

(論文内容の要旨)

NMDA 受容体を構成する NR2 サブユニットは、受容体のチャネル特性を決定付け、中枢神経系の興奮性伝達の制御に大きく寄与する。NR2 サブユニットの発現は、神経の発達過程において著しく変化する事が知られ、これに伴うチャネル特性の変化が、神経回路の形成と成熟に重要であるとされる。発達期の小脳顆粒細胞では、NR2B から NR2C への転換がシナプスの成熟に必須であり、小脳運動制御系の構築に欠く事ができないとされるが、そのサブユニット交換を制御する機構については、不明瞭な点が多い。

強制発火を伴わない生理的な KCl (5mM) 条件下でマウス小脳顆粒細胞の初代培養を行い、NR2B から NR2C へのサブユニット交換を制御する機構の解析を行った。初代培養においては、NR2B mRNA が継続的に減少し、これと平行して NR2C mRNA の増加が進む。この鏡像的な発現変化は、TTX 処理によって細胞の興奮を抑える事で消失し、また、AMPA 受容体あるいは NMDA 受容体に対する選択的阻害剤によっても消失した。即ち、グルタミン酸を介した神経伝達の活性化が、両者の発現制御に必須である事が示された。TTX 処理により消失した NR2B 及び NR2C の発現制御は、AMPA 受容体阻害下での NMDA 刺激によって共に回復される一方、NMDA 受容体阻害下での AMPA 刺激では回復されなかった。また、NMDA 刺激による NR2B から NR2C へのサブユニット交換は、細胞膜上に発現した機能的な NMDA 受容体においても確認された。

NMDA 刺激による細胞内シグナル機構を薬理学的手法にて解析した結果、CaMK の活性化が NR2C の発現誘導に必要とされる一方、NR2B の発現抑制には関与せず、また、NR2C の発現誘導には ERK 及び p38 MAPK カスケードの活性化が関わっている事が明らかとなった。

以上の結果は、発達期の小脳顆粒細胞における、シナプス伝達の制御に関わる NR2B から NR2C への NMDA 受容体サブユニットの転換に、NMDA 受容体の活性化が必須の役割を果たし、かつその下流シグナルには異なる細胞内シグナル系が関わっている事を示している。

(論文審査の結果の要旨)

NMDA 受容体は、イオンチャネル型のグルタミン酸受容体の一つであり、 Na^+ 、 Ca^{2+} 透過性のチャネルによって、興奮性入力や細胞内カルシウムシグナル系の活性化に関与する。受容体の構成は、NR1 サブユニットと NR2 サブユニットとのヘテロメリックな会合によって成されるが、受容体の機能性を特徴付けるのは NR2 サブユニットであり、発現分布の異なる NR2A から NR2D の 4 種によって、チャネルの開口速度や開口時間、膜電位依存性の程度などが決定される。発達過程における小脳顆粒細胞では、発現する NMDA 受容体の構成サブユニットが NR2B から NR2C へと転換する事が知られており、この転換が小脳皮質回路の形成と成熟に重要な役割を担う事が指摘されてきた。しかし、その転換を担う調節機構については、依然として不明瞭なままであった。

生体内の顆粒細胞では、サブユニット転換の時期と一致して、苔状線維との間に興奮性シナプスが確立される。故に、興奮性入力によってサブユニット転換の機構が駆動される、との仮説が提唱されていた。過去の研究では、ラットより調製した初代培養が実験系として主流であり、この初代培養を維持する上で欠く事のできない高濃度 (25 mM) KCl 等による強制的・慢性的脱分極が、「苔状線維からの興奮性入力の代用」と解釈されてきた。しかし、強制的な脱分極が細胞の生存に必須である以上、純粋に成熟の過程を観察しているとは言い難く、また、生理的な神経活動の発生とその効果を観察する系としては不適であった。

ラットとは異なり、マウスより調製した初代培養は、生理的 (5 mM) KCl 条件下でも生存が可能である。近年、このマウス由来の初代培養を用いた研究において、電気生理学的特徴や発現遺伝子の種類を比較する事により、強制的脱分極条件下 (25mM KCl) の顆粒細胞は未成熟な状態に留まり、生理的条件下 (5 mM KCl) の顆粒細胞は成熟を示す事が、明らかとなった。そこで申請者は、生理的条件下で培養したマウス由来の顆粒細胞を用い、NMDA 受容体のサブユニット構成を転換させる機構について、解析を行った。

まず申請者は、定量的 PCR を用いた mRNA 量の検討から、生理的条件下で培養したマウス顆粒細胞における NMDA サブユニットの自発的な発現変化は、生体内における発現変化と酷似する事を見いだした。即ち、培養初期においては NR1, NR2A, NR2B の mRNA の発現が誘導されるが、途中 NR2B mRNA のみが減少へと転じた。NR2C mRNA の発現は、培養初期には変化に乏しく、NR2B mRNA が減少に転じる時期を境目に著しい増加を示した。この NR2B の減少と NR2C の増加の過程は、TTX によって阻害を受け、また AMPA 受容体、或は NMDA 受容体の選択的遮断薬によっても阻害を受けた事から、グルタミン酸受容体の活性化による神経活動が、NR2B から NR2C への移行に必須である事が明らかとなった。次に申請者は、AMPA 受容体もしくは NMDA 受容体に対する選択的な刺激を試み、AMPA 受容体ではなく NMDA 受容体の活性化が、NR2B から NR2C への移行を促す事を見いだした。更に、NMDA 刺激による NR2B から NR2C へのサブユニット転換が、細胞膜上に発現した機能的 NMDA 受容体の構成サブユニットにおいても認められる事を、明らかとした。最後に申請者は、NMDA 受容体の下流シグナル分子に対する阻害剤を用いる事で、NMDA 受容体の活性化による NR2B の減少と NR2C の増加が、それぞれ異なる細胞内シグナル系によって担われる事を、明らかとした。

以上のように、本論文で述べられた成果は重要であり、本論文は博士 (生命科学) の学位論文として価値あるものと認められる。さらに、平成 21 年 1 月 26 日に論文公聴会を開催し、論文内容とそれに関連した試問を行った結果、合格と認めた。