°C で 16 min 遠心した上清を crude lysate とした。440 μ L の crude lysate に 20 μ L の Neutravidin agarose (Thermo Scientific) を加え、4°C で 2 hr、rotate した。resin を RIPA buffer で 3 回洗浄し、30 μ L の sample buffer mix を加え、5 min 煮沸した上清をサンプルとした。なお、Stripping buffer (+) で洗浄したものを endocytosis サンプル、Stripping buffer (-) で洗浄したものを cell surface サンプルとして用いた。

生細胞活性の測定 (MTT assay)

96 well dish に播種した Div. 13 の初代培養神経細胞に NMDA (WAKO)、Glycine (WAKO)、D-APV (WAKO) を添加し、24hr、37°C、5 % CO₂ 条件下で培養した。1 well あたりの培地残量を 50 μ L に調整し、そこへ 5 μ L の 5 mg/mL MTT (DOJINDO) を添加し、3 hr、37°C、5 % CO₂ 条件下で incubate することでホルマザンを形成させた。その後、10% SDS in 0.01N HCl を 100 μ L 添加し 37°C で一晩 incubate することでホルマザンを可溶化し、OD570 をマイクロプレートリーダーで測定した。

細胞傷害率の測定 (LDH assay)

96 well dish に播種した Div. 13 の初代培養神経細胞に NMDA (WAKO)、Glycine (WAKO)、D-APV (WAKO) を添加し、24hr、37°C、5 % CO₂ 条件下で培養した。培養上清を回収し、LDH Cytotoxicity Detection Kit (TaKaRa) をもちいて LDH 活性に応じた呈色反応を誘導し、OD490 をマイクロプレートリーダーで測定した。細胞傷害率は下記の式で算出した。なお、blank には assay に使用した medium に対してサンプルと同様の操作をした際の OD490 活性を用いた。

$$\text{細胞傷害率} = \frac{\text{各サンプルのLDH活性} - \text{blank}}{\text{全可溶した細胞のLDH活性} - \text{blank}}$$

実験に用いた buffer の組成

- 0.85 M sucrose: 0.85 M sucrose, 10 mM HEPES (pH 7.6), 0.1% PI mix
- 1.0 M sucrose: 1.0 M sucrose, 10 mM HEPES (pH 7.6), 0.1% PI mix
- 1.2 M sucrose: 1.2 M sucrose, 10 mM HEPES (pH 7.6), 0.1% PI mix
- 5 $\times$ Sample buffer: 15% SDS, 40% Glycerol, 0.2 M Tris-HCl (pH6.8), 5 mM EDTA (pH8.0), 10% 2-Mercaptoethanol, 64 ng/ml Bromophenol blue
- ACSF: 125 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 1.1 mM NaH₂PO₄ /H₂O, 1.0 mM MgSO₄, 2.0 mM CaCl₂, 26 mM NaHCO₃, 12 mM glucose

- Buffer A: 0.32 M sucrose, 10 mM HEPES (pH 7.6), 0.1% PI mix
- Buffer HB: 10 mM HEPES, 10 mM KCl, 0.1 mM EDTA, 0.1 mM EGTA, 1 mM DTT, 5 mM NaF, 1 mM Na₃VO₄, 5 mM sodium pyrophosphate, 0.1% PI mix
- CM (+): 2% B27 supplement (Gibco), 4 mM Glutamax I (Gibco), penicillin/streptomycin (Gibco), 5% or 1% Horse serum (Gibco) in Neurobasal medium (Gibco)
- HBSS (+): 5 mM KCl, 0.4 mM KH₂PO₄, 137 mM NaCl, 4 mM NaHCO₃, 0.3 mM Na₂HPO₄, 10 mM HEPES, 33.3 mM Glucose, 10 µM Gentamycin
- HBS-T: 10 mM HEPES (pH7.6), 150 mM NaCl, 0.5% Triton X-100, 0.1% PI mix
- Homogenization buffer: 250 mM sucrose, 20 mM Tris-HCl (pH 7.6), 1 mM EGTA, 1 mM EDTA, 0.1% PI mix
- LB medium: 1% Tryptone, 0.5% Yeast extract, 170 mM NaCl
- Papain dilute solution: 1.65 mM L-Cysteine, 27.8 mM D-Glucose, 0.02% bovine serum albumin
- PBS: 10 mM sodium phosphate buffer (pH 7.4), 137 mM NaCl, 27 mM KCl
- PI (protease inhibitor) mix: 5µg/ml Leupeptin, 5µg/ml Pepstatin A, 5µg/ml Chymostatin
- RIPA buffer: 50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 150 mM NaCl, 0.5% DOC, 0.5% NP-40, 0.5% SDS, 0.1% PI mix
- Stripping buffer (-): 75 mM NaOH, 10% FBS
- Stripping buffer (+): 48.8 mM Glutathione, 75 mM NaCl, 75 mM NaOH, 10% FBS
- Sucrose sol: 234 mM sucrose, 2.5 mM KCl, 1.1 mM NaH₂PO₄ /H₂O, 10 mM MgSO₄, 0.5 mM CaCl₂, 26 mM NaHCO₃, 12 mM glucose
- Tail lysis buffer: 100 mM Tris-HCl (pH 8.0), 100 mM NaCl, 20 mM EDTA, 1% SDS, 0.4 mg/ml Proteinase K (Roche, PCR grade)
- TBS-T: 20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 137 mM NaCl, 0.05% Tween20
- TE: 10 mM Tris-HCl (pH 7.4), 1 mM EDTA

6. 参考文献

- Blanpied, T. A., Scott, D. B. and Ehlers, M. D. (2002) “Dynamics and Regulation of Clathrin Coats at Specialized Endocytic Zones of Dendrites and Spines.” *Neuron* 36(3): 435–449.
- Bordji, K., Becerril-Ortega, J., Nicole, O. and Buisson, A. (2010) “Activation of Extrasynaptic, But Not Synaptic, NMDA Receptors Modifies Amyloid Precursor Protein Expression Pattern and Increases Amyloid- β Production.” *The Journal of Neuroscience* 30(47): 15927–15942.
- Borg, J. P., Ooi, J., Levy, E. and Margolis, B. (1996) “The Phosphotyrosine Interaction Domains of X11 and FE65 Bind to Distinct Sites on the YENPTY Motif of Amyloid Precursor Protein.” *Molecular and cellular biology* 16(11): 6229–6241.
- Carroll, R. C. Beattie, E. C., Lüscher, C., Nicoll, R. A., Malenka, R. C. and Zastrow, M. V. (1999) “Dynamin-Dependent Endocytosis of Ionotropic Glutamate Receptors.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96(24): 14112–14117.
- Chung, H. J., Huang, Y. H., Lau, L. F. and Huganir, R. L. (2004) “Regulation of the NMDA Receptor Complex and Trafficking by Activity-Dependent Phosphorylation of the NR2B Subunit PDZ Ligand.” *The Journal of neuroscience* 24(45): 10248–10259.
- Dieterich, D. C., Karpova, A., Mikhaylova, M., Zdobnova, I., König, I., Landwehr, M., Kreutz, M., Smalla, K. H., Richter, K., Landgraf, P., Reissner, C., Boeckers, T. M., Zuschratter, W., Spilker, C., Seidenbecher, C. I., Garner, C. C., Gundelfinger, E. D. and Kreutz, M. R. (2008) “Caldendrin-Jacob: A Protein Liaison That Couples NMDA Receptor Signalling to the Nucleus.” *PLoS Biology* 6(2): 286–306.
- Duclos, F., Boschert, U., Sirugo, G., Mandel, J. L., Hen, R. and Koenig, M. (1993) “Gene in the Region of the Friedreich Ataxia Locus Encodes a Putative Transmembrane Protein Expressed in the Nervous System.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90(1): 109–113.
- Garcia-Munoz, M., Lopez-Huerta, V. G., Carrillo-Reid, L. and Arbuthnott, G. W. (2015) “Extrasynaptic Glutamate NMDA Receptors: Key Players in Striatal Function.” *Neuropharmacology* 89: 54–63.

- Gardner, S. M., Takamiya, K., Xia, J., Duh, J. G., Johnson, R., Yu, S. and Huganir, R. L (2005) "Calcium-Permeable AMPA Receptor Plasticity Is Mediated by Subunit-Specific Interactions with PICK1 and NSF." *Neuron* 45(6): 903–915.
- Glodowski, D. R. Chih-Hsiung, C., Schaefer, H., Grant, B. D. and Rongo, C. (2007) "RAB-10 Regulates Glutamate Receptor Recycling in a Cholesterol-Dependent Endocytosis Pathway." *Molecular biology of the cell* 18(11): 4387–4396.
- Gu, Y., and Huganir, R. L. (2016) "Identification of the SNARE Complex Mediating the Exocytosis of NMDA Receptors." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 113(43): 12280–12285.
- Guillaud, L., Wong, R. and Hirokawa, N. (2008) "Disruption of KIF17-Mint1 Interaction by CaMKII-Dependent Phosphorylation: A Molecular Model of Kinesin-Cargo Release." *Nature cell biology* 10(1): 19–29.
- Hardingham, G. E., Fukunaga, Y. and Bading, H. (2002) "Extrasynaptic NMDARs Oppose Synaptic NMDARs by Triggering CREB Shut-off and Cell Death Pathways." *Nature neuroscience* 5(5): 405–414.
- Hardingham, G. E., Arnold, F. J. L. and Bading, H. (2001a). "A Calcium Microdomain near NMDA Receptors: On Switch for ERK-Dependent Synapse-to-Nucleus Communication." *Nature Neuroscience* 4(6): 565–566.
- Hardingham, G. E., Arnold, F. J. L. and Bading H. (2001b) "Nuclear Calcium Signaling Controls CREB-Mediated Gene Expression Triggered by Synaptic Activity." *Nature Neuroscience* 4(3): 261–267.
- Ho, A., Morishita, W., Atasoy, D., Liu, X., Tabuchi, K., Hammer, R. E., Malenka, R. C. and Südhof, T. C. (2006) "Genetic Analysis of Mint/X11 Proteins: Essential Presynaptic Functions of a Neuronal Adaptor Protein Family." *The Journal of neuroscience* 26(50): 13089–13101.
- Ivanov, A., Pellegrino, C., Rama, S., Dumalska, I., Salyha, Y., Ben-Ari, Y. and Medina, I. (2006) "Opposing Role of Synaptic and Extrasynaptic NMDA Receptors in Regulation of the Extracellular Signal-Regulated Kinases (ERK) Activity in Cultured Rat Hippocampal Neurons." *The Journal of physiology* 572(3): 789–798.

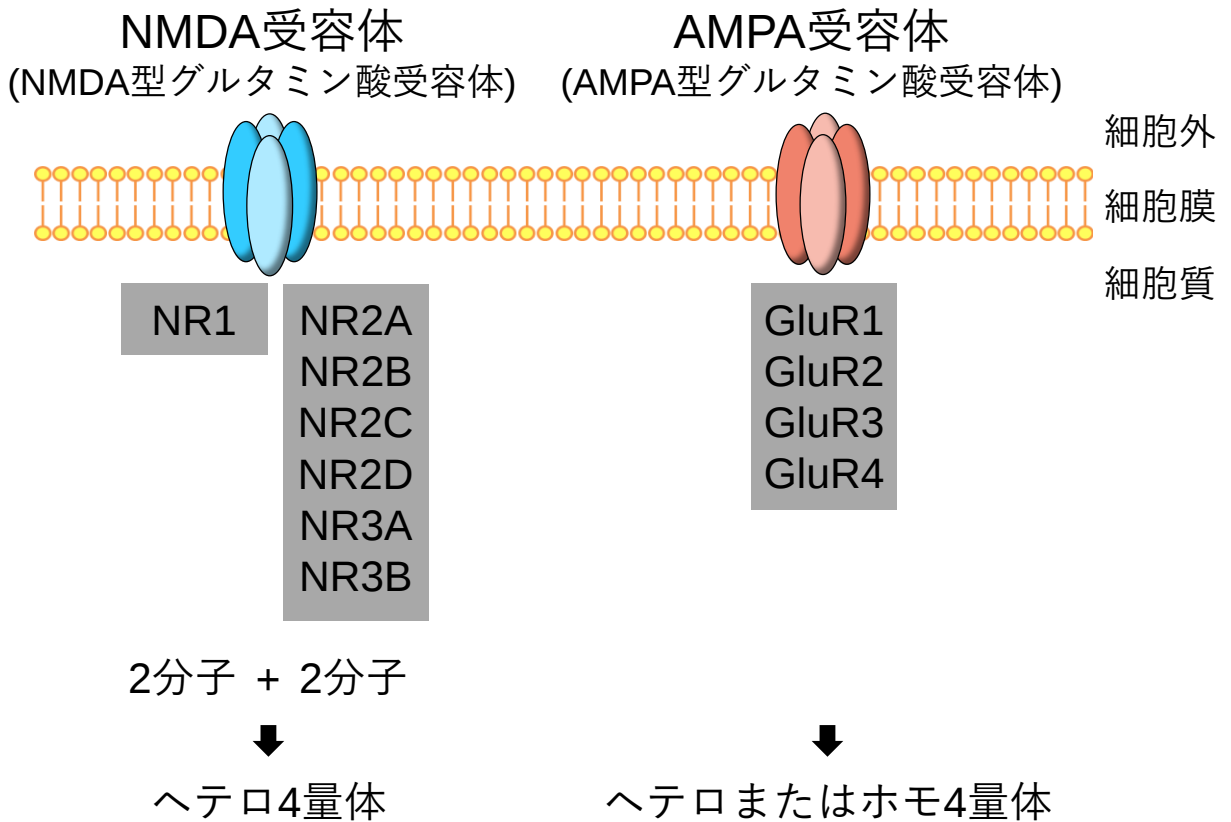
- Jeyifous, O., Waites, C. L., Specht, C. G., Fujisawa, S., Schubert, M., Lin, E. I., Marshall, J., Aoki, C., Silva, T. D., Montgomery, J. M., Garner, C. C. and Green, W. N. (2009) "SAP97 and CASK Mediate Sorting of NMDA Receptors through a Previously Unknown Secretory Pathway." *Nature neuroscience* 12(8): 1011–1019.
- Jones, K. A., End, A. G., Raval, P., Srivastava, D. P. and Penzes, P. (2014) "Scaffold Protein X11 α Interacts with Kalirin-7 in Dendrites and Recruits It to Golgi Outposts." *The Journal of Biological Chemistry* 289(51): 35517–35529.
- Karlsson, R. M., Tanaka, K., Heilig, M. and Holmes, A. (2008) "Loss of Glial Glutamate and Aspartate Transporter (Excitatory Amino Acid Transporter 1) Causes Locomotor Hyperactivity and Exaggerated Responses to Psychotomimetics: Rescue by Haloperidol and Metabotropic Glutamate 2/3 Agonist." *Biological Psychiatry* 64(9): 810–814.
- Karpova, A., Mikhaylova, M., Bera, S., Bär, J., Reddy, P. P., Behnisch, T., Rankovic, V., Spilker, C., Bethge, P., Sahin, J., Kaushik, R., Zuschratter, W., Kähne, T., Naumann, M., Gundelfinger, E. D. and Kreutz, M. R. (2013) "Encoding and Transducing the Synaptic or Extrasynaptic Origin of NMDA Receptor Signals to the Nucleus." *Cell* 152(5): 1119–1133.
- Kiraly, D. D., Lemtiri-Chlieh, F., Levine, E. S., Mains, R. E. and Eipper, B. A. (2011) "Kalirin Binds the NR2B Subunit of the NMDA Receptor, Altering Its Synaptic Localization and Function." *The Journal of neuroscience* 31(35): 12554–12565.
- Lavezzari, G., McCallum, J. R. and Roche, K. W. (2003) "Differential Binding of the AP-2 Adaptor Complex and PSD-95 to the C-Terminus of the NMDA Receptor Subunit NR2B Regulates Surface Expression." *Neuropharmacology* 45: 729–737.
- Lee, H. K., Tkamiya, K., Han, J. S., Man, H., Kim, C. H., Rumbaugh, G., Yu, S., Ding, L., He, C., Petralia, R. S., Wenthold, R. J., Gallagher, M. and Huganir, R. L. (2003) "Phosphorylation of the AMPA Receptor GluR1 Subunit Is Required for Synaptic Plasticity and Retention of Spatial Memory." *Cell* 112(5): 631–643.
- Malenka, R. C. and Nicoll, R. A. (1993). "NMDA-Receptor-Dependent Synaptic Plasticity: Multiple Forms and Mechanisms." *Trends in Neurosciences* 16(12): 521-527.
- Milnerwood, A. J., Gladding, C. M., Pouladi, M. A., Kaufman, A. M., Hines, R. M., Boyd, J. D., Ko, R. W. Y., Vasuta, O. C., Graham, R. K. and Hayden, M. R. (2010) "Early Increase in

- Extrasynaptic NMDA Receptor Signaling and Expression Contributes to Phenotype Onset in Huntington's Disease Mice." *Neuron* 65(2): 178–190.
- Miyakawa, T., Leiter, L. M., Gerber, D. J., Gainetdinov, R. R., Sotnikova, T. D., Zeng, H., Caron, M. G. and Tonegawa, S. (2003) "Conditional Calcineurin Knockout Mice Exhibit Multiple Abnormal Behaviors Related to Schizophrenia." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100(15): 8987–8992.
- Monyer, H., Burnashev, N., Laurie, D. J., Sakmann, B. and Seeburg, P. H. (1994) "Developmental and Regional Expression in the Rat Brain and Functional Properties of Four NMDA Receptors." *Neuron* 12(3): 529–540.
- Motodate, R., Saito, Y., Hata, S. and Suzuki, T. (2016) "Expression and Localization of X11 Family Proteins in Neurons." *Brain Research* 1646: 227–234.
- Mulkey, R. M. and Malenka, R. C. (1992) "Mechanisms Underlying Induction of Homosynaptic Long-Term Depression in Area CA1 of the Hippocampus." *Neuron* 9(5): 967–975.
- Okamoto, M. and Südhof, T. C. (1997) "Mints, munc18-Interacting Proteins in Synaptic Vesicle Exocytosis." *The Journal of Biological Chemistry* 272(50): 31459–31464.
- Papouin, T., Ladépêche, L., Ruel, J., Sacchi, S., Labasque, M., Hanini, M., Groc, L., Pollegioni, L., Mothet, J. P. and Oilet, S. H. R. (2012) "Synaptic and Extrasynaptic NMDA Receptors Are Gated by Different Endogenous Coagonists." *Cell* 150(3): 633–646.
- Passafaro, M., Piäch, V. and Sheng, M. (2001) "Subunit-Specific Temporal and Spatial Patterns of AMPA Receptor Exocytosis in Hippocampal Neurons." *Nature Neuroscience* 4(9): 917–926.
- Piguel, N. H., Fiebre, S., Blanc, J. M., Carta, M., Moreau, M. M., Moutin, E., Pinheiro, V. L., Mendina, C., Ezan, J., Lasvaux, L., Loll, F., Durand, C. M., Chang, K., Petralia, R. S., Wenthold, R. J., Stephenson, F. A., Vuillard, L., Darbon, H., Perroy, K., Mulle, C., Montcouquiol, M., Racca, C. and Sans, N. (2014) "Scribble1/AP2 Complex Coordinates NMDA Receptor Endocytic Recycling." *Cell Reports* 9(2): 712–727.
- Roche, K. W., Standley, S., McCallum, J., Ly, C. D., Ehlers, M. D. and Wenthold, R. J. (2001) "Molecular Determinants of NMDA Receptor Internalization." *Nature neuroscience* 4(8): 794–802.

