NMDA型グルタミン酸受容体の定量的解析

鈴 木 康 浩
新潟大学大学院医歯学総合研究科
分子細胞医学専攻細胞神経生物学分野
(主任：崎村建司教授)

Quantitative Analysis of NMDA Receptor Channel Subunits in Mouse Brain

Yasuhiro SUZUKI

Niigata University Graduate School of Medical and Dental Science
Course for Molecular and Cellular Medicine
Cellular Neurobiology
(Director: Prof. Kenji SAKIMURA)

要　旨

NMDA型グルタミン酸受容体（NMDAR）は，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関わる分子群である．NMDARは，単一遺伝子にコードされスプライスにより多様性を持つGluN1サブユニットと，4種類のGluN2サブユニットが2分子ずつ会合して構成されており，それらの組み合わせがチャネル特性を決定する．しかし，脳におけるGluNサブユニットタンパク質の定量的な解析はなく，その構成比率は明らかにされていない．そこで脳各部位におけるNMDARサブユニットを定量するために，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ウエスタンブロットを行った．その結果，大脳皮質，海馬，小脳いずれにおいてもGluN1がGluN2より多く存在していたが，NMDARが機能していると考えられているシナプトソーム画分では，ほぼ等量の割合になっていた．また，GluN1のC末端の形状は，C2'型がC2型よりも多かった，これは小脳でとりわけ顕著で，約10倍多いと算定された．

キーワード：NMDA受容体，ウエスタンブロット，タンパク質定量

はじめに

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，シナプス可塑性などの鍵になる分子群である[1)2)]．NMDARは，グリシン結合部位をもつGluN1とグルタミン酸結合部位をもつ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[1)3)]．このうち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

Reprint requests to: Yasuhiro SUZUKI
Department of Cellular Neurobiology
Brain Research Institute, Niigata University
1-757 Asahimachi-dori, Chuo-ku,
Niigata 951-8585, Japan.

別刷請求先：〒951-8585　新潟市中央区旭町通1-757
新潟大学脳研究所細胞神経生物学分野　　鈴木康浩

在しており，シナプスへのターゲティングや安定性に関与することが報告されている[4)-6)]．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[1)7)-11)]．したがって，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．これまでに各分子に対する抗体を用いた免疫組織化学解析により，GluN1が脳の広い範囲に発現している一方で，4種類のGluN2は発生段階や脳領域によって分布が変化することが示されてきたが[11)]，その量的な関係は明らかではなかった．mRNAレベルの定量的な解析としては，nuclease protection assayによる報告があり，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いる[12)]．さらに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倍多いことを報告しているのみであった[13)]．

タンパク質の同定や定量法には，質量分析法[14)]やウエスタンブロットなどの方法があるが，前者に比べ後者は実験方法が簡便であり，脳部位や細胞画分などの異なった試料間の同一分子解析には適した方法である．一方この手法は，使用する抗体の反応性（抗体力価）が異なるために分子間の量的な比較をすることができない．この問題点を克服するため，同一分子に標準タンパク質と比較する他のグルタミン酸受容体サブユニットを持つキメラ分子を作製し，抗体力価を補正することによりカイニン酸型サブユニットの定量をした報告がある[15)16)]．本研究では，NMDAR構成サブユニットの量を脳部位と各細胞画分において調べるために，AMPA型グルタミン酸受容体サブユニットGluA1[17)18)]を標準物質として，各NMDARサブユニット抗体の力価を測定し，ウエスタンブロット法を用いて定量を行うことにした．

材料と方法

キメラタンパク質

各抗GluN抗体力価を抗GluA1抗体力価と比較して算定するために，GluA1抗体とGluN抗体両者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コードするcDNAをpEF-BOSベクター[19)]に連結し，LipofectamineとPlus Reagent（Invitrogen）を用いてHEK293細胞に導入した．20-24時間後，細胞を溶解液（1 mM phenylmethylsulfonylfluoride，cOmplete Tablets mini（Roche, Germany）in 10ml PBS）により回収し，超音波破砕機で処理した．これを12,000×g，30分，4℃で遠心して得た沈殿を溶解液に1％Triton X-100を加えたもので懸濁しさらに超音波破砕機で処理した．この懸濁液を30分間，2℃ローテーターで撹拌させた後，12,000×gで10分間遠心した上清を標準キメラタンパク質試料とした．なおタンパク質濃度は，BCA protein assay kit（Thermo Scientific）で測定した．

脳組織の細胞分画

細胞分画は，Carlinら[20)]の方法に準拠して行った．8～12週齢のC57BL/6N系統マウス（Charles River, Japan）の大脳皮質，海馬，小脳を摘出し，ホモジネートバッファー（0.32Mショ糖，5mM EDTA，Tris-HCl pH7.5，cOmlplete Tablets mini）でポッター型ホモゲナイザーを用いてホモジナイズした後，1,000×g，10分間遠心した上清（S1）を細胞粗画分とした（以降ホモジネート画分と呼ぶ）．ホモジネート画分の一部を12,000×g，2℃で10分間遠心分離し上清（S2）と沈殿（P2）に分離する．マイクロソーム画分は，S2を2℃，200,000×gで90分間遠心して得た沈殿を40mM Tris-Cl，1％SDSに溶解し使用した．シナプトソーム画分は，P2画分をホモジネートバッ

ファーに懸濁した後，0.8Mと1.2Mショ糖を用いた密度勾配遠心を74,000×gで130分行うことで得た．調製した試料は，タンパク定量した後，－80℃で保管した．

