博 士 論 文 の 要 旨 及 び 審 査 結 果 の 要 旨

氏　　名	中本　千尋
学　　位	博士（医学）
学 位 記 番 号	新大院博（医）第734号
学位授与の日付	平成29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	マウス脳におけるデルタ型グルタミン酸受容体サブユニット構成の定量的解析.
論文審査委員	主査　教授　竹林　浩秀
	副査　教授　笹岡　俊邦
	副査　教授　﨑村　建司

博士論文の要旨

デルタ型グルタミン酸受容体サブユニット（GluD1，GluD2）は，アミノ酸の相同性からイオン透過型グルタミン酸受容体に分類されてきたが，GluD サブユニットにはグルタミン酸結合能がなく，イオンチャネルとして通常機能しない．それゆえ，その生理機能は長い間不明であったが，近年シナプス接着因子として脳内で働くことが報告されたユニークな分子群である．2 種のサブユニットは脳内において特徴的なパターンで発現しており，特に GluD2 は小脳プルキンエ細胞に強く発現し，平行線維シナプスの形成と維持に必須であることが示されている．ヒトのゲノム解析や変異マウスから得られた知見より，GluD サブユニットが脳の高次機能に関与している可能性が示唆されるが，小脳以外の脳部位での各サブユニットの機能的重要性は明らかとなっていない．接着因子としての機能とタンパク質存在量は密接な関連があると考えられるため，キメラタンパク質を用いた定量的なウェスタンブロット法を用いて，脳内における GluD1 と GluD2 の存在量比を測定した．

ウェスタンブロット法でタンパク質の量を比較するためには，抗体の抗体力価を考慮する必要がある．まず，AMPA 型グルタミン酸サブユニット GluA2 の C 末端側細胞内領域を GluD1 または GluD2 に置換したキメラタンパク質を標準物質として用い，抗 GluD1 抗体ならびに抗 GluD2 抗体の抗体力価を決定した．この抗体力価を補正に用い，脳試料中の GluD1 と GluD2 の存在量を GluA2 に対する比率で算出した．脳試料として大脳皮質，海馬，小脳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を用いた．その結果，大脳皮質，海馬の各画分における GluD サブユニット量は GluA2 の 10%以下程度であった．また，小脳の各画分の GluD1 は GluA2 の 7.6%-16.1%と大脳皮質や海馬と比べて大きく変わらないのに対し，GluD2 は GluA2 の 127%-255%と突出して多かった．GluD サブユニット間の発現比は，小脳では GluD2 は GluD1 の 10-22 倍と多いが，大脳皮質や海馬ではその差は 1-2 倍と小さかった．興味深いことに，大脳皮質や海馬では GluD2 が GluD1 に匹敵するレベルで発現していることが明らかとなった．また，既存の報告と比較すると，GluD サブユニットの発現量はカイニン酸受容体とも同程度の発現であった．高等哺乳動物の中枢神経系における興奮性シナプス伝達を担う主要な受容体である AMPA 型 GluA2 サブユニットの約 1 割，その伝達の調節因子として多様かつ重要な生理機能を有するカイニン酸型と同程度の量で GluD サブユニットが大脳皮質や海馬に発現していることは，これらサブユニットが有する分子機能を発揮するに十分な発現量

であることが推測される．次に，脳領域間の GluD サブユニットの存在比を決定した．大脳皮質の GluD1 を 1.0 としたときの GluD サブユニットの相対的な量比は，大脳皮質ではホモジネート画分，マイクロソーム画分，シナプトソーム画分，PSD 画分の GluD1 は 1.0，0.9，2.0，1.9 であり，GluD2 は 0.5，0.4，0.9，1.9 であった．海馬ではそれぞれの画分で GluD1 は 1.1，1.1，2.0，2.0 であり，GluD2 は 0.6，0.4，0.7，1.2 であった．小脳ではそれぞれの画分で GluD1 は 0.7，0.5，2.4，2.4 であり，GluD2 は 7.7，5.6，53.5，52.0 であった．GluA2 は各脳領域においてシナプトソームから PSD に濃縮しているのに対し，GluD1 はいずれの領域においても PSD への濃縮がみられなかった.GluD2 も GluA2 に比べるとシナプトソームから PSD への濃縮の程度が弱かった．このことは，GluD サブユニットがエキストラシナプスにも豊富に存在する可能性を示唆する．

大脳皮質や海馬で GluD1 と GluD2 が量的に十分に発現することから，次に，GluD サブユニットにヘテロメリックな構成をとりうるか調べた．HEK293 細胞を用いた強制発現系および大脳皮質海馬の膜画分でのサブユニット構成を調べた結果,その両方において,GluD1 と GluD2 が共沈した.大脳皮質や海馬において GluD1 と GluD2 を共発現する細胞の存在がシングルセル解析でも示されていることからも，両者が部分的にヘテロマーを形成し脳内で機能している可能性は十分考えられる．

GluD1 は脳に大脳皮質や海馬，線条体，扁桃体といった情動や記憶学習に関わる領域に発現しており，本解析結果からもカイニン酸受容体と同程度と豊富に発現していることが示唆された．また GluD1 遺伝子が統合失調症や自閉症などのリスクファクターといったヒトの報告や，その欠損マウスが社会性や認知機能の低下や情動異常を示すことなどが報告されている．一方，GluD2 はこれまで小脳に着目した研究が主だったが，本研究から明らかとなった大脳皮質や海馬における GluD2 の高い発現量は，GluD2 を欠損したヒトにおいて運動失調とともに認められる認知機能障害の原因が，小脳以外の GluD2 によるものであることを示唆する．高次脳機能に果たす GluD サブユニットの役割の詳細，ならびに GluD1 と GluD2 の組み合わせに機能的な差異があるかは今後の研究課題の一つといえるだろう．

審査結果の要旨

デルタ型グルタミン酸受容体サブユニット（GluD1，GluD2）は，イオン透過型グルタミン酸受容体に相同性をもつが，グルタミン酸結合能がなく，イオンチャネルとして機能しないと考えられている．近年、GluD1，GluD2 はシナプス接着因子として働くことが報告された．2 種のサブユニットは脳内で特徴的なパターンで発現し，特に GluD2 は小脳プルキンエ細胞に強発現する．ヒト遺伝病や変異マウスの解析より，GluD サブユニットが脳の高次機能に関与していることが示唆されるが，小脳以外の脳部位での各サブユニットの機能的重要性は明らかとなっていない．そこで，本研究では，まず、GluA2-GluD キメラタンパク質を用いた定量的なウェスタンブロット法を用いて，大脳皮質，海馬，小脳における GluD1 と GluD2 の存在量比を測定した．その結果、次のことを明らかにした。1）GluD2 の小脳発現は、GluA2 の 1.2 から 2.6 倍と突出して多いこと 2）小脳 GluD1 および，大脳皮質，海馬の GluD1，GluD2 の発現は GluA2 の約 1 割程度であること 3）大脳皮質や海馬でも GluD2 は GluD1 と同程度に発現していること 4）細胞画分を用いたウエスタンブロットにより GluD1，GluD2 ともにシナプトソームから PSD への濃縮の程度が弱いこと。さらに，免疫沈降法を用いて，GluD1 と GluD2 が共沈することを示した。

本研究は，GluD2 が大脳皮質や海馬にも発現して小脳以外でも役割を果たす可能性，GluD 1 と GluD2 がエクストラシナプスにも存在する可能性，GluD1 と GluD2 のヘテロな多量体化により機能的多様性を生み

出している可能性を実験的に示唆するものである。これらの点に本研究の学位論文としての価値を認めるものである。