- Rouach, N., Byrd, K., Petralia, R. S., Eilas, G. M., Adesnik, H., Tomita, S., Karimzadegan, S., Kealey, C., Bredt, D. S. and Nicoll, R. A. (2005) "TARP Gamma-8 Controls Hippocampal AMPA Receptor Number, Distribution and Synaptic Plasticity." *Nature neuroscience* 8(11): 1525–1533.
- Saito, Y., Sano, Y., Vassar, R., Gandy, S., Nakaya, T., Yamamoto, T. and Suzuki, T. (2008) "X11 Proteins Regulate the Translocation of Amyloid β -Protein Precursor (APP) into Detergent-Resistant Membrane and Suppress the Amyloidogenic Cleavage of APP by β -Site-Cleaving Enzyme in Brain." *The Journal of Biological Chemistry* 283(51): 35763–35771
- Setou, M., Nakagawa, T., Seog, D. H. and Hirokawa, N. (2000) "Kinesin Superfamily Motor Protein KIF17 and mLin-10 in NMDA Receptor-Containing Vesicle Transport." *Science* 288(5472): 1796–1802.
- Setou, M., Seog, D. H., Tanaka, Y., Kanai, Y., Takei, Y., Kawagishi, M. and Hirokawa, N. (2002) "Glutamate-Receptor-Interacting Protein GRIP1 Directly Steers Kinesin to Dendrites." *Nature* 417(6884): 83–87.
- Sheng, M., Cummings, J., Roldan, L. A., Jan, Y. N. and Jan, L. Y. (1994) "Changing Subunit Composition of Heteromeric NMDA Receptors during Development of Rat Cortex." *Nature* 368(10): 144–147.
- Snyder, E. M., Nong, Y., Almeida, C. G., Paul, S., Moran, T., Choi, E. Y., Nairn, A. C., Salter, M. W., Lombroso, P. J., Gouras, G. K. and Greengard, P. (2005) "Regulation of NMDA Receptor Trafficking by Amyloid-Beta." *Nature neuroscience* 8(8): 1051–1058.
- Stricker, N. L. and Huganir, R. L. (2003) "The PDZ Domains of mLin-10 Regulate Its Trans-Golgi Network Targeting and the Surface Expression of AMPA Receptors." *Neuropharmacology* 45(6): 837–848.
- Sumioka, A., Brown, T. E., Kato, A. S., Bredt, D. S., Kauer, J. A. and Tomita, S. (2011) "PDZ Binding of TARPy-8 Controls Synaptic Transmission but Not Synaptic Plasticity." *Nature neuroscience* 14(11): 1410–1412.
- Tang, T. T. T., Badger, J. D. 2nd, Roche, P. A. and Roche, K. W. (2010) "Novel Approach to Probe Subunit-Specific Contributions to N-Methyl-D-Aspartate (NMDA) Receptor Trafficking Reveals a Dominant Role for NR2B in Receptor Recycling." *The Journal of Biological Chemistry* 285(27): 20975–20981.

- Tomita, S., Ozaki, T., Taru, H., Oguchi, S., Takeda, S., Yag, Y., Sakiyama, S., Kirino, Y. and Suzuki, T. (1999) "Interaction of a Neuron-Specific Protein Containing PDZ Domains with Alzheimer's Amyloid Precursor Protein." *The Journal of Biological Chemistry* 274(4): 2243–2254.
- Tomita, S., Stein, V., Stocker, T. J., Nicoll, R. A. and Brecht, D. S. (2005) "Bidirectional Synaptic Plasticity Regulated by Phosphorylation of Stargazin-like TARPs." *Neuron* 45(2): 269–277.
- Washbourne, P., Bennett, J. E. and McAllister, A. K. (2002) "Rapid Recruitment of NMDA Receptor Transport Packets to Nascent Synapses." *Nature neuroscience* 5(8): 751–759.
- Won, S., Incontro, S., Nicoll, R. A. and Roche, K. W. (2016) "PSD-95 Stabilizes NMDA Receptors by Inducing the Degradation of STEP₆₁." *Proceedings of the National Academy of Sciences*: 113(32): 4736–4744.
- Yudowski, G. A., Puthenveedu, M. A., Leonoudakis, D., Panicker, S., Thorn, K. S., Beattie, E. C. and Zastrow, M. V. (2007) "Real-Time Imaging of Discrete Exocytic Events Mediating Surface Delivery of AMPA Receptors." *The Journal of Neuroscience* 27(41): 11112–11121.
- Zhang, S., Edelmann, L., Liu, J., Crandall, J. E. and Morabito, M. A. (2008) "Cdk5 Regulates the Phosphorylation of Tyrosine 1472 NR2B and the Surface Expression of NMDA Receptors." *The Journal of neuroscience* 28(2): 415–424.
- Zheng, N., Jeyifous, O., Munro, C., Montgomery, J. M. and Green, W. N. (2015) "Synaptic Activity Regulates AMPA Receptor Trafficking through Different Recycling Pathways." *eLife* 11: 1–20.
- Zhu, J. J., Esteban, J. A., Hayashi, Y. and Malinow, R. (2000) "Postnatal Synaptic Potentiation: Delivery of GluR4-Containing AMPA Receptors by Spontaneous Activity." *Nature Neuroscience* 3(11): 1098–1106.

(A)



(B)

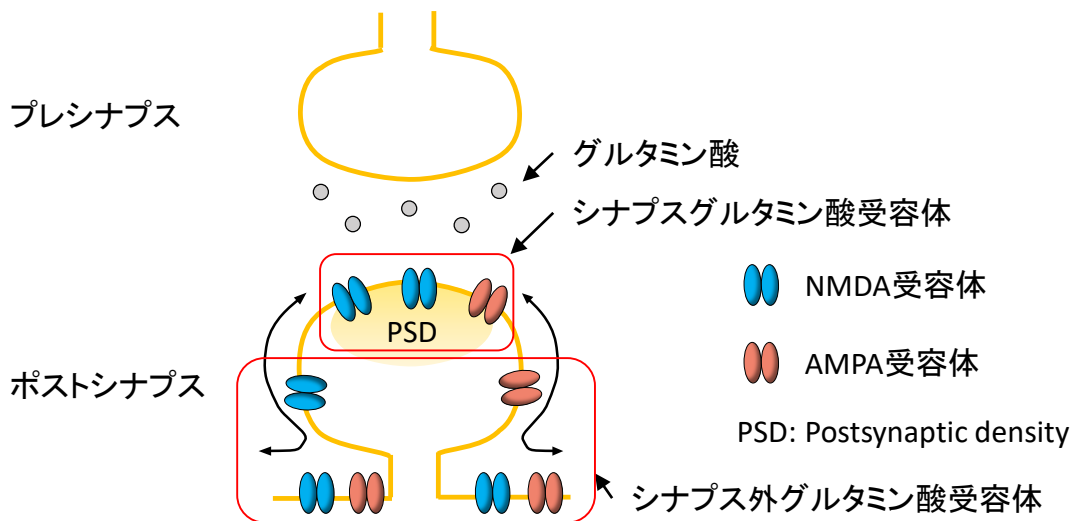
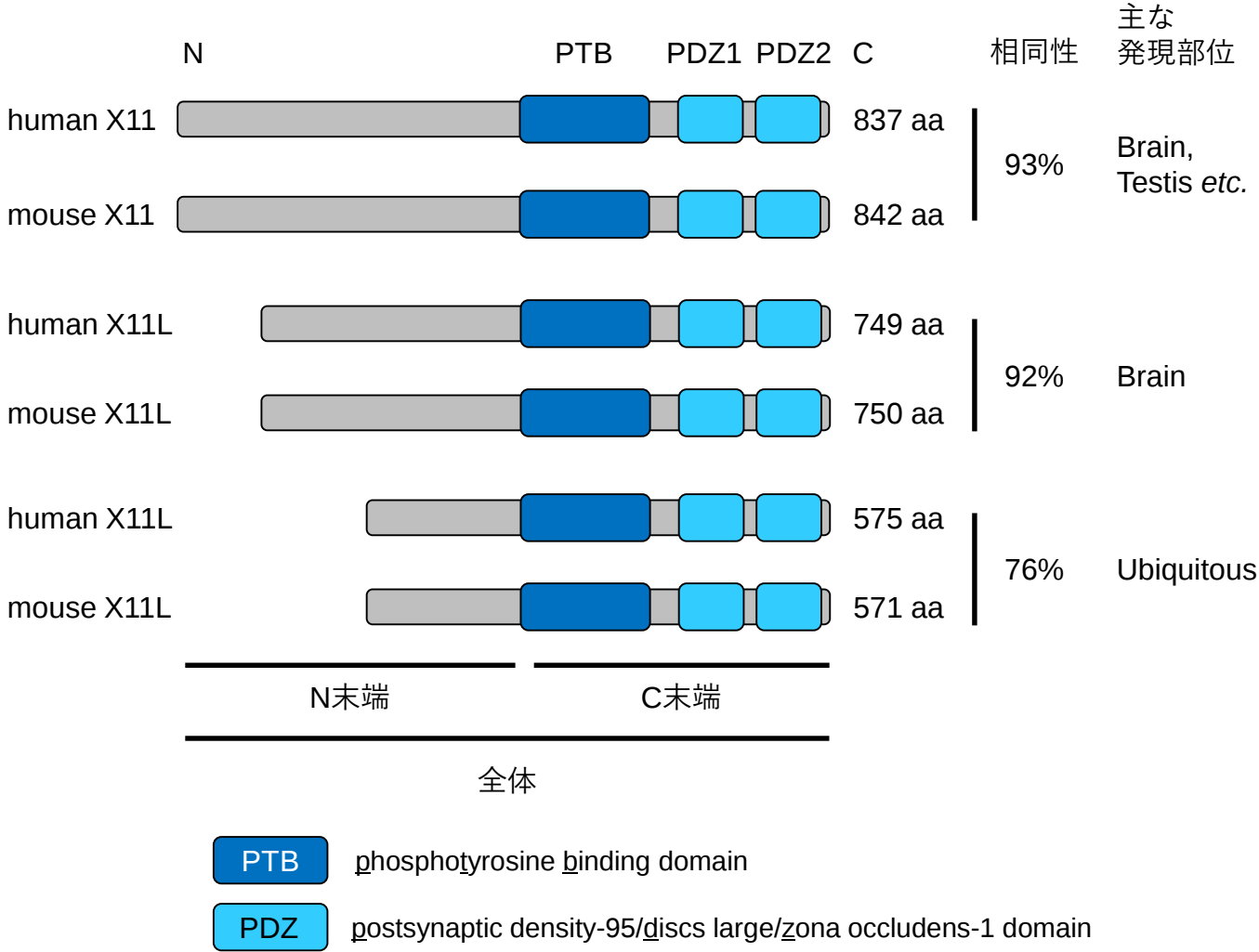


Figure 1. グルタミン酸受容体

(A) NMDA受容体はNR1サブユニット2分子とNR2またはNR3サブユニット2分子からなるヘテロ4量体を形成し、AMPA受容体はGluR1-4サブユニットからなるホモまたはヘテロ4量体を形成する。

(B) シナプス受容体およびシナプス外受容体の模式図。

(A)



(B)

human X11ファミリータンパク質の相同性比較

	N末端	C末端	全体
X11 vs X11L	25%	85%	52%
X11 vs X11L2	17%	61%	37%
X11L vs X11L2	20%	61%	40%

Figure 2. X11ファミリータンパク質

(A) X11ファミリータンパク質の模式図、主な発現部位ならびにhumanとmouseの一次構造を比較した際の相同性を示す。X11およびX11Lの種間での相同性は極めて高い。

(B) human X11ファミリータンパク質のファミリー内での相同性を比較した結果を示す。N末端の相同性が低い一方、C末端の相同性が高い。特にX11とX11LのC末端は極めて相同的である。