ウエスタンブロット

調製した試料に最終濃度1xSample Buffer（63 mM Tris-Cl，2％SDS，10％グリセロール，1％メルカプトエタノール）になるように加え加熱した（キメラタンパク質：37℃，60 min，脳サンプル：100℃，5 min）．SDS-PAGEは，4％濃縮ゲルと7～7.5％分離ゲルで行い，分離したタンパク質をニトロセルロース膜（GEヘルスケア・ジャパン）に電気的に転写した．この膜を5％スキムミルクを含むTBS-T（20mM Tris-Cl pH7.6, 137mM NaCl，0.1％Tween20）で1時間ブロッキングし，その後TBS-Tで15分×1回，5分×2回洗浄した．1次抗体反応（条件は後述）を室温で2時間または4℃で一晩反応させた後，メンブレンをTBS-Tで15分×1回，5分×2回洗浄し，ペルオキシダーゼコンジュゲート2次抗体に1時間室温で反応させた．TBS-Tで15分×1回，5分×3回洗浄した後，ECL-Primeウエスタンブロッティング検出システム（GE Healthcare）を用いて発光させ，冷却CCDカメラ内蔵化学発光イメージアナライザー（EZ Capture MG，ATTO）で検出した．

抗体

ウエスタンブロットには，以下の抗体を使用した．1次抗体；マウス抗GluA1抗体（0.5μg/ml）(Millipore)，ウサギ抗GluN1-C2抗体（0.5μg/ml），モルモット抗GluN1-C2'抗体（0.2μg/ml），ウサギ抗GluN2A抗体（0.2μg/ml），ウサギ抗GluN2B抗体（0.2μg/ml），ウサギ抗GluN2C抗体（1.0μg/ml）(以上北海道大学渡辺雅彦教授よ

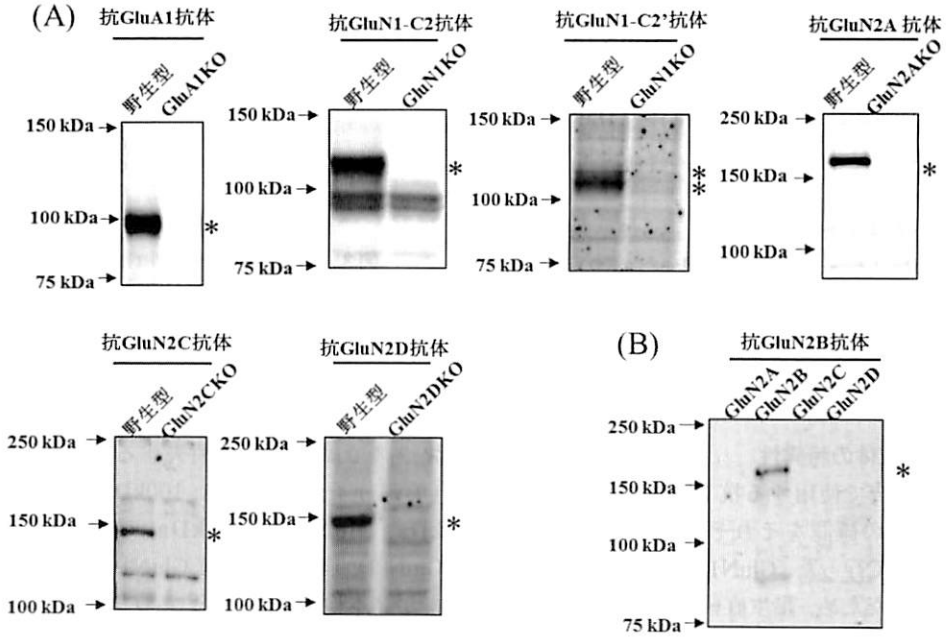


図1　抗体特異性の確認

(A) 野生型と各ノックアウトマウスの脳試料を用いた，抗GluA1，GluN1-C2，GluN1-C2'，GluN2A，GluN2C，GluN2D抗体のウエスタンブロット．

(B) HEK293細胞に発現させたGluA1N2A～Dタンパク質を用いた，抗GluN2B抗体のウエスタンブロット．

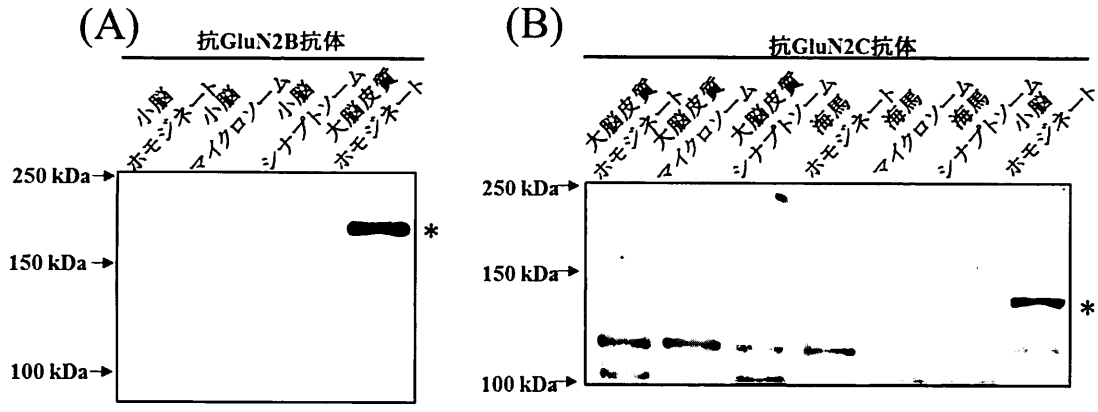


図2　脳部位におけるGluN2BとGluN2Cの発現確認
(A) 小脳のホモジネート，マイクロソーム，シナプトソーム画分における抗GluN2B抗体によるウエスタンブロット．
(B) 大脳皮質及び海馬画分における抗GluN2C抗体によるウエスタンブロット．

