

論文の内容の要旨

論文題目 NMDA 受容体による発生初期における AMPA 受容体のシナプス移行の制御に関する研究

指導教員 真鍋俊也 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 18 年 4 月 入学

医学博士課程

脳神経医学専攻

濱田 駿

NMDA 受容体 (NMDAR) は中枢神経系の主要な神経伝達物質であるグルタミン酸の受容体であり、シナプス可塑性、記憶・学習、神経回路形成、精神疾患など、中枢神経系の機能に深く関わっていることが知られている。NMDAR はその構成されるサブユニットの組み合わせによってイオンチャネルとしての性質や活性化されるシグナル伝達経路が異なり、NMDAR の機能の多様性がもたらされている。主要な NMDAR のサブユニットは2つの GluN1 (GluR ζ 1、NR1) サブユニットと2つの GluN2 (GluR ϵ 、NR2)

サブユニットから構成されており、GluN2 サブユニットには発現時期や領域、さらにイオンチャンネルの性質が大きく異なる4つのサブユニット GluN2A, 2B, 2C, 2D が存在する。

GluN2C や GluN2D は発現時期や領域が限定的であるため、GluN2A と GluN2B が主要な GluN2 サブユニットとして機能している。GluN2B は発生初期では脳のほとんどの領域で発現しているが、成長に伴って発現領域が前脳に限定される。一方 GluN2A は出生直後では発現がほとんど見られないが、次第に発現量が増加していき、脳内のほとんどの領域で発現するようになる。また、シナプス上においても、初めは GluN2B 含有型の NMDAR しか存在しないが、GluN2A の発現が増加するにつれて GluN2A 含有型 NMDAR に置き換わっていくと考えられている。このサブユニットごとの局在領域の違いには結合分子の違いが深く関わっている。GluN2B には PSD (postsynaptic density) 足場タンパク質である SAP102 が、GluN2A には PSD-95 が強く結合することが生化学的解析によって明らかになっている。また、SAP102 は出生時にはすでに発現しているのに対し、PSD-95 は GluN2A の発現の増加する時期とほぼ同時期に発現量が増加していくことが知られている。こういった局在部位の違いや結合分子の違いが GluN2A と GluN2B の高次脳機能における役割の違いと深く関わっていると考えられている。

過去の研究において、GluN2A KO マウスでは成体の海馬 CA3 領域-CA1 領域間のシナプスにおけるテタヌス刺激による長期増強 (long-term potentiation, LTP) や、モリス水迷路による空間学習の効率が悪化することから、GluN2A は LTP 誘導の閾値や学習効率を制御している可能性が示唆されている。一方 GluN2B KO マウスは哺乳反射に異常が起こり、ミルクを飲まずに生後24時間以内に死亡してしまうため、高次脳機能に

関する研究はこれまで進んでいなかった。近年コンディショナル GluN2B KO マウスの研究により、成体海馬 CA1 におけるシナプス可塑性の閾値の変化や、空間学習の悪化などが見られたり、初期発生における神経細胞の形態に変化が起こるなど、GluN2B がシナプス可塑性や記憶・学習だけでなく、神経細胞の発達にも重要であることが示唆されている。初期発生においては GluN2B が主要な GluN2 サブユニットであるため、GluN2B を KO してしまうと NMDAR 自体が機能しなくなるため神経細胞の発達において NMDAR が重要なのか GluN2B が重要なのかはこれまで明確に区別されていなかった。

そこで、我々は GluN2B 遺伝子の上流に GluN2A 遺伝子を挿入することで、GluN2B の発現を GluN2A に置き換えた GluN2B-GluN2A 発現置換マウス (KI マウス) を作製した。KI マウスは GluN2B KO マウスと同様にミルクを飲まずに生後 24 時間以内に死亡してしまっていた。P0 のマウスの脳内では GluN2B の発現は無くなり、代わりに GluN2A の発現が上昇していたが、GluN1 の量が減少していたことから NMDAR の総量が減少していることが示唆された。そして、細胞外電位記録法により、NMDAR fEPSP (field excitatory postsynaptic potentiation) を調べたところ、KI マウスではわずかな NMDAR 依存性の fEPSP が確認された。また、HT マウスでは NMDAR が減少していたにもかかわらず、NMDAR fEPSP が増大していた。通常シナプスの成熟過程では初めに GluN2B がシナプス上には存在し、その後 GluN2A の発現上昇に伴って NMDAR の活動依存的にシナプス中心部の NMDAR は GluN2B 含有型から GluN2A 含有型へ移行することが知られているが、KI マウスでは最初にあるべき GluN2B が全く存在しない

め、KI マウスでは本当に NMDAR がシナプスにあるのかどうかを確認するため、生化学的に PSD 画分を精製したところ、KI マウスでは量が減少するものの、NMDAR が存在することが確認された。また、このとき AMPAR のサブユニットの一つ GluA1 が PSD において増加していた。ホールセルパッチクランプ法により、1 神経細胞レベルでの AMPAR や NMDAR のシナプス応答を調べたところ、NMDA EPSC (excitatory postsynaptic current) は HT マウスでは大きく、KI マウスでは小さくなっていた。また、AMPA EPSC は変異型アレルが増えるにつれて大きくなる傾向が見られた。さらに自発性シナプス応答 (spontaneous EPSC) の振幅の大きさや頻度も変異型マウスでは増加する傾向が見られ、変異型マウスで AMPAR がシナプス上で増加していることが電気生理学的にも示された。

今回の研究の結果により、GluN2A は発生初期においてはタンパク質レベルで制限を受けており、mRNA 量を増やすだけでは NMDAR の機能を十分に補えないこと、少なくとも海馬 CA1 錐体細胞では GluN2A のみでシナプスでイオンチャネルとして機能できること、NMDAR の量の変化もしくは GluN2A/2B 比の変化は AMPAR のシナプス移行の制御に重要であることが示唆された。