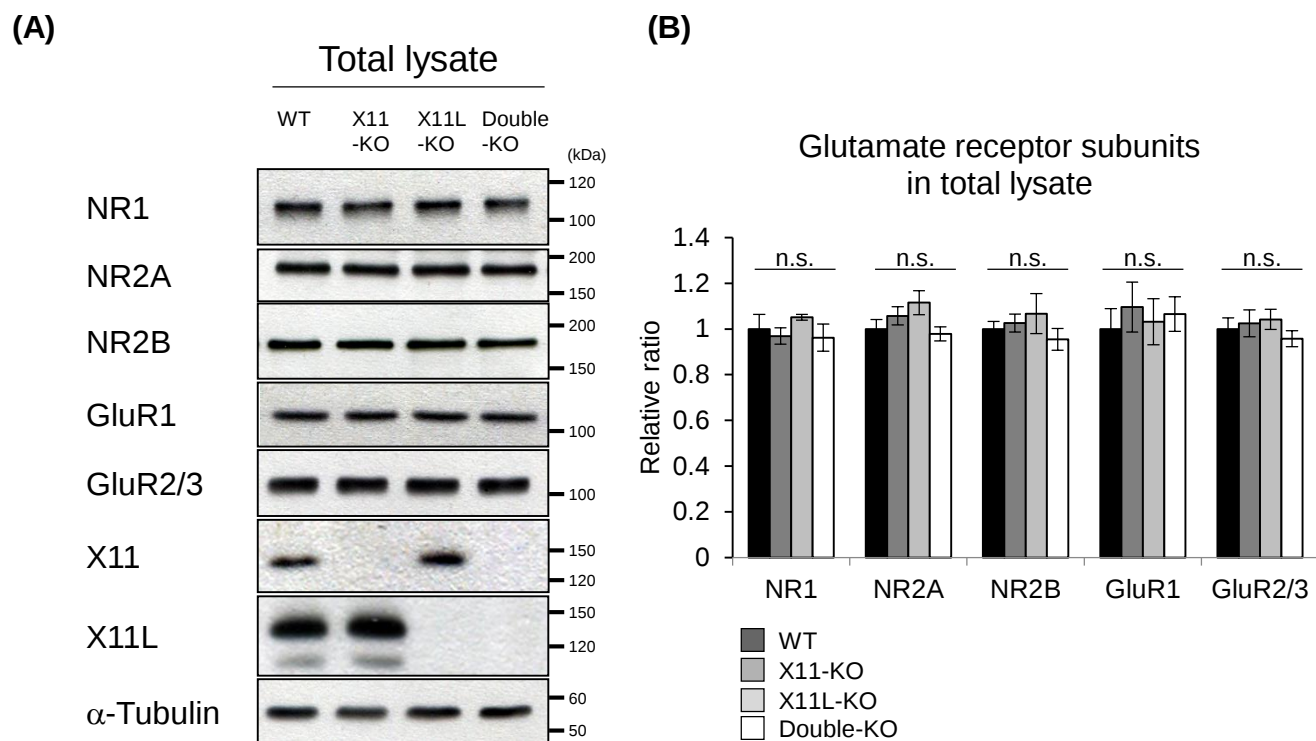


Figure 3. X11およびX11L KOマウスにおけるグルタミン酸受容体サブユニット量の解析

各遺伝子型マウス的大脑皮質および海馬のtotal lysateをもちいてグルタミン酸受容体サブユニット量の解析をおこなった。

(A) ウェスタンブロッティングによりグルタミン酸受容体サブユニットの存在量を解析した。

(B) (A)の定量結果を示す (n=4; mean $\pm$ S.E.; Tukey-Kramer method)。

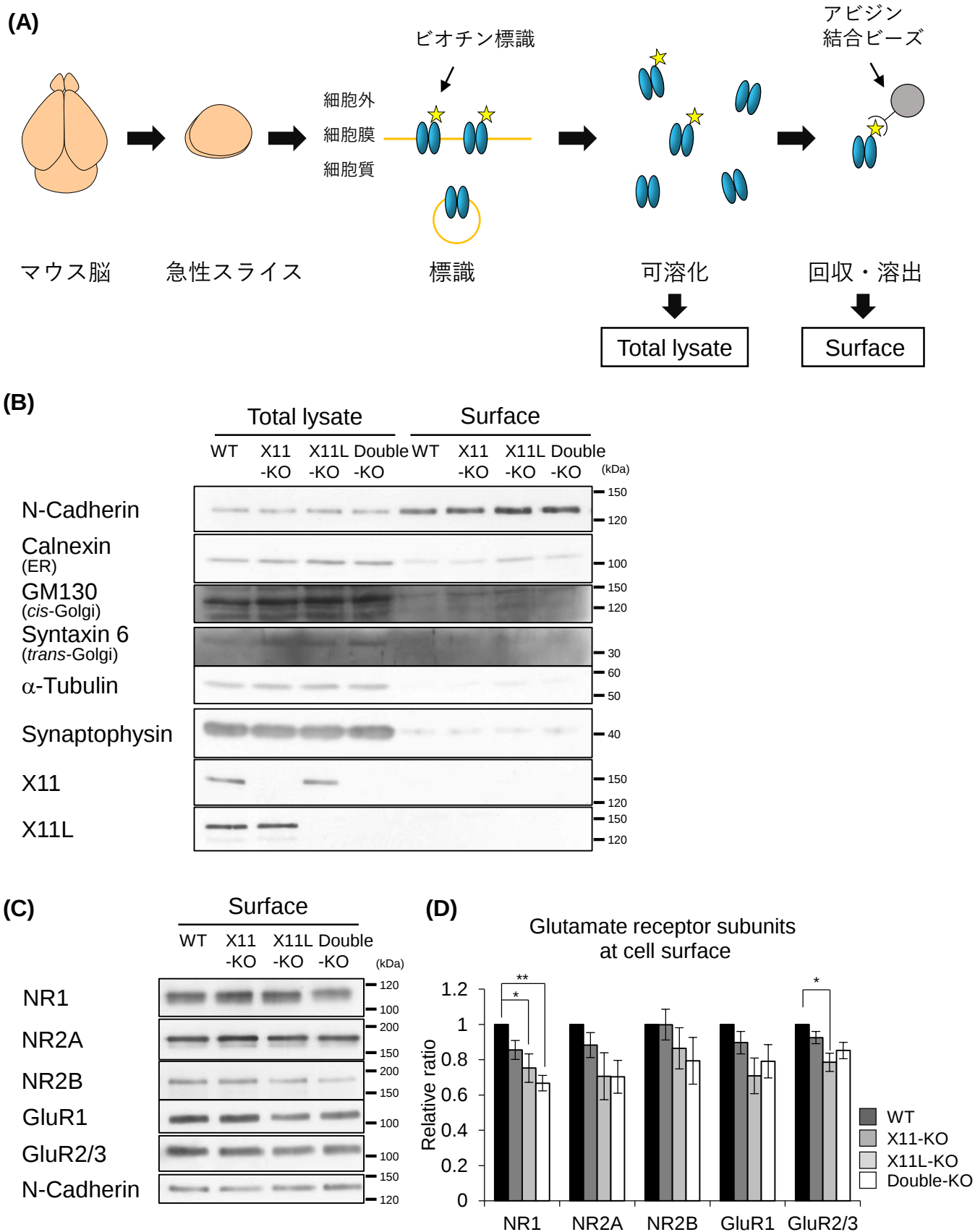


Figure 4. X11およびX11L KOマウスにおけるグルタミン酸受容体サブユニットの細胞表面局在量の解析
各遺伝子型マウスの海馬から細胞表面サンプルを調製し、細胞膜表面に局在するグルタミン酸受容体サブユニット量の解析をおこなった。

(A) 実験手法の模式図を示す。

(B) ウェスタンブロッティングによりグルタミン酸受容体サブユニットの細胞膜表面局在量を解析した。

(C) (B)の定量結果を示す (n=4; mean $\pm$ S.E.; * p<0.05; ** p<0.01; Tukey-Kramer method)。

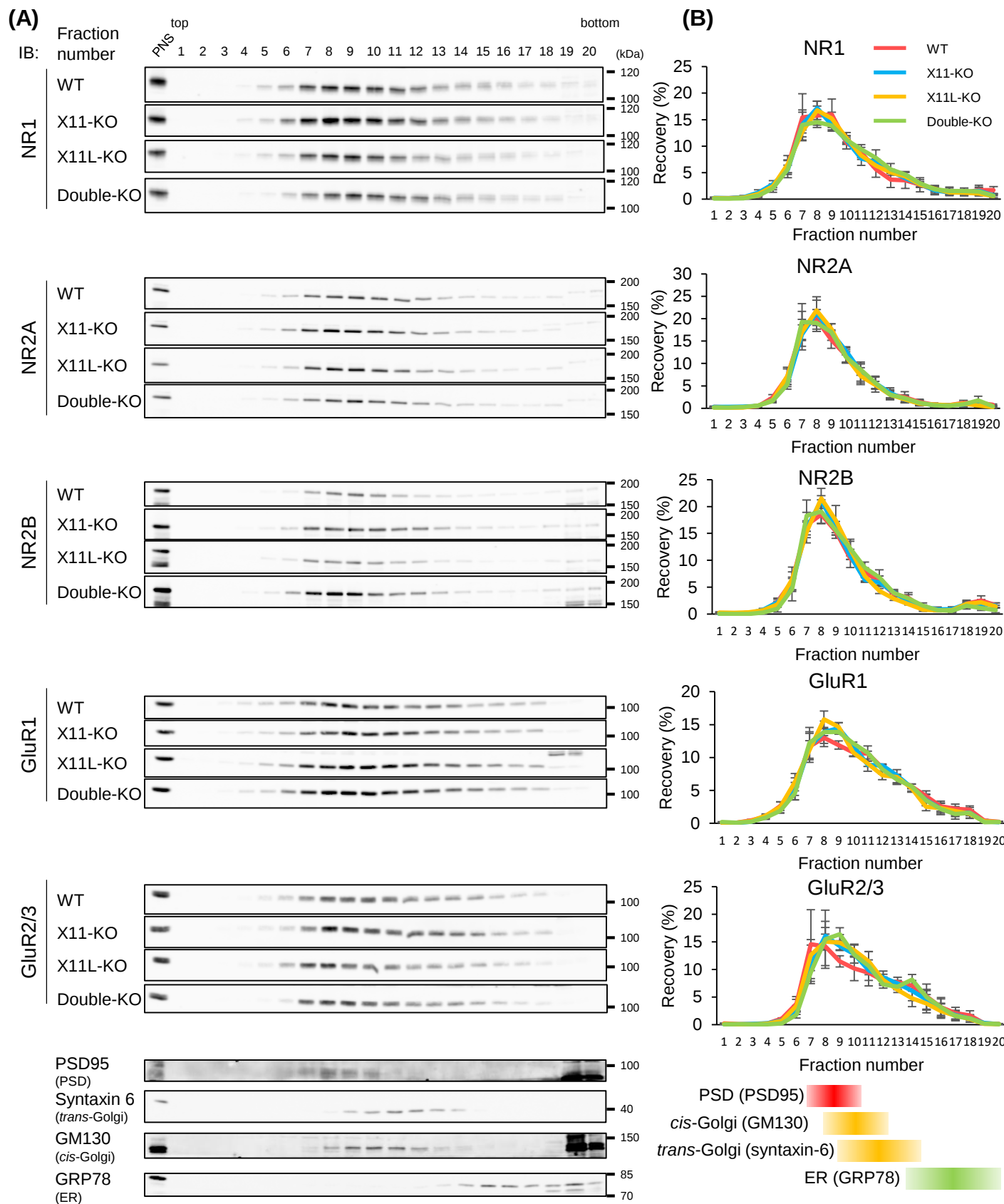
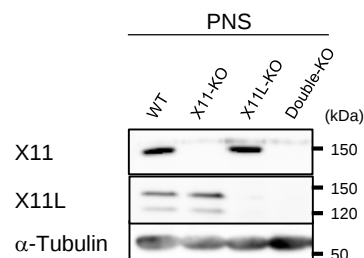


Figure 5. X11およびX11L KOマウスにおけるグルタミン酸受容体サブユニットの細胞内局在変化の解析

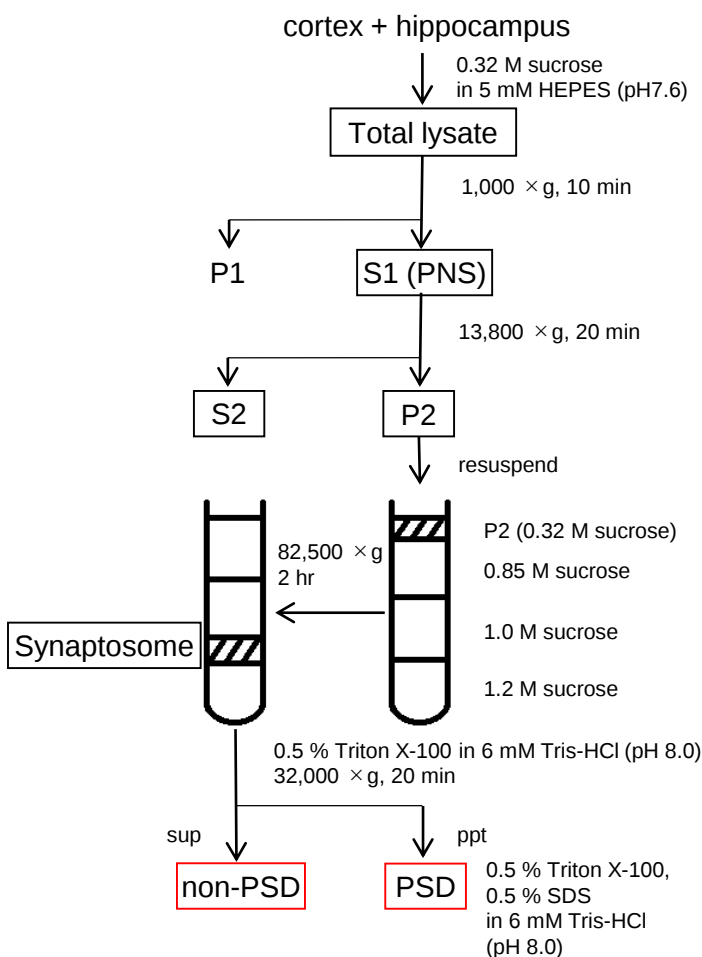
各遺伝子型マウス的大脑皮質および海馬をもちいてIodixanol密度勾配遠心法によってグルタミン酸受容体サブユニットの局在解析をおこなった。

(A) ウェスタンブロッティングによりグルタミン酸受容体サブユニットの局在を解析した。

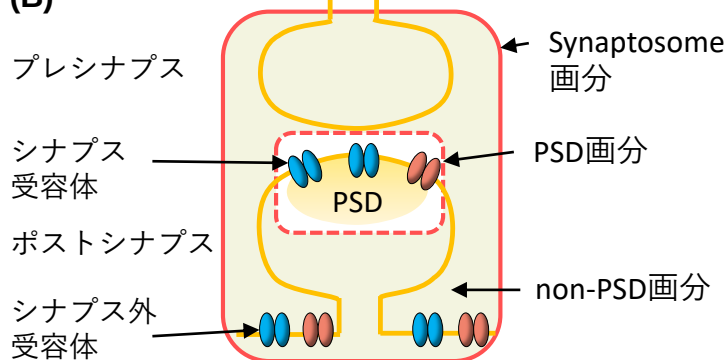
(B) Fraction 1–20における各サブユニットのシグナル強度の総和を100%としたときの各画分におけるバンド強度の割合を定量した (n=3; mean ± S.E.; Tukey-Kramer method)。



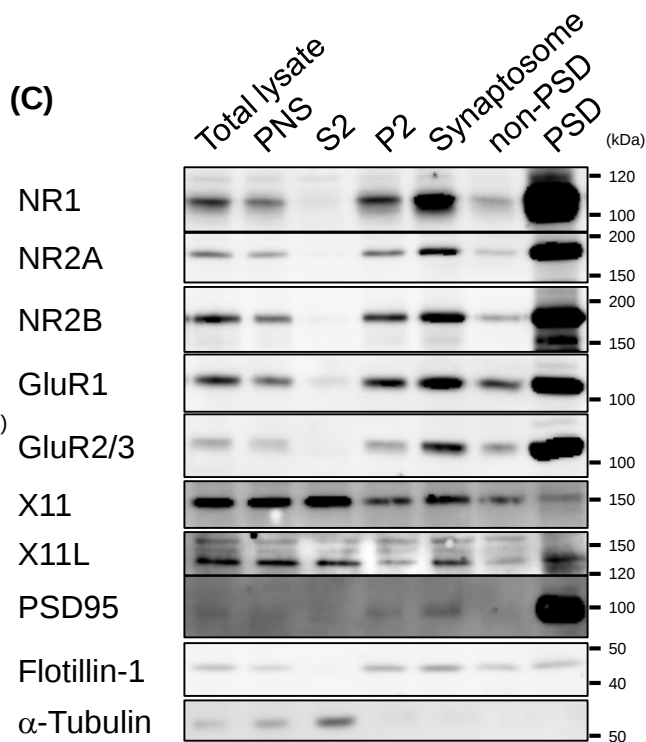
(A)



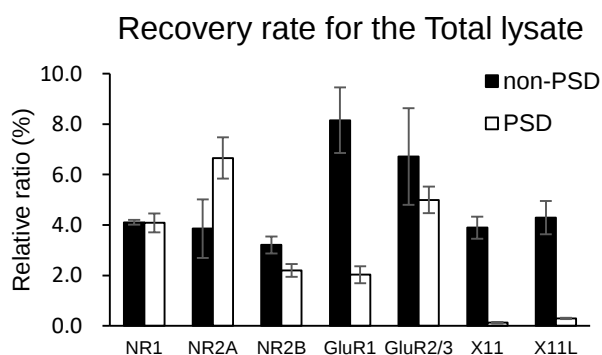
(B)



(C)



(D)



(E)

	Total lysateに対する回収率 (%)		non-PSDおよびPSD画分への分布割合 (%)	
	non-PSD	PSD	non-PSD	PSD
NR1	4.1	4.1	50	50
NR2A	3.9	6.7	37	63
NR2B	3.2	2.2	59	41
GluR1	8.2	2.0	80	20
GluR2/3	6.7	5.0	57	43
X11	3.9	0.1	97	3
X11L	4.3	0.3	93	7

Figure 6. PSDおよびnon-PSD画分におけるグルタミン酸受容体サブユニットならびにX11とX11Lの局在解析

(A) ショ糖密度勾配遠心法の模式図。

(B) Synaptosome画分、PSD画分、non-PSD画分と受容体局在の対応図。

(C) ウェスタンブロッティングによりグルタミン酸受容体サブユニットならびにX11およびX11Lの局在を解析した。

(D) Total lysateに対する回収率を解析した結果 (n=3; mean $\pm$ S.E.).

