学位論文題名

小脳プルキンエ細胞におけるシナプス伝達分子の
局在に関する形態学的研究

学位論文内容の要旨

哺乳類の中樞神経系において、グルタミン酸は主要な興奮性神経伝達物質であり、神経系の発達やシナプス伝達の可塑性に重要な役割を果たしている。しかし、グルタミン酸は強い神経毒作用も示すために、正常では細胞外グルタミン酸濃度は、低く保たれている。グルタミン酸受容体はイオンチャネル型（GluR）と代謝型（mGluR）が同定されており、シナプスではGluRがシナプス接合部に、mGluRがシナプス接合周囲部に局在することが明らかにされている。グルタミン酸を介したシナプス伝達機構においては、さまざまな伝達分子は階層的に局在し、かつ機能している可能性が考えられる。

小脳プルキンエ細胞は、平行線維および登上線維と大量のシナプスを形成し、グルタミン酸など興奮性アミノ酸を介した入力を数多く受けている。豊富なグルタミン酸入力に応じ、プルキンエ細胞とプルキンエ細胞を被蓋するパーグマンガリア細胞は、多くのグルタミン酸受容体およびトランスポーターを発現している。

本研究では、グルタミン酸伝達機構解明を目指し、マウス小脳プルキンエ細胞のシナプス部におけるシナプス伝達分子の局在を、特にグルタミン酸トランスポーター（EAAT4）とGTP結合蛋白であるGq蛋白 α サブユニット（G α q/G α 11）に注目して、*in situ* hybridizationおよび免疫組織化学により、解析を行った。

EAAT4の局在について

EAAT4は、4番目に同定されたグルタミン酸トランスポーターで、小脳プルキンエ細胞に発現する。本研究では、抗EAAT4抗体を用いた免疫電顕（金コロイド銀増感法）により、局在解析を行った。その結果、EAAT4の免疫反応は平行線維とシナプス接合するプルキンエ細胞の棘突起細胞膜に局在し、シナプス接合部には認められなかった。EAAT4の免疫反応は、もう一つの興奮性

入力系である登上線維とシナプス接合する棘突起にも観察され、ここでもシナプス接合部を除く細胞膜に局在した。また、抑制性神経終末とのシナプスでは、EAAT4の免疫反応が観察されなかったことにより、EAAT4は興奮性シナプスに選択的に分布していることが判明した。細胞体および樹状突起内部では、EAAT4の免疫反応は小胞体および小胞膜に付随していた。細胞体で生成されたEAAT4は、細胞内小胞に付随して、棘突起までの輸送されたと考えられた。

EAAT4がシナプス接合部を除く棘突起細胞膜に局在する事実と、グルタミン酸の動態から、次のことが考えられる。平行線維および登上線維から放出されたグルタミン酸は、はじめにシナプス接合部に局在するGluRを、次にmGluRを活性化させる。やがて、グルタミン酸は、シナプス間隙から外側に漏れ出す。シナプス接合部の外側に局在するEAAT4は、この漏れ出たグルタミン酸を取り込む結果、シナプス間隙に残るグルタミン酸の拡散を促し、シナプス伝達を速く終わらせる機能が考えられる。

G α q/G α 11の局在について

Gq蛋白 α サブユニット (G α q, G α 11, G α 14, G α 15/16) は、7回膜貫通型受容体と共役し、受容体が活性化されるとホスファチジルイノシトール (PI) 系細胞内情報伝達経路にシグナルを伝達する。7回膜貫通型受容体の一つであるmGluRは、これまでに8種類同定されており、その中でmGluR1およびmGluR5が、PI系情報伝達経路を活性化することが知られている。mGluR1は主に小脳プルキンエ細胞に、mGluR5は海馬錐体細胞に強く発現する。Gq蛋白 α サブユニットは小脳および海馬でも強く発現していることから、mGluRと共存してシグナルを伝達することが考えられるが、詳細な形態学的解析はなされていない。本研究では、マウス脳におけるGq蛋白 α サブユニットの発現、分布および細胞内局在を、*in situ* hybridization法および免疫組織化学により解析した。mGluR1とmGluR5は興奮性シナプスにおいてシナプス接合周囲部に局在することが知られており、Gq蛋白 α サブユニットの局在様式をmGluRのそれと比較することで、Gq蛋白 α サブユニットの機能解明を目指した。

in situ hybridization法により、4つのGq蛋白 α サブユニットのうち、G α qとG α 11が脳に強く発現していることが明らかになった。特に、G α qとG α 11のmRNAは、小脳と海馬に強く発現しており、細胞レベルではプルキンエ細胞と錐体細胞に強いシグナルが検出された。

次に、G α qとG α 11を認識する抗体を用いて免疫組織化学を行った。その結果、まず光学顕微鏡レベルにおいて、G α q/G α 11の免疫反応は脳全体に広く検出され、特に強い反応が小脳分子層と海馬神経絨に認められた。金コロイド銀増感法による電子顕微鏡レベルでの解析から、小脳プ

