

博士論文の要旨及び審査結果の要旨

氏名 鈴木 康浩
学位 博士 (医学)
学位記番号 新大院博 (医) 第 669 号
学位授与の日付 平成 28 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 NMDA 型グルタミン酸受容体の定量的解析.

論文審査委員 主査 教授 竹林 浩秀
副査 教授 崎村 建司
副査 教授 笹岡 俊邦

博士論文の要旨

NMDA 型グルタミン酸受容体 (NMDAR) は、イオン透過型グルタミン酸受容体の一種であり、中枢神経系においてシナプス形成やシナプス可塑性など脳機能に直接関与する分子群である。NMDAR は、GluN1 と GluN2 が 2 分子ずつ会合して機能していると考えられている。GluN1 は、単一の遺伝子にコードされているが、選択的スプライシングにより C 末端側に C2 または C2' カセットを含む GluN1-1~N1-4 の 4 種類が存在しており、シナプスへの移行や安定性に関与することが報告されている。一方 GluN2 は、GluN2A, 2B, 2C, 2D の 4 種類のサブユニットが存在しており、この分子的な多様性がこの受容体の機能的な多様性の基盤となっている事が示されている。脳の各部位における NMDA 受容体の性質を分子レベルで解析するには、各サブユニットタンパク質の量を知る必要があるが、これまでその解析は、遺伝子発現解析が主であり、タンパク質の定量的な解析はされてこなかった。遺伝子発現解析では、GluN2 より GluN1 が多いことや、脳領域によって GluN2 の発現が異なることが示されてきている。またウエスタンブロットによって、各サブユニットの発現量の違いが報告されているが、これらの解析はいずれも同一分子の多寡であり、サブユニット間の量的な検討は、海馬の CA3 領域で GluN2B が N2A の約 2 倍多いことが報告されているだけである。本研究の目的は、脳の領域及びその細胞内での NMDAR サブユニットの分布を明らかにするために、これらのサブユニットタンパク量を定量することである。このために、AMPA 型グルタミン酸受容体 GluA1 サブユニットに対する抗体を基準として、6 種類の NMDAR サブユニット GluN に対する抗体の力価を算出し、ウエスタンブロットで検出されるバンド強度から、GluA1 タンパク質量に対する比率として各 GluN サブユニット量を算定した。測定する部位としては、大脳皮質、海馬、小脳を選び、それぞれのホモジネート画分、マイクロソーム画分、シナプトソーム画分における当該サブユニット量を定量した。

上記目的を達成するために、各抗 GluN 抗体と抗 GluA1 抗体の力価を比較できる両抗体が認識するエピトープを同一分子上にもつキメラタンパク質を作製した。キメラタンパク質は、GluA1 (1-907) の C 末端側を、GluN1-1 (834-938), GluN1-4 (834-885), GluN2A (838-1464), GluN2B (839-1482), GluN2C (836-1239), GluN2D (863-1323) に置換したものである。これらのキメラタンパク質を HEK293 細胞に発現させて標準タンパク質として測定に用いた。脳各部位より調整した 3 種類の細胞画分と標準タンパク質を同一ゲルで SDS 電気泳動を行い、タンパク質をニトロセルロース膜に転写させた後、GluA1 抗体と各 GluN 抗体を用いて目

的分子を検出し、そのバンド強度より当該分子の量を算定した。

脳の各部位における細胞画分を測定した結果、NMDAR の全体量は海馬で最も量が多く、大脳皮質、小脳の順であり、小脳の含有量はホモジネート画分で海馬の 21%であった。それぞれの部位で程度の差はあるが、いずれもシナプトソーム画分に NMDAR は濃縮していた。また、NMDAR は、GluN1 と GluN2 が等モルで会合し機能するが、シナプトソーム画分ではいずれの部位でも GluN1 と GluN2 の比はほぼ等量であった。一方、ホモジネート画分の大脳皮質 GluN1 と GluN2 の量比は、大脳皮質と海馬が 1.6 倍、小脳が 2.1 倍 GluN1 の量が多かった。このことは、シナプス画分ではチャンネル機能を持つ NMDAR が存在していると考えられるが、その合成や移送過程では、チャンネル活性を持たないサブユニット分子が存在することを意味する。また、小脳において 2 倍以上存在する GluN1 は、プルキンエ細胞に GluN2 が存在しないことを反映しているのかもしれない。GluN1 サブユニットでは、GluN1-C2' 型が C2 型よりも多く発現していることが明らかになった。NMDAR の機能的特性を決める GluN2 の分布は部位と細胞画分により大きな違いがある。大脳皮質ホモジネート画分では GluN2B が GluN2A の 1.5 倍多く、シナプス画分でも 1.6 倍ある。これに対して海馬ではホモジネート画分では 1.7 倍 GluN2B が多いが、シナプス画分では GluN2A と GluN2B はほぼ同量になっていた。同様のことは小脳でも認められ、ホモジネート画分では GluN2C は GluN2A の 2.0 倍存在するが、シナプトソーム画分では 1.1 倍になる。これらのことは、シナプスで機能する NMDAR の組成は、合成されてから移送される間に調節されることを示唆する。

本研究では、抗 GluA1 抗体と各抗 GluN 抗体のエピトープを同一分子上にもつ GluA1N キメラタンパク質を標準物質とすることで、力価の異なる抗体を用いても分子間の量的比較が可能となった。この手法の優れている点は、煩雑な試料の処理過程と高価な機器を必要とする質量分析法などと違い、簡便な手法で定量的な解析が可能になることである。したがって、この手法は他の膜局在分子などにも適用が可能であり、受容体機能などを量的な基盤に立って解析する有力な手法になると考えている。

審査結果の要旨

本論文は、NMDA 型グルタミン酸受容体 (NMDAR) を構成するサブユニットタンパク質量を定量したものである。哺乳類の NMDAR は、GluN1 と GluN2 が 2 分子ずつ会合して機能していると考えられており、選択的スプライシングにより C 末端側に C2 または C2' カセットを含む GluN1 と 4 種類の GluN2 (2A-D) から構成される。この分子的な多様性はこの受容体の機能的な多様性の基盤となっている事が示されているが、これまで各サブユニットタンパク質量を系統的に調べた研究は無かった。本研究では、マウス脳の領域及びその細胞内での各サブユニットの分布を明らかにするために、AMPA 型グルタミン酸受容体サブユニット GluA1 を標準物質とした定量的なウエスタンブロット法を開発し解析をおこなった。その結果、脳各組織の NMDAR サブユニット構成が明らかになり、これら分子の動態が脳部位や各細胞画分で明らかになってきた。また、本研究で開発した定量的ウエスタンブロット法は、煩雑な試料の処理過程と高価な機器を必要とせず、今後 NMDAR 機能を量的な基盤に立って解析する有力な手法になると考えられる。これらの点に本論文の博士論文としての価値を認める。