(E) Total lysateに対する回収率ならびにnon-PSD画分対PSD画分の分布割合を解析した結果。

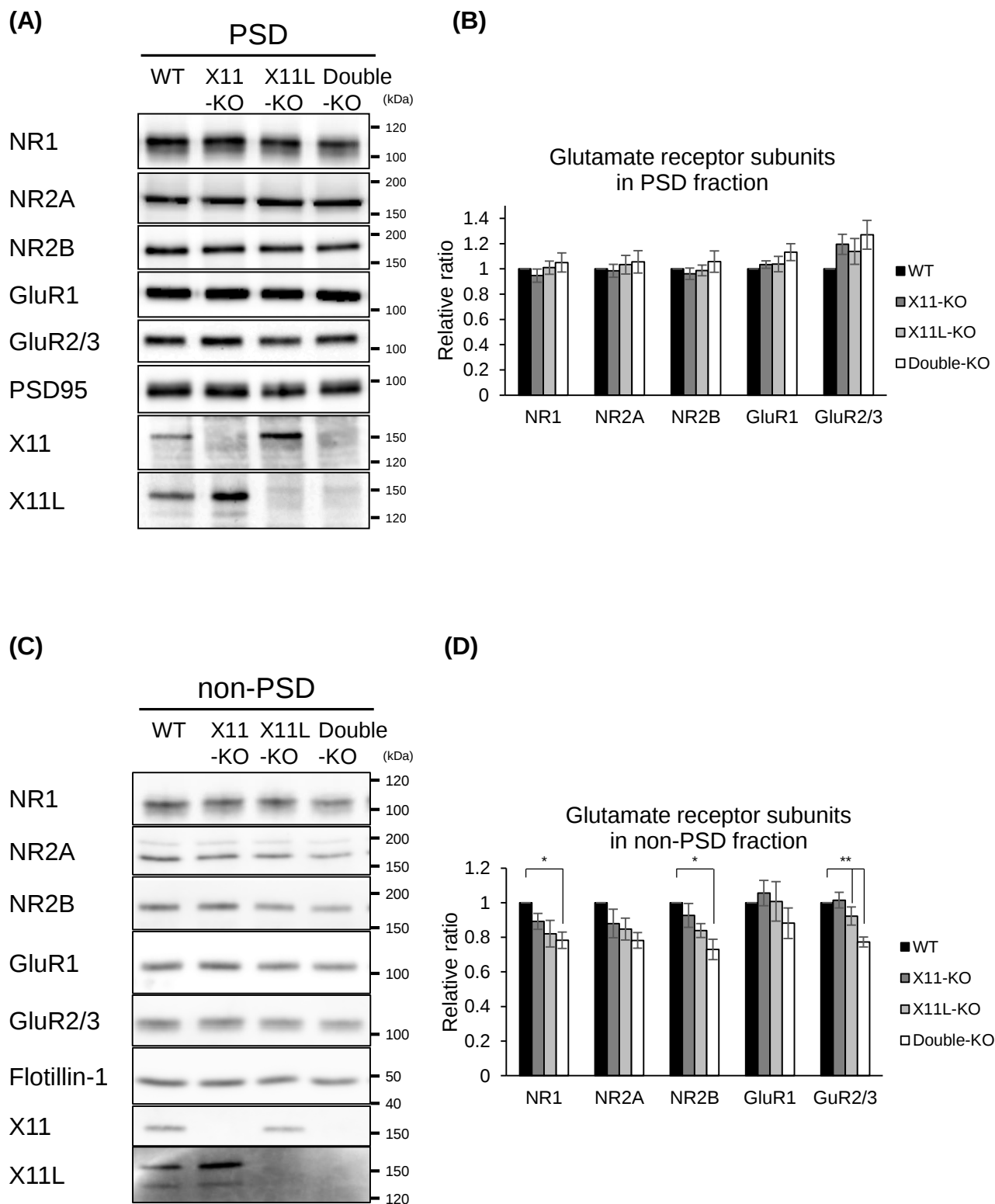


Figure 7. X11およびX11L KOマウスにおけるグルタミン酸受容体サブユニットのPSD画分ならびに non-PSD画分における局在量の解析

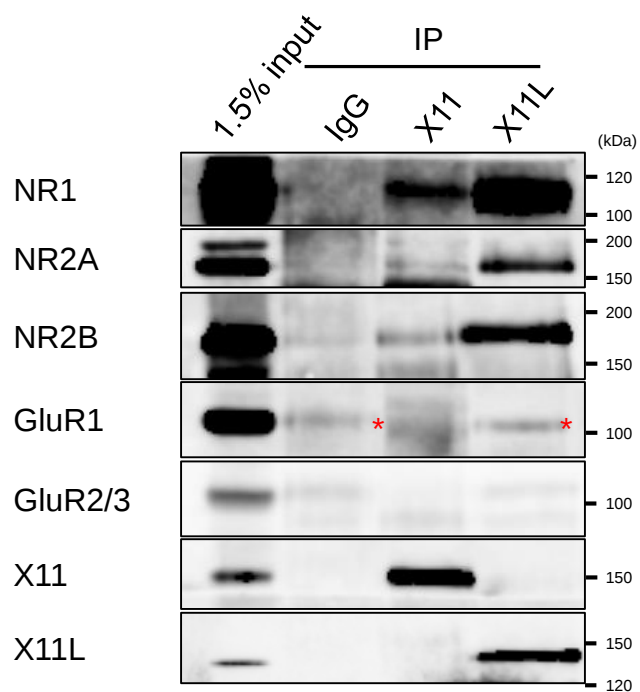
各遺伝子型マウスの大脳皮質および海馬から調製したPSD画分およびnon-PSD画分におけるグルタミン酸受容体サブユニット量を解析した。

(A) ウェスタンブロッティングによりPSD画分におけるグルタミン酸受容体サブユニット量を解析した。

(B) (A)の定量結果を示す (n=4; mean ± S.E.; Tukey-Kramer method)。

(C) ウェスタンブロッティングによりnon-PSD画分におけるグルタミン酸受容体サブユニット量を解析した。

(D) (C)の定量結果を示す (n=4; mean ± S.E.; * p<0.05; ** p<0.01; Tukey-Kramer method)。



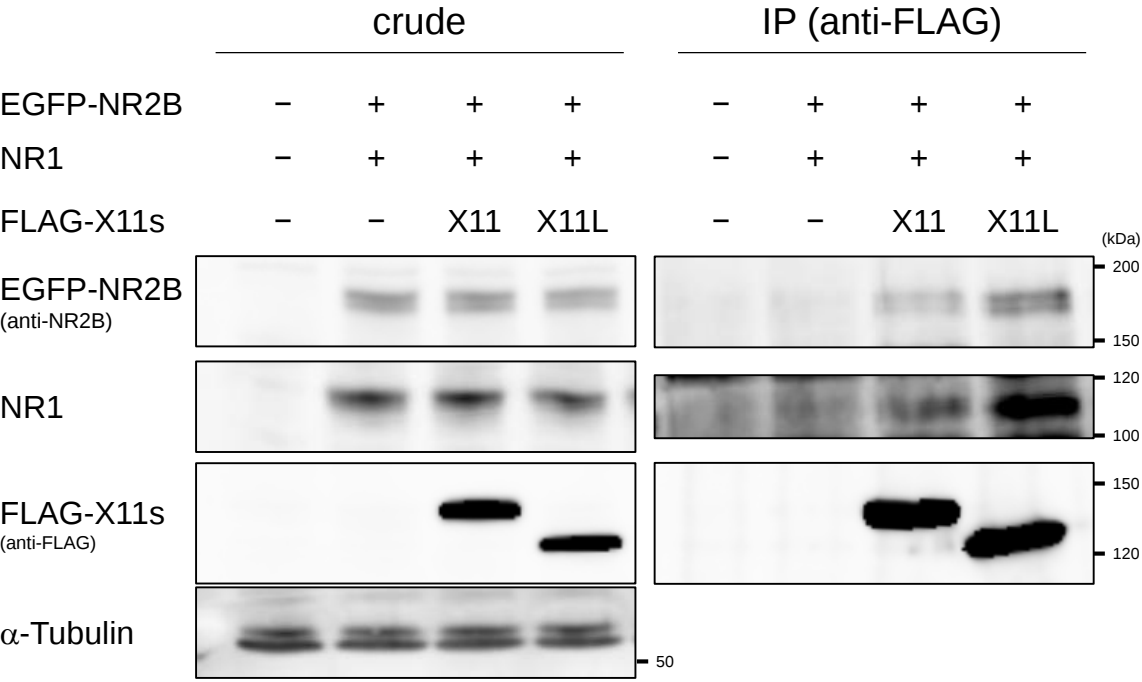
input = non-PSD画分

* = non specific band

Figure 8. non-PSD画分におけるX11およびX11Lとグルタミン酸受容体の相互作用解析

WTマウスの海馬および大脳皮質から調製したnon-PSD画分をもちいて、anti-X11またはX11L抗体により共役免疫沈降をおこない、X11およびX11Lがグルタミン酸受容体サブユニットと相互作用しているかをウェスタンブロッティングによって解析した。

(A)



(B)

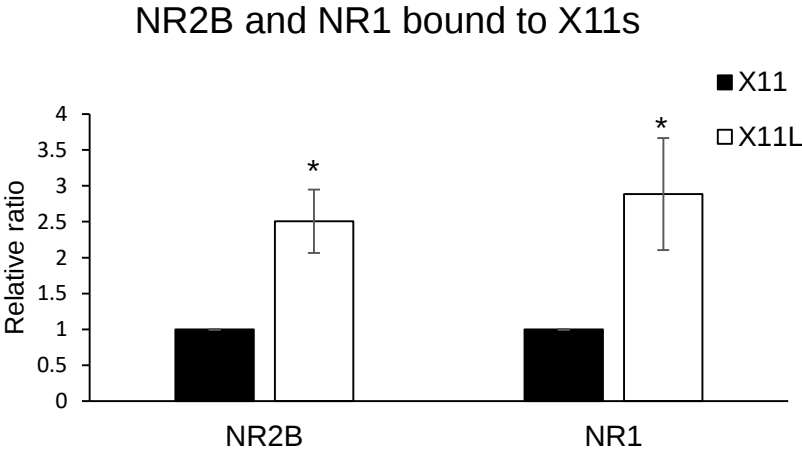


Figure 9. 過剰発現系におけるX11およびX11LとNMDA受容体の相互作用解析
(A) FLAG-X11またはX11LとEGFP-NR2BおよびNR1を共発現させたN2a細胞lysateにたいして、anti-FLAG抗体をもちいて共役免疫沈降実験をおこない、ウェスタンブロッティングによって解析した。
(B) (A)の定量結果を示す (n=5; mean $\pm$ S.E.; * p<0.05; T-test)。

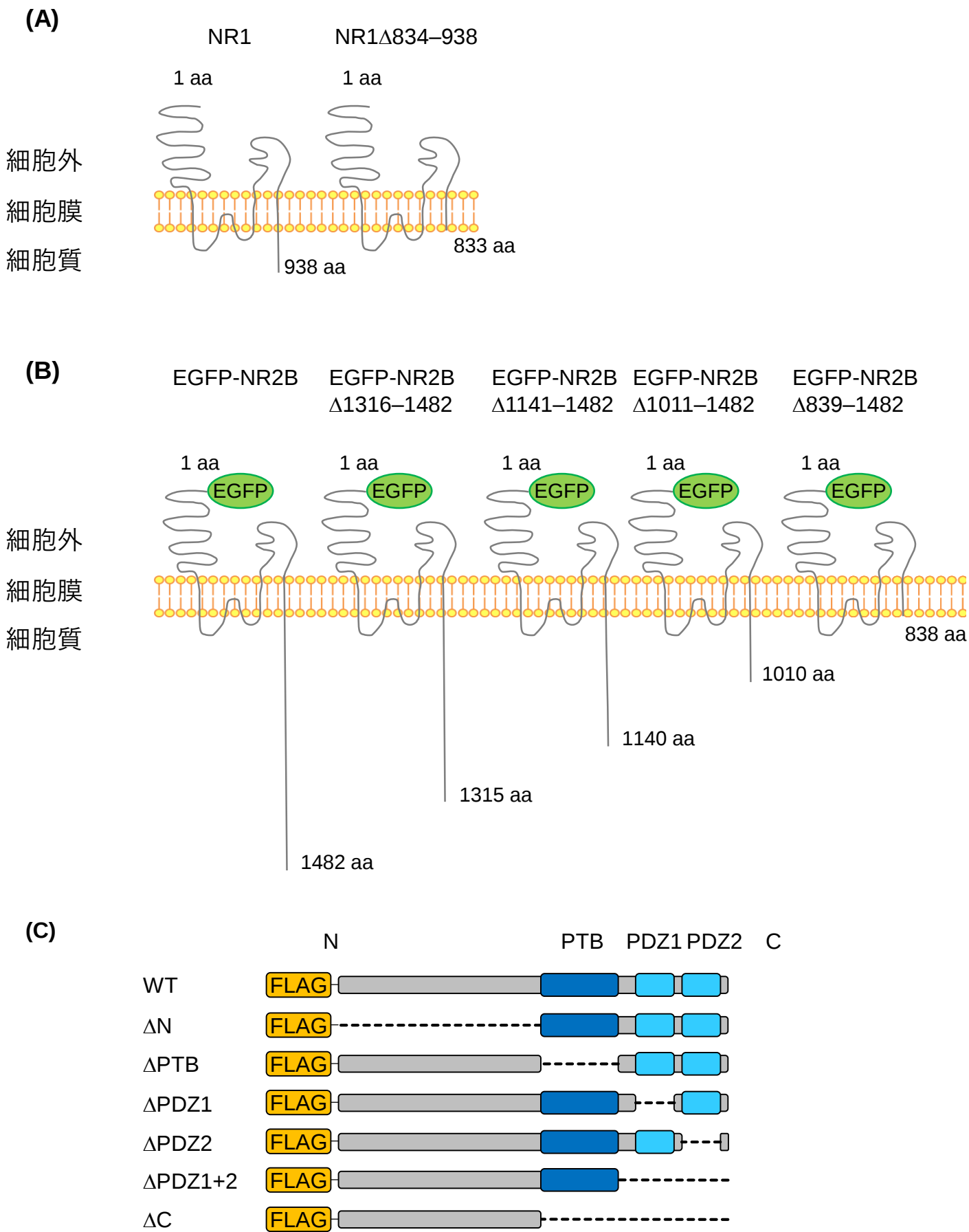


Figure 10. 結合領域探索にもちいた欠失変異体のまとめ

(A) NR1の欠失変異体の模式図。

(B) EGFP-NR2Bの欠失変異体の模式図。

(C) FLAG-X11およびX11Lの欠失変異体の模式図。

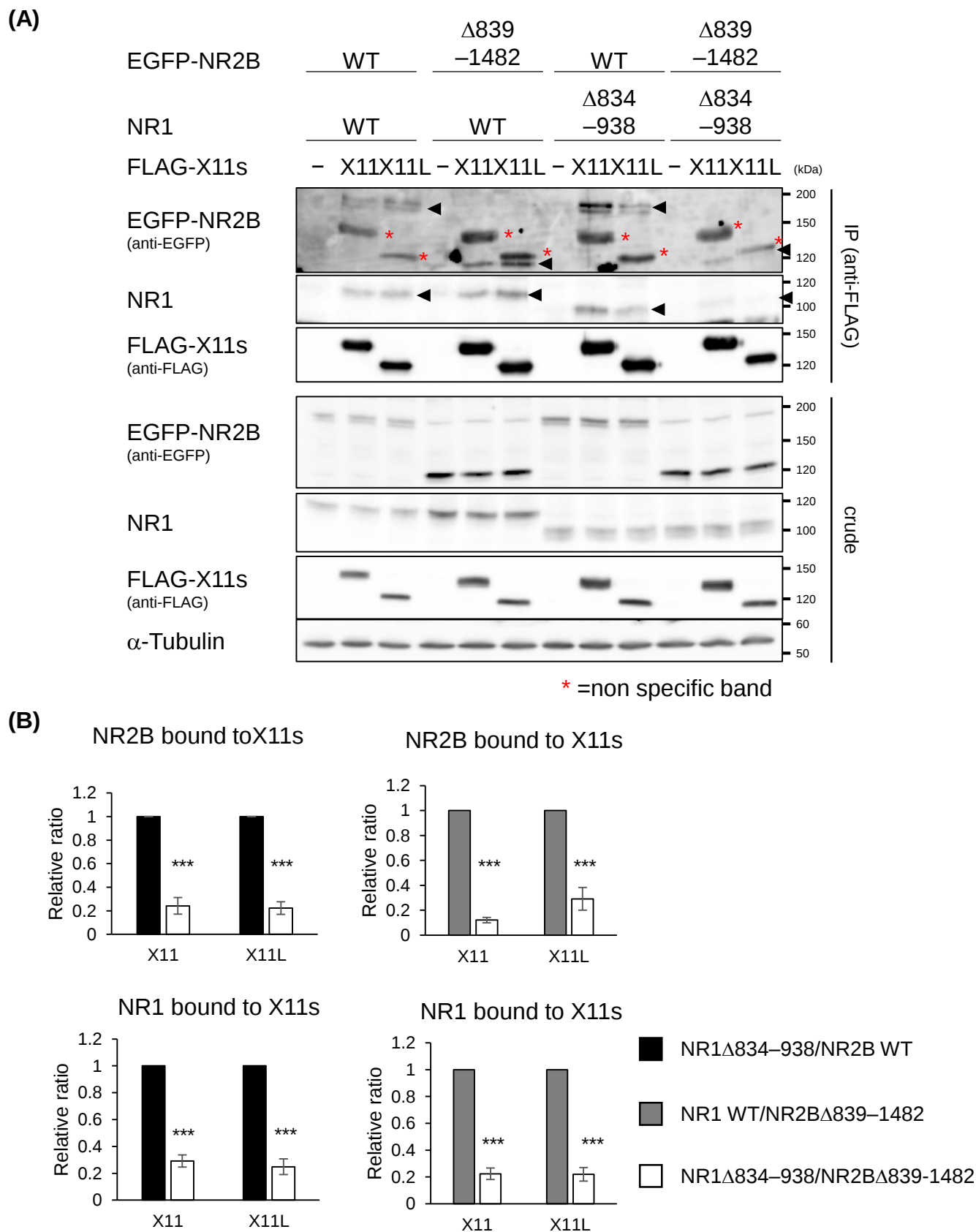
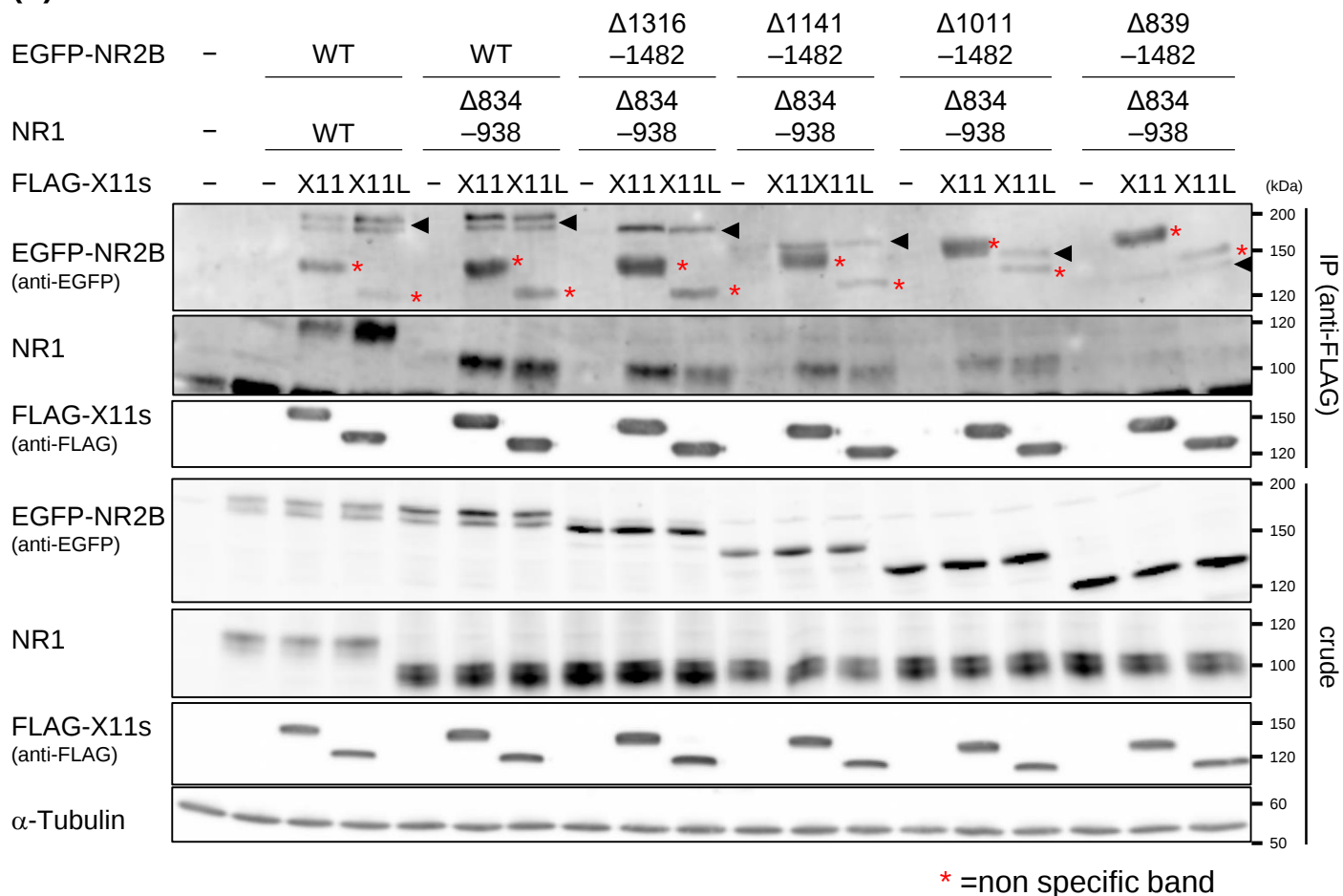


