

は やま ふみ え

氏 名	葉 山 文 恵
学 位	博 士 (医学)
学 位 記 番 号	新大院博(医)第1187号
学位授与の日付	平成17年 3月23日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
博 士 論 文 名	マウス網膜における NMDA 型受容体チャネル GluR ϵ 1 サブユニットの分布と機能

論文審査委員	主査 教授 阿 部 春 樹
	副査 教授 崎 村 建 司
	副査 教授 那 波 宏 之

博士論文の要旨

グルタミン酸は、脊椎動物の網膜における垂直方向の主要な興奮性神経伝達物質であり、その様々な活動は受容体の多様性に起因すると考えられている。グルタミン酸受容体 (GluRs) は代謝型とイオン透過型とに分類されるが、イオン透過型受容体である *N*-methyl-D-aspartate (NMDA) 型受容体は、1種類の GluR ζ 1 サブユニットと4種類の GluR ϵ 1 (NR2A)、 ϵ 2 (NR2B)、 ϵ 3 (NR2C)、 ϵ 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他、NR3A、3B など活性調節サブユニットの存在も知られている。NMDA 型受容体チャネルは、構成される GluR ϵ サブユニットにより薬理的・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 ϵ サブユニットであることが明らかにされている。本研究の目的は NMDA 型受容体の網膜における生理機能を解析することである。このために網膜における NMDA 型受容体サブユニットの分布を免疫組織学的に検索するとともに、この受容体の薬理的・電気生理学的特性を決定する GluR ϵ サブユニットのうち網膜における局在が確認されている GluR ϵ 1 サブユニットに着目し、このサブユニット遺伝子を欠損したマウスを用いて、網膜電位図 (electroretinogram ; ERG) により解析した。

網膜における NMDA 型受容体の局在は、主に *in situ* hybridization を用いた mRNA レベルでの検討がなされてきたが、本研究では網膜における NMDA 型受容体のシナプス局在を検討するために NMDA 型受容体各サブユニットに対する特異的抗体を用いて免疫組織学的に局在を検討した。GluR ϵ 1、GluR ϵ 2、GluR ζ 1 各サブユニットは、主に網膜内網状層 (IPL) 外側に優位に免疫反応をみとめた。一方、GluR ϵ 3 サブユニットの明らかな免疫反応はみとめられなかった。GluR ϵ 1 ノックアウトマウスでは網膜における GluR ϵ 1 サブユニットの抗体に対する免疫反応はみられず、抗 GluR ϵ 1 抗体の特異性と結果の信頼性が裏付けられた。IPL は双極細胞が網膜神経節細胞やアマクリン細胞とシナプスを形成している層であり、NMDA 型受容体はシナプス後膜に存在するという知見から GluR ϵ 1、GluR ϵ 2、GluR ζ 1 サブユニットは神経節細胞、アマクリン細胞に局在していると考えられる。また IPL 外側 2/5 は主に OFF のシグナル伝達が行われており、各サブユニ

ットは OFF 経路に関与している可能性が考えられた。

次に *in vivo* における網膜の機能を評価するために、Ganzfeld 刺激装置を用いて scotopic ERG および photopic ERG を記録した。Scotopic ERG 波形、photopic ERG 波形については GluR ϵ 1 ノックアウトマウスと野生型マウスとの間に明らかな差は見られなかった。さらに scotopic ERG の a 波、b 波の振幅と潜時、最大刺激強度 $1.0 \log \text{cd}\cdot\text{s}/\text{m}^2$ における各律動小波 (OP 波) (OP1-4) の振幅、および photopic ERG の b 波の振幅について詳細に検討したところ、両群間に有意差はみとめられなかった。b 波は一般的に ON 型双極細胞が起源であるとされてきたが、NMDA 型受容体拮抗薬を用いた薬理学的手法により NMDA 型受容体が b 波の発生に関与している可能性についても報告されている。今回の実験結果では、少なくとも GluR ϵ 1 サブユニットは b 波の発生に関して明らかな寄与はないと考えられた。また OP 波は主に IPL 内のアマクリン細胞の活動を反映していると考えられており、GluR ϵ 1 サブユニットがアマクリン細胞に発現していることから OP 波の変化がもっとも期待されたが、両群間に有意差は認められなかった。GluR ϵ 1、GluR ϵ 2 サブユニットが共存している領域では NMDA 電流が減少するがある程度残るという報告があり、GluR ϵ 1 欠損は GluR ϵ 2 サブユニットにより代償されている可能性も考えられる。

本研究では NMDA 型受容体 GluR ϵ 1 サブユニットノックアウトマウスを用いることにより、GluR ϵ 1 サブユニットの網膜における局在を正確に示すことができた。NMDA 型受容体 GluR ϵ 1、 ϵ 2、 ζ 1 サブユニットは内網状層の OFF sublamina に優位に局在していることが判明した。また、これまで NMDA 型受容体の ERG への関与に関して議論が分かれていたが、少なくとも GluR ϵ 1 サブユニットは ERG に明確な関与をみとめなかった。本研究は ERG と NMDA 型受容体 GluR ϵ 1 サブユニットの関連をはじめて示したものである。

審査結果の要旨

本論文では、網膜における NMDA 型受容体サブユニットのシナプス局在を免疫組織学的に検討し、GluR ϵ 1、GluR ϵ 2、GluR ζ 1 各サブユニットが、内網状層の OFF sublamina に優位に局在していることを見出した。また、NMDA 型受容体の網膜での生理機能を明らかにするために GluR ϵ 1 ノックアウトマウスを用いて、一晩暗順応後の scotopic 網膜電位図 (ERG) および明順応後の photopic ERG を記録した。その結果 GluR ϵ 1 ノックアウトマウスと野生型マウスとの間に明らかな差は見出せなかった。これまで NMDA 型受容体の ERG への関与に関して議論が分かれていたが、少なくとも GluR ϵ 1 サブユニットは ERG に明確な関与をみとめなかった。本論文は NMDA 型受容体 GluR ϵ 1 サブユニットノックアウトマウスを用いることにより、GluR ϵ 1 サブユニットの網膜における局在を正確に示し、さらに ERG と NMDA 型受容体 GluR ϵ 1 サブユニットの機能関連を示したところに学位論文としての価値を認める。