

## 苔状線維—小脳顆粒細胞シナプスにおける NMDA 受容体の局在機構の解析

新潟大学脳研究所細胞神経生物学分野（主任：崎村建司教授）

阿 部 学

Analysis of NMDA Receptor Localization at the Mossy  
Fiber-Granule Cell Synapse in the Cerebellum

Manabu ABE

*Department of Cellular Neurobiology,  
Brain Research Institute, Niigata University  
(Director: Prof. Kenji SAKIMURA)*

NMDA receptors are critical for synaptic plasticity and neuronal development. They are complexes consisting of the GluR  $\zeta$  1 (NR 1) subunits and one or more GluR  $\epsilon$  ( $\epsilon$  1–4 or NR 2 A–D) subunits. Although their synaptic localization is physiologically important in neural activities, the mechanism underlying synaptic targeting, subcellular localization, and cell surface expression remains largely unknown. To understand the synaptic localization of the NMDA receptor in cerebellum, I generated mutant mice lacking both GluR  $\epsilon$  1 and  $\epsilon$  3 subunits, and made immunohistochemical and biochemical analysis in the cerebellum. There was little immunoreactivity for the GluR  $\zeta$  1 subunit in the granular layer of *GluR  $\epsilon$  1 /  $\epsilon$  3* mutant cerebellum, while the GluR  $\zeta$  1,  $\epsilon$  1, and  $\epsilon$  3 subunits were found to be localized at the cerebellar glomerulus in wild-type mouse. The amount of GluR  $\zeta$  1 protein in the *GluR  $\epsilon$  1 /  $\epsilon$  3* mutant cerebellum was greatly reduced and hardly enriched in PSD fraction. These results indicate that the GluR  $\epsilon$  subunits serve as determinants of synaptic localization and protein stabilization of the GluR  $\zeta$  1 subunit in vivo.

---

Key words: NMDA receptor channel,  $\zeta$  1 subunit,  $\epsilon$  subunits, gene targeting, immunohistochemistry, synaptic localization  
NMDA 受容体チャネル,  $\zeta$  1 サブユニット,  $\epsilon$  サブユニット,  
ジーンターゲティング, 免疫組織化学, シナプス局在

---

Reprint requests to: Manabu ABE,  
Department of Cellular Neurobiology,  
Brain Research Institute,  
Niigata University Niigata City,  
951-8585 JAPAN.

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

阿 部 学

## はじめに

脳の高次機能である記憶、学習を理解する上で、その基礎過程であると考えられている長期増強、長期抑圧などシナプス伝達の可塑性や、神経回路形成の分子機構を解明することは重要な課題である。高等動物においては、NMDA 型グルタミン酸受容体チャネルは、可塑性の発現<sup>1)</sup>やシナプスの精緻化<sup>2)</sup>の鍵となる分子として注目されている。NMDA 受容体チャネルは、cDNA クローニングと、その再構成実験より $\epsilon$  1 (NR1) と  $\epsilon$  1-4 (NR2A-D) のヘテロマーで構成されることが示された<sup>3)-5)</sup>。ジーンターゲティングの手法を用いて、全てのサブユニット遺伝子について欠損変異マウスが作製されており<sup>6)-11)</sup>、各サブユニットが担う様々な神経機能が示された。また、近年に作製された、 $\epsilon$  サブユニットの細胞内領域を欠失した変異マウスの解析結果から<sup>12)-14)</sup>、NMDA 受容体チャネルの細胞内局在は、シナプス可塑性の発現に重要であることが強く示唆されている。

NMDA 受容体チャネルのシナプス局在機構の過程である、サブユニットの会合、細胞表面への発現、シナプスへのターゲティングと集積機構などについて、いまだ未知の部分は多いが、 $\epsilon$  1 サブユニットがそれらの機構に重要な役割を果たしている可能性が示唆されている<sup>15)-17)</sup>。一方、マウス成体の小脳プルキンエ細胞は、非常に豊富な $\epsilon$  1 サブユニット mRNA が発現しているのにもかかわらず、例外的に、 $\epsilon$  サブユニット mRNA の発現が全く見出されない細胞である<sup>18)</sup>。免疫組織化学的解析では、小脳プルキンエ細胞の細胞体と、その樹状突起部分である分子層には、 $\epsilon$  1 サブユニットのシナプスへの集積を示すようなシグナルは検出されない。このことから、 $\epsilon$  1 サブユニット単独ではシナプスへ移行しないという仮説が生ずる。ただし、プルキンエ細胞では NMDA 受容体活性を認めないので、シナプスへの集積機構そのものが欠落している可能性を否定はできない。つまり、生体内での NMDA 受容体のシナプス局在を検証するためには、機能的な NMDA 受容体を発現する神経細胞での解析が必要である。

マウス成体の小脳顆粒細胞において、NMDA 受容体チャネルは $\epsilon$  1,  $\epsilon$  1,  $\epsilon$  3 サブユニットが発現し、苔状線維－顆粒細胞シナプスにおいてイオンチャネルとして機能していることは、すでに、in situ ハイブリダイゼーション<sup>18)</sup>、免疫組織化学、電気生理学的な解析<sup>19)</sup>から示されている。そこで、本研究では *GluR $\epsilon$  3* 欠損

マウスと、*GluR $\epsilon$  1/ $\epsilon$  3* 2 重欠損マウスを作製し、これらの変異マウスを用いて、NMDA 受容体サブユニットの発現と細胞内局在について検証した。その結果、*GluR $\epsilon$  1/ $\epsilon$  3* 欠損マウスにおいて、 $\epsilon$  1 サブユニットは顆粒層のシナプスへ局在せず、タンパク量も減少していることを見出した。これらの事実から、生体内において、NMDA 型グルタミン酸受容体チャネル  $\epsilon$  サブユニットは、 $\epsilon$  1 サブユニットのシナプス局在とタンパク安定性に対する決定因子として働くことが示唆される。