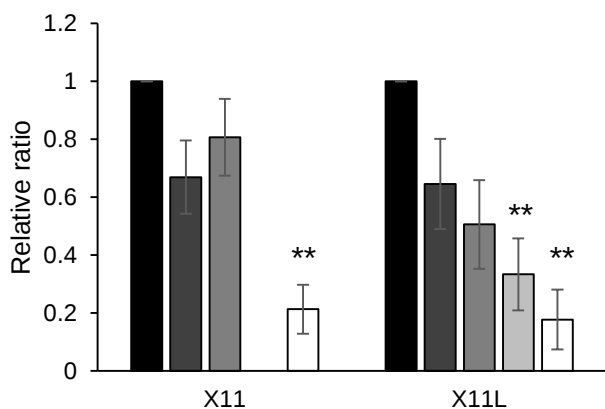
Figure 11. NR1およびNR2BのX11およびX11L結合領域探索

(A) FLAG-X11またはFLAG-X11LとEGFP-NR2BおよびNR1のWTならびに細胞質領域欠失体を共発現させたN2a細胞lysateにたいして、anti-FLAG抗体をもちいて共役免疫沈降実験をおこない、ウェスタンブロッティングによって解析した。黒矢頭 (◄) は共沈されたEGFP-NR2BまたはNR1を示す。

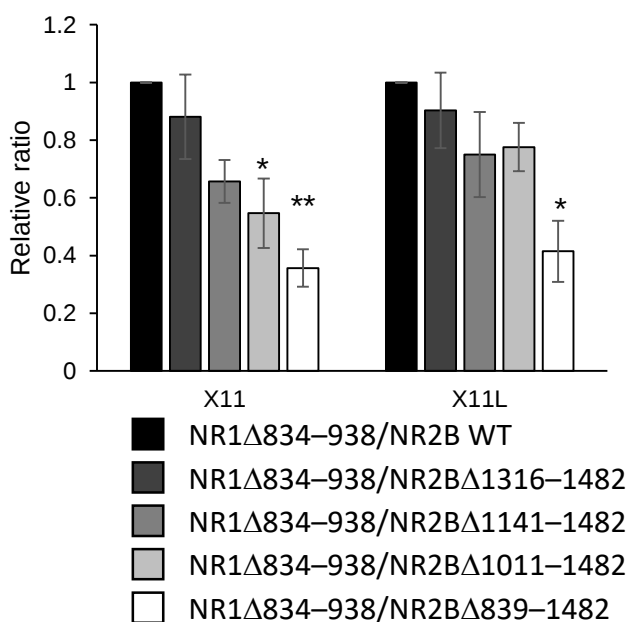
(B) (A)の定量結果を示す (n=5; mean $\pm$ S.E.; *** p<0.001; T-test)。

(A)**(B)**

NR2B bound to X11s



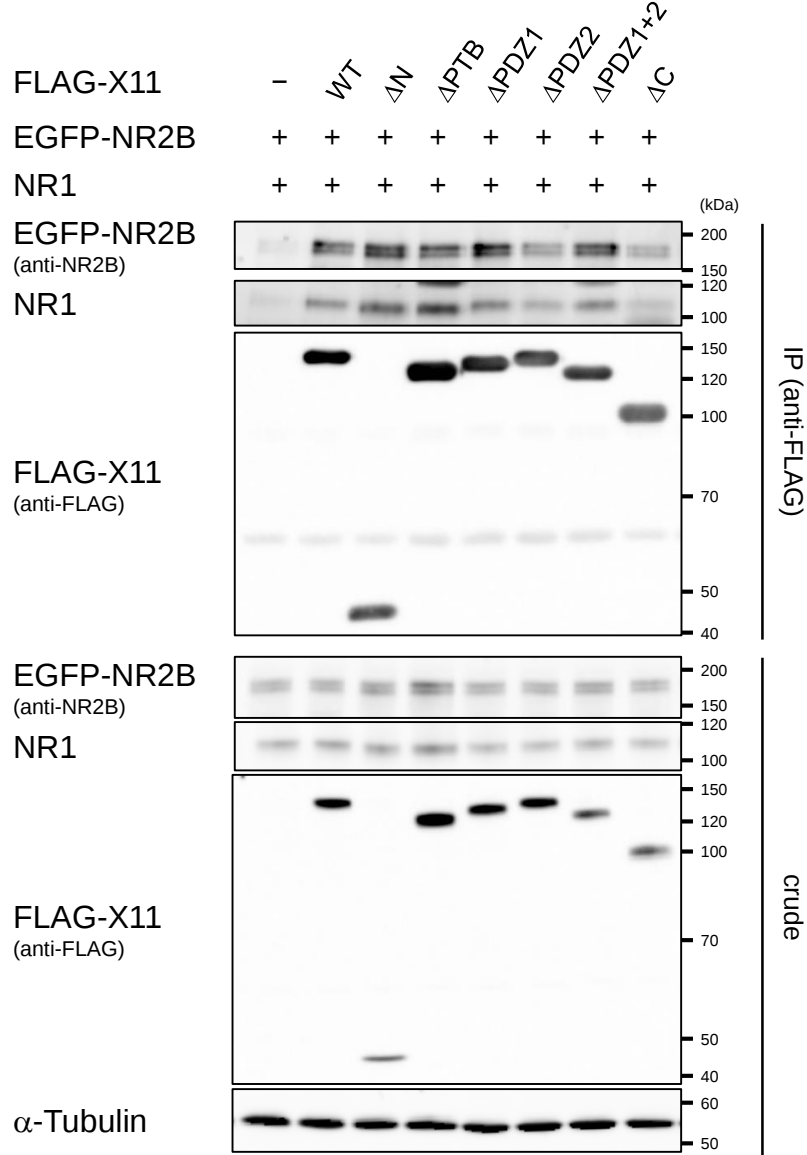
NR1 bound to X11s

**Figure 12. NR2BのX11およびX11L結合領域探索**

(A) FLAG-X11またはFLAG-X11LとEGFP-NR2Bの各欠失変異体ならびにNR1のWTまたは細胞質領域欠失体を共発現させたN2a細胞lysateにたいして、anti-FLAG抗体をもちいて共役免疫沈降実験をおこない、ウェスタンブロッティングによって解析した。

(B) (A)の定量結果を示す (n=3; mean $\pm$ S.E.; * p<0.05; ** p<0.01; Dunnet's test)。なお、X11から共沈されたEGFP-NR2B $\Delta 1011$ -1482はnon specific bandと分離ができなかったため、定量結果は示していない。

(A)



(B)

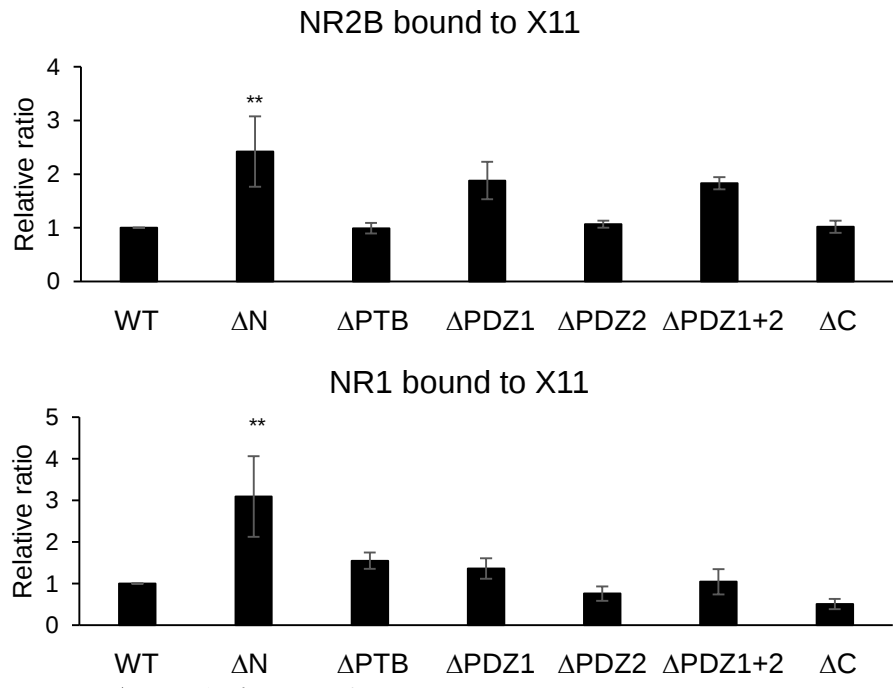
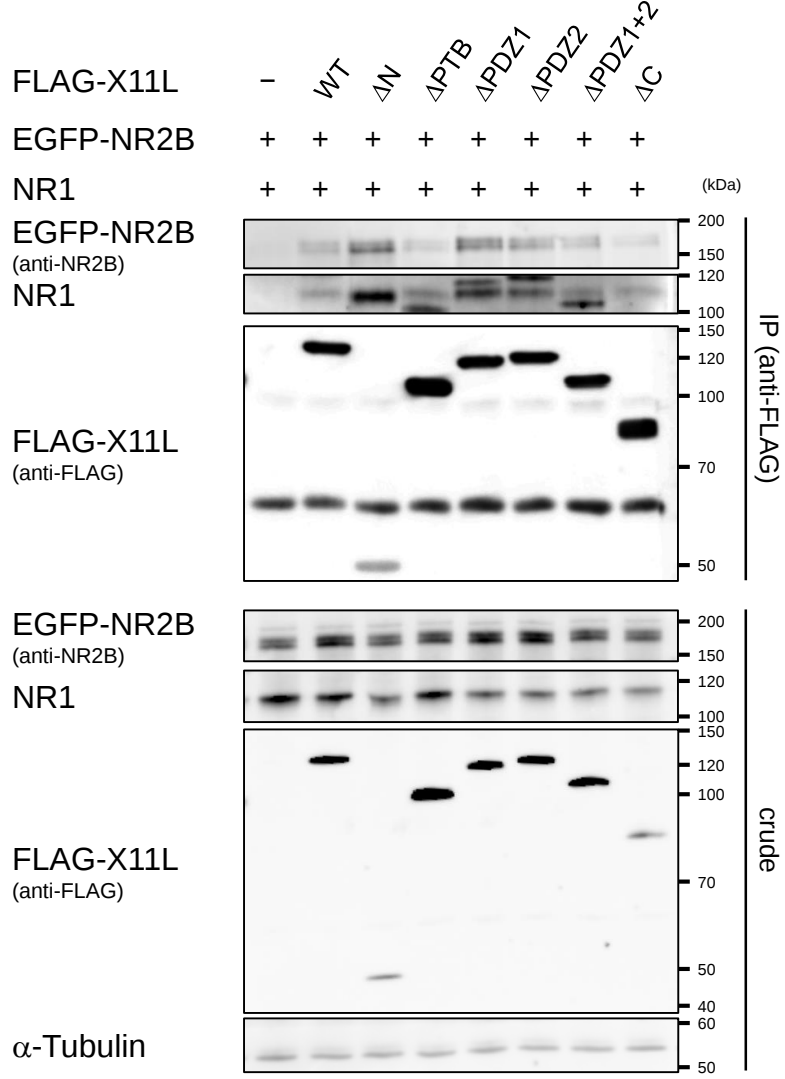


Figure 13. X11のNR1およびNR2B結合領域探索
(A) FLAG-X11のWTならびに各欠失体とEGFP-NR2BおよびNR1を共発現させたN2a細胞lysateにたいして、anti-FLAG抗体をもちいて共役免疫沈降実験をおこない、ウェスタンブロッティングによって解析した。
(B) (A)の定量結果を示す(n=3; mean $\pm$ S.E.; * p<0.05; ** p<0.01; Dunnet's test)。

(A)



(B)

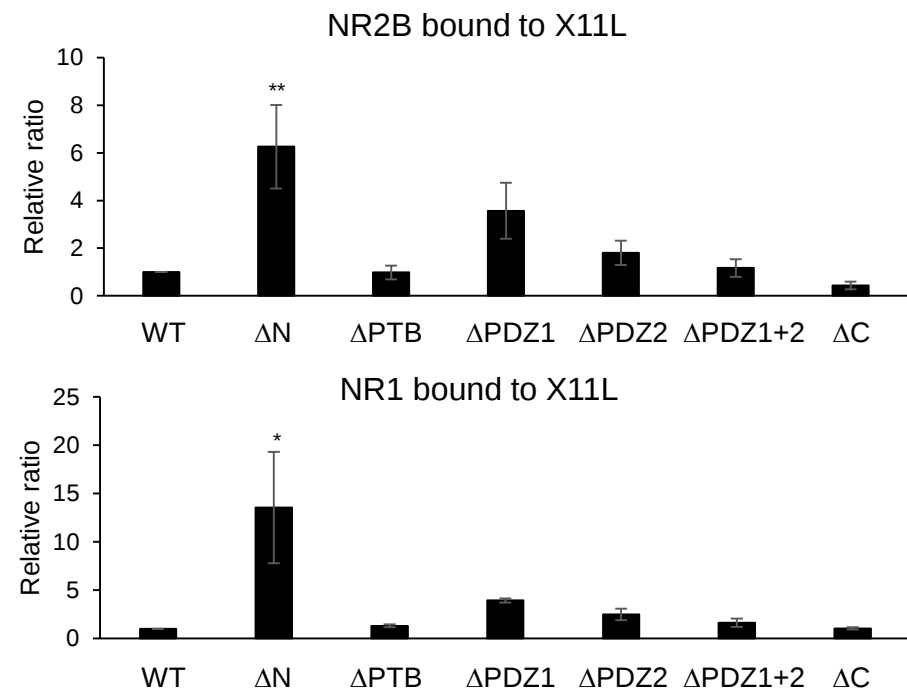
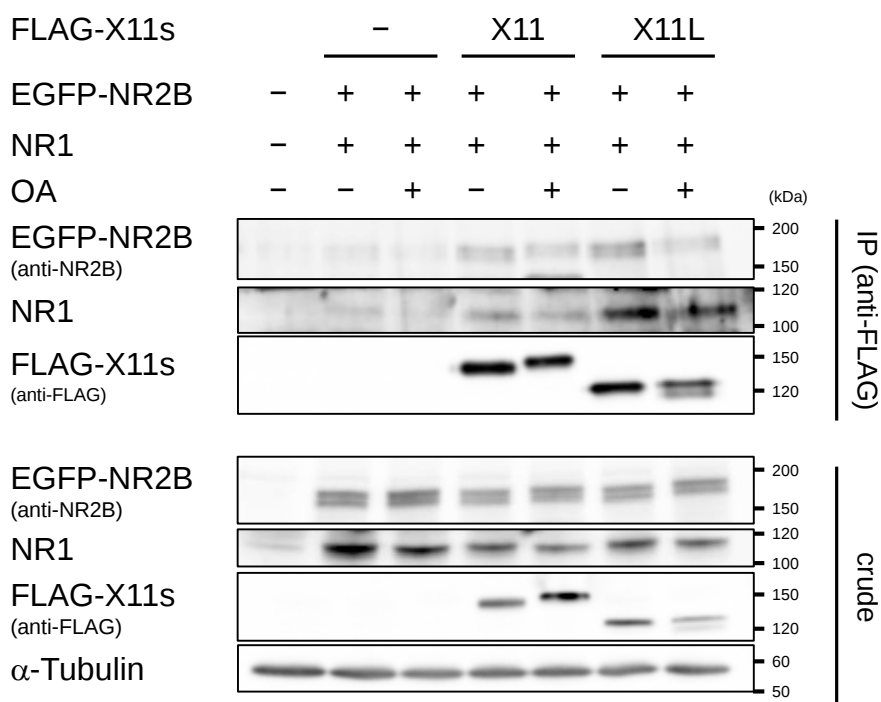


