

## 興奮毒性における NMDA 型受容体の関与

夏目 里恵・阿部 学・菅井 智昭

葉山 文恵・崎村 建司

新潟大学脳研究所細胞神経生物学分野

### The Role of NMDA Receptor Epsilon Subunits in Excitotoxicity

Rie NATSUME, Manabu ABE, Tomoaki SUGAI

Fumie HAYAMA and Kenji SAKIMURA

*Department of Cellular Neurobiology,*

*Brain Research Institute, Niigata University*

#### 要 旨

グルタミン酸興奮毒性は、脳虚血やてんかんなどの急性疾患ばかりでなく、長い過程を経る神経変性疾患による神経細胞死の原因としても注目されている。グルタミン酸受容体チャネルは、興奮毒性発現機序において中心的な役割を果たしていると考えられてきた。とりわけ、高いCa<sup>2+</sup>イオンの透過性を持つNMDA型グルタミン酸受容体はその鍵を握る分子として注目されてきた。この受容体の機能特性を決定する4種類のGluRεサブユニットノックアウトマウスを用いて、カイニン酸急性毒性におけるNMDA型受容体の関与を検証した。その結果、GluRε1サブユニットがカイニン酸による興奮毒性発現に最も重要な役割を果たしていることが明らかになった。さらに、小脳顆粒細胞に有意に発現するGluRε3や幼若期に主な発現があるGluRε4にも毒性発現への影響力が有ることから、NMDA型受容体は様々な機序で興奮毒性に関与していることが示唆された。

キーワード：グルタミン酸受容体チャネル、ノックアウトマウス、興奮毒性、カイニン酸、神経細胞死

#### はじめに

神経細胞は、虚血や低血糖などのエネルギー低下やてんかんなどの異常興奮により細胞死を起こすことが知られている。その発生机序として、グルタミン酸の過剰放出や再取り込みの低下による細胞間隙のグルタミン酸濃度上昇により、神経細胞の長期に渡る脱分極状態と細胞内カルシウム濃

度の上昇が考えられている。グルタミン酸興奮毒性として知られているこの現象は、脳虚血やてんかんなどの急性疾患ばかりでなく、長い過程を経る神経変性疾患による神経細胞死の原因としても注目されている<sup>1)</sup>。グルタミン酸受容体チャネルは、神経細胞興奮の最初の過程を担う分子群であり、興奮毒性発現機序においても中心的な役割を果たしていると考えられてきた。とりわけ、高い

Reprint requests to: Rie NATSUME  
Department of Cellular Neurobiology  
Brain Research Institute  
Niigata University  
1-757 Asahimachi-dori,  
Niigata 951-8585 Japan

別刷請求先：〒951-8585 新潟市旭町通り1-757  
新潟大学脳研究所細胞神経生物学分野

夏目 里恵

Ca イオンの透過性を持つ NMDA 型グルタミン酸受容体はその鍵を握る分子として注目されてきた。この受容体は、遺伝子クローニングとその機能発現解析により、GluR $\zeta$ 1 (NR1) サブユニットと 4 種類の GluR $\epsilon$ 1 (NR2A),  $\epsilon$ 2 (NR2B),  $\epsilon$ 3 (NR2C),  $\epsilon$ 4 (NR2D) サブユニットの組み合わせにより構成されるヘテロオリゴマーで働くことが判明している。GluR $\zeta$ 1 サブユニットには alternative splicing によりさらに 8 つの splice variant が存在しており、受容体機能との関連が議論されているが、その生理機能についての定説はない。一方、GluR $\epsilon$  サブユニットは、その発現分布が脳の発達段階や部位により異なっているばかりでなく、GluR $\zeta$ 1 サブユニットと組合わさって形成される NMDA 型受容体の薬理学的・電気生理学的特性が異なっており、この受容体の機能的な多様性の分子基盤が GluR $\epsilon$  サブユニットの多様性であることが明らかにされている<sup>2)3)</sup>。我々は、これまでに NMDA 型受容体の生理機能を明らかにするために 4 種類の GluR $\epsilon$  サブユニットの遺伝子ノックアウトマウスを作成した<sup>4)–7)</sup>。本研究では、興奮毒性発現の機序に NMDA 型受容体がどのように関わっているのかを検討した。