## 材料と方法

### NMDA 受容体チャネル $\epsilon$ 3 サブユニット欠損マウスの作製

標的遺伝子組換え法により  $\epsilon$  3 サブユニット欠損マウス（以降 *GluR $\epsilon$  3* 欠損マウスと表記する）を作成した。マウス *GluR $\epsilon$  3* cDNA, pGRU20<sup>20)</sup> の 2.2 kb XhoI 断片をプローブとし、C57BL/6 マウスゲノム DNA ライブラリーをスクリーニングすることで、*GluR $\epsilon$  3* ゲノム DNA クローン, pGE  $\epsilon$  3 E#16-1 を得た。このクローンを SalI と HindIII で消化して得られる 6.5 kb の断片を、pBluescript 2 KS (-) に挿入したものを pG  $\epsilon$  3 SH とした。pGK 2 Neo を EcoRI と BamHI で消化して得られる 1.3 kb の断片を、EcoRI と BamHI で消化した pG  $\epsilon$  3 SH に連結し、pG  $\epsilon$  3 SHN とした。pGK 2 Neo の 1.3 kb の断片には、ポジティブ選別のためのネオマイシン耐性遺伝子が含まれている。pGE  $\epsilon$  3 E#16-1 を NotI と EcoRV で消化して得られる 1.2 kb の断片と、BamHI で消化し、末端を平滑化した pG  $\epsilon$  3 SHN を連結して pG  $\epsilon$  3 NT2 を作製した。pG  $\epsilon$  3 NT2 を SalI と NotI で消化して得られる 9 kb の断片を、SalI と NotI で消化した pPauDT-3 に挿入し、ターゲティングベクター、pG  $\epsilon$  3 TV3-T2 を作製した。pPauDT-3 には、ネガティブ選別に必要なジフテリアトキシン遺伝子が含まれている。1  $\times$  10<sup>7</sup> 個の TT2 ES 細胞に対し、SalI で直線化した pG  $\epsilon$  3 TV3-T2 を 6 pmol 混和し、電気穿孔法（電圧 0.25 kV、容量 960  $\mu$ F、抵抗  $\infty$ ）で導入した後、150  $\mu$ g/ml G 418 含有培地で 7 日間培養し選別を行った。相同組換えをおこした ES 細胞の同定は PCR およびサザンプロットにより行った。ICR マウスの 8 細胞胚に、相同組換え ES 細胞を約 10 個注入し、キメラマウスを作製した。キメラマウスと C57BL/6 のマウスを交配させ、産まれてきた仔の *GluR $\epsilon$  3* 変異遺伝子をサザンハイブリダイゼーション

で確認し、さらにヘテロ変異マウス同士を交配させ、*GluR*  $\epsilon$  3欠損マウスを樹立した。また、 $\epsilon$  1と $\epsilon$  3サブユニットを同時に欠損するマウス(*GluR*  $\epsilon$  1/ $\epsilon$  3欠損マウス)を作製するため、すでに作製されていた $\epsilon$  1サブユニット欠損マウス<sup>6)</sup>(*GluR*  $\epsilon$  1欠損マウス)と*GluR*  $\epsilon$  3変異マウスを交配させ、*GluR*  $\epsilon$  1/ $\epsilon$  3欠損マウスを作製した。

#### in situ ハイブリダイゼーション

$\epsilon$  1,  $\epsilon$  3,  $\xi$  1サブユニット mRNA に対して、それぞれ特異的なプローブ、oligo  $\epsilon$  1 E, oligo  $\epsilon$  3 M 4 C, oligo  $\xi$  1 A を作製した。oligo  $\epsilon$  1 E は $\epsilon$  1サブユニット cDNA の1,862 ~ 1,906番に、oligo  $\epsilon$  3 M 4 C は $\epsilon$  3サブユニット cDNA の2,525 ~ 2,570番に、oligo  $\xi$  1 A は $\xi$  1サブユニット cDNA の-54 ~ -10番に相補的な配列の合成オリゴマーである。これらを terminal deoxyribonucleotidyl transferase (BRL, Bethesda, MD) を用い、<sup>[32P]</sup>-dATP で標識し、プローブとして用いた。動物をジエチルエーテルで麻酔した後、全脳を摘出し、ドライアイスで急速に凍結した。クライオスタットにより20  $\mu$ m 厚の矢状断切片を作製し、3'-aminopropyltriethoxysilane でコートしたスライドガラスに貼付した。ハイブリダイゼーションは50%ホルムアミド存在下で、42°C, 12時間行い、Hyperfilm- $\beta$  max (Amersham, Buckinghamshire, England) に3週間、露出させた。

#### 免疫組織化学

ペントバルビタール(100 mg/kg)による麻酔下の動物を、4%パラホルムアルデヒドにより灌流固定し、全脳を摘出しパラフィンに包埋後、ミクロトームにて5  $\mu$ m 厚の矢状断切片を作製しスライドガラスに貼付した。脱パラフィン後、切片を1 mg/ml ペプシン-PBS で37°C, 11分間インキュベートした<sup>21)</sup>。PBS で洗浄した後、ブロッキング(10%正常ヤギ血清、室温30分間)、一次抗体反応( $\xi$  1,  $\epsilon$  1サブユニット抗体は1  $\mu$ g/ml,  $\epsilon$  3サブユニット, PSD-95抗体は0.5  $\mu$ g/mlで室温10時間)、2次抗体反応(ビオチン標識抗ウサギ IgG 抗体で室温1時間)、ペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジンで室温30分間インキュベートし、3, 3'-diaminobenzidine で発色させた。ブロッキング、2次抗体、ストレプトアビジンは Histofine SAB-PO (R) kit (Nichirei, Tokyo, Japan) を用いた。共焦点レーザー顕微鏡を用いた免疫蛍光では、まず、ウサギ抗 $\xi$  1サブユニット抗体で室温10時間、ビオチン標識抗ウサギ IgG 抗体で1時間、ペルオキシダーゼ標

識ストレプトアビジンで30分間インキュベートした後、tyramide signal amplification kit (TSA Fluorescein system [green], NEN Life science, Boston, MA) で発色させた。さらに同サンプルを、モルモット PSD-95抗体で室温10時間、Cy 3 標識ロバ抗モルモット IgG 抗体で2時間インキュベートするか、または10 mM propidium iodide (Molecular Probes, Eugene, OR) で核染色した。

#### ウエスタンブロット解析

各遺伝子型について3個体のマウスより小脳を摘出し、10倍量のバッファー(10 mM Tris-Cl, pH 7.2, 5 mM EDTA, 0.32%スクロース)でホモゲナイズ後、700  $\times$ g で10分間遠心し、上清の postnuclear fraction を試料とした。Lowry 法でタンパク濃度を測定し、各サンプル 50  $\mu$ g を7%SDS-PAGE で分離した。Electro-blot 法でニトロセルロースフィルターに転写し、ブロッキング(5%スキムミルクで室温で1時間振盪)、一次抗体反応( $\xi$  1,  $\epsilon$  1サブユニット抗体は1  $\mu$ g/ml,  $\epsilon$  3サブユニット抗体は3  $\mu$ g/ml, PSD-95抗体は0.5  $\mu$ g/mlで1時間)、2次抗体反応(ペルオキシダーゼ標識抗ウサギ IgG 抗体 (Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, England) を4000倍希釈し、1時間インキュベート)させ ECL (Amersham Pharmacia Biotech) にて発色させ X 線フィルムに感光させた。

#### 細胞分画法

シナプトソーム, PSD 画分は Carlin らによって報告された方法<sup>22)</sup>を改変して調製した。まず、マウス小脳(野生型マウスは11匹, *GluR*  $\epsilon$  1/ $\epsilon$  3欠損マウスは5匹)より postnuclear fraction を調製した。この画分を0.8 M と1.2 M のスクロース密度勾配で遠心し、界面に集積するシナプトソームを、0.5% Triton X-100で15分、4°Cで攪拌し、111,000  $\times$ g で60分間遠心し、ペレットを40 mM Tris-Cl (pH 8.0)で懸濁したものを PSD 画分とした。

## 結 果

### *GluR* $\epsilon$ 3欠損マウスと*GluR* $\epsilon$ 1/ $\epsilon$ 3 2重欠損マウスの作製

NMDA 受容体 $\epsilon$  3サブユニット遺伝子を欠損させるために、ターゲティングベクターを構築し(Fig. 1 A), ES 細胞に導入した。このベクターで相同組換えを起こさせることで、エクソン13にある推定膜貫通領域 TM 4 をネオマイシン耐性遺伝子により置換し、 $\epsilon$  3サブユニッ

