

学位論文題名

小脳における NMDA 型グルタミン酸受容体の
免疫組織化学的検討

学位論文内容の要旨

はじめに

N-methyl-D-aspartate 型受容体 (NMDA 受容体) は、グルタミン酸受容体の主要なサブタイプの 1 つである。この受容体は、シナプス可塑性に関与し、脳における記憶や学習、シナプスの発達等に中心的役割を果たしている。これまで同定されているイオンチャンネル型グルタミン酸受容体サブユニット (GluR) のうち、4種の ϵ サブユニット (GluR ϵ 1- ϵ 4) と ζ 1 サブユニット (GluR ζ 1) が、この受容体の構成サブユニットである。

成熟マウス小脳では、苔状線維-顆粒細胞シナプスに顕著な NMDA 受容体電流応答が観察される。近年、このシナプスにおける NMDA 受容体は長期増強を誘発し、協調運動の制御に関わることが報告されている。mRNA レベルでは、顆粒細胞に GluR ϵ 1, GluR ϵ 3 及び GluR ζ 1 が発現する。これに対し、サブユニット蛋白分子の細胞内分布やシナプス局在の報告は、mRNA 分布や電気生理学的な受容体分布との矛盾点が多い。本研究では、小脳における NMDA 受容体サブユニットの分布を検討する目的で、GluR ϵ 3 及び GluR ζ 1 の特異抗体を作製し、ペプシン処理を加えた免疫組織化学法により解析した。

材料と方法

実験動物： 解析には 6 週齢の C57BL/6J マウスを使用した。

抗体作製： GluR ϵ 3 はアミノ酸残基 908-927 (E06595), GluR ζ 1 はアミノ酸残基 909-938 (D10028)の領域の合成ペプチドを作製し、これらを抗原ペプチドとしてウサギとモルモットを免疫後、採血、精製した。

イムノプロット： マウスを断頭抜脳後、小脳を homogenize した。これを遠心し、上清を小脳サンプルとして回収した。50 μ g のサンプルを 7.5%ポリアクリルアミドゲルにて電気泳動後に、ニトロセルロース膜に転写し、通常通り免疫反応を行いバンドを可視化した。

免疫組織化学： 光顕用には 4%パラフォルムアルデヒド (PFA) 溶液、電顕用には 4% PFA / 0.2%グルタルアルデヒド溶液を用いてマウスを灌流固定し、抜脳した。酵素抗体法にはパラフィン切片、蛍光抗体法及び免疫電顕にはピプラトーム切片を用いた。

抗体反応の前に、切片のペプシン処理を行った。-80℃に凍結保存したペプシン水溶液 (100 mg/ml) を使用直前に融解し、37℃の 0.2N HCl 水溶液中に加え、切片をこの中で一定時間 incubation した。

a) 酵素抗体法： ペプシン処理後、ABC 法に従って通常の免疫反応を行った。

b) 蛍光抗体法： 上記と同様に免疫反応後、10mM の propidium iodide で対比染色した。蛍光 2 重染色には FITC 及び Cy3 標識の 2 次抗体を用い、通常の免疫反応を行った。

c) 包埋前免疫電顕: 光顕・酵素抗体法と同様の免疫反応後, 1%オスミウムで後固定した。これをエポキシ樹脂に包埋し, 超薄切片を作製した。

結 果

抗体の特異性: 小脳サンプルを用いたイムノプロットでは, GluR ϵ 1C 抗体は 175 kDa, ウサギ及びモルモット GluR ϵ 3C 抗体は 140 kDa, GluR ζ 1C 抗体は 120 kDa の単一蛋白バンドを認識した。一方, 全脳サンプルで 180 kDa の単一蛋白バンドを認識する GluR ϵ 2N 抗体は反応陰性だった。以上のバンドのサイズは, 個々の推定分子量とほぼ一致し, 更に mRNA 分布との矛盾も認められなかった。以上より, これらの抗体の特異性が示された。

