

氏名	にしむねあつし 西宗敦史
学位(専攻分野)	博士(医学)
学位記番号	医博第2233号
学位授与の日付	平成12年3月23日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
研究科・専攻	医学研究科分子医学系専攻
学位論文題目	NSF binding to GluR 2 regulates synaptic transmission (AMPA型グルタミン酸受容体 GluR 2 サブユニットの N-エチルマレイミド感受性融合タンパク質 (NSF) による活性調節に関する研究)

論文調査委員 (主査) 教授 川口三郎 教授 大森治紀 教授 中西重忠

論文内容の要旨

目的:

中枢神経系で興奮性のシナプス伝達を担う AMPA 型グルタミン酸受容体は、大部分が Ca^{2+} 非透過性のカチオンチャンネルを構成しており、GluR 2 サブユニットの存在が AMPA 受容体の Ca^{2+} 非透過性を決定している。近年の研究から、イオントロピックグルタミン酸受容体 (iGluRs) は、アミノ末端を細胞外に、カルボキシル末端 (C 末端) を細胞内に持つことが明らかとなった。細胞外領域はリガンド結合領域であることが既に示されているが、細胞内領域の機能は不明であった。本研究の目的は AMPA 型受容体と細胞内で結合しているタンパク質を同定し、受容体と細胞内タンパク質間の相互作用による興奮性シナプス伝達の制御機構を明らかにすることである。

方法と結果:

AMPA 型受容体 GluR 2 サブユニットの C 末端細胞内領域をプローブとし、酵母 2 ハイブリッド法によりラット全脳 cDNA ライブラリーから同領域に結合する分子をスクリーニングしたところ、全長の N-エチルマレイミド感受性融合蛋白質 (NSF) cDNA を得た。他の iGluR サブユニットの C 末端細胞内領域は NSF との結合を示さず、NSF との結合は GluR 2 に特異的であった。また *in vitro* のタンパク質結合実験により、GluR 2 は NSF と直接結合していることを示した。欠失変異体を作製しこの結合に必要な最小領域を求めたところ、NSF の全長及び GluR 2 の第 4 膜貫通部位から 10 アミノ酸 C 末端側の細胞内領域 Lys⁸⁴⁴-Gln⁸⁵³ の 10 アミノ酸の部位が必要領域であった。本領域の GluR 2 合成ペプチドは 100 μ M の濃度で、GluR 2 と NSF の結合を *in vitro* で完全かつ特異的に阻害した。

興奮性シナプス伝達における GluR 2 と NSF の結合の役割を解析する目的で、本ペプチドを海馬 CA 1 領域の錐体ニューロンに細胞内投与し、興奮性シナプス電流を記録したところ、AMPA 受容体を介するシナプス電流が顕著かつ進行性に減弱してゆく現象を観察した。抗 NSF モノクローナル抗体の細胞内投与によっても同様の現象が観察できた。さらに、局所投与した AMPA に対する受容体の応答反応も、結合阻害ペプチド依存的に減弱することを観察した。結合を阻害しない類似のペプチド、或いは非特異的なモノクローナル抗体の投与によってはこの現象は起こらなかった。

考察と結論:

NSF は小胞輸送に関与し、輸送小胞と標的膜とのドッキングまたは融合を媒介する細胞質タンパク質であると考えられてきた。神経系における NSF の機能は、シナプス前終末での伝達物質放出過程における役割と比較して、後シナプスについては知見に乏しいのが現状である。本研究により、GluR 2 と NSF とが、後シナプスにおいて直接結合し得ることが明らかとなった。さらに、AMPA 受容体の応答反応の一部は GluR 2-NSF 間の相互作用に依存していることが明らかとなった。結合の阻害によってシナプス電流は振幅だけが減少したことから、個々の受容体の性質の変化ではなく、活性受容体の数の減少を起こしていると考えられた。従って、AMPA 受容体の活性の一部分は、GluR 2-NSF 間相互作用依存性に活性受容体

をシナプス後膜へ供給することによって維持されていると考えられる。以上の結果は、シナプス後膜において AMPA 受容体が小胞輸送に関与する NSF によって調節されているという新しい興奮性シナプス伝達の制御機構を示すものである。

論文審査の結果の要旨

中枢神経系の興奮性のシナプス伝達は主としてイオントロピックグルタミン酸受容体を介して起こっている。本研究は遺伝子工学的手法を用いて、AMPA 型イオントロピックグルタミン酸受容体 GluR 2 サブユニットの活性制御機構を明らかにしようとしたものである。

酵母 2 ハイブリッド法により、GluR 2 サブユニットの細胞内領域に結合する分子をスクリーニングし、N-エチルマレインド感受性融合蛋白質 (NSF) cDNA を得た。GluR 2 サブユニット上の NSF 結合部位を同定し、結合部位の合成ペプチドが GluR 2-NSF 間の結合を阻害することを示した。このペプチドを、ラット海馬 CA 1 錐体細胞内へ注入し、興奮性シナプス伝達に対する影響を調べたところ、結合阻害作用をもつペプチドに特異的に、興奮性シナプス電流が進行性に減弱することを示した。この興奮性シナプス電流の変化は AMPA 受容体応答自体の減弱によって起こる。したがって、AMPA 受容体の活性の一部分は、GluR 2-NSF 間の相互作用によって制御されていると結論された。以上の成果は、シナプス後膜において AMPA 受容体が NSF によって調節されているという新しい興奮性シナプス伝達の制御機構を明らかにしたものである。

以上の研究は、興奮性シナプスの生理的制御機構の解明に貢献し、神経科学・医学に寄与するところが多い。

したがって、本論文は博士 (医学) の学位論文として価値あるものと認める。

なお、本学位授与申請者は、平成 12 年 2 月 22 日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。