カイニン酸は、AMPA 型およびカイニン酸型グルタミン酸受容体チャネルの強力なアゴニストとして知られており、てんかんモデル作成や神経変性疾患研究に興奮毒性薬として用いられている。本研究では、興奮毒性に NMDA 受容体がどのような役割を果たすのかを調べるために、4 種類の GluR $\epsilon$  サブユニットノックアウトマウスにカイニン酸を投与し、検討をおこなった。

## 方 法

### マウス

NMDA 型受容体チャネル GluR $\epsilon$ 1, GluR $\epsilon$ 2, GluR $\epsilon$ 3, GluR $\epsilon$ 4 サブユニットそれぞれの遺伝子を欠損したマウスは、これまでに我々が作製し報告したものである<sup>4)–7)</sup>。これらのマウスを 10 代以上 C57BL/6 系統マウスに戻し交配し、その遺伝子背景をそろえた。また、GluR $\epsilon$ 2 サブユニット

遺伝子をホモに欠損した個体は新生仔致死となるので、ヘテロ欠損マウスで実験に供した。それぞれ 8–10 週齢雄遺伝子欠損マウスと対照として C57BL/6N 系統マウスを使用した。なお、全ての実験は、新潟大学動物実験ガイドラインならびに日本薬理学会動物倫理規定に従いおこなった。

### カイニン酸投与

カイニン酸は 100mg/ml の濃度で水に溶解した保存液を投与毎に 0.65 % NaCl 溶液で希釈し、各群のマウスに 10mg/kg body weight (b.w.), 20 mg/kg, 40mg/kg の量を腹腔注射した。対照としては、生食 (0.65 % NaCl) を注射した。注射後 60 分間、詳細な行動観察をおこなった。

### 組織解析

カイニン酸投与後生き残った個体は、投与 3 時間後と 1 週間後、ネンブータルで深麻酔し 4 % パラホルムアルデヒドで灌流固定した。定法に従い 5 $\mu$ m のパラフィン切片を作成し脳組織を検索した。

## 結 果

本研究で使用した 4 種類の NMDA 型受容体サブユニット GluR $\epsilon$  ノックアウトマウスは、GluR $\epsilon$ 2 を除き、完全欠損 (null KO) にしても正常に発育し交配も可能である。一方、GluR $\epsilon$ 2 サブユニットは null KO にすると吸吮反射が消失し、乳が飲めないために新生仔期に死亡する。したがって、GluR $\epsilon$ 2 サブユニットに関しては、そのタンパク量が約半分に減少するヘテロノックアウトの状態で解析をおこなった。4 種類の GluR $\epsilon$  ノックアウトマウスの表現型を表 1 に示す。

野生型 C57BL/6N 系統マウスにカイニン酸を 10mg/kg b.w. 投与しても、生食投与群との間に行動の差異は認められなかった。また、20mg/kg b.w. 投与群では、投与後 60 分間に渡りうずくまりやカタトニア様の特異な体位が認められた他、一部の個体で痙攣発作を起こすものが認められたが、いずれも一過性で死亡したものは 12 匹中 1 匹であった。40mg/kg b.w. 投与群では、投与 3–5 分後にカタトニア様症状が全ての個体に現れ、10

表1 Phenotype of NMDA receptor channel subunits null mutant mice

GluRε subunit	Development	Morphology	Behavior
GluRε1	normal	normal	decrease of learning (NR2A) ability
GluRε2 (NR2A)	lethal (newborn)	disappear barrelette	loss of suckling response
GluRε3 (NR2C)	normal	normal	extremely light motor coordination
GluRε4 (NR2D)	normal	normal	reduce spontaneous activity
GluRζ1 (NR1)	lethal (newborn)	disappear barrelette	suspend breathing

分以内にほとんどのマウス(92%)が痙攣をおこした。その後、走り回り行動(wild run)が約半分のマウスで認められた。これらの個体は走り回り行動と痙攣を繰り返し、その大部分のものが死亡した(図1, 表2)。