り分与），マウス抗GluN2D抗体（0.5 μg/ml）(Millipore)．2次抗体；HRP抗マウス抗体（GE healthcare）（× 10,000希釈），HRP抗ウサギ抗体（Amersham）（GluN1 - C2抗体，GluN2A抗体，GluN2B抗体：× 10,000希釈，GluN2C抗体：× 4,000希釈），HRPモルモット抗体（Dako）（× 8,000希釈）．

ウエスタンブロットの定量解析

ウエスタンブロットで得られたバンドのシグナルは，Image J softwareを用いて測定した．

結　　果

抗NMDAR抗体の特異性

まず，本研究で使用する抗GluA1と各抗GluN抗体の特異性の確認をそれぞれのノックアウト（KO）を用いて行った．GluN1KOマウスは，新生児致死であったため，出生直後のマウスを用いた[21]．GluN2Dはタンパク質発現の時期を考慮し生後7日前後のマウスを用いた．抗GluN2B抗体の特異性はHEK293細胞に発現させたGluN2キメラタンパク質を用いて行った．抗GluA1，GluN1 - C2，GluN1 - C2'，GluN2A，GluN2C，GluN2D抗体では，予測分子量位置にバンドが認められ，KOマウスではバンドが消失することが確認された（予測分子量：GluA1; 100kDa, GluN1 - C2; 103 kDa, GluN2A; 163 kDa, GluN2C; 134 kDa, GluN2D; 140 kDa）．抗GluN1 - C2'抗体は，バンドが2本検出されたが，ノックアウトマウスではこれらのバンドが消失したので，両バンドを定量の対象とした（図1A）．また，抗GluN2B抗体はGluA1N2Bタンパク質を特異的に検出した（図1B）．なお，小脳におけるGluN2Bと，大脳皮質と海馬におけるGluN2Cは，8～12週齢マウスにおいて

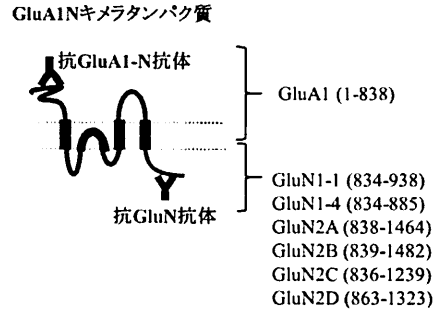


図3　キメラタンパク質GluA1Nの模式図
GluA1を骨格とし，C末端側をGluNに置換したキメラタンパク質を設計した．

検出限界以下であったので定量は断念した（図2A, B）.

抗NMDA型受容体の抗体力価の測定

各サブユニットタンパク質の定量をウエスタンブロット法で行うために，GluA1のC末端をGluNのC末端に置換した6種類のGluA1Nキメラタンパク質（GluA1N1-C2, GluA1N1-C2', GluA1N2A-D）を設計し，これらをコードする発現ベクターを構築した（図3）．このベクターをHEK293細胞に導入して発現させキメラタンパク質を標準タンパク質とした．これらのキメラタンパク質は，抗GluA1抗体と各抗GluN抗体が認識するエピトープを同一分子上にもつので，抗GluA1-N末端抗体力価と各抗GluN-C末端抗体の力価がウエスタンブロットのバンドの濃度とし

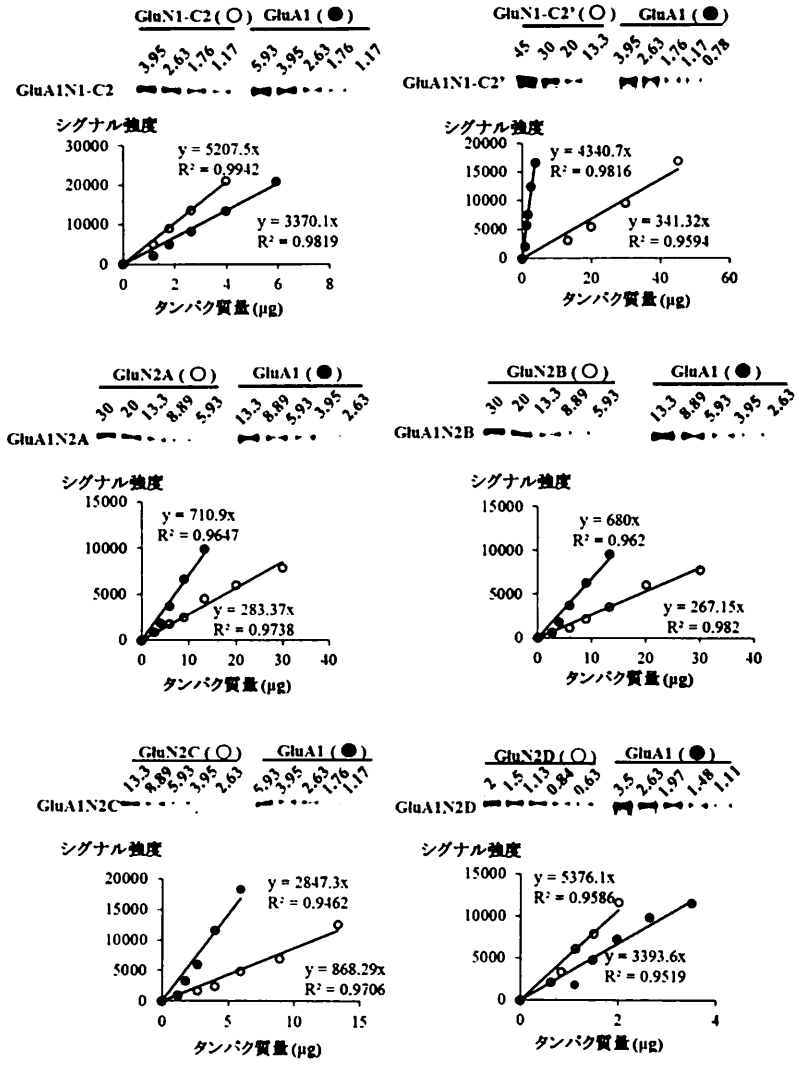


図4　抗GluA1抗体を基準にした各抗GluN抗体の力価測定
GluA1とGluN1-C2, GluN1-C2', GluN2A, GluN2B, GluN2C, GluN2Dのキメラタンパク質の量を変えたウエスタンブロットのシグナル値から各抗GluNサブユニット抗体の力価を算定した．