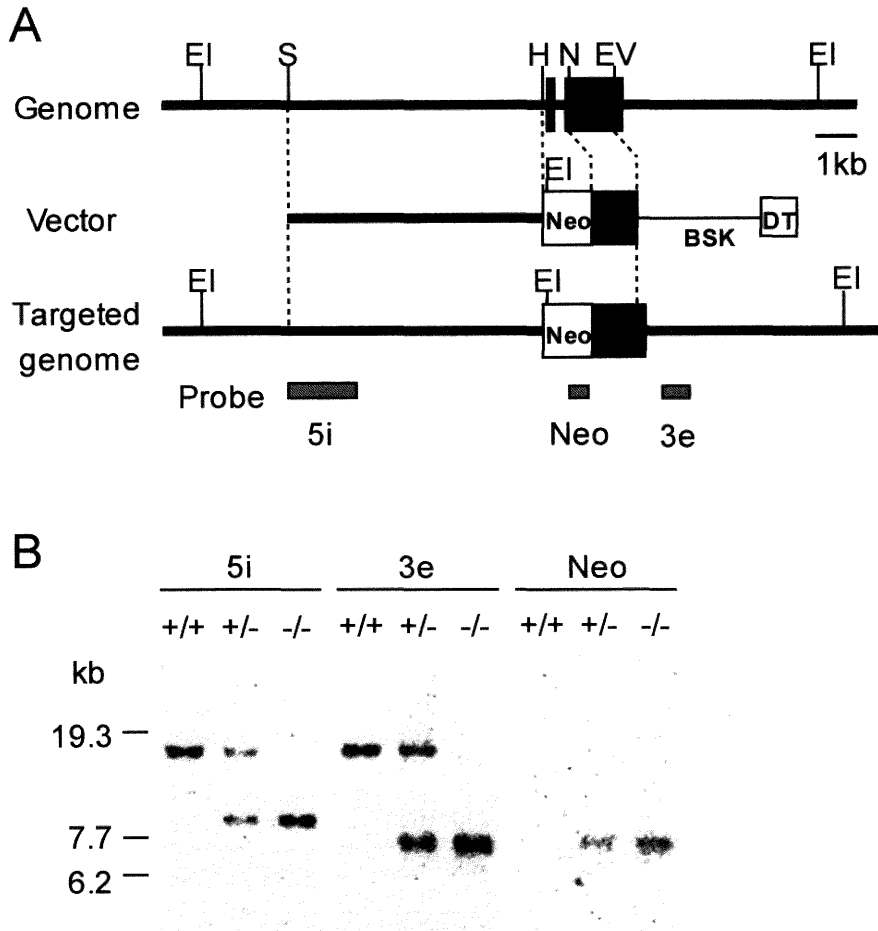


Figure 1

標的遺伝子組換えによる、NMDA 受容体  $\epsilon$  3 サブユニット欠損マウスの作製。(A) マウス  $\epsilon$  3 サブユニット遺伝子、ターゲティングベクター、組換え後の遺伝子の模式図。第13, 14エクソンをそれぞれ黒四角で示す。斜線のバーはサザンプロット解析に用いるプローブの位置を示す。EI は EcoRI, S は SalI, H は HindIII, N は NotI, EV は EcoRV のそれぞれの制限酵素認識部位, Neo はネオマイシン耐性遺伝子, DT はジフテリア毒素遺伝子, BSK はプラスミド pBluescript を示す。(B) 制限酵素 EcoRI で消化した、野生型マウス (+/+),  $\epsilon$  3 サブユニットヘテロ変異マウス (+/-),  $\epsilon$  3 サブユニット欠損マウス (-/-) のゲノム DNA のサザンハイブリダイゼーション解析。ベクターの 5'内側 (5i), 3'外側 (3e), および Neo プローブ (Neo) を用いた。

トのイオンチャネルとしての機能を失わせる。このベクターを TT2 ES 細胞に電気穿孔法で導入し、G 418 耐性の 1210 クローンを解析した結果、相同組換えを起こした 2 クローンを同定した。これらクローンからキメラマウスを作製し、1 系統のキメラマウス (8-88-

3) を得た。このキメラマウスと C57BL/6 マウスから生まれた仔の遺伝子型を解析し、ヘテロ変異マウスを同定した。このヘテロ変異マウス同士を交配させ、NMDA 受容体  $\epsilon$  3 サブユニット欠損マウス (ホモ変異マウス, 以下 *GluR  $\epsilon$  3* 欠損マウス) を作製した

(Fig. 1 B).

この *GluR $\epsilon$  3* 欠損マウスでは、完全な  $\epsilon$  3 サブユニット mRNA は発現していないことを in situ ハイブリダイゼーションにより確認し、また、 $\epsilon$  3 サブユニットタンパクが消失していることをウェスタンブロットにより確認した (Fig. 2 と 5). また、ヘテロ変異マウスでは、 $\epsilon$  3 サブユニットタンパクの発現量がおおよそ半減していた (非掲載データ). すでに報告されている NR2C $^{-/-}$ マウス<sup>8)9)</sup>の表現型と同様、*GluR $\epsilon$  3* 欠損マウスは、少なくとも見かけは正常に生育し、生殖能力も有し、歩行障害などを含め異常な行動は観察されなかった. また形態学的異常も、特に見出されなかった.

*GluR $\epsilon$  1/ $\epsilon$  3* 欠損マウスは、*GluR $\epsilon$  1* 欠損マウスと *GluR $\epsilon$  3* 欠損マウスを交配することによって作製した. *GluR $\epsilon$  1/ $\epsilon$  3* 欠損マウスは少なくとも見かけは正常に生育し、生殖能力も有し、異常な行動は観察されず、形態学的異常も特に見出されなかった. しかし、回転棒上での歩行運動の持続時間が、野生型のマウスに比べ有意に減少していた (非掲載データ) ことから、協調運動には軽度の障害がおこっていることが示唆される. この結果は、すでに報告されている NR2A $^{-/-}$ /2C $^{-/-}$ マウス<sup>9)</sup>の表現型とはほぼ同じである.

#### mRNA とタンパクの発現

in situ ハイブリダイゼーションにより  $\zeta$ 1,  $\epsilon$ 1,  $\epsilon$ 3 サブユニット mRNA の発現について検証した (Fig. 2 A-L). *GluR $\epsilon$  1*, *GluR $\epsilon$  3*, *GluR $\epsilon$  1/ $\epsilon$  3* 欠損マウスにおいて、それぞれ欠損しているサブユニットの mRNA は全く検出されなかったが、 $\zeta$ 1 サブユニットおよび欠損していない  $\epsilon$  サブユニット mRNA の発現分布は野生型のものと変化はなかった.

