

Developmental changes in gephyrin and collybistin mRNA expressions in the rat olfactory bulb

著者	山下 寛奈
発行年	2005-03-15
URL	http://hdl.handle.net/10271/248

doi: 10.1016/S0165-3806(01)00261-9

学位論文の内容の要旨及び論文審査の結果の要旨

学位記番号	医博第 428号	学位授与年月日	平成17年 3月15日
氏名	山下 寛 奈		
論文題目	elopmental changes in gephyrin and collybistin mRNA expressions in the rat olfactory bulb (ラット嗅球におけるゲフィリンおよびコリビスチン mRNA の発達に伴う発現変化)		

博士(医学) 山下寛奈

論文題目

Developmental changes in gephyrin and collybistin mRNA expressions in the rat olfactory bulb
(ラット嗅球におけるゲフィリンおよびコリビスチンmRNAの発達に伴う発現変化)

論文の内容の要旨

[はじめに]

効率的な神経伝達を行うためには、神経終末から放出される神経伝達物質とシナプス後膜の受容体が一致し、さらに受容体が密集して細胞骨格に繋ぎとめられていること(アンカリング; anchoring)が必要である。近年、GABA_A受容体およびグリシン受容体のアンカリングタンパクであるゲフィリンと、ゲフィリン結合タンパクであるコリビスチンが、シナプス後膜におけるGABA_A受容体およびグリシン受容体のクラスター(cluster)形成において重要な役割を果たしていることが明らかとなった。

ゲフィリンは、グリシン受容体βサブユニットおよび重合チューブリンと高親和性に結合することにより、グリシン受容体をシナプス近傍の微小管に繋ぎとめる。さらにゲフィリンは、γ2またはα2サブユニットを持つGABA_A受容体のシナプス局在に必要であることも示されている。

コリビスチンはゲフィリン結合タンパクとして同定され、GDP/GTP交換因子ファミリーに属し、ゲフィリンの細胞内局在を変化させ細胞質内のグリシン受容体を細胞膜上に誘導することができる。また、ゲフィリンはGABA_A受容体クラスタリングにも関与しているため、コリビスチンはグリシン受容体と同様にGABA_A受容体のクラスター形成も制御していると考えられている。

GABAは成熟した嗅球における主要な抑制性神経伝達物質であり、グリシンも嗅球内で神経伝達物質として働くと考えられている。従って、その関連タンパクであるゲフィリンとコリビスチンも嗅球において重要な役割を果たしていると考えられる。嗅球は生直後では解剖学的に未成熟であり、神経発生およびシナプス形成は生後に行われることが知られている。これは嗅球におけるグリシン作動性およびGABA作動性のシステムが生後に発達することを示唆している。しかし発達期嗅球におけるゲフィリンおよびコリビスチンの発現変化はこれまで報告されていない。従って、本研究では嗅球発達に伴うゲフィリンとコリビスチンmRNA発現の変化をin situハイブリダイゼーション法を用いて検討した。

[材料ならびに方法]

生後1, 3, 7, 14, 21日齢の雄のウィスターラットから脳を取り出し、クライオスタットで切片を作製した。ゲフィリンとコリビスチンに特異的な合成オリゴヌクレオチドプローブを用いてin situハイブリダイゼーションを行った。コリビスチンは2つのスプライス・バリエーションを持つことから、コリビスチン1のみを認識するプローブと、コリビスチン1と2両方を認識するプローブを用いた。

[結果]

1. コリビスチン1が嗅球におけるメインのアイソフォームである。

観察したすべての日齢で、コリビスチン1のみを認識するプローブで得られたシグナルは、コリビスチン1と2両方を認識するプローブで得られたシグナルとほとんど一致した。したがって、発達中

の嗅球の主なアイソフォームはコリビスチン1であることが示唆された。

2. 発達期嗅球におけるゲフィリン、コリビスチン1mRNAの発現。

生後1日齢では、僧帽細胞がゲフィリンおよびコリビスチン1mRNAを中等度に発現していたが、他の領域においては弱い発現または検出限界以下であった。生後3日齢では、顆粒細胞において両者のmRNAを検出できた。生後7日齢になってはじめて傍糸球体細胞において両者のmRNAのシグナルを検出できた。生後14日齢では、成体と同じレベルとなり、すべての領域で両者の強い発現が認められた。