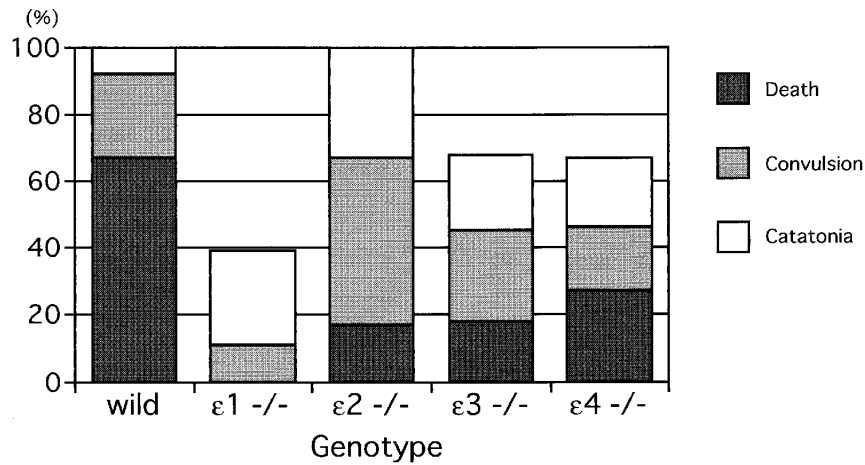
これに対してGluRεノックアウトマウスでは、20mg/kg b.w. 投与群でGluRε2ヘテロノックアウトマウスが野生型とほぼ同様の投与後60分間に渡りうずくまりやカタトニア様症状を示したが、GluRε1, GluRε3, GluRε4では明らかな変化は認められなかった。40mg/kg b.w. 投与群では、GluRε1ノックアウトマウスに、カタトニア様の症状を示すものが39%と認められるが、痙攣をおこすのは11%である。また、走り回り行動や死亡するものはいなかった。一方、小脳顆粒細胞に主要な発現が認められるGluRε3ノックアウトマウスでは、カタトニア様症状を示すものが68%あり、痙攣をおこしたものが45%であった。また、痙攣の重積によりその18%が死亡した。成体では非常に低い発現しかないGluRε4サブユニットのノックアウトマウスでは、カタトニア様症状と痙攣をおこすものはGluRε3ノックアウトマウスとほぼ同じ割合(それぞれ67%と46%)であったが、死亡率は若干高く27%であった。死亡した個体のほとんどで走り回り行動が認められた。新生仔致死のためにヘテロノックアウトのみしか解析できなかったGluRε2マウスでは、カタトニ

ア様症状は野生型と同様に全ての動物に認められたが、痙攣をおこす割合(67%)と死亡率(17%)はいずれも対照の野生型動物よりも低かった。GluRε2ヘテロノックアウトマウスと比較するために、GluRε1ヘテロノックアウトマウスでカイニン酸の効果を調べた。GluRε1ヘテロノックアウトマウスでもそのタンパク量はほぼ半分になることは報告されている。カイニン酸40mg/kg b.w. を投与すると、カタトニア様症状を示すものが67%であり、痙攣をおこしたものと死亡したものがそれぞれ、25%と8%であった。この値はGluRε2ヘテロノックアウトマウスと比較していずれも低いものであった。

カイニン酸投与3時間後の個体脳の組織では、ヘマトキシリン-エオシンの染色で、対処群と投与群の間で差を認めることはできなかった。一方、一週間後の脳組織では、痙攣が重積した個体で海馬領域や大脳皮質部分に散在的に組織破壊がおこったと思われる空洞が存在していた。その中には、出血痕が認められるものも存在していた。組織破壊の像は、強い痙攣を呈したもののほど多く認められる傾向にあったが、ひどい痙攣をおこしたものの中でも変化が認められないものもあった。

## 考 察

NMDA型受容体の機能的特性は、組み合わせ



Kainate (40 mg/kg b.w.) was administrated via ip injection.

図1 Effects of kainate on the NMDA receptor knockout mice

表2 Effects of kainate on the GluRε1-4 subunits deficient mice

Genotype	Catatonia* (%)	Convulsion (%)	Death (%)	n
wild	100	92	67	12
ε1 -/-	39	11	0	18
ε2 +/-	100	67	17	6
ε3 -/-	68	45	18	11
ε4 -/-	67	46	27	15

Kainate (40mg/kg b.w.) was administrated via ip injection.