また、免疫組織化学的手法を用いて  $\zeta$ 1,  $\epsilon$ 1,  $\epsilon$ 3 各サブユニットタンパクの発現変化を検索した (Fig. 2 M-X). 野生型マウスにおける  $\zeta$ 1 サブユニットタンパクの発現は mRNA の発現とはほぼ対応しており、全脳に強く発現しているが、小脳分子層には明瞭なシグナルは認められなかった. また、 $\epsilon$ 1 と  $\epsilon$ 3 サブユニットタンパクの発現は mRNA の発現と同様であった. 一方、*GluR $\epsilon$  1*, *GluR $\epsilon$  3*, *GluR $\epsilon$  1/ $\epsilon$  3* 欠損マウスにおいては、それぞれ欠損しているサブユニットのタンパクは全く検出されなかった. *GluR $\epsilon$  1* 欠損マウスにおける  $\epsilon$ 3 サブユニットと、*GluR $\epsilon$  3* 欠損マウスにおける  $\epsilon$ 1 サブユニットの発現には差異がなかった. しかし、*GluR $\epsilon$  1/ $\epsilon$  3* 欠損マウスにおいて  $\zeta$ 1 サブユニットのシグナルは、小脳で著しく減少しており、*Glu*

*R $\epsilon$  1* と *GluR $\epsilon$  3* 欠損マウスにおいても、やや減少していた.

さらに小脳の拡大像 (Fig. 3) で検証すると、野生型マウスでは、 $\zeta$ 1,  $\epsilon$ 1,  $\epsilon$ 3 サブユニットとも顆粒層に明瞭なシグナルが検出された. 対照的に、分子層には各サブユニットともシグナルは検出されなかった. また、*GluR $\epsilon$  1* 欠損マウスにおける  $\epsilon$ 3 サブユニット、*GluR $\epsilon$  3* 欠損マウスにおける  $\epsilon$ 1 サブユニットの発現には変化がないように見えるが、両変異マウスとも  $\zeta$ 1 サブユニットのシグナルが減弱しており、*GluR $\epsilon$  1/ $\epsilon$  3* 欠損マウスにおいては  $\zeta$ 1 サブユニットのシグナルは検出感度以下であった. だが、PSD-95のシグナルについては、これら4系統のマウスで発現の差異はなかった.

さらに、 $\zeta$ 1 サブユニットと PSD-95に対して2重蛍光ラベル免疫染色を行った (Fig. 4). 野生型の小脳顆粒層では、 $\zeta$ 1 サブユニットのシグナルは、明瞭に propidium iodide による核の染色とは分離し、PSD-95のシグナルと一致した. この結果は、 $\zeta$ 1 サブユニットは細胞体のようなシナプス以外の部分には集積せず、小脳糸球体 (顆粒細胞-苔状線維シナプス) にのみ局在していることを示している. *GluR $\epsilon$  1/ $\epsilon$  3* 欠損マウスでは、 $\zeta$ 1 サブユニットのシグナルは検出することができなかった. これらの結果から、小脳顆粒細胞においては、 $\epsilon$ 1 と  $\epsilon$ 3 サブユニットの欠失は、 $\zeta$  サブユニットのシナプス局在を減少させることを示唆する.

#### 小脳における蛋白量と局在の変化

小脳顆粒細胞内の NMDA 受容体サブユニットのタンパク量について検証するため、全小脳から調製したホモジネートをウェスタンブロットによって解析した (Fig. 5 A). 野生型マウスに比べて、 $\zeta$ 1 サブユニットのシグナルは、*GluR $\epsilon$  1* 欠損マウスと *GluR $\epsilon$  3* 欠損マウスでは若干減少していた. さらに、*GluR $\epsilon$  1/ $\epsilon$  3* 欠損マウスでは著しく減少していた. また、*GluR $\epsilon$  1* 欠損マウスと *GluR $\epsilon$  3* 欠損マウスでは、それぞれ  $\epsilon$ 3 と  $\epsilon$ 1 サブユニットがやや減少していた. また、*GluR $\epsilon$  1/ $\epsilon$  3* 欠損マウスでは PSD-95がやや増加していた.

$\zeta$ 1 サブユニットタンパクの細胞内局在を検証するために、小脳のシナプトソームと PSD 画分を調製し、ウェスタンブロットによって解析した (Fig. 5 B). 野生型マウスでは、 $\zeta$ 1 サブユニットと PSD-95は、ホモジネート、シナプトソーム、PSD 画分の順に、タンパク量当たりの含有量が増加した. この濃縮は、 $\zeta$ 1 サブ