て比較することが可能になる．これらのキメラタンパク質 GluA1N を用いて，各抗 GluN 抗体の力価を測定した（図4）．

定量的ウエスタンブロット法

図5に GluA1N1-C2 キメラタンパク質を用いて，抗 GluA1 抗体と抗 GluN1-C2 抗体の力価比を求め，脳試料における GluA1 と GluN1-C2 の定量をした例を示す．GluA1N1-C2 キメラタンパク質及び脳試料（大脳皮質マイクロソーム画分）を同一ゲルで泳動し，それぞれ抗 GluA1 抗体と抗 GluN1-C2 抗体により検出した（図5A）．GluA1N1-

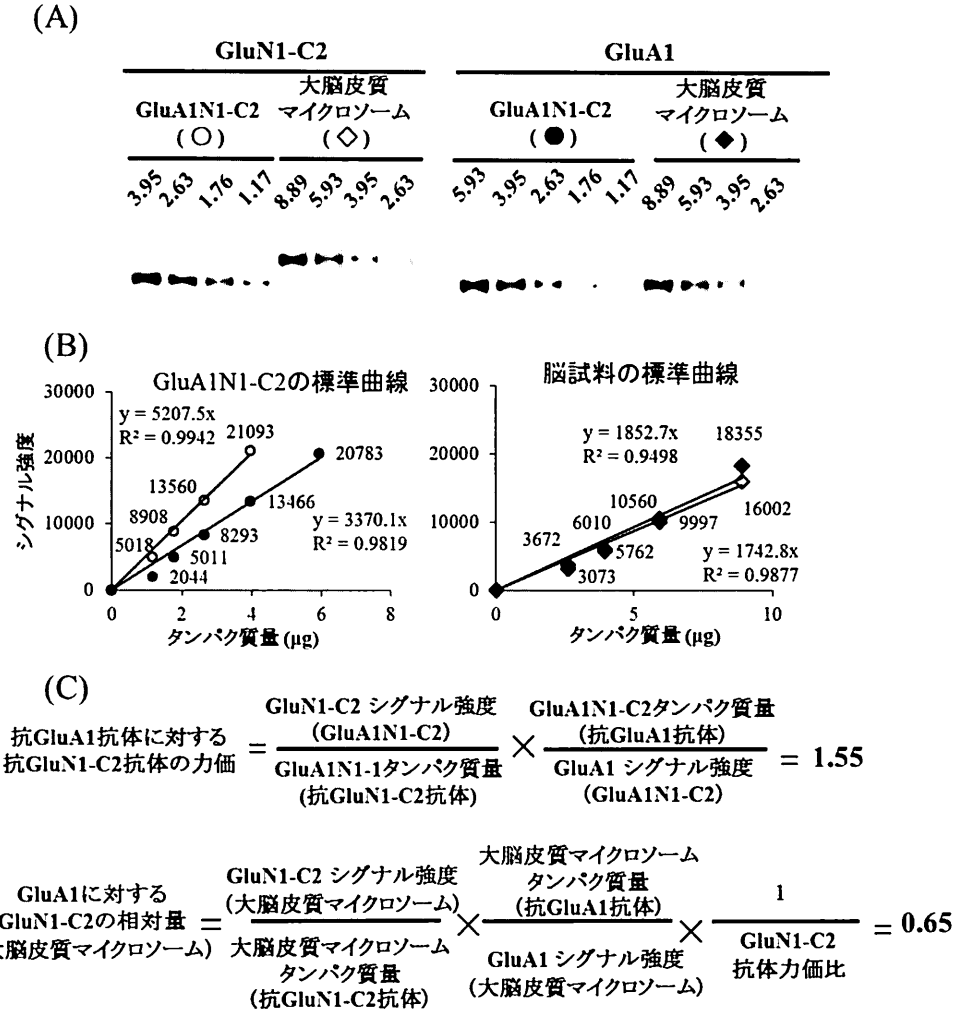


図5　定量的ウエスタンブロット法によるタンパク質定量

(A) GluA1N1-C2 と大脳皮質マイクロソーム画分を，同一のゲルで SDS-PAGE した後，抗 GluN1-C2 抗体と抗 GluA1 抗体でウエスタンブロットを行い，バンドを検出した．

(B) GluA1N1-C2 シグナルから抗体力価を調べた（○ GluN1-C2, ● GluA1）．大脳皮質マイクロソーム画分における，GluN1-C2 と GluA1 のバンドのシグナル標準曲線（◇ GluN1-C2, ◆ GluA1）．

