

## 博士論文の要旨及び審査結果の要旨

氏名 渡辺 和泉  
学位 博士 (医学)  
学位記番号 新大院博 (医) 第 580 号  
学位授与の日付 平成 26 年 3 月 24 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 定量的ウェスタンブロット法の開発とカイニン酸型グルタミン酸受容体への応用

論文審査委員 主査 教授 竹林 浩秀  
副査 教授 小野寺 理  
副査 教授 崎村 建司

### 博士論文の要旨

#### 【背景と目的】

イオン透過型グルタミン酸受容体であるカイニン酸型受容体 (KAR) は、GluK1-5 のサブユニットから構成される。これらは、カイニン酸に低親和性の GluK1-3 と、高親和性の GluK4-5 に分類され、前者がホモメリック受容体として機能するのに対して、後者は前者と複合体形成しないと機能しない。これらサブユニットは脳領域や細胞種特異的に様々な組み合わせで発現し、それが KAR の機能を規定していると考えられてきた。しかしながら脳における KAR サブユニットの量を定量的に解析した報告はなく、その詳細は不明のままであった。本研究では、KAR サブユニットに対する特異抗体を作製し、これらの抗体を用いて AMPA 型グルタミン酸受容体サブユニット GluA2 を標準とした定量的なウェスタンブロット法の開発を行ない、KAR サブユニットの量的関係を明らかにした。

#### 【方法】

定量に必要となる、5 種類のサブユニットに対する抗 GluK1-5 抗体の特異性を各種遺伝子欠損マウスと合成 KAR サブユニットを用いて確認した。力価の高い特異的な抗 GluK1 抗体は作製できなかった。GluK2-5 タンパク質の定量をするために必要な、各抗 KAR サブユニット抗体力価の補正は、GluA2 の細胞内 C 末端領域を KAR サブユニットのものと置換したキメラタンパク質 (GluA2K2-5) を発現するベクターを構築しおこなった。

#### 【結果】

作製したキメラタンパク質と特異抗体を用いて、海馬 P2 画分、PSD 画分と小脳 P2 画分、PSD 画分において、GluK2-5 の GluA2 に対する相対的割合を定量した。その結果、海馬 P2 画分では、GluK2, GluK3, GluK4, GluK5 はそれぞれ GluA2 に対して、 $9.2 \pm 0.77\%$ ,  $3.5 \pm 0.92\%$ ,  $0.77 \pm 0.30\%$ ,  $2.0 \pm 0.31\%$  (各  $n=3$ , 平均値  $\pm$  標準誤差)、海馬 PSD 画分では、 $7.0 \pm 0.55\%$ ,  $4.2 \pm 0.78\%$ ,  $0.47 \pm 0.09\%$ ,  $3.1 \pm 0.16\%$  ( $n=3$ ) であった。小脳 P2 画分では、 $22 \pm 2.14\%$ ,  $17 \pm 3.78\%$ ,  $1.9 \pm 0.44\%$ ,  $2.8 \pm 0.51\%$  ( $n=3$ )、小脳 PSD 画分は、 $9.9 \pm 2.4\%$ ,  $7.3 \pm 0.97\%$ ,  $1.1 \pm 0.14\%$ ,  $1.4 \pm 0.17\%$  ( $n=3$ )。これらの結果から、海馬と小脳において KAR は AMPAR よりも少ないことが示された。また最も発現量が多いのは GluK2 であった。

次に各脳領域間の KAR サブユニットのタンパク量を海馬 P2 画分の GluK2 を 1 として比較した。低親和性

サブユニットの GluK2 と特に GluK3 は、海馬 (GluK2 : GluK3 : GluK4 : GluK5 = 1.0 : 0.38 : 0.08 : 0.22) よりも小脳 (1.28 : 0.99 : 0.11 : 0.16) で割合として高い。海馬 PSD 画分の GluK5 の割合は小脳 PSD 画分よりも 3 倍高い。一方 GluK2, GluK3, GluK5 の割合は両領域で同じであった。海馬 PSD 画分で (3.57 : 2.13 : 0.24 : 1.57), 小脳 PSD 画分では (3.83 : 2.83 : 0.43 : 0.56) であった。この結果から、低親和性サブユニットの GluK2 と GluK3 が海馬と小脳で多く発現していること、また高親和性サブユニットの GluK4 と GluK5 の発現は特に小脳において低親和性サブユニットより極めて少ないことが明らかとなった。また P2 画分から PSD 画分へ KAR サブユニットはそれぞれ濃縮していたが、濃縮の程度は各サブユニットによって異なることがわかった。

#### 審査結果の要旨

中枢神経系における主要な興奮性神経伝達物質のグルタミン酸に対する受容体は複数のサブタイプに分類される。カイン酸型グルタミン酸受容体 (カイン酸受容体、以下 KAR) は、GluK1-5 のサブユニットにて形成される。

本研究では、これらのサブユニットの量をマウス脳において定量的に解析した。まず特異的抗体の作製を行い、続いて、AMPA 型グルタミン酸受容体サブユニット GluA2 を標準とした定量的なウエスタンブロット法を確立した。その結果、海馬と小脳において、KAR は AMPA 型受容体よりも少ない事が判明した。最も発現量が多いのは、GluK2 であった (海馬 PSD 画分  $7.0 \pm 0.55\%$ , 小脳 PSD 画分  $9.9 \pm 2.4\%$ : GluA2 を 100% とする)。次に、海馬と小脳の KAR サブユニットの量を比較したところ、高親和性の GluK5 の発現は、特に小脳において極めて少ない事が明らかとなった。すなわち、脳領域によって KAR サブユニットの割合が異なること、そして、サブユニットの組み合わせが異なることが示唆された。

本研究は、KAR サブユニットのタンパク量の定量化法を初めて確立したこと、小脳で高親和性 GluK5 が低い事を見いだしたことにより、今後の GluK2, GluK5 ノックアウトマウスの表現型解析のために極めて重要な知見となることから、学位論文としての価値を認める。