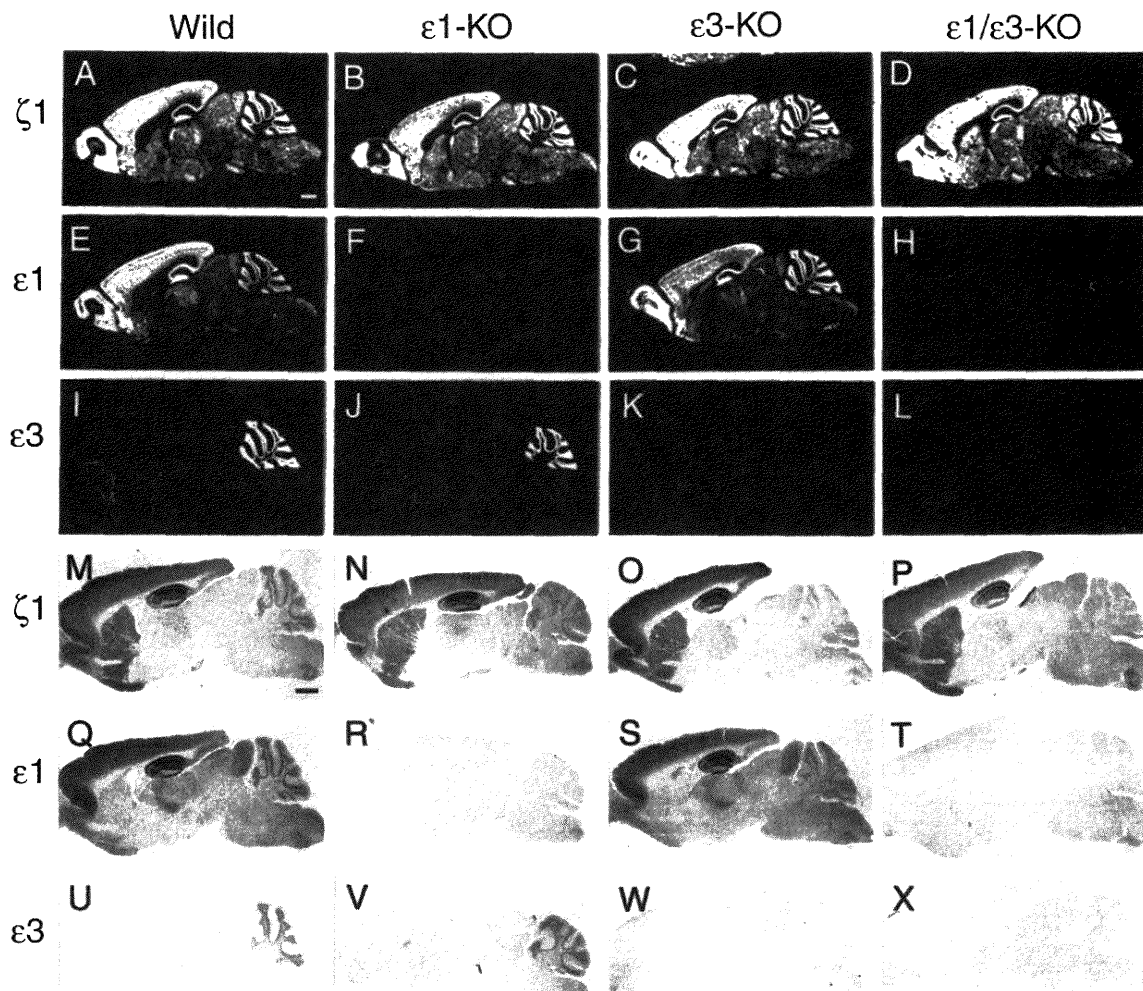


Figure 2

マウス全脳矢状断面での NMDA 受容体  $\zeta 1$ ,  $\epsilon 1$ ,  $\epsilon 3$  サブユニット mRNA とタンパクの発現. 野生型 (A, E, I, M, Q, U), *GluR $\epsilon 1$*  欠損 (B, F, J, N, R, V), *GluR $\epsilon 3$*  欠損 (C, G, K, O, S, W), *GluR $\epsilon 1/\epsilon 3$*  欠損マウス (D, H, L, P, T, X) の矢状断切片での in situ ハイブリダイゼーション (A-L) および免疫組織化学的解析 (M-X). ハイブリダイゼーションにはそれぞれ  $\zeta 1$  (A-D),  $\epsilon 1$  (E-H),  $\epsilon 3$  (I-L) サブユニット mRNA に特異的なオリゴヌクレオチドプローブを用い, 免疫反応にはそれぞれ  $\zeta 1$  (M-P),  $\epsilon 1$  (Q-T),  $\epsilon 3$  (U-X) サブユニットタンパクに特異的な抗体を用いた. スケールバーは 1 mm を示す.

ユニットと PSD-95 がシナプス後膜で共局在していることを反映していると考えられる. しかし, *GluR $\epsilon 1/\epsilon 3$*  欠損マウスでは,  $\zeta 1$  サブユニットの蛋白量当たりの含有量がほとんど増えなかった. しかし, PSD-95 は野生型マウスとはほぼ同様に濃縮された. これらの結果より,  $\zeta 1$  サブユニットは,  $\epsilon$  サブユニットの消失により減少し, 残存した成分も, シナプス後膜に局在しないこ

とが示唆される.

## 考 察

本研究においては, ジーンターゲティングの手法を用いて *GluR $\epsilon 3$*  欠損マウス, *GluR $\epsilon 1/\epsilon 3$*  欠損マウスを作製し, これらの変異マウスを用いて, NMDA 受容体チャネルの局在について検証した.

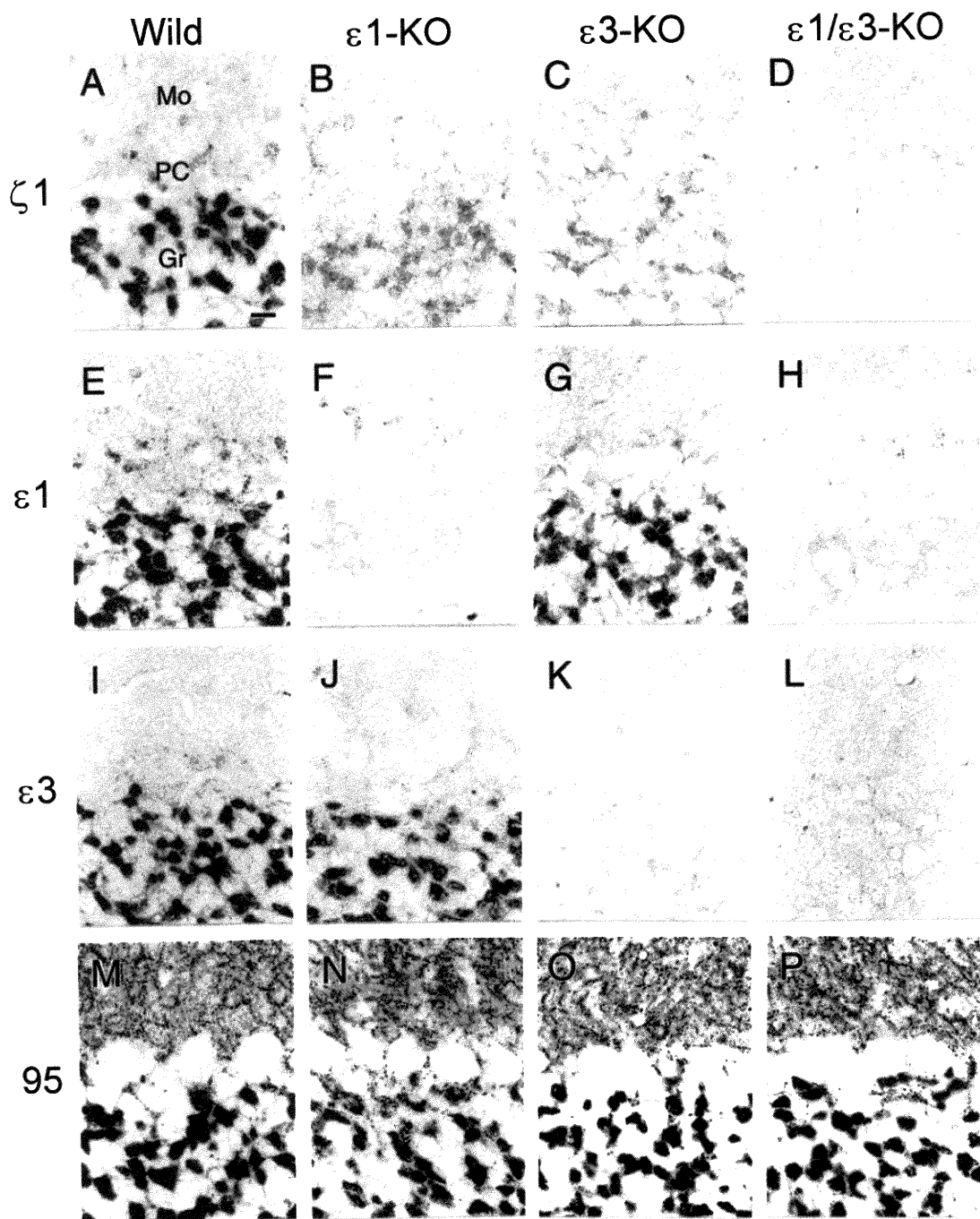


Figure 3

小脳皮質における NMDA 受容体  $\zeta 1$ ,  $\epsilon 1$ ,  $\epsilon 3$  サブユニットおよび PSD-95 タンパクの局在.  $\zeta 1$  (A-D),  $\epsilon 1$  (E-H),  $\epsilon 3$  (I-L) サブユニット, PSD-95 (M-P) 抗体を用いて免疫組織化学を行った. Gr は顆粒層, Mo は分子層. PC はプルキンエ細胞層の位置を示す. スケールバーは  $0.5 \mu\text{m}$  を示す.