Figure 14. X11LのNR1およびNR2B結合領域探索
(A) FLAG-X11LのWTならびに各欠失体とEGFP-NR2BおよびNR1を共発現させたN2a細胞lysateにたいして、anti-FLAG抗体をもちいて共役免疫沈降実験をおこない、ウェスタンブロッティングによって解析した。
(B) (A)の定量結果を示す (n=3; mean $\pm$ S.E.; * p<0.05; ** p<0.01; Dunnet's test)。

(A)



(B)

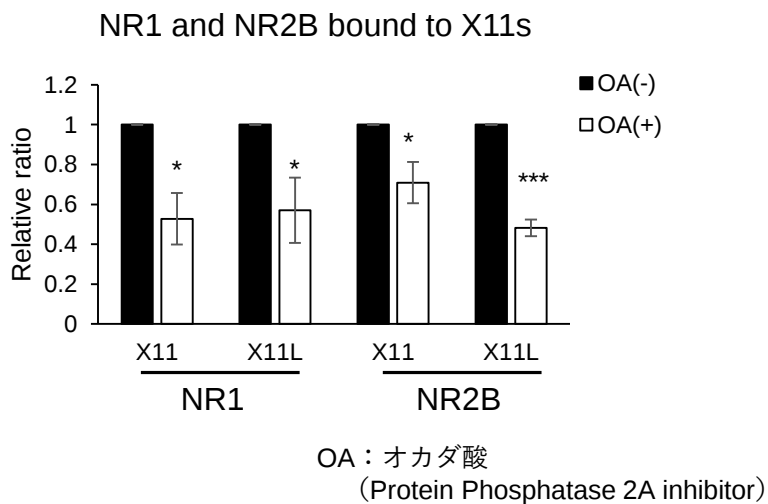


Figure 15. X11およびX11LとNMDA受容体の相互作用におけるリン酸化の影響の解析

(A) FLAG-X11またはFLAG-X11LならびにEGFP-NR2BおよびNR1を共発現させオカダ酸 (OA) 処理によってリン酸化を亢進させたN2a細胞lysateにたいして、anti-FLAG抗体をもちいて共役免疫沈降実験をおこない、ウェスタンブロッティングによって解析した。

(B) (A)の定量結果を示す (n=4; mean $\pm$ S.E.; * p<0.05; *** p<0.001; T-test)。

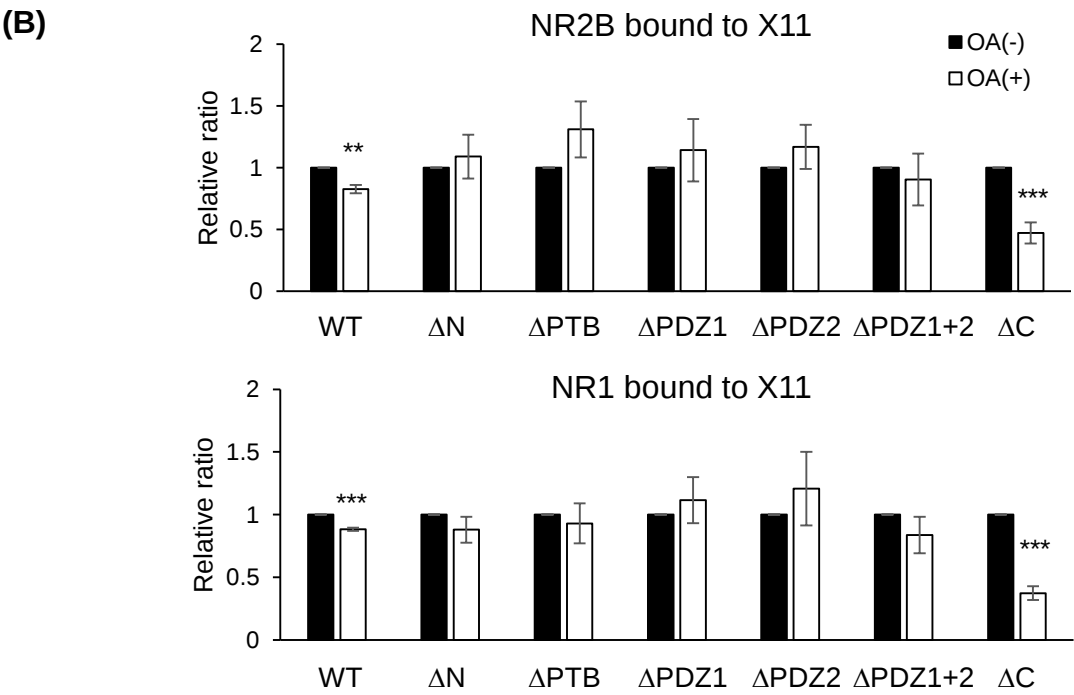
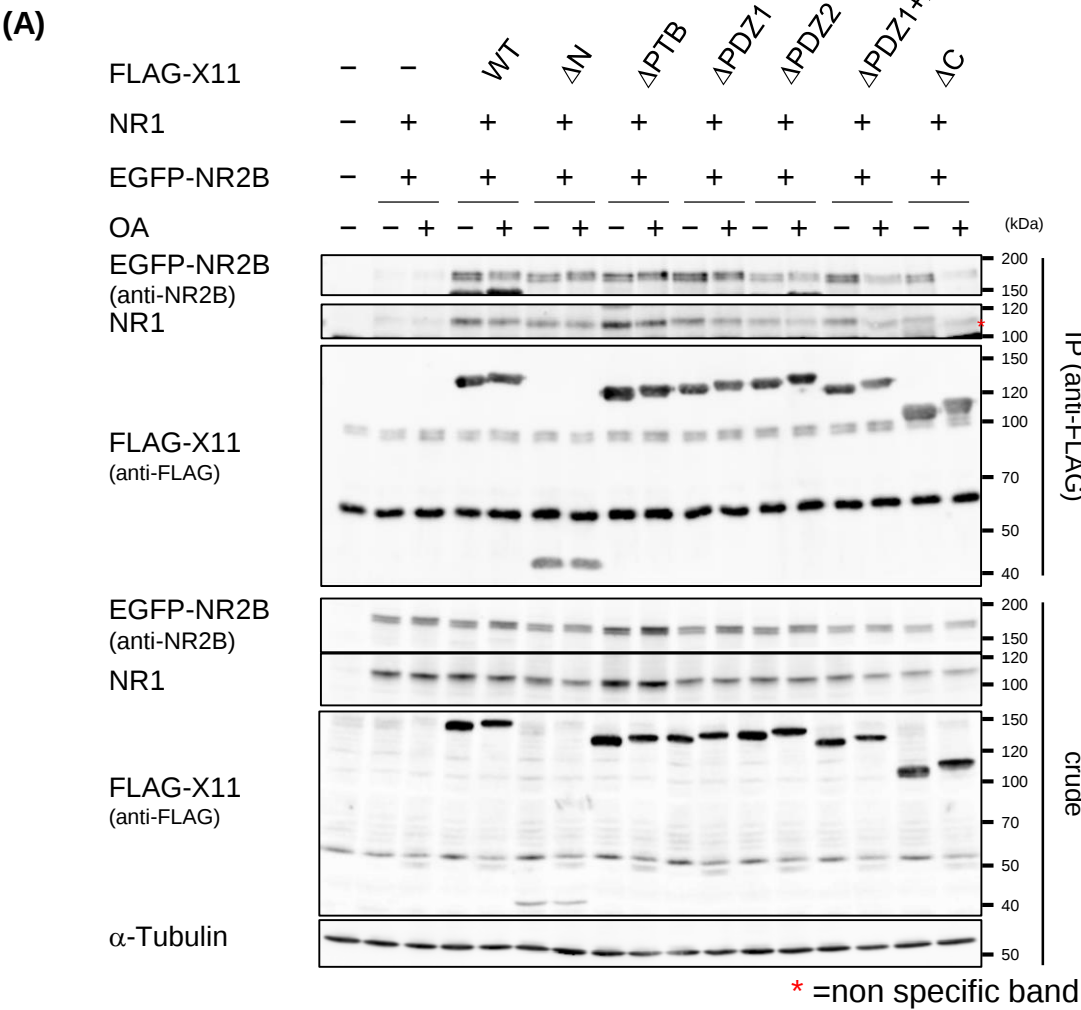


Figure 16. X11におけるリン酸化を介したNMDA受容体との結合制御領域の探索
 (A) FLAG-X11のWTならびに各欠失体とEGFP-NR2BおよびNR1を共発現させ、OA処理によってリン酸化を亢進させたN2a細胞lysateにたいして、anti-FLAG抗体をもちいて共役免疫沈降実験をおこない、ウェスタンブロットングによって解析した。
 (B) (A)の定量結果を示す (n=3; mean $\pm$ S.E.; ** p<0.01; *** p<0.001; T-test)。

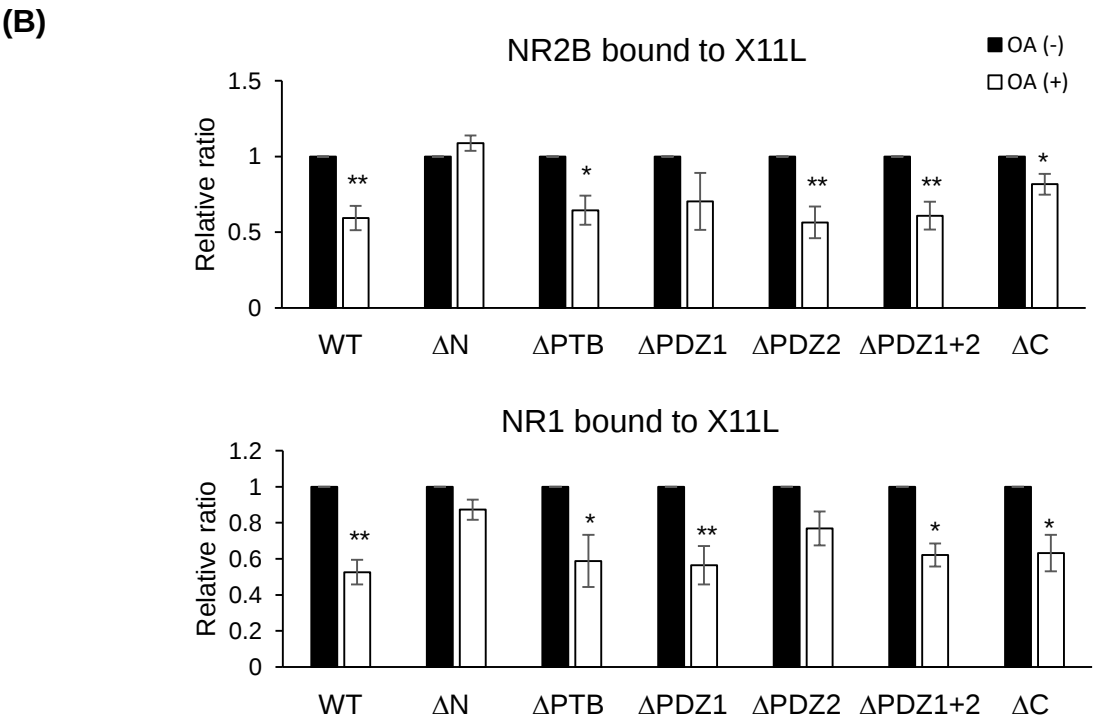
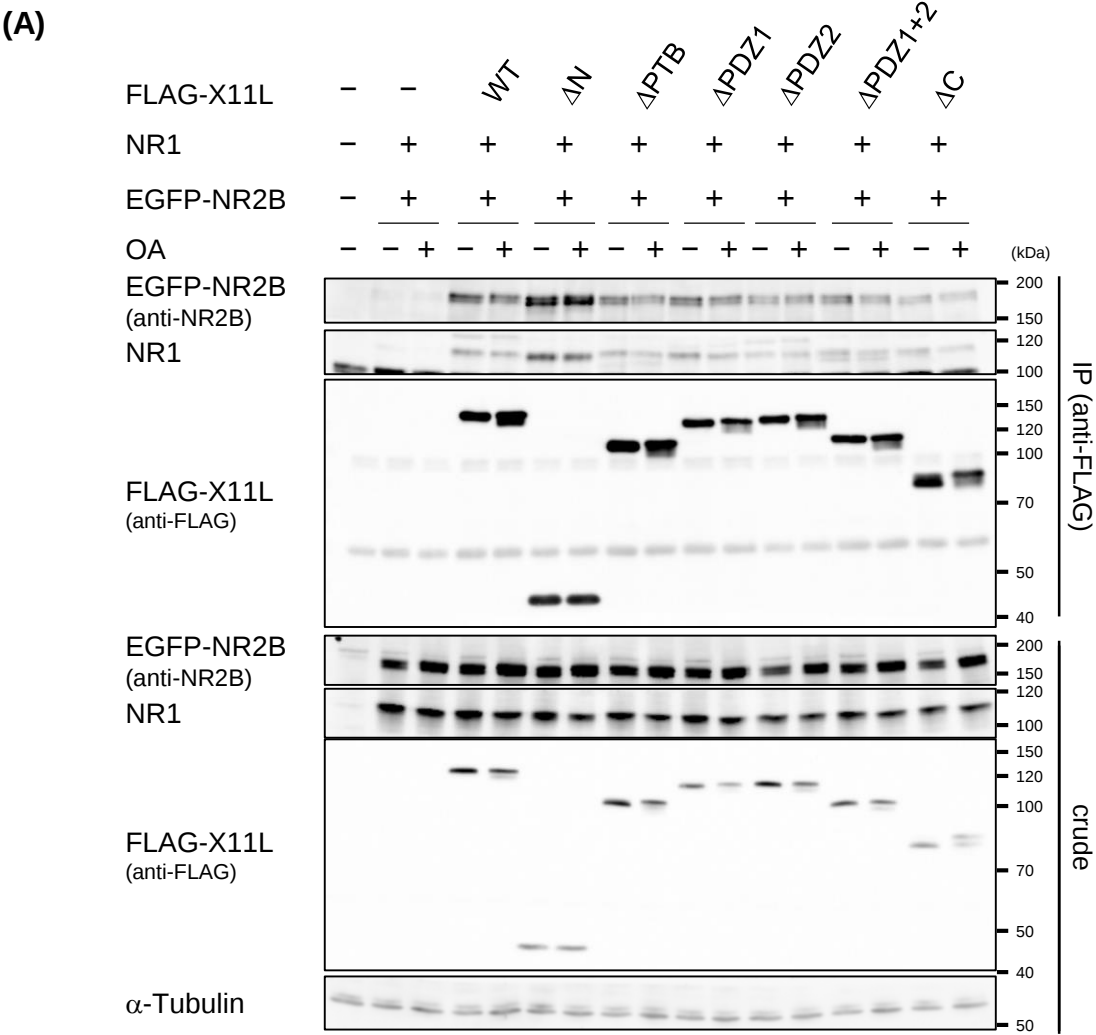
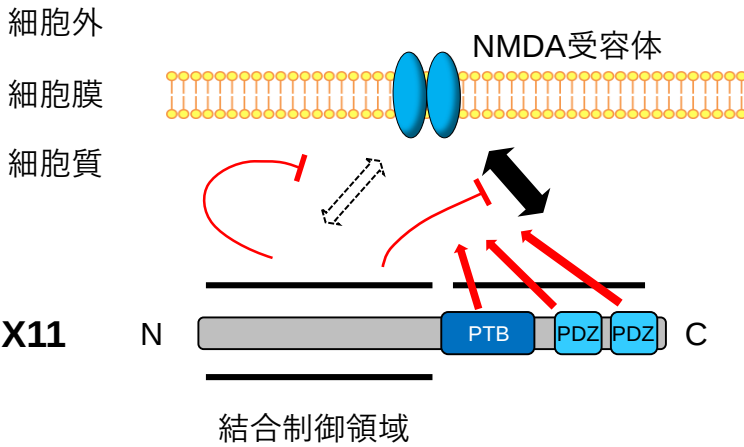


Figure 17. X11Lにおけるリン酸化を介したNMDA受容体との結合制御領域の探索
(A) FLAG-X11LのWTならびに各欠失体とEGFP-NR2BおよびNR1を共発現させ、OA処理によってリン酸化を亢進させたN2a細胞lysateにたいして、anti-FLAG抗体をもちいて共役免疫沈降実験をおこない、ウェスタンブロッティングによって解析した。
(B) (A)の定量結果を示す (n=3; mean $\pm$ S.E.; * p<0.05; ** p<0.01; *** p<0.001; T-test)。

(A)



(B)