(C) 各バンドの計測に用いる，抗体力価と GluN1-C2 量を算定する計算式．

C2キメラタンパク質の，GluA1のバンドのシグナル値4点（20783，13466，8293，5011）とGluN1-C2のバンドのシグナル値4点（21093，13560，8908，5018）から標準曲線を描いた（図5B左）．これらのシグナル値とタンパク質量の比から，抗GluN1-C2抗体力価は抗GluA1抗体の1.55倍とわかった（図5C上段式）．続いて脳試料において，GluA1のバンドのシグナル値3点（18355，9997，5762）とGluN1-C2のシグナル値3点（16002，10560，6010）から標準曲線を描いた（図5B右）．脳試料のGluA1とGluN1-C2のシグナル値とタンパク質量の比を，上で求めた力価比で補正すると，GluN1-C2はGluA1の0.65倍と算定された（図5C下段式）．

このように，脳試料のウエスタンブロットのバンドシグナル強度率を抗体力価比で補正することで，各脳部位と細胞画分における各GluNサブユニットの定量を行った．抗GluA1抗体と各抗GluN抗体によって検出されたシグナル値の極端な差は定量誤差を大きくするため，各バンドのシグナル値が近い範囲においてのみ，定量を行った．またウエスタンブロットで検出されるバンドのシグナルは，同一試料でも反応ごとに異なるため，GluA1Nキメラタンパク質と解析試料を同一のゲルに電気泳動し，それぞれを抗GluA1抗体と各抗GluN抗体で検出した．上記の方法で求めた，抗GluA1抗体に対する抗GluN1-C2'，GluN2A，GluN2B，GluN2C，GluN2D抗体の各力価は，それぞれ0.07，0.57，0.43，0.35，1.48であった（図4）．

GluNサブユニットの定量

GluNサブユニットの各脳領域と細胞内における分布を解析するために，大脳皮質，海馬，小脳を細胞分画し，ホモジネート，マイクロソーム，

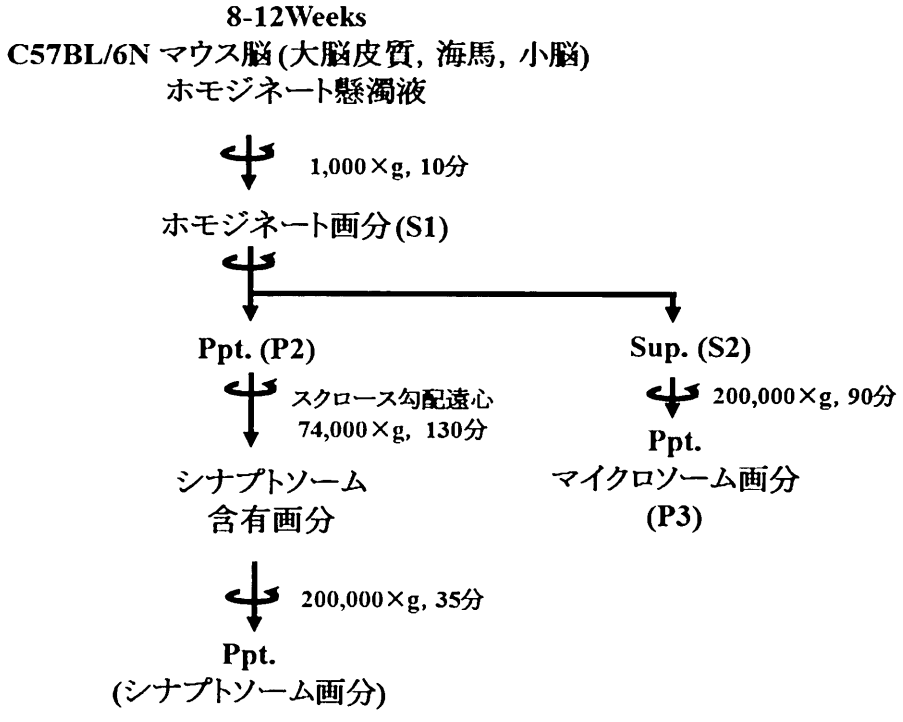
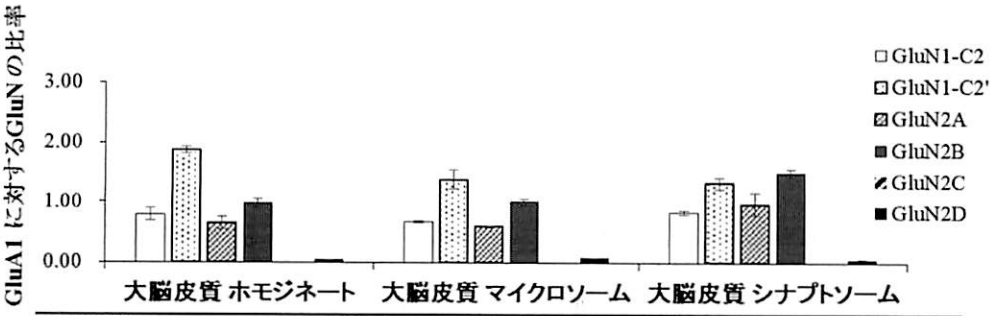
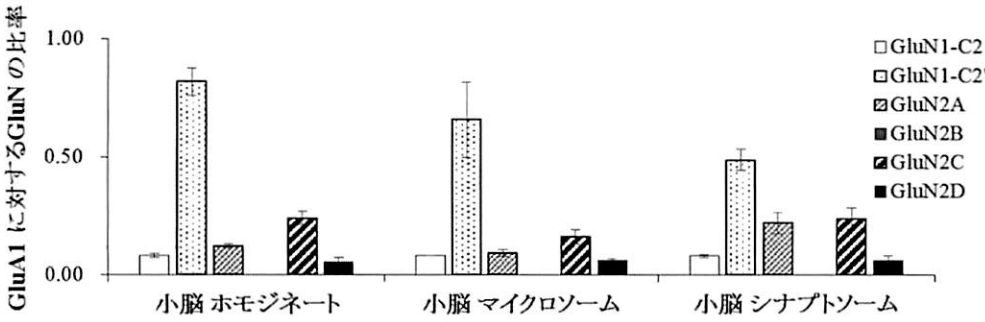