対比染色を行ったところ、ゲフィリンおよびコリビスチン1mRNAが傍糸球体細胞、傍飾細胞、僧帽細胞、顆粒細胞で共存していることが明らかとなった。

[考察]

生後1日齢で豊富なゲフィリンおよびコリビスチン1mRNAが僧帽細胞に発現していたことは、すでにそこではGABAあるいはグリシン作動性シナプスが成熟していることを示唆している。一方、顆粒細胞と傍糸球体細胞での遺伝子発現は僧帽細胞に比べ遅延していた。このことは、これらの細胞による抑制性の制御が生後形成されていくことを示唆している。今回の研究により、ゲフィリンおよびコリビスチン1mRNAの発現が時間・空間的に厳密に制御されていることが明らかとなった。嗅球におけるニューロン発生は胎生12日から生後20日に及ぶ。ニューロンの種類によって発生する時期が異なり、僧帽細胞、顆粒細胞、傍糸球体細胞の順に作られるが、ゲフィリンおよびコリビスチン1mRNAはちょうどこの順序に従って発現していた。このことは、両者の遺伝子発現は個々のニューロンの成熟度に対応していることを示すものである。従って、ゲフィリンおよびコリビスチン1mRNAは、ニューロンが最終目的地に到着し、分化を終えた時にその発現が誘導されると考えられた。本研究により、ゲフィリンおよびコリビスチン1mRNAは発達期嗅球において効率的な抑制性シナプスを形成するのに重要であることが示唆された。

論文審査の結果の要旨

興奮性シナプスのシナプス後膜には偏在する肥厚部が観察される。後シナプス肥厚の蛋白分子は受容体分子を繋ぎ止める働きをもち、受容体は肥厚部に集合してクラスターを形成している。これにより、興奮性シナプスにおいて効率的な神経伝達が行われる。中枢神経系には興奮性シナプスとともに抑制性シナプスも存在する。

抑制性シナプスのシナプス後膜には、肥厚は存在せず、受容体分子の集合化(クラスターリング)には他の蛋白が関与している。ゲフィリンとゲフィリン結合蛋白であるコリビスチンはその主要蛋白の一つであり、抑制性伝達物質GABA_Aおよびグリシンのシナプス後膜受容体であるGABA_A受容体とグリシン受容体のクラスターリングに重要な役割を果たしている。近年のin situハイブリダイゼーションと免疫細胞化学などの研究から、これらの受容体クラスターリングに関わる蛋白は抑制性神経回路の成熟度の指標として用いることができることが報告されている。そこで、申請者は、脳において比較的秩序だった層構造を有し神経回路形成を研究するための最も良い部位の一つとして知られる嗅球において、ゲフィリンとコリビスチンmRNAの発現変化を生直後から成熟期に至るまで経時的に観察した。

対象の選定と方法は以下の通りである。

生後 1、3、7、14、21日齢のWistar系雄性ラットを用いた。エーテル麻酔下で脳を取り出しクリオスタットで厚さ20 μm の凍結切片を作成した。ハイブリダイゼーションにはゲフィリンとコリビスチンに特異的な合成オリゴヌクレオチドを用いた。なお、コリビスチンは2つのスプライス・バリエーションを持つことから、コリビスチン1を特異的に認識するプローブとコリビスチン1と2の両方を認識するプローブを用いた。

おもな結果は以下の通りである。

- (1) コリビスチン1のmRNA発現は、観察したすべての日齢において、コリビスチン1および2のmRNA発現分布とはほぼ一致していた。したがって、発達中に嗅球で発現するコリビスチンmRNAのおもなアイソフォームはコリビスチン1であることが示唆された。
- (2) ゲフィリンおよびコリビスチン1のmRNAは、生後1日齢では、僧帽細胞で中程度の発現を示し他の領域での発現は弱いか検出不可であった。生後3日齢では、顆粒細胞において両mRNAの中程度の発現が認められた。生後7日齢では、両mRNAが傍糸球体細胞にも初めて発現した。両者のmRNAは、生後14日齢以降になると、すべての領域で成体と同レベルの高い発現を示した。
- (3) 対比染色により、僧帽細胞、顆粒細胞、傍糸球体細胞および房飾細胞でゲフィリンとコリビスチン1mRNAが共存することがわかった。

以上のように、ゲフィリンおよびコリビスチン1の