ペプシン処理の効果と GluR ϵ 3, GluR ζ 1 の脳内分布: GluR ϵ 3C 抗体及び GluR ζ 1C 抗体を用いた通常免疫組織化学では, 特異的な反応は認められなかった。一方, ペプシン処理後の免疫組織化学では, GluR ϵ 3C 抗体に対する強い反応が小脳顆粒層に認められた。また GluR ζ 1C 抗体に対する反応は特に大脳皮質, 海馬, 小脳顆粒層, 線条体, 嗅球で強く認められた。これらの結果は個々の mRNA 分布とよく一致しており, 抗原吸収試験や 1 次抗体を除いた場合には陽性反応は消失した。以上より, ペプシン処理により特異的な免疫組織化学反応が得られることが判明した。

ペプシン処理の至適条件: ペプシン濃度を 1mg/ml に固定して処理時間を変化させると, GluR ϵ 3C 抗体による顆粒層の反応は処理時間 5-15 分の範囲で認められ, 10 分で最強だった。処理時間を 10 分に固定してペプシン濃度を変化させると, 反応はペプシン濃度 0.5-2 mg/ml の範囲で認められ, 1 mg/ml で最も強かった。GluR ζ 1C 抗体, GluR ϵ 1C 抗体及び GluR ϵ 2N 抗体の反応も同様であった。以上より, ペプシン濃度は 1 mg/ml, 処理時間は 10 分が至適条件と考えられ, 本研究のペプシン処理は全てこの条件下で行った。

小脳内局在: GluR ϵ 1, GluR ϵ 3 及び GluR ζ 1 は顆粒層に最も強く認められたが, GluR ϵ 2 は反応陰性であった。蛍光抗体法では, GluR ϵ 1, GluR ϵ 3 及び GluR ζ 1 の顆粒層内の陽性構造は, 対比染色された核を含む細胞体とは重ならず, その間のニューロピル領域に認められた。これより, これら 3 種のサブユニットはその合成部位である細胞体には検出されず, 顆粒細胞のシナプスが集積する小脳糸球体に局在することが示唆された。更に蛍光 2 重染色では, GluR ϵ 3 の反応は, GluR ϵ 1 及び GluR ζ 1 の反応とほぼ一致し, これらのサブユニットの共存が示唆された。免疫電顕では, GluR ϵ 1, GluR ϵ 3 及び GluR ζ 1 に対する強い反応は, 苔状線維終末と非対称性シナプスを形成するシナプス後成分に認められた。その形態学的特徴から, 陽性構造は顆粒細胞の樹状突起であると判断できた。

考 察

本研究では, 成熟マウス小脳における NMDA 受容体サブユニットの分布と局在を, 特異抗体作製とペプシン処理を用いた免疫組織化学で検討した。ペプシン処理は, 海馬の NMDA 受容体の検出においてその有用性が報告されている。今回, 小脳の NMDA 受容体の免疫組織化学的検出においても, 劇的な効果を示すことができた。実際, 通常の方法では検出されなかった強い反応が顆粒層の糸球体に現れた。この結果は, この領域にグルタミン酸作動性シナプスが密集するという神経解剖学的見解や各サブユニットの mRNA 分布と一致している。

一方, 本研究の検出結果を, 通常免疫組織化学を用いた過去の報告と比較すると多くの差異が認められる。しかし, これら従来報告は, 明らかに mRNA の分布と矛盾している。更に, 過去の多くの報告では陽性反応が神経細胞の細胞体や近位樹状突起に認められている。しかし, 興奮性シナプスはこれらの部位ではなく, 樹状突起より派出する棘突起に形成され

ている事実を考えあわせると、細胞体や近位樹状突起における受容体局在の意義は明らかではない。小脳糸球体に GluR ϵ 1, GluR ϵ 3 及び GluR ζ 1 蛋白が高いレベルで存在することを示した今回の研究成果は、従来の分子生物学的、薬理的、電気生理学的研究成果ともよく一致しており、GluR ϵ 1, GluR ϵ 3 及び GluR ζ 1 の3種のサブユニットが苔状線維-顆粒細胞シナプスの後膜において機能的な受容体を形成し、小脳の機能や機能調節に関与している生理的意義に対して、分子解剖学的証左を与えるものと考えられる。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 犬 山 征 夫

副 査 教 授 渡 辺 雅 彦

副 査 教 授 井 上 芳 郎

学 位 論 文 題 名

小脳における NMDA 型グルタミン酸受容体の 免疫組織化学的検討

N-methyl-D-aspartate 型受容体 (NMDA 受容体) は, グルタミン酸受容体の主要なサブタイプの 1 つである. この受容体はシナプス可塑性に関与し, 記憶や学習, シナプスの発達などに中心的役割を果たしている. 近年, 成熟マウス小脳では, 協調運動の制御に関与することが報告されている. しかしながら, サブユニット蛋白分子の局在について報告されている結果は, これまで明らかにされている mRNA 分布や電気生理学的及び薬理的な受容体分布と矛盾する点が多い. 本研究は, GluR ϵ 3 及び GluR ζ 1 の特異抗体を作製し, ペプシン処理を加えた免疫組織化学法により, 成熟マウス小脳における NMDA 受容体サブユニットの局在を検討した.