図6　脳試料の作製過程の模式図
マウスの大脳皮質，海馬，小脳を，細胞分画法を用いて分画し，ホモジネート画分，マイクロソーム画分，シナプトソーム画分を得た．



大脳皮質	GluN1-C2	GluN1-C2'	GluN2A	GluN2B	GluN2C	GluN2D
ホモジネート	0.79±0.11	1.88±0.06	0.65±0.10	0.98±0.07	ND	0.04±0.01
マイクロソーム	0.67±0.02	1.39±0.16	0.59±0.02	1.00±0.05	ND	0.07±0.01
シナプトソーム	0.83±0.04	1.33±0.10	0.97±0.19	1.51±0.07	ND	0.05±0.01

海馬	GluN1-C2	GluN1-C2'	GluN2A	GluN2B	GluN2C	GluN2D
ホモジネート	0.32±0.04	1.22±0.11	0.34±0.03	0.57±0.12	ND	0.03±0.00
マイクロソーム	0.30±0.04	0.99±0.13	0.46±0.08	0.50±0.05	ND	0.03±0.01
シナプトソーム	0.46±0.02	0.86±0.08	0.65±0.05	0.65±0.02	ND	0.04±0.01

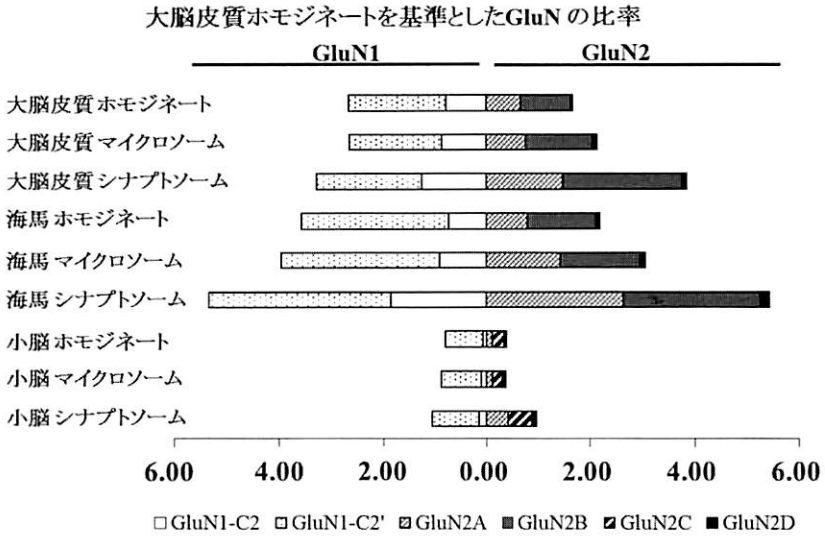


小脳	GluN1-C2	GluN1-C2'	GluN2A	GluN2B	GluN2C	GluN2D
ホモジネート	0.08±0.01	0.82±0.06	0.12±0.01	ND	0.24±0.03	0.05±0.02
マイクロソーム	0.08±0.00	0.66±0.16	0.09±0.01	ND	0.16±0.03	0.06±0.01
シナプトソーム	0.08±0.01	0.49±0.05	0.22±0.05	ND	0.24±0.04	0.06±0.02

図7　各脳領域の各細胞画分における GluA1 を基準にした各 GluN の量比
（A）大脳皮質ホモジネート，マイクロソーム，シナプトソーム画分
（B）海馬ホモジネート，マイクロソーム，シナプトソーム画分
（C）小脳ホモジネート，マイクロソーム，シナプトソーム画分

シナプトソーム画分に含まれるGluNサブユニットを算定した（**図6**）.

大脳皮質におけるGluA1に対する各GluNの比率を算定した（**図7**）．ホモジネート画分でのGluN1-C2，GluN1-C2'，GluN2A，GluN2B，GluN2C，GluN2Dは，それぞれGluA1に対して，0.79±0.11，1.88±0.06，0.65±0.1，0.98±0.07，ND，0.04±0.01であった（各n＝3，平均値±標準誤差）．マイクロソーム画分では，0.67±0.02，1.39±0.16，0.59±0.02，1.0±0.05，ND，0.07±0.01であった（n＝3）．シナプトソーム画分では，0.83±0.04，1.33±0.1，0.97±0.19，1.51±0.07，ND，0.05±0.01であった（**図7上段**）．海馬ホモジネート画分においては，0.32±0.04，1.22±0.11，0.34±0.03，0.57±0.12，ND，0.03±0.004であり（n＝3），マイクロソーム画分では0.3±0.04，0.99±0.13，0.46±0.08，0.5±0.05，ND，0.03±0.01であった（n＝3）．シナプトソーム画分では0.46±0.02，0.86±0.08，0.65±0.05，0.56±0.02，ND，0.04±0.01であった（**図7中段**）．小脳ホモジネート画分においては，0.08±0.01，0.82±0.06，0.12±0.01，ND，0.24±0.03，0.05±0.02であった（n＝3）．マイクロソーム画分においては，0.08±0.001，0.66±0.16，0.09±0.01，ND，0.16±0.03，0.06±0.01であった．シナプトソーム画分では0.08±0.01，0.49±0.05，0.22±0.05，ND，0.24±0.04，0.06±0.02であった（**図7下段**）．



