

学 位 審 査 報 告 書

(ふ り が な) 氏 名	くろやなぎ ともあき 畔柳 智明
学位 (専攻分野)	博 士 (理 学)
学 位 記 番 号	理 博 第 号
学位授与の日付	平成 年 月 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	理学研究科 生物科学 専攻
(学位論文題目) イオン透過型グルタミン酸受容体 $\delta 2$ サブユニットによるシナプス前 終末形成機構の解析	
論 文 調 査 委 員	(主査) 平野丈夫 教授 藤吉好則 教授 七田芳則 教授

理 学 研 究 科

(続紙 1)

京都大学	博士（理学）	氏名	畔柳 智明
論文題目	イオン透過型グルタミン酸受容体 $\delta 2$ サブユニットによるシナプス前終末形成機構の解析		
（論文内容の要旨） 脳は動物が環境に適応した行動を決定し、実行するための器官である。脳が適切に機能するためには、脳を構成するニューロンが情報伝達をするためのシナプスを正確に形成することが不可欠である。これまでに、Neuroligin、Neurexin、SynCAM などの細胞接着分子がシナプス形成に関与するタンパク質として同定されているが、ニューロン特異的なシナプス形成の分子基盤は十分理解されていない。小脳皮質を構成するニューロンは同定されているので、ニューロン種特異的なシナプス形成を研究するモデルとして有用である。これまでに、小脳皮質の平行線維-プルキンエ細胞間シナプスの形成及び維持に、イオン透過型グルタミン酸受容体 $\delta 2$ サブユニット(GluD2)の関与が示唆されていたが、その機構は不明だった。 第一章では、GluD2 がシナプス前終末形成を直接誘導できる分子であることを示す。GluD2 欠損マウスより調製した小脳分散培養系では、顆粒細胞-プルキンエ細胞間シナプス前終末が少なく小さかった。また GluD2 欠損マウス由来のプルキンエ細胞から記録された paired-pulse facilitation は野生型のそれよりも大きく、シナプス前終末からの神経伝達物質の放出確率が低いことが示唆された。GluD2 を発現させた非神経細胞である HEK293T 細胞を小脳ニューロンと混合培養すると、HEK293T 細胞の周囲に興奮性シナプス前終末分子が特異的に集積した。この集積には、GluD2 の最初の 440 残基にあたる NTD ドメインが必要かつ十分であった。FM1-43 イメージングにより、放出可能なシナプス小胞が HEK293T 細胞の周囲で確認された。AMPA 型グルタミン酸受容体サブユニットの GluA1 と GluD2 を共発現させた HEK293T 細胞を小脳ニューロンと混合培養すると、HEK293T 細胞から微小興奮性シナプス後電流様の応答も記録された。GluA1 の NTD ドメインを GluD2 のそれに置換したキメラ分子のみを発現した HEK293T 細胞によってもシナプス前終末分子の集積が誘導され、その細胞からはシナプス後電流様の応答が記録された。以上の結果は、GluD2 の NTD ドメインが直接顆粒細胞へ作用してシナプス前終末形成を促すことを示唆している。最近の知見から GluD2 は分泌タンパク質の Cbln1 に結合してシナプス前終末分子の Neurexin に結合することが報告され、本研究を裏付ける形となった。 第二章では GluD2 と Cbln1 の相互作用の分子基盤を報告する。GluD2 の NTD ドメインの flap ループ(Arg321-Trp339)に注目し、様々な変異体を作製した。その結果、R321A と W323A というシナプス前終末形成誘導能を喪失した変異体を得ることができた。これらの変異体は Cbln1 と結合しなかった。一方、Cbln1 変異体 V148Q と E151A は、どちらも GluD2 に結合しなかった。GluD2 と Cbln1 のホモロジーモデルを構築すると、GluD2 と Cbln1 の結合に影響を与えた各々の残基は、互いに結合面を形成している可能性が示唆された。以上の結果は、GluD2 と Cbln1 の結合において、GluD2 の flap ループが Cbln1 の gC1q ドメインと特異的に相互作用していることを示唆している。			

(論文審査の結果の要旨)

脳を構成する神経細胞はシナプスを介して情報伝達を行い、動物の行動を制御している。シナプス形成に際しては、Neuroligin、Neurexin、SynCAM などの細胞接着タンパク質が重要なはたらきをするが、特異的なシナプス形成の分子機構に関しては不明な点が多い。小脳皮質を構成する神経細胞とそれらが形成する神経回路は明らかになっているため、小脳は特異的なシナプス形成機構を研究する良いモデルになる。小脳皮質において、顆粒細胞-プルキンエ細胞間シナプスの形成と維持に、イオン透過型グルタミン酸受容体 $\delta 2$ サブユニット (GluD2) の関与が示唆されていたが、その機構は不明であった。申請者は GluD2 のシナプス形成への関与機構を研究し、GluD2 がシナプス前終末形成を直接誘導できる分子であることを示した。

GluD2 欠損マウスより調製した小脳分散培養系では、顆粒細胞-プルキンエ細胞間シナプス前終末が少なく小さかった。また GluD2 欠損マウス由来のプルキンエ細胞から記録したシナプス応答の解析により、シナプス前顆粒細胞からの神経伝達物質放出確率が低いことが示唆された。GluD2 を発現させた非神経 HEK293T 細胞を小脳神経細胞と混合培養すると、HEK293T 細胞の周囲に興奮性シナプス前終末に局在する分子が特異的に集積した。この集積には、GluD2 の NTD ドメインが必要であった。蛍光イメージング実験により、HEK293T 細胞の周囲に伝達物質を放出しうるシナプス前終末を確認できた。また、グルタミン酸受容体サブユニットの GluA1 と GluD2 を共発現させた HEK293T 細胞を小脳神経細胞と混合培養すると、HEK293T 細胞から興奮性シナプス後電流様の応答も記録された。さらに、GluA1 の NTD ドメインを GluD2 のそれに置換したキメラ分子のみを発現した HEK293T 細胞によりシナプス前終末分子の集積が誘導され、その細胞からシナプス後電流様の応答が記録された。以上の結果は GluD2 の NTD ドメインが直接顆粒細胞へ作用してシナプス前終末形成を促すことを示唆している。最近、GluD2 は分泌タンパク質の Cbln1 と結合し、それがシナプス前終末分子の Neurexin に結合することが報告され、本研究の結果が確認・発展されている。次に、申請者は GluD2 と Cbln1 の相互作用の分子基盤を研究した。GluD2 の NTD ドメインの flap ループに注目し、様々な変異体を作製した。その結果、R321A と W323A というシナプス前終末形成誘導能を喪失した変異体を得ることができ、これらは Cbln1 と結合しなかった。一方、Cbln1 変異体 V148Q と E151A は、どちらも GluD2 に結合しなかった。GluD2 と Cbln1 のホモロジーモデルを構築すると、GluD2 と Cbln1 の結合に影響を与えた各々の残基は、結合面を形成していることが示唆された。これらは、GluD2 の flap ループが Cbln1 の gC1q ドメインと相互作用していることを示唆している。

上述したように、申請者はイオン透過型グルタミン酸受容体 GluD2 によるシナプス形成の分子機構に関する研究を行い、GluD2 によるシナプス前終末形成誘導作用を明らかにし、この作用に必須の GluD2 アミノ酸残基を同定した。これらの成果は、シナプス形成の分子機構解明に寄与する重要な知見である。よって、本論文は博士（理学）の学位論文として価値あるものと認められる。また、平成 23 年 1 月 25 日に論文内容とそれに関連した口頭試問を行い、その結果合格と認めた。