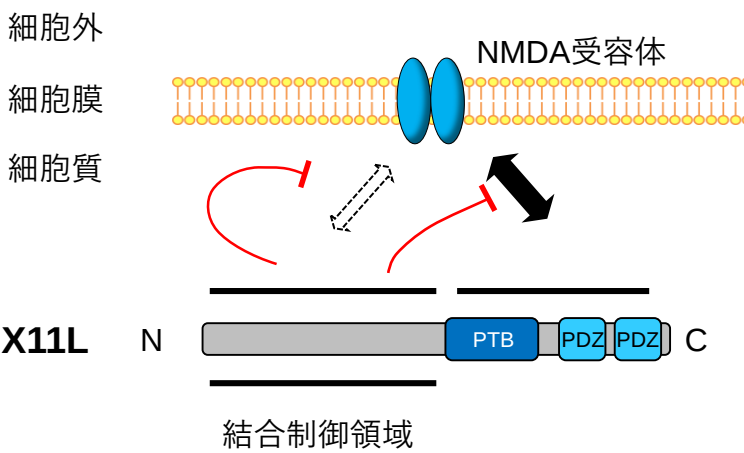
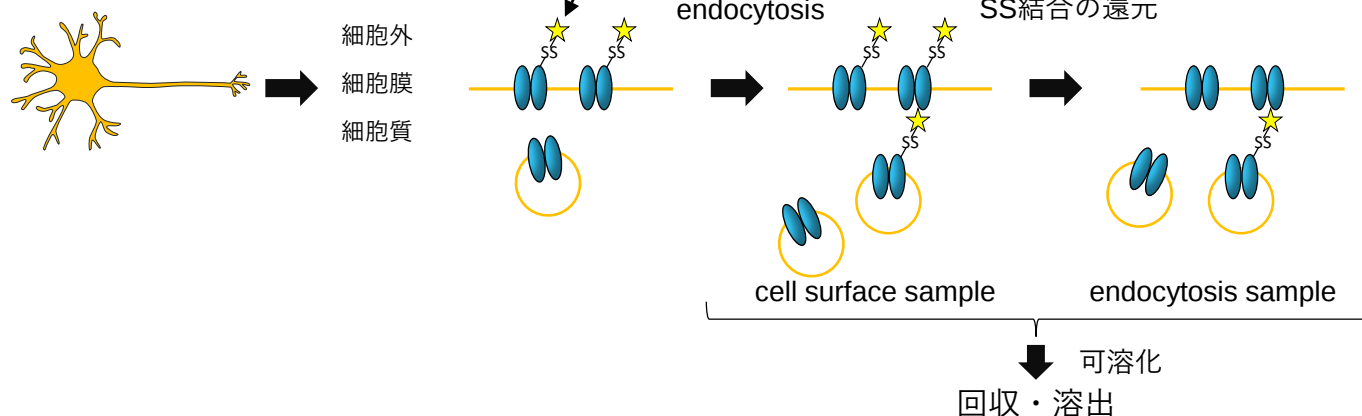
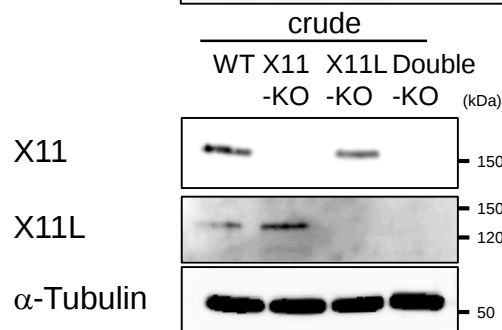
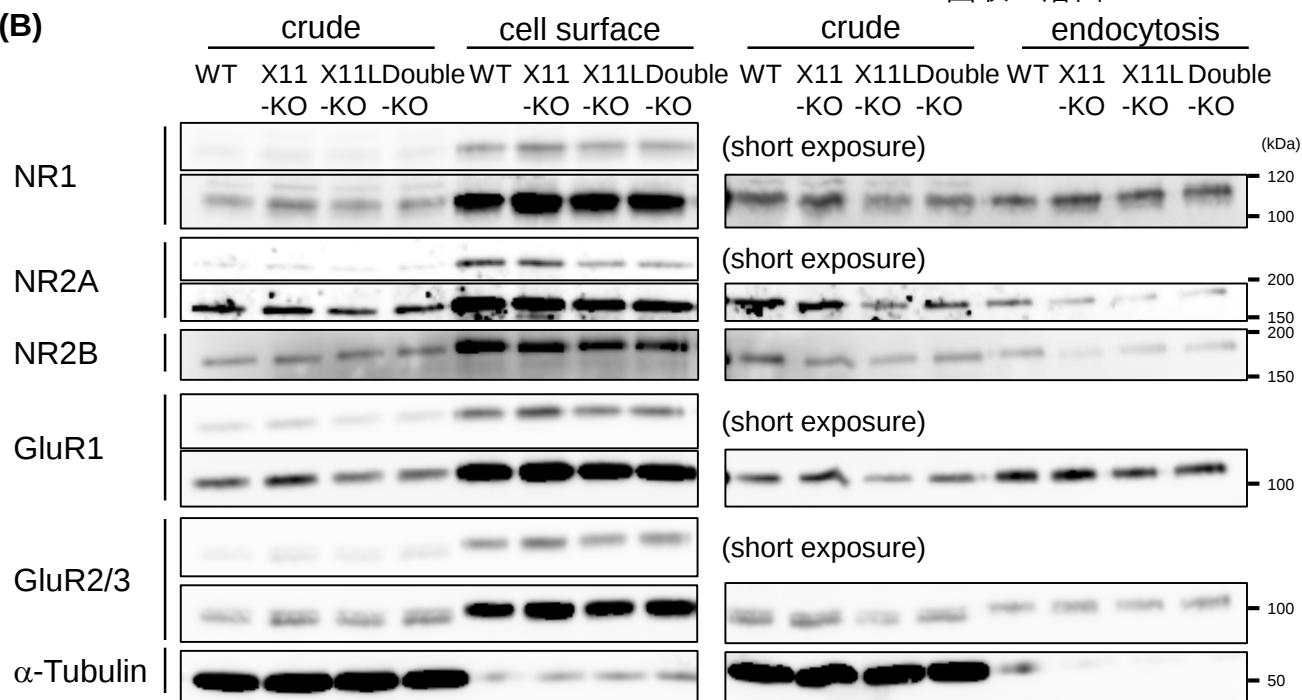
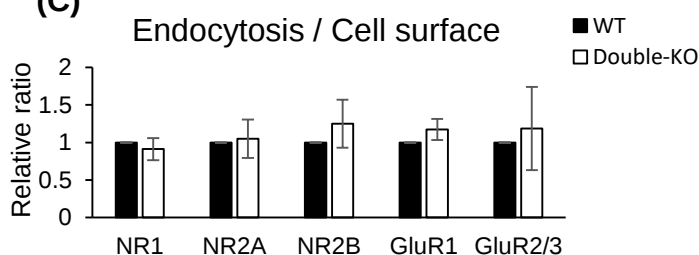
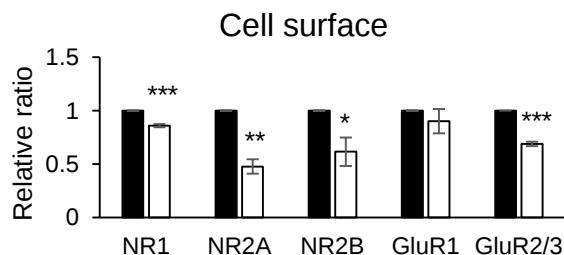
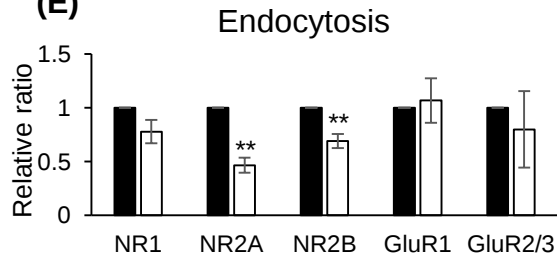


Figure 18. X11およびX11LとNMDA受容体の結合解析のまとめ

- (A) X11はC末端側でNMDA受容体の細胞質領域と強く相互作用する。N末端側は、C末端側およびN末端側両領域を介したNMDA受容体との結合をリン酸化依存的に制御する。また、PTBならびにPDZドメインがリン酸化を介した結合制御に必要である。
- (B) X11LはC末端側でNMDA受容体の細胞質領域と強く相互作用する。N末端側は、C末端側およびN末端側両領域を介したNMDA受容体との結合をリン酸化依存的に制御する。

(A)

初代培養神経細胞

**(B)****(C)****(D)****(E)****Figure 19. Double-KO neuronにおけるグルタミン酸受容体エンドサイトーシス効率の検証**

(A) 実験手法の模式図。

(B) Div.14の初代培養神経細胞をもちいて Sulfo-NHS-SS-biotin 標識を行い、cell surface サンプルならびに endocytosis サンプルを調製し、ウェスタンブロッティングによって解析した。

(C)–(E) (B)の定量結果を示す (n=3; mean ± S.E.; * p<0.05; ** p<0.01; *** p<0.001; T-test)。

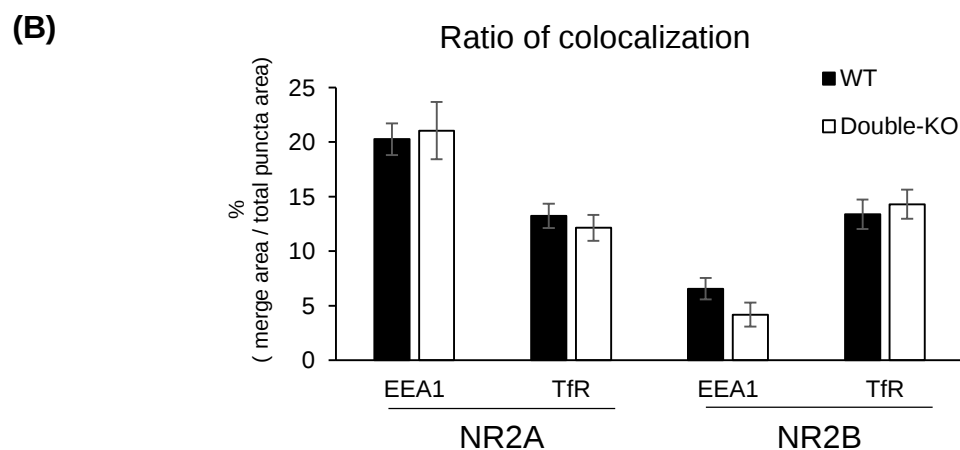
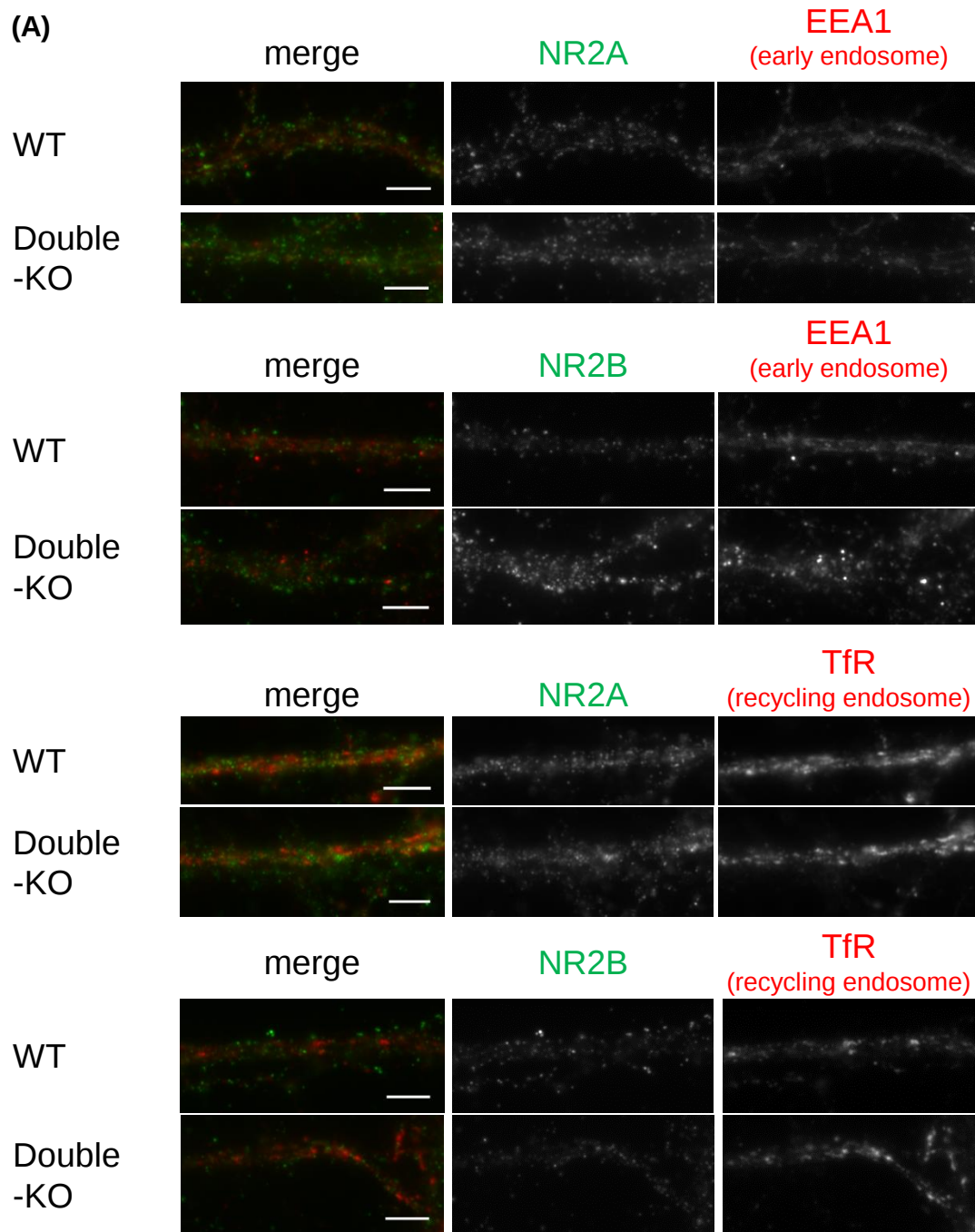


Figure 20. Double-KO neuronにおけるNR2AおよびNR2Bの局在解析

(A) Div.14の初代培養神経細胞をもちいてNR2AまたはNR2B (Alexa 488 : 緑) とEEA1またはTfR (Alexa 546 : 赤) との共染色をおこなった (scale bar = 5μm)。

(B) (A)の定量結果を示す (n=at least 12 neurons (independent 3 experiments); mean ± S.E; T-test)。

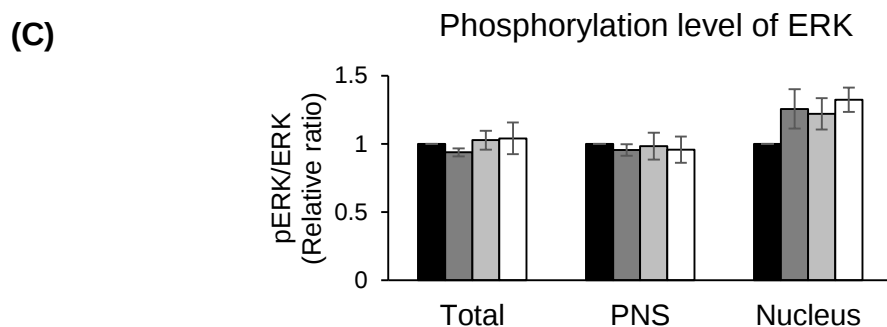
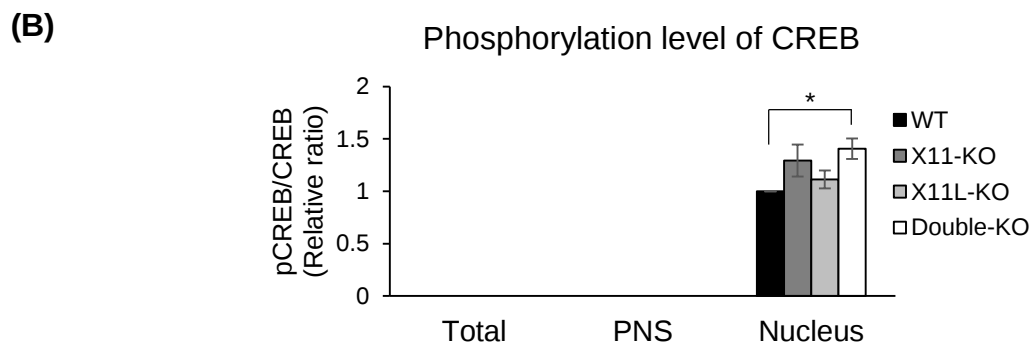
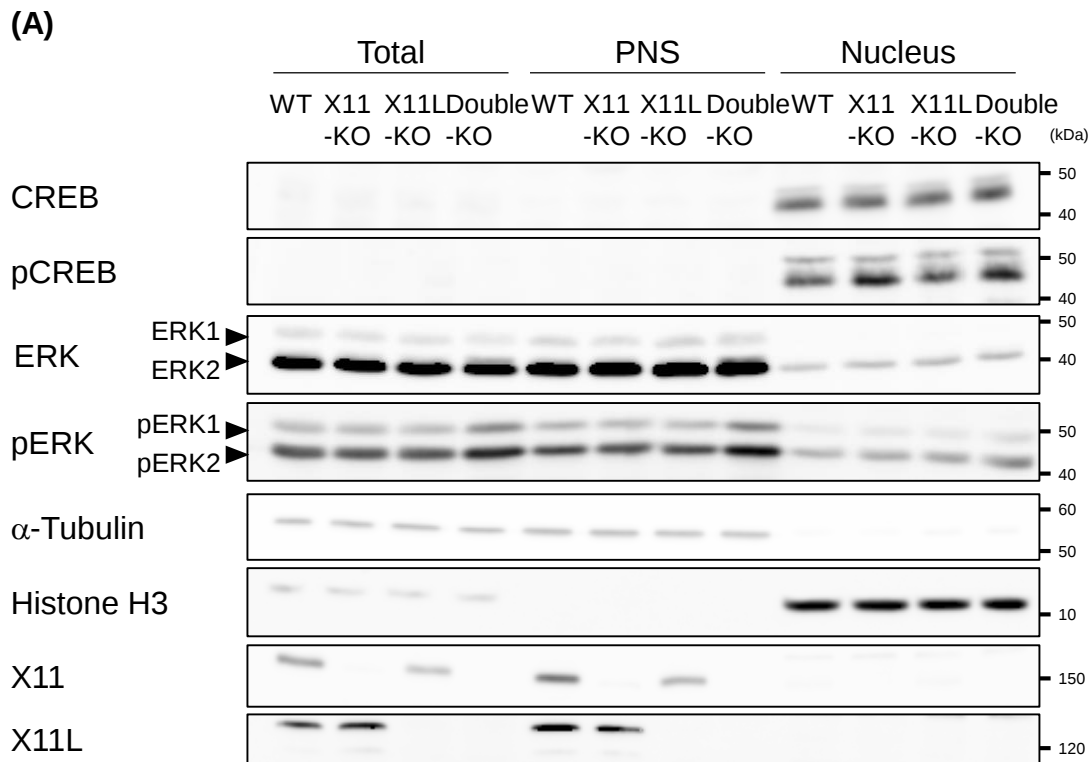
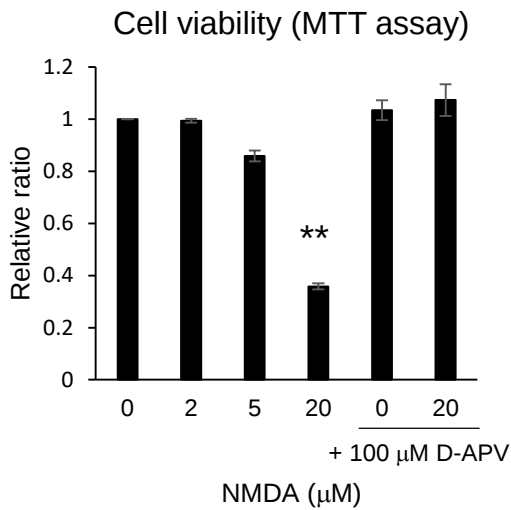


