

平成 12 年度日米科学技術協力事業「脳研究」分野長期派遣共同研究者実施報告書

所属機関・職名・氏名：岡崎国立共同研究機構 生理学研究所 助手 木下彩栄

研究課題：multi-photon microscopy による transgenic mouse のグルタミン酸受容体の in vivo での経時的解析

米国側研究機関・共同研究者：Department of Neurology and Neuroscience
Masachusetts General Hospital Harvard Medical School
Prof. Bradley T. Hyman

派遣期間：平成 12 年 7 月 12 日～平成 12 年 10 月 11 日

研究の概要：

2000 年 7 月より本年 10 月まで米国ハーバード大学マサチューセッツ総合病院にて「multiphoton microscopy による神経受容体の in vivo での経時的解析に関する神経変性疾患の病態解明を目的とする研究」の学術研究に携わってきましたので、その成果をここに報告します。

私の今回の共同研究の目的は、神経受容体の集合離散や他の分子との相互作用といった dynamic な局在の変化を経時的に解析するというものでした。これは、これまでにより、神経受容体の静的な局在分布を調べるだけでは、生理的な脳機能の解明に方法論的な限界があることが明かとなってきたからです。

それで、まず、分子間の相互作用を検出するための FRET fluorescence resonance energy transfer という方法を学びました。これは、近接した分子の間でエネルギーの移動が起こるという原理を利用したもので、分子間の距離が 10nm 以下のときに観察される現象と考えられています。10nm 以内の近接ということは、直接会合しているということとほぼ等しいと考えられています。それで、私は Alzheimer 病の病因分子として重要と考えられている神経受容体 LRP (LDL receptor related protein) とその ligand (APP) にそれぞれ GFP, DsRed という蛍光物質の tag をつけた plasmid を作成し、これを培養細胞や培養神経細胞に共発現させ、その分子間で FRET を検出する実験を行いました。その結果、これらの分子は実際に相互作用をしており、これらの interaction は細胞内の endosome で起こっていることが明らかになりました。また、この受容体の特異的阻害剤である RAP (receptor associated protein) を共発現することにより、この相互作用は阻害され、FRET も生じなくなることを

見い出しました。これらの結果より、Alzheimer 病の病因分子である APP は LRP と endosome で直接会合していることが明らかになりました。さらに、現在は他の刺激 (agonist, antagonist) によりどのように変化するかということを継続して実験中です。

さらに、当初の目的として、神経受容体の動的な局在の変化を in vivo で (生きたマウス脳において) multiphoton microscopy によって観察するというものがありました。それで、私はこれらの受容体同志あるいは受容体と ligand との相互作用の実験を in vivo でも経時的に観察するという実験にもとりくんできました。現在のところ transgenic mouse よりもさらに応用のきくと思われる herpes virus vector に目的の遺伝子を組み込み、さらにその遺伝子に GFP などの蛍光物質をつけたものを construct として作成し、脳内の特定部位へ導入する手技を確立し、multi photon microscopy を用いて living animal での脳内の分布を観察することに成功しております。さらに、この方法をおしすすめ、living animal でのさまざまな刺激における動的な局在の変化を長期にわたり観察する予定です。

まとめますと、この3ヶ月間の日米共同研究におきまして、神経受容体とその ligand の相互作用を新しい技術を用いて培養細胞の系において証明することができました。さらに、in vivo でも遺伝子導入法を用いて目的分子を脳内に発現させ、それを multiphoton microscopy にて経時的観察を行うという方法を確立することができ、非常に有意義な成果を得ることができました。