

NMDA 型グルタミン酸受容体の シナプス局在制御機構に関する分子解剖学的研究

学位論文内容の要旨

中枢神経系において、グルタミン酸は早い興奮性神経伝達物質として機能している。グルタミン酸を介するシグナル伝達は、感覚性上行路や、大脳・小脳などの高次領域で情報の伝達と処理に関与している。グルタミン酸受容体を構成する主要なサブタイプのうち、*N*-methyl-D-aspartate (NMDA) 受容体は電位依存性のマグネシウム阻害と高いカルシウム透過性を背景として、神経活動依存的なシナプス回路の発達、シナプス可塑性の誘発、学習や記憶の基盤として重要な役割を果たしている。本研究では、遺伝子改変動物などの生体解析システムを用いて、NMDA 受容体のシナプス局在の制御機構について、1) 興奮性シナプスの足場蛋白 PSD-95、2) NMDA 受容体の基本サブユニット NR1、3) NMDA 受容体の制御サブユニット NR2、の3つ側面から総合的に検討した。

1) PSD-95 は興奮性シナプスの足場蛋白の1つで、その PDZ ドメインを介して NMDA 受容体と結合し、シナプス可塑性の発現を調節する分子である。PSD-95 に対する特異抗体を作成し、シナプス後部分子の検出に有効な切片のペプシン処理法や包埋後免疫電顕法を用いて PSD-95 の分子局在を検討した。その結果、PSD-95 陽性反応は興奮性シナプスの後膜肥厚部に選択的に局在していた。また、NMDA 受容体の NR2 サブユニットとの共存が確認された。しかし、NMDA 受容体を発現しない海馬 CA3 錐体細胞や小脳プルキンエ細胞の興奮性シナプスにも、PSD-95 が単独で分布し、NMDA 受容体の実験的欠失にも関わらず PSD-95 のシナプス局在に変化は起こらなかった。これらの結果から、PSD-95 は NMDA 受容体のシナプス局在自体を制御する分子ではなく、シナプス後部に到達後に受容体や他のシグナル分子との会合化を通してシナプス伝達の機能調節に関与する分子であると結論した。

2) 海馬 CA1 特異的 NR1 ノックアウト (NR1-CA1-KO) マウスを用いて、NR1 欠損状態における NR2 サブユニットの細胞内局在変化を解析し、NMDA 受容体の生体内発現過程における NR1 の役割を検討した。NR1-CA1-KO マウスでの NR2 サブユニットの転写レベルは正常であった。しかし、NR1 欠損に伴って NR2 サブユニットのシナプス局在は完全に消失し、錐体細胞の細胞体に集積するようになった。その細胞内集積部位について包埋後免疫

電顕法で解析した結果、NR2 サブユニットは電子密度の高い顆粒 (intracisternal granule) となって小胞体の腔内に貯留していた。以上の結果は、NR2 サブユニットの小胞体からゴルジ装置への輸送は NR1 サブユニットに依存しており、その非存在下では小胞体腔内において凝集体となり処理されることを示している。

3) NR2 サブユニットを欠失する (NR2A/NR2C-KO) 小脳顆粒細胞を用いて、NR2 欠損状況における NR1 サブユニットの細胞内分布を検討し、NMDA 受容体の生体内発現過程における NR2 の役割を検討した。NR1 サブユニット転写レベルに変動は生じなかった。しかし、NR2 欠損に伴って NR1 サブユニットのシナプス局在は著明に減少し、免疫組織化学的にはほぼ完全に消失した。ところが、NR1 欠損時とは異なり、NR2 欠損により NR1 サブユニットの細胞体貯留は起こらなかった。これらの変化は、NR1 サブユニットの C 末変異体の種類に関係なく同様であった。以上の結果は、生体脳では NR2 欠損により、NR1 サブユニットの小胞体貯留は起こらないが、シナプス局在が不能になることを示している。

これらの生体解析系の研究を通して、NR1 サブユニットと NR2 サブユニットとが正しくヘテロメリックチャネル複合体を形成した場合にのみ、NMDA 受容体のシナプス発現が許されることが明かとなった。また、このような機構により機能的な NMDA 受容体がシナプス後部に到達した後に、PSD-95 などの足場蛋白との結合が起こり、シナプス伝達とシナプス可塑性の発現に適したシナプス後部の分子環境へと整えられることが考えられる。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 渡 辺 雅 彦
副 査 教 授 井 上 芳 郎
副 査 教 授 吉 岡 充 弘