\*Catatonia like symptoms: no move and catatonic rigidity

る GluRε サブユニットに依存すると考えられてきた。GluRε1/ε1 と GluRε2/ε1 は、そのチャネルの特性、Mg イオンによる閉塞やイオン透過性、シングルチャネルのコンダクタンスなど非常によく似ており、その分布もシナプスの可塑性が報告されている領域で多く発現しているなど共通性が高い。しかしながら、カイニン酸による興奮毒性の感受性は大きく異なっていた。GluRε2 の減少は興奮毒性にあまり効果を及ぼさなかったが、GluRε1 では大きな変化が認められた。このこと

は、カイニン酸投与による興奮毒性発生の機序に GluRε1 サブユニットを介する過程があることを強く示唆する。実験的脳血流梗塞による脳損傷の大きさを見た研究で、GluRε1 ノックアウトマウスでは、損傷領域が有意に少ないことが報告されており、虚血による細胞死にも GluRε1 を介する過程が指摘されている<sup>8)</sup>。

一方、小脳顆粒細胞に有意に発現する GluRε3 ノックアウトマウスや幼若期に主な発現がある GluRε4 ノックアウトマウスでも、カイニン酸に

よる興奮毒性は明らかに減弱していた。この現象が、発達過程でおこったことの影響なのか、弱く発現しているためなのか、いずれにしても現時点では明確ではない。いずれにしても NMDA 型受容体が、興奮毒性発現の過程に関与することは明らかである。

本研究により、カイニン酸による興奮毒性発生の過程に NMDA 型受容体に関与しており、とりわけ GluR $\epsilon$ 1 サブユニットが大きな役割を果たしていることが明らかになった。

### 参考文献

- 1) Sakimura K: Molecular structure and physiological function of the glutamate receptor channel. In K. Shimoji, Ed. "Molecular Neurobiology and Brain Ischemia", Springer, Tokyo, pp13 - 27, 1996.
- 2) Kutsuwada T, Kashiwabuchi N, Mori H, Sakimura K, Kushiya E, Araki K, Meguro H, Masaki H, Kumanishi T, Arakawa M and Mishina M: Molecular diversity of the NMDA receptor channel. *Nature* 358: 36 - 41, 1992.
- 3) Mishina M, Mori H, Araki K, Kushiya E, Meguro H, Kutsuwada T, Kashiwabuchi N, Ikeda K, Nagasawa M, Yamazaki M, Masaki H, Yamakura T, Morita T and Sakimura K: Molecular and functional diversity of the NMDA receptor channel. *Ann NY Acad Sci* 707: 136 - 152, 1993.
- 4) Ikeda K, Araki K, Takayama C, Inoue Y, Yagi T, Aizawa S and Mishina M: Reduced spontaneous activity of mice defective in the  $\epsilon$ 4 subunit of the NMDA receptor channel. *Brain Res Mol Brain Res* 33: 61 - 71, 1995.
- 5) Sakimura K, Kutsuwada T, Ito I, Manabe T, Takayama C, Kushiya E, Yagi T, Aizawa S, Inoue Y, Sugiyama H and Mishina M: Reduced hippocampal LTP and spatial learning in mice lacking NMDA receptor  $\epsilon$ 1 subunit. *Nature* 373: 151 - 155, 1995.
- 6) Abe M, Fukaya M, Yagi T, Mishina M, Watanabe M and Sakimura K: NMDA receptor GluR $\epsilon$ /NR2 subunits are essential for postsynaptic localization and protein stability of GluR $\zeta$ 1/NR1 subunit. *J Neurosci* 24: 7292 - 7304, 2004.
- 7) Kutsuwada T, Sakimura K, Manabe T, Takayama C, Katakura N, Kushiya E, Natsume R, Watanabe M, Inoue Y, Yagi T, Aizawa S, Arakawa M, Takahashi T, Nakamura Y, Mori H and Mishina M: Impairment of suckling response, trigeminal neuronal pattern formation, and hippocampal LTD in NMDA receptor  $\epsilon$ 2 subunit mutant mice. *Neuron* 16: 333 - 344, 1996.
- 8) Morikawa E, Mori H, Kiyama Y, Mishina M, Asano T and Kirino T: Attenuation of focal ischemic brain injury in mice deficient in the  $\epsilon$ 1 (NR2A) subunit of NMDA receptor. *J Neurosci* 18: 9727 - 9732, 1998.

(平成17年1月25日)