	GluN1-C2	GluN1-C2'	GluN2A	GluN2B	GluN2C	GluN2D
大脳皮質ホモジネート	0.79	1.88	0.65	0.98	ND	0.04
大脳皮質マイクロソーム	0.86	1.79	0.76	1.29	ND	0.09
大脳皮質シナプトソーム	1.26	2.02	1.47	2.30	ND	0.08
海馬ホモジネート	0.74	2.83	0.79	1.32	ND	0.07
海馬マイクロソーム	0.92	3.05	1.42	1.54	ND	0.09
海馬シナプトソーム	1.86	3.48	2.63	2.63	ND	0.16
小脳ホモジネート	0.07	0.74	0.11	ND	0.22	0.05
小脳マイクロソーム	0.10	0.79	0.11	ND	0.19	0.07
小脳シナプトソーム	0.15	0.92	0.41	ND	0.45	0.11

図8　大脳皮質ホモジネートのGluA1を基準とした各GluNの比率
各画分中のGluA1量を，大脳皮質ホモジネート量を基準に算定し，その値で各分画のNMDARサブユニット量を算出した．

脳領域間細胞画分におけるGluNの比較

各脳領域の細胞画分におけるNMDARサブユニット量を調べるため，大脳皮質ホモジネートに含まれるGluA1を基準とし，各脳領域の細胞画分におけるGluNの比率を比較した．まず，同一のメンブレンに大脳皮質，海馬，小脳のホモジネート，マイクロソーム，シナプトソーム画分試料をのせて抗GluA1抗体によってウエスタンブロットを行い，検出したバンド強度から各画分のGluA1量を算定した．大脳皮質ホモジネートに含有されるGluA1量を基準（1.00）とすると，大脳皮質，マイクロソーム，大脳皮質シナプトソーム，海馬ホモジネート，海馬マイクロソーム，海馬シナプトソーム，小脳ホモジネート，小脳マイクロソーム，小脳シナプトソームにおけるGluA1の量はそれぞれ，1.29，1.52，2.32，3.08，4.05，0.90，1.19，1.88であった．次に，これらの比率を各脳領域の細胞画分に当てはめ，GluNサブユニットの相対的な量比を算出した（図8）．

大脳皮質のホモジネート画分における，GluN1-C2，GluN1-C2'，GluN2A，GluN2B，GluN2C，GluN2Dは，0.79，1.88，0.65，0.98，ND，0.04であった（各n＝3平均値）．マイクロソーム画分では，0.86，1.79，0.76，1.29，ND，0.09であり，シナプトソームでは，1.26，2.02，1.47，2.30，ND，0.08であった．また，海馬ホモジネート画分では，0.74，2.83，0.79，1.32，ND，0.07であり，マイクロソーム画分では，0.92，3.05，1.42，1.54，ND，0.09であり．シナプトソーム画分では1.86，3.48，2.63，2.63，ND，0.16であった．そして，小脳ホモジネート画分では，0.07，0.74，0.11，ND，0.22，0.05であった．また，マイクロソーム画分において算定したところ，0.10，0.79，0.11，ND，0.19，0.07であり，シナプトソーム画分では0.15，0.92，0.41，ND，0.45，0.11であった．算定結果より，細胞画分間で比較したときの海馬のGluNは大脳皮質よりも多いことが示された．また，小脳での比率は，大脳皮質や海馬に比べて少ないことも示された．

考　　察

本研究では，GluNサブユニットの量をウエスタンブロットによるバンドのシグナル値を比較することで算定した．そのために抗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．

mRNAの発現量と今回の研究で明らかとなったタンパク質量を比較すると，前者で想定されていた各サブユニット多寡はおおよそタンパク量と一致する．しかし，海馬においてnuclease protection assayによるmRNA定量では，GluN2AがGluN2Bよりも多いと報告されているが[12]，タンパク質量では逆である．したがって，mRNA量とタンパク質量の関係は部位によって異なっており，それは翻訳後の調節機構に依存すると推察される．

本定量の結果，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は濃縮している事がわかった．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の量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の量が多い．また，マイクロソーム画分では，大脳皮質，海馬，小脳各部位でGluN1とGluN2の量比はそれぞれ1.2倍，1.3倍，2.4倍となっており，合成過程とサブユニット分子移送過程でもGluN1は過剰に存在していた．このことは，細胞内には非会合型のGluN1が過剰に存在しており，それがどのように調節されているのかは興味ある問題である．なお，小脳においては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[10)22)23)].

サブユニットの分布特性からみると，いずれの部位においてもホモジネート画分のGluN1-C2'はGluN1-C2より多く，ホモジネート画分で大脳皮質2.4倍，海馬3.8倍，小脳10.6倍であった．GluN1は，選択的スプライシングにより，C末端側はC2またはC2'をもつ4種類のサブタイプが存在しているが，in vitroにおけるGluN1の細胞表面への発現は，C2'型がC2型より有利であることが報告されている[5)]．しかし，ホモジネート画分でC2'型がC2型より相当高いのに対して，シナプトソーム画分では，それぞれ1.6倍，1.9倍，6.1倍に減少することから，C末端側の選択制は単純に膜への移行性だけで決まっているのではないと思われる．

一方，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はほぼ同量なっていた．同様のこ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．

結　語

AMPA型受容体サブユニットGluA1を標準物質として，定量的ウエスタンブロット法により6種類のNMDARサブユニット量を算出した．その結果，大脳皮質，海馬，小脳における当該サブユニットの構成が明らかになった．また，本方法が，膜結合性受容体などシナプス機能分子の定量的な解析に有用である事が示された．

謝　辞

本研究を進めるにあたり，様々なご指導をいただいた新潟大学脳研究所細胞神経生物学分野の崎村建司教授をはじめ，実験に用いた抗体を分与してくださった北海道大学の渡辺雅彦教授，研究にご協力いただいた当研究室の皆様に深謝いたします．

文　献

1）Paoletti P: Molecular basis of NMDA receptor functional diversity. Eur J Neurosci. 33: 1351-1365, 2011.