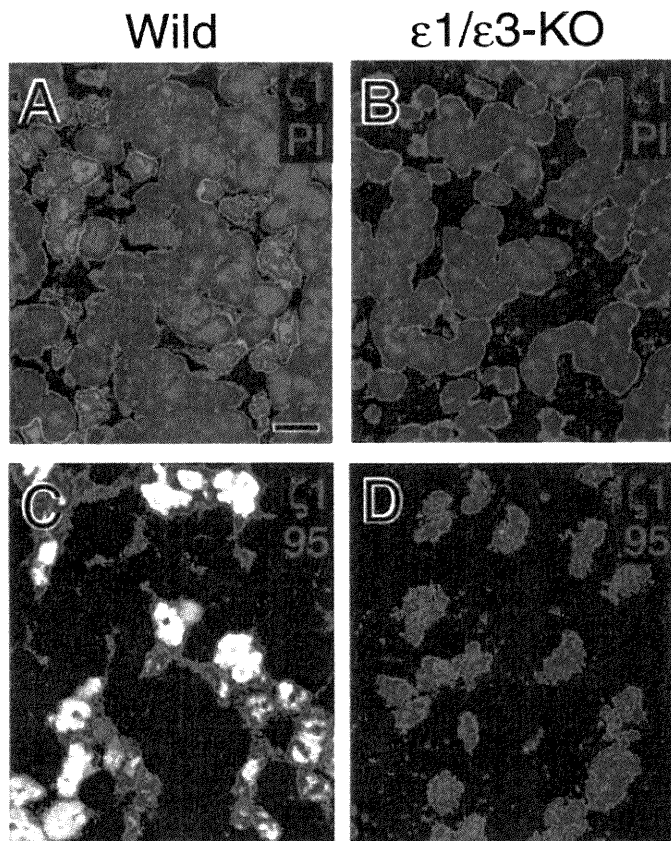


Figure 4

マウス小脳顆粒層における $\epsilon 1$ サブユニットタンパクの局在。(A, B)  $\epsilon 1$ サブユニット抗体による免疫蛍光染色と propidium iodide による核染色。(C, D)  $\epsilon 1$ サブユニット抗体と PSD-95抗体による二重免疫蛍光染色。野生型 (A, C) と *GluR $\epsilon 1/\epsilon 3$* 欠損マウス (B, D) の矢状断切片を用いた。C でのみ、共局在のシグナル (白色) が検出された。スケールバーは  $0.5 \mu\text{m}$  を示す。

#### $\epsilon 1$ と $\epsilon 3$ サブユニットの欠失による, NMDA 受容体サブユニットのシナプス局在への影響

免疫組織化学的に, NMDA 受容体 $\epsilon 1$ ,  $\epsilon 1$ ,  $\epsilon 3$  サブユニットタンパクの発現について解析したところ, 野生型マウスと比較して, *GluR $\epsilon 1$* 欠損, および *GluR $\epsilon 3$* 欠損マウスにおいて, 小脳顆粒層の $\epsilon 1$ サブユニットのシグナルは減弱しており, *GluR $\epsilon 1/\epsilon 3$* 欠損マウスにおいては検出感度以下にまで減弱していた。しかし, 各変異マウスの $\epsilon 1$ サブユニット mRNA の発現量, 発現パターンに変化はなかった。このことから,  $\epsilon 1$ サブユニットのシグナルの減少は, 転写量の減少や

mRNA の安定性の変化によるものではないことが示唆される。また, 野生型マウスの小脳顆粒層の二重免疫染色では, この $\epsilon 1$ サブユニットのシグナルは PSD-95のシグナルと一致するので,  $\epsilon 1$ サブユニットはシナプスへ局在していることは明らかである。

さらに,  $\epsilon 1$ サブユニットの細胞内局在について生化学的に検証するため, 小脳のシナプトソームと PSD 画分を調製し, ウェスタンブロットを行った。その結果, *GluR $\epsilon 1/\epsilon 3$* 欠損マウスにおける $\epsilon 1$ サブユニットのシナプトソームと PSD 画分への濃縮率は, 野生型マウスでの濃縮率に比べて著しく減少していた。このこ



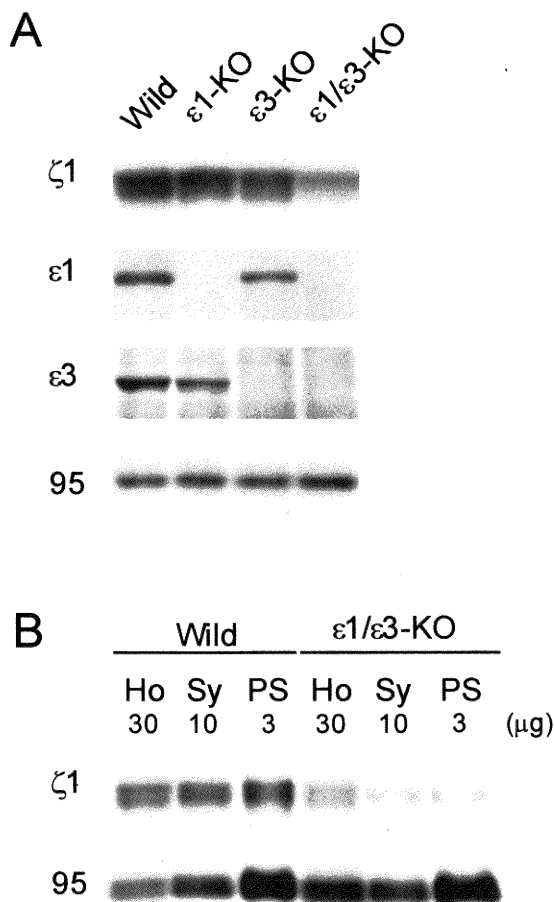


Figure 5

小脳タンパクのウェスタンブロット解析. (A) 野生型, *GluR $\epsilon$  1* 欠損, *GluR $\epsilon$  3* 欠損, *GluR $\epsilon$  1/ $\epsilon$  3* 欠損マウス小脳から調製したホモジネートをそれぞれ  $\zeta 1$ ,  $\epsilon 1$ ,  $\epsilon 3$  サブユニット, PSD-95 抗体により反応させた. 各レーンのタンパク量は 50  $\mu$ g. (B) 野生型および *GluR $\epsilon$  1/ $\epsilon$  3* 欠損マウス小脳から調製したホモジネート (Ho), シナプトソーム (Sy), PSD 画分 (PS) をそれぞれ  $\zeta 1$  サブユニットまたは PSD-95 抗体により反応させた. 各レーンのタンパク量は Ho で 30  $\mu$ g, Sy で 10  $\mu$ g, PS で 3  $\mu$ g.

とから,  $\zeta 1$  サブユニットは  $\epsilon$  サブユニットの欠損により減少するが, 残りの成分もシナプスへは局在していないことが考えられる.

近年, カルボキシル末端側の細胞内領域を欠失した

NMDA 受容体サブユニットを発現する変異マウスが作製された. 解析の結果,  $\epsilon 1$  サブユニットの変異では海馬の長期増強が減弱しており<sup>13)</sup>,  $\epsilon 2$  サブユニットの変異では海馬の長期抑圧が部分的に消失することが見出された<sup>12)</sup>. どちらの変異マウスにおいても, シナプスへの NMDA 受容体の局在が減少していることから<sup>12)-14)</sup>, NMDA 受容体の局在には,  $\epsilon$  サブユニットのカルボキシル末端側の細胞内領域が重要な役割を果たしていることが示唆される.