Figure 21. X11およびX11L KOマウスにおけるシナプス外NMDA受容体下流因子の解析

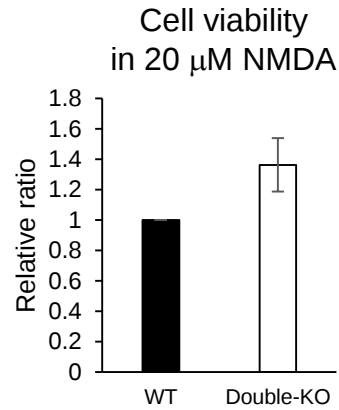
(A) 各遺伝子型マウスの海馬および大脳皮質から核画分を調製し、CREBならびにERKのリン酸化レベルをウェスタンブロッティングによって解析した。

(B)–(C) (A)の定量結果を示す (n=7; mean $\pm$ S.E; * p<0.05; Tukey-Kramer method)。

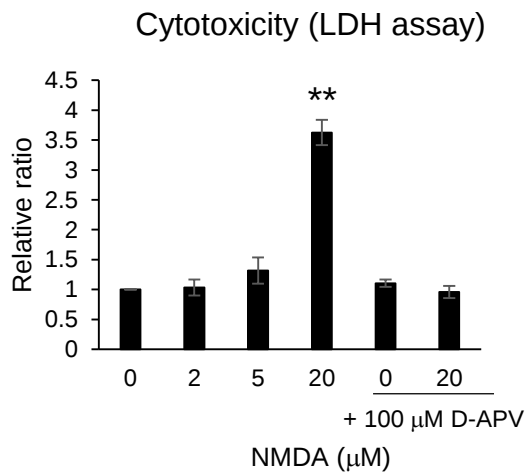
(A)



(B)



(C)



(D)

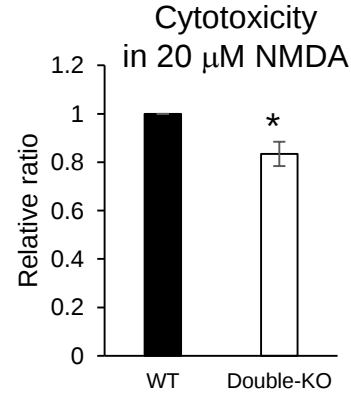


Figure 22. Double-KO neuronにおけるNMDA受容体依存的神経細胞死に対する抵抗性の検証

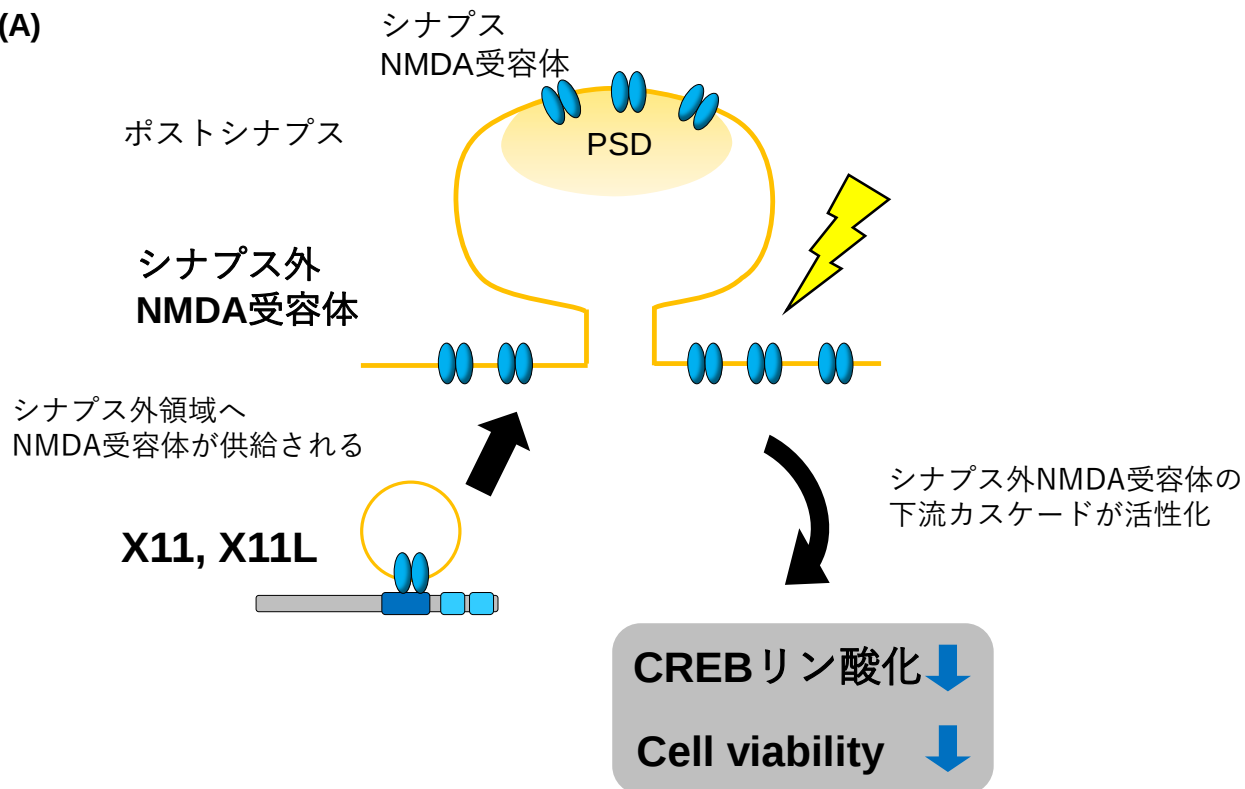
(A) MTT assayをもちいた生細胞活性評価の条件検討 (n=4; mean $\pm$ S.E.; ** <0.01; Dunnet's test)。

(B) 20 μ M NMDA添加時のWTとDouble-KO neuronの生細胞活性をMTT assayをもちいて解析した (n=4; mean $\pm$ S.E.; T-test)

(C) LDH assayをもちいた細胞傷害活性評価の条件検討 (n=4; mean $\pm$ S.E.; ** <0.01; Dunnet's test)。

(D) 20 μ M NMDA添加時のWTとDouble-KO neuronの細胞傷害率をLDH assayをもちいて解析した (n=4; mean $\pm$ S.E.; * <0.05; T-test)

(A)



(B)

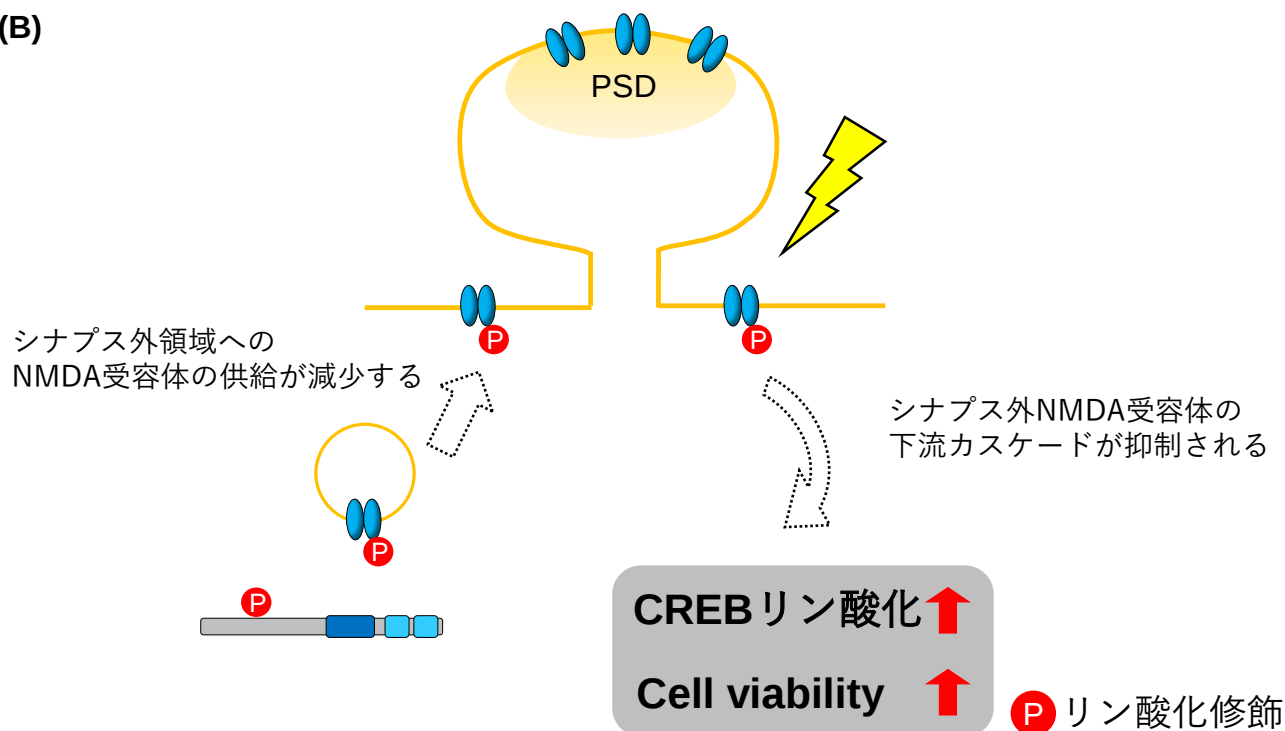


Figure 23. NMDA受容体局在制御におけるX11およびX11Lの機能の模式図

(A) X11およびX11LはNMDA受容体と結合し、シナプス外領域膜のNMDA受容体の局在量を増加させる。シナプス外NMDA受容体の下流カスケードが活性化され、CREBのリン酸化レベルや細胞活性が低下する。

(B) X11およびX11LまたはNMDA受容体がリン酸化することで両者の結合が解離し、シナプス外領域膜のNMDA受容体の局在量が減少する。その結果、シナプス外NMDA受容体の下流カスケードが抑制され、CREBのリン酸化レベルや細胞活性が亢進する。

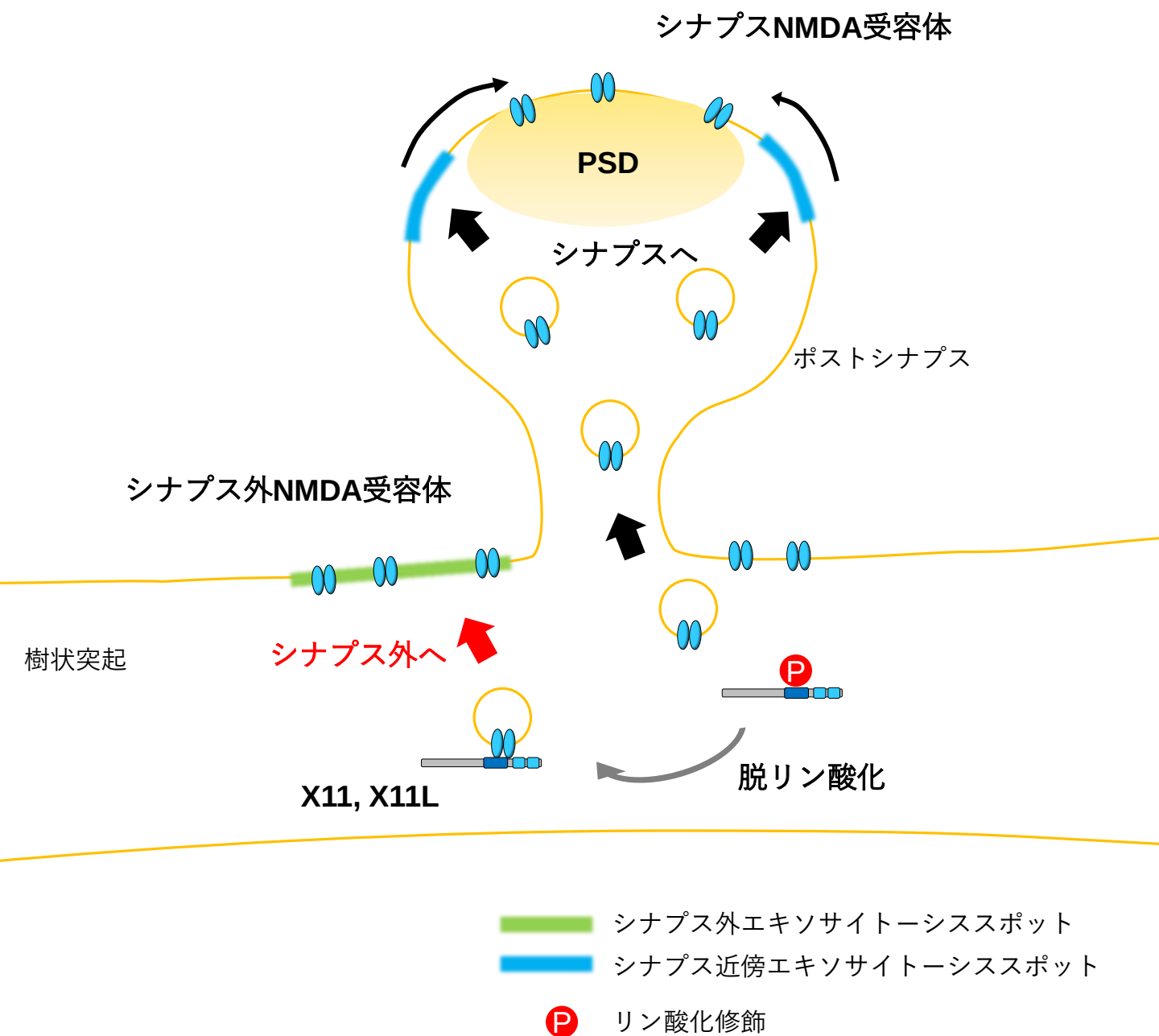


Figure 24. 想定されるX11およびX11Lの機能

X11およびX11Lは脱リン酸化依存的にNMDA受容体と結合することで、NMDA受容体のエキソサイトーシススポットの選択を担っている可能性がある。

なお、相互作用を制御するリン酸化部位がX11およびX11LまたはNMDA受容体どちらに存在するかは明らかではないが、ここではX11およびX11Lがリン酸化修飾を受けるものとして図示している。

8. 謝辞

本研究を行う機会を与えてくださり、終始適切なご指導ならびにご鞭撻を賜りました北海道大学 大学院薬学研究院 神経科学研究室 鈴木利治教授に深く感謝申し上げます。

ご多忙の中、学位論文発表会での座長ならびに本論文の審査をしてくださいました北海道大学 大学院薬学研究院 生化学研究室 佐々貴之准教授、同じく本論文の審査をしてくださいました北海道大学 大学院薬学研究院 生化学研究室 木原章雄教授ならびに北海道大学 大学院薬学研究院 神経科学研究室 多留偉功准教授に心から感謝いたします。

北海道大学 大学院薬学研究院 神経科学研究室 多留偉功准教授、中矢正助教、羽田沙緒里助教には本研究を行うにあたり日々の研究活動において的確なご指導、ご助言を賜りました。また、The Rockefeller University Robert B Darnell Laboratory 齋藤有紀博士、Yale University Cellular Molecular Physiology Laboratory Tomita, Susumu associate professor には研究を進めるうえで的確なご助言を賜りました。皆様に深く感謝いたします。

北海道大学 大学院薬学研究院 神経科学研究室の先輩、同期、後輩の皆様には大変お世話になりました。蘇武佑里子博士、白木柚葉博士には研究の相談に乗っていただいたり、雑談に付き合っていただいたりとたくさんの時間を共に過ごしました。木村彩乃博士、千葉杏子博士は研究者として人として心から尊敬する存在でした。お二人を目標に研究活動に励むことができました。阿部るり子技術補佐員には日々の実験のサポートをしていただきました。西田祥江秘書、鈴木比奈子秘書には事務的な面、精神的な面で日々の生活をサポートしていただきました。日々の研究生生活を支えてくださった全ての皆様に心から感謝いたします。

最後に博士課程への進学を快諾し、長い長い学生生活を支え、応援してくれた両親と妹に深く感謝いたします。本当にありがとうございました。

2018 年 3 月
本館 利佳