学 位 論 文 題 名

NMDA 型グルタミン酸受容体の シナプス局在制御機構に関する分子解剖学的研究

学位論文の内容は以下の通りであった。グルタミン酸受容体を構成する主要なサブタイプのうち、NMDA 受容体は神経活動依存的なシナプス回路の発達、シナプス可塑性の誘発、学習や記憶の基盤として重要な役割を果たしている。本研究では、遺伝子改変動物などの生体解析システムを用いて、NMDA 受容体のシナプス局在の制御機構について、NMDA 受容体の足場蛋白 PSD-95、NMDA 受容体の基本サブユニット NR1、NMDA 受容体の制御サブユニット NR2 の3つ側面から検討した。まず、PSD-95 に対する特異抗体を作成し、シナプス後部分子の検出に有効な切片のペプシン処理法や包埋後免疫電顕法を用いて PSD-95 の分子局在を検討した。その結果、PSD-95 陽性反応は興奮性シナプスの後膜肥厚部に選択的に局在し、NMDA 受容体の NR2 サブユニットとの共存が確認された。しかし、NMDA 受容体を発現しない興奮性シナプスにも PSD-95 が単独で分布していた。これらの結果から、PSD-95 は NMDA 受容体のシナプス局在自体を制御する分子ではなく、シナプス後部に到達後に受容体と会合してシナプス伝達に関与する分子であると結論した。次に、海馬 CA1 特異的 NR1 欠損マウスを用いて、NR1 欠損状態における NR2 サブユニットの細胞内局在変化を解析した。NR1 欠損マウスでの NR2 サブユニットの転写レベルは正常であったが、NR1 欠損に伴って NR2 サブユニットのシナプス局在はほぼ完全に消失し、錐体細胞の細胞体に集積するようになった。その細胞内集積部位について包埋後免疫電顕法で解析した結果、NR2 サブユニットは電子密度の高い顆粒となって小胞体の腔内に貯留していた。以上の結果は、NR2 サブユニットの小胞体からゴルジ装置への輸送は NR1 サブユニットに依存しており、その非存在下では小胞体腔内において凝集体となり処理されることを示している。さらに、NR2 サブユニットを欠失する小脳顆粒細胞で、NR1 サブユニットの細胞内分布を検討した。NR1 サブユニット転写レベルに変動は生じなかったが、NR2 欠損に伴って NR1 サブユニットのシナプス局在は

著明に減少し、免疫組織化学的にはほぼ完全に消失した。これらの変化は、NR1 サブユニットの C 末変異体の種類に関係なく同様であった。以上の結果は、生体脳では NR2 欠損により、NR1 サブユニットの小胞体貯留は起こらないが、シナプス局在が不能になることを示している。これらの生体解析系の研究を通して、NR1 サブユニットと NR2 サブユニットとが正しくヘテロメリックチャネル複合体を形成した場合にのみ NMDA 受容体のシナプス発現が許されること、そして NMDA 受容体がシナプス後部に到達した後に PSD-95 などの足場蛋白との結合が起こり、シナプス伝達とシナプス可塑性の発現に適したシナプス後部の機能的な分子環境となることが考えられる。

質疑応答では吉岡教授から、ペプシン処理の効果について、PSD-95 の NMDA 受容体以外に結合する分子について、小胞体からの輸送時における正常な NMDA 受容体の分別のシステムについての質問があり、ペプシンの濃度、処理時間、検出分子の局在部位の違いによってペプシン処理の効果は異なること、PSD-95 は多くのシナプス後膜関連蛋白と結合し、分子の集約に関わっていること、ER retention 配列が複合体形成により隠されることで輸送が可能となるとの回答があった。井上教授からは、小胞体腔内顆粒における NR2 サブユニットの生化学的な証明についての質問があり、今回の実験ではサンプル調整の難しさから生化学的な証明はなく、分子解剖学的な所見だけであるとの回答があった。主査の渡辺教授からは NR1 と NR2 の ER retention の違いについて、他の受容体の品質管理機構についての質問があり、NR1 には ER retention の自己抑制機構が存在し、NR2 にはそれが無いこと、他の複合体を形成する受容体チャネルや代謝型受容体にも NMDA 受容体とは異なるものの品質管理機構が存在し、ヘテロメリックな複合体を形成して機能する分子には必要な機構であるという回答があった。

この論文は、NMDA 受容体のシナプス局在制御機構を興奮性シナプスの足場蛋白 PSD-95、NMDA 受容体の基本サブユニット NR1、NMDA 受容体の制御サブユニット NR2 の3つ側面から研究し、生体内におけるそれぞれの役割を明らかにした点で高く評価され、これらの結果を基盤として、今後さらに NMDA 受容体のシナプス局在制御機構についての知見が得られるものと期待される。

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。