培養細胞に導入された  $\zeta 1$  サブユニットは, そのスプライス型によっては, ホモメリックな複合体を形成し, 細胞表面に発現する能力をもつという報告がある<sup>15)17)</sup>. また, 最近,  $\zeta 1$  サブユニットには細胞内領域を介して, 様々な細胞骨格系タンパク<sup>24)-27)</sup>, リン酸化酵素<sup>28)</sup>, PDZ タンパク<sup>15)29)</sup> などが結合していることが示された. これらの多くは後シナプスに存在し, NMDA 受容体を含む他の受容体とさらに相互作用することで, 巨大なタンパク複合体を形成し, シナプス可塑性などの神経伝達の高次機能を担っているという仮説が提唱されている<sup>30)</sup>. これらのことから,  $\zeta 1$  サブユニットは  $\epsilon$  サブユニット非存在下でシナプスに局在できる可能性が示唆される. しかし, ブルキンエ細胞には  $\epsilon$  サブユニット mRNA の発現は認められず,  $\zeta 1$  サブユニット mRNA は非常に豊富に発現しているが, 免疫組織学的には, シナプスに集積した  $\zeta 1$  サブユニットを示すような, 明瞭なシグナルは検出されない.

このことと本研究での実験結果から,  $\zeta 1$  サブユニット単独ではシナプスへ局在できず, 局在するには, 少なくとも一種類の  $\epsilon$  サブユニットが共存することが必須であると考えられる.

#### $\epsilon 1$ と $\epsilon 3$ サブユニットの欠失による, NMDA 受容体サブユニットと PSD-95 タンパクへの影響

ウェスタンブロットによって小脳での  $\zeta 1$ ,  $\epsilon 1$ ,  $\epsilon 3$  サブユニットタンパクの発現量について検証したところ, *GluR $\epsilon$  1* 欠損マウスと *GluR $\epsilon$  3* 欠損マウスにおいて,  $\zeta 1$  サブユニットタンパクの発現量はやや減少しており, さらに *GluR $\epsilon$  1/ $\epsilon$  3* 欠損マウスにおいては大幅に減少していた. このことは,  $\epsilon$  サブユニットと会合していない  $\zeta 1$  サブユニットは, タンパクの安定性が低いということを強く示唆する.

カルボキシル末端側の細胞内領域を欠失した  $\epsilon$  サブユニットを発現する変異マウスでは, NMDA 受容体がシナプスに局在しないが,  $\zeta 1$  サブユニットのタンパク量に変化は見出されていない<sup>12)</sup>. このことは,  $\zeta 1$  サブユ

ニットのタンパク安定性は、細胞内局在よりも、 $\epsilon$  サブユニットとの会合状態によって影響をうけると考えられる。

神経細胞には、 $\zeta$  1サブユニットのプールが存在することが、生化学的に示されており、そのサブユニットは $\epsilon$  サブユニットと会合しておらず、会合しているものに比べタンパクの半減期が著しく短いとの報告がある<sup>31)</sup>。*GluR $\epsilon$  1/ $\epsilon$  3*欠損マウス小脳の $\zeta$  1サブユニットタンパクが、どのような状態で細胞内で存在しているのかは不明であるが、その半減期は著しく短いことが、mRNA の存在量より推定される。また、 $\zeta$  1サブユニットのカルボキシル末端側の細胞内領域に存在する、折一のスプライス型 (C2, C2'カセット) は、サブユニットの細胞表面への発現に影響するという報告がある<sup>32)</sup>。これら C2カセット、または C2'カセットを含む $\zeta$  1サブユニットタンパクの発現量は、ラット成体の小脳では、ほぼ等しいという報告もある。本研究で用いた $\zeta$  1サブユニット抗体は C2カセットを認識するものであり、C2'カセットを認識しない。しかし、ウエスタンブロット解析では、全スプライス型の $\zeta$  1サブユニットを認識しうる、アミノ末端側の細胞外領域に対する抗体も用いており、その結果は、C2カセットを認識する抗体とはほぼ同じ結果、つまり、 $\epsilon$  サブユニットの欠損によってタンパクの発現量は著しく減少する傾向を示した (非掲載データ)。このことは、 $\zeta$  1サブユニットのタンパク安定性に関しては、スプライス型による差異がないことを示唆する。

一方、*GluR $\epsilon$  1*欠損マウスと*GluR $\epsilon$  3*欠損マウスにおいて、それぞれ $\epsilon$  3と $\epsilon$  1サブユニットタンパクの発現量がやや減少していた。苔状線維-小脳顆粒細胞シナプスでは、電気生理学的に $\epsilon$  1/ $\zeta$  1、 $\epsilon$  3/ $\zeta$  1ヘテロメリックチャネルの他、 $\epsilon$  1/ $\epsilon$  3/ $\zeta$  1ヘテロメリックチャネルが存在することが示されている<sup>8)</sup>。各 $\epsilon$  サブユニットタンパクの減少は、 $\epsilon$  1/ $\epsilon$  3/ $\zeta$  1チャネルが形成できないことと関係があるのかもしれない。また*GluR $\epsilon$  1/ $\epsilon$  3*欠損マウスにおいて、PSD-95タンパクの発現量が増加していた。このことについての生理的意義は不明である。最近、PSD-95の過剰発現が、シナプスの形成と成熟を導くという報告がされた<sup>33)</sup>。本研究で用いた動物は、すべてが成体であり、小脳顆粒細胞-苔状線維間シナプスの形態的な変化は見い出されておらず、他系統の*GluR $\epsilon$  1/ $\epsilon$  3*欠損マウスにおいてもNMDA 電流の消失以外の電気生理学的な異常は報告されていない。このことから、PSD-95の発現量の変化

は、少なくともシナプス形成に最終的には影響を与えていないようである。

## 結 論

生体内において、NMDA 型グルタミン酸受容体チャネルの $\epsilon$  サブユニットは、 $\zeta$  1サブユニットのシナプス局在とタンパク安定性に対する決定因子として働くことが強く示唆される。普遍的に発現する $\zeta$  1サブユニットは、4種の $\epsilon$  サブユニットの時期、部位特異的発現に伴い、 $\epsilon$  / $\zeta$  ヘテロマーを構成したときのみ安定化し、シナプス後膜へ輸送され局在し、機能的 NMDA 受容体チャネルを構成すると考えられる。