2）Unoki T, Matsuda S, Kakegawa W, Van NT, Kohda K, Suzuki A, Funakoshi Y, Hasegawa H, Yuzaki M and Kanaho Y: NMDA receptor-mediated PIP5K activation to produce PI (4, 5) P_2 is essential for AMPA receptor endocytosis during LTD. Neuron 73: 135-148, 2012.

3）Yamazaki M, Mori H, Araki K, Mori KJ and Mishina M: Cloning, expression and modulation of a mouse NMDA receptor subunit. FEBS Lett. 300: 39-45, 1992.

4）Hollmann M, Boulter J, Maron C, Beasley L, Sullivan J, Pecht G and Heinemann S: Zinc potentiates agonist-induced currents at certain splice variants of the NMDA receptor. Neuron 10: 943-954, 1993.

5）Okabe S, Miwa A and Okado H: Alternative splicing of the C-terminal domain regulates cell surface expression of the NMDA receptor NR1 subunit. J Neurosci. 19: 7781-7792, 1999.

6）Mu Y, Otsuka T, Horton AC, Scott DB and Ehlers MD: Activity-dependent mRNA splicing controls ER export and synaptic delivery of NMDA receptors. Neuron 40: 581-594, 2003.

7）Mori H, Masaki H, Yamakura T and Mishina M: Identification by mutagenesis of a Mg^{2+}-block site of the NMDA receptor channel. Nature 358: 673-675, 1992.

8）Watanabe M, Inoue Y, Sakimura K and Mishina M: Developmental changes in distribution of NMDA receptor channel subunit mRNAs. Neuroreport 3: 1338-1340, 1992.

9）Wagner DA and Leonard JP: Effect of protein kinase - C activation on the Mg^{2+} - sensitivity of cloned NMDA receptors. Neuropharmacology 35: 29 - 36, 1996.

10) Abe M, Fukaya M, Yagi T, Mishina M, Watanabe M and Sakimura K: NMDA receptor GluRε/NR2 subunits are essential for postsynaptic localization and protein stability of GluRζ1/NR1 subunit. J Neurosci. 24: 7292 - 7304, 2004.

11) Yamasaki M, Okada R, Takasaki C, Toki S, Fukaya M, Natsume R, Sakimura K, Mishina M, Shirakawa T and Watanabe M: Opposing role of NMDA receptor GluN2B and GluN2D in somatosensory development and maturation. J Neurosci. 34: 11534 - 11548, 2014.

12) Goebel DJ and Poosch MS: NMDA receptor subunit gene expression in the rat brain: a quantitative analysis of endogenous mRNA levels of $NR1_{Com}$, NR2A, NR2B, NR2C, NR2D and NR3A. Brain Res Mol Brain Res. 69: 164 - 170, 1999.

13) Akashi K, Kakizaki T, Kamiya H, Fukaya M, Yamasaki M, Abe M, Natsume R, Watanabe M and Sakimura K: NMDA receptor GluN2B（GluRε2/NR2B）subunit is crucial for channel function, postsynaptic macromolecular organization, and actin cytoskeleton at hippocampal CA3 synapses. J Neurosci. 29: 10869 - 10882, 2009.

14) Cheng D, Hoogenraad CC, Rush J, Ramm E, Schlager MA, Duong DM, Xu P, Wijayawardana SR, Hanfelt J, Nakagawa T, Sheng M and Peng J: Relative and absolute quantification of postsynaptic density proteome isolated from rat forebrain and cerebellum. Mol Cell Proteomics 5: 1158 - 1170, 2006.

15) 畦地裕統：脳内AMPA型グルタミン酸受容体サブユニット分布と定量的解析．新潟医学会誌 125: 532 - 546, 2011.

16) Watanabe - Iida I, Konno K, Akashi K, Abe M, Natsume R, Watanabe M and Sakimura K: Determination of kainate receptor subunit ratios in mouse brain using novel chimeric protein standards. J Neurochem 136: 295 - 305, 2016.

17) Huganir RL and Nicoll RA: AMPARs and synaptic plasticity: the last 25 years. Neuron 80: 704 - 717, 2013.

18) Shibata T, Watanabe M, Ichikawa R, Inoue Y and Koyanagi T: Different expressions of alpha - amino3 - hydroxy - 5 - methyl - 4 - isoxazole propionic acid and N - methyl - D - aspartate receptor subunit mRNAs between visceromotor and somatomotor neurons of the rat lumbosacral spinal cord. J Comp Neurol. 404: 172 - 182, 1999.

19) Mizushima S and Nagata S: pEF - BOS, a powerful mammalian expression vector. Nucleic Acids Res. 18: 5322, 1990.

20) Carlin RK, Grab DJ, Cohen RS 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 - 845, 1980.

21) Forrest D, Yuzaki M, Soares HD, Ng L, Luk DC, Sheng M, Stewart CL, Morgan JI, Connor JA and Curran T: Targeted disruption of NMDA receptor 1 gene abolishes NMDA response and results in neonatal death. Neuron 13: 325 - 338, 1994.

22) Yamada K, Fukaya M, Shimizu H, Sakimura K and Watanabe M: NMDA receptor subunits GluRε1, GluRε3 and GluRζ1 are enriched at the mossy fibre - granule cell synapse in the adult mouse cerebellum. Eur J Neurosci. 13: 2025 - 2036, 2001.

23) Huh KH and Wenthold RJ: Turnover analysis of glutamate receptors identifies a rapidly degraded pool of the N - methyl - D - aspartate receptor subunit, NR1, in cultured cerebellar granule cells. J Biol Chem. 274: 151 - 157, 1999.

（平成28年1月20日受付）