ルキンエ細胞における $G\alpha q/G\alpha 11$ の免疫反応は、平行線維および登上線維とシナプス接合する棘突起細胞膜に集積しており、シナプス接合部には乏しく、シナプス接合周辺部を含む外側の細胞膜に検出された。棘突起における $G\alpha q/G\alpha 11$ の免疫反応の分布を、シナプスからの距離毎に比較すると、シナプスから離れるに従って緩やかに分布は減少していた。一方、海馬錐体細胞でも、 $G\alpha q/G\alpha 11$ の免疫反応はシナプス接合部には乏しく、シナプス接合周辺部を含む外側の細胞膜に認められた。

$G\alpha q/G\alpha 11$ とmGluRの局在の比較解析を蛍光抗体二重染色法により行った。小脳におけるmGluR1の免疫反応は、分子層に点状に現われた。それに対し、 $G\alpha q/G\alpha 11$ の免疫反応は分子層に加え、顆粒細胞層およびプルキンエ細胞層にも検出された。分子層における免疫反応を詳細に解析すると、mGluR1は樹状突起から離れた場所で点状に観察されたことから、棘突起に局在していると考えられた。 $G\alpha q/G\alpha 11$ の免疫反応はmGluR1と共存しており、樹状突起や細胞体の表層に不連続的に局在していた。海馬においても $G\alpha q/G\alpha 11$ の免疫反応は、mGluR5のそれと共存していた。免疫電顕および蛍光抗体二重染色法による解析から、 $G\alpha q/G\alpha 11$ は小脳および海馬においてmGluRからのシグナルを細胞内へと伝達するという生理機能が考えられる。

金コロイド銀増感法による免疫電顕は、二次抗体に付加している金粒子の直径が1.4nmと極めて小さいために、組織切片に対する浸透性が向上し、従来の免疫電顕と比べ抗原分子の細胞内局在を詳細に解析することが可能である。本研究により、興奮性シナプスにおいて、EAAT4と $G\alpha q/G\alpha 11$ はシナプス接合周辺部を含むシナプスの外側の細胞膜に広く局在していることが明らかになった。これに対し、GluRはシナプス接合部に、mGluRはシナプス接合周辺部に局在している。これまでに多種多様なシナプス伝達分子が同定されているが、この手法を用いてシナプス伝達分子の細胞レベルの局在が明らかになれば、シナプス伝達機構の全容説明が期待される。

学位論文審査の要旨

主査 教授 岩永敏彦
副査 教授 斉藤昌之
副査 教授 梅村孝司
副査 教授 渡辺雅彦 (医学研究科)

学位論文題名

小脳プルキンエ細胞におけるシナプス伝達分子の 局在に関する形態学的研究

グルタミン酸は中枢神経系の主要な興奮性神経伝達物質であるが、一方で強い神経毒作用をもつため伝達後のシナプスにおける濃度はすぐに低下するとされている。本研究は、グルタミン酸を介したシナプス伝達機構とその回収機構に関係する代表的な分子のシナプスでの局在を明らかにする目的で行われた。

EAAT4は4番目に同定されたグルタミン酸トランスポーターで、小脳プルキンエ細胞に強く発現する。電顕レベルの免疫組織化学により、EAAT4は興奮性入力系である平行線維および登上線維とシナプス結合するプルキンエ細胞の棘突起細胞膜に選択的に存在することがわかった。そこでは、陽性反応を示す金粒子はシナプス接合部を除く細胞膜上にひろがっていた。シナプス間隙に放出されたグルタミン酸はシナプス接合部のグルタミン酸受容体を刺激するが、EAAT4にはシナプス間隙から漏れ出たグルタミン酸を取り込んでシナプス伝達を速く終わらせる役割を担うことが示唆された。

つぎに、GTP結合蛋白であるGq蛋白 α サブユニットの局在および代謝型グルタミン酸受容体(mGluR)との位置関係を調べた。*in situ* hybridization法により、Gq蛋白 α サブユニットの中でG α qとG α 11が小脳分子層と海馬に強く発現することがわかった。両者を同時に認識する抗体を用いた免疫電顕により、Gq蛋白は棘突起のシナプス接合部を除く細胞膜に発現していた。小脳プルキンエ細胞にはmGluR1が、海馬錐体細胞にはmGluR5が強く発現することからGq蛋白との関係を見たところ、Gq蛋白とmGluRは両細胞の棘突起において共存していた。G α qとG α 11は、小脳皮質および海馬においてmGluRからのシグナルを細胞内へ伝達することが形態学的に証明された。

以上の成果は、シナプス伝達に関わる2つの分子の局在を明らかにしたもので、興奮

性シプナス伝達機構の解明に大きく貢献すると思われる。よって、審査員一同は、上記博士論文提出者田中 淳氏の博士論文は、北海道大学大学院獣医学研究科規程第6条の規定による本研究科の行う博士論文の審査等に合格と認めた。