解析には, 野生型として 6 週齢の C57BL/6J マウス, 対照として GluR ϵ 1 欠損マウスと GluR ϵ 3 欠損マウスを用いた. これらより常法に従って, 小脳サンプル, パラフィン切片, ビブラトーム切片を作製した. 抗体作製は GluR ϵ 3 及び GluR ζ 1 の合成ペプチドを用いてウサギ及びモルモットを免疫後, 抗血清を精製して GluR ϵ 3 及び GluR ζ 1 に特異的なポリクローナル抗体を作製した. 小脳サンプルを用いたイムノプロット法で, 使用抗体の特異性を検定した. 作製抗体, 抗 GluR ϵ 1 抗体, 抗 GluR ϵ 2 抗体, 細胞マーカーの抗体を用い, 酵素抗体法, 蛍光抗体法, 免疫電顕法を行い, 各サブユニットの局在を特定した. また, 大部分の免疫組織化学の前に, 切片のペプシン処理を行った.

イムノプロット法では, 作製抗体, 抗 GluR ϵ 1 抗体, 抗 GluR ϵ 2 抗体の特異性が確認された. 作製抗体に対し, ペプシン処理を用いた免疫組織化学を行ったところ, 通常の方法では検出されない, NMDA 受容体サブユニットに特異的

な反応が認められた。このペプシン処理を用いた免疫組織化学で、成熟マウス小脳における NMDA 受容体サブユニットの局在を検討したところ、GluR ϵ 1, GluR ϵ 3, GluR ζ 1 の3種のサブユニットが、顆粒層に高いレベルで分布していた。蛍光抗体法では、この3種のサブユニットは、顆粒層のニューロピル領域、即ち小脳糸球体に認められた。また、これらのサブユニットは互いに共存しており、機能的受容体形成が示唆された。さらに免疫電顕では、これら3種のサブユニットは顆粒細胞樹状突起のシナプス結合部に局在していた。

ペプシン処理を用いた免疫組織科学により、成熟マウス小脳における NMDA 受容体サブユニットの局在を検討し、GluR ϵ 1, GluR ϵ 3, GluR ζ 1 の3種のサブユニットが、その合成部位である細胞体ではなく、顆粒細胞樹状突起のシナプス結合部に局在することを示した。この検出結果を、通常の免疫組織化学を用いた過去の報告と比較すると多くの相違点が認められる。しかし、過去の報告が多くの問題点を含むのに対し、今回の研究成果は、これまで明らかにされた mRNA 分布や分子生物学的、薬理的、電気生理学的研究成果ともよく一致する。以上の点から、今回の研究結果は、GluR ϵ 1, GluR ϵ 3, GluR ζ 1 の3種のサブユニットが、苔状線維-顆粒細胞シナプスの後膜において機能的な受容体を形成し、小脳の機能や機能調節に関与している生理的意義に対して、分子解剖学的証左を与えるものと考えられる。

公開発表では、井上芳郎教授から、苔状線維-顆粒細胞シナプスにおける NMDA 受容体チャンネルのサブユニット構成について質問があった。渡辺雅彦教授は、小脳の NMDA 受容体チャンネルと海馬や大脳皮質における NMDA 受容体チャンネルとの相違点やその生理的意義について質問した。犬山征夫教授は免疫組織化学における共存の意義を問い、さらに、今後の NMDA 受容体のシナプス局在化の研究への展望を求めた。いずれの質問に対しても、申請者はおおむね妥当な回答をした。

この論文は、顆粒細胞樹状突起のシナプス結合部における ϵ 1, ϵ 3 および ζ 1 サブユニットの共存と局在をはじめて明確にしたことで高く評価され、今後の NMDA 受容体と小脳機能の研究が期待される。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ申請者が博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。