## 謝 辞

本研究のご指導と本稿のご校閲をいただきました、崎村建司教授に深謝いたします。

## 文 献

- 1) Bliss, T.V.P. and Collingridge, G.L.: A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature*, **361**: 31~39, 1993.
- 2) Schlagger, B.L., Fox, K. and O'Leary, D.D.M.: Postsynaptic control of plasticity in developing somatosensory cortex. *Nature*, **364**: 623~626, 1993.
- 3) Hollmann, M. and Heinemann, S.: Cloned glutamate receptors. *Ann. Rev. Neurosci.*, **17**: 31~108, 1994.
- 4) Moriyoshi, K., Masu, M., Ishii, T., Shigemoto, R., Mizuno, N. and Nakanishi, S.: Molecular cloning and characterization of the rat NMDA receptor. *Nature*, **354**: 31~37, 1991.
- 5) Mori, H. and Mishina, M.: Structure and function of the NMDA receptor channel. *Neuropharmacology*, **34**: 1219~1237, 1995.
- 6) 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.
- 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) Ebrilidze, A.K., Rossi, D.J., Tonegawa, S. and Slater, N.T.: Modification of NMDA receptor channels and synaptic transmission by targeted disruption of the NR 2 C gene. *J. Neurosci.*, **16**: 5014~5025, 1996.
  - 9) Kadotani, H., Hirano, T., Masugi, M., Nakamura, K., Nakao, K., Katsuki, M. and Nakanishi, S.: Motor discoordination results from combined gene disruption of the NMDA receptor NR 2 A and NR 2 C subunits, but not from single disruption of the NR 2 A or NR 2 C subunit. *J. Neurosci.*, **16**: 7859~7867, 1996.
  - 10) 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. *Mol. Brain Res.*, **33**: 61~71, 1995.
  - 11) Forrest, D., Yuzaki, M., Soares, H.D., Ng, L., Luk, D.C., Sheng, M., Stewart, C.L., Morgan, J.I., Connor, J.A. and Curran, T.: Targeted disruption of NMDA receptor 1 gene abolishes NMDA response and results in neonatal death. *Neuron*, **13**: 325~338, 1994.
  - 12) Mori, H., Manabe, T., Watanabe, M., Satoh, Y., Suzuki, N., Toki, S., Nakamura, K., Yagi, T., Kushiya, E., Takahashi, T., Inoue, Y., Sakimura, K. and Mishina, M.: Role of the carboxy-terminal region of the GluR  $\epsilon$  2 subunit in synaptic localization of the NMDA receptor channel. *Neuron*, **21**: 571~580, 1998.
  - 13) Sprengel, R., Suchanek, B., Amico, C., Brusa, R., Burnashev, N., Rozov, A., Hvalby, Ø., Jensen, V., Paulsen, O., Anderson, P., Kim, J.J., Thompson, R.F., Sun, W., Webster, L.C., Grant, S.G.N., Eilers, J., Konnerth, A., Li, J., McNamara, J.O. and Seeburg P.H.: Importance of the intracellular domain of NR 2 subunits for NMDA receptor function in vivo. *Cell*, **92**: 279~289, 1998.
  - 14) Steigerwald, F., Schulz, T.W., Schenker, L.T., Kennedy, M.B., Seeburg, P.H. and Köhr, G.: C-terminal truncation of NR 2 A subunits impairs synaptic but not extra synaptic localization of NMDA receptors. *J. Neurosci.*, **20**: 4573~4581, 2000.
  - 15) Standley, S., Roche, K.W., McCallum, J., Sans, N. and Wenthold, R.J.: PDZ domain suppression of an ER retention signal in NMDA receptor NR 1 splice variants. *Neuron*, **28**: 887~898, 2000.
  - 16) Ehlers, M.D., Tingley, W.G. and Huganir, R.L.: Regulated subcellular distribution of the NR 1 subunit of the NMDA receptor. *Science*, **269**: 1734~1737, 1995.
  - 17) Okabe, S., Miwa, A. and Okado, H.: Alternative splicing of the C-terminal domain regulates cell surface expression of the NMDA receptor NR 1 subunit. *J. Neurosci.*, **19**: 7781~7792, 1999.
  - 18) Watanabe, M., Mishina, M. and Inoue, Y.: Distinct spatiotemporal expressions of five NMDA receptor channel subunit mRNAs in the cerebellum. *J. Comp. Neurol.*, **343**: 513~519, 1994.
  - 19) Farrant, M., Feldmeyer, D., Takahashi, T. and Cull-Candy, S.G.: NMDA-receptor channel diversity in the developing cerebellum. *Nature*, **368**: 335~339, 1994.
  - 20) Nagasawa, M., Sakimura, K., Mori, K.J., Bedell, M.A., Copeland, N.G., Jenkins, N.A. and Mishina, M.: Gene structure and chromosomal localization of the mouse NMDA receptor channel subunits. *Mol. Brain Res.*, **36**: 1~11, 1996.
  - 21) Watanabe, M., Fukaya, M., Sakimura, K., Manabe, T., Mishina, M. and Inoue, Y.: Selective scarcity of NMDA receptor channel subunits in the stratum lucidum (mossy fibre-recipient layer) of the mouse hippocampal CA 3 subfield. *Eur. J. Neurosci.*, **10**: 478~487, 1998.
  - 22) Carlin, R.K., Grab, D.J., Cohen, R.S. and Siekevitz, P.: Isolation and characterization of postsynaptic densities from various brain regions: enrichment of different types of postsynaptic densities. *J. Cell Biol.*, **86**: 831~843, 1980.
  - 24) van Rossum, D., Kuhse, J. and Betz, H.: Dynamic interaction between soluble tubulin and C-terminal domains of *N*-methyl-D-aspartate receptor subunits. *J. Neurochem.*, **72**: 962~973, 1999.

- 25) Wechsler, A. and Teichberg, V.I.: Brain spectrin binding to the NMDA receptor is regulated by phosphorylation, calcium and calmodulin. *EMBO J.*, **17**: 3931~3939, 1998.
- 26) Wyszynski, M., Lin, J., Rao, A., Nigh, E., Beggs, A.H., Craig, A.M. and Sheng, M.: Competitive binding of  $\alpha$ -actinin and calmodulin to the NMDA receptor. *Nature*, **385**: 439~442, 1997.
- 27) Ehlers, M.D., Fung, E.T., O'Brien, R.J. and Huganir, R.L.: Splice variant-specific interaction of the NMDA receptor subunit NR 1 with neuronal intermediate filaments. *J. Neurosci.*, **18**: 720~730, 1998.
- 28) Leonard, A.S., Lim, I.A., Hemsworth, D.E., Horne, M.C. and Hell, J.W.: Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II is associated with the *N*-methyl-D-aspartate receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**: 3239~3244, 1999.
- 29) Kornau, H.C., Schenker, L.T., Kennedy, M.B. and Seeburg, P.H.: Domain interaction between NMDA receptor subunits and the postsynaptic density protein PSD-95. *Science*, **269**: 1737~1740, 1995.
- 30) Husi, H., Ward, M.A., Choudhary, J.S., Blackstock, W.P. and Grant, S.G.N.: Proteomic analysis of NMDA receptor-adhesion protein signaling complexes. *Nat. Neurosci.*, **3**: 661~669, 2000.
- 31) Huh, K.H. and Wenthold, R.J.: Turnover analysis of glutamate receptors identifies a rapidly degraded pool of the *N*-methyl-D-aspartate receptor subunit, NR 1, in cultured cerebellar granule cells. *J. Biol. Chem.*, **274**: 151~157, 1999.
- 32) Prybylowski, K.L. and Wolfe, B.B.: Developmental differences in alternative splicing of the NR 1 protein in rat cortex and cerebellum. *Dev. Brain Res.*, **123**: 143~150, 2000.
- 33) El-Husseini, A.E.D., Schnell, E., Chetkovich, D.M., Nicoll, R.A. and Brecht, D.S.: PSD-95 involvement in maturation of excitatory synapses. *Science*, **290**: 1364~1368, 2000.

(平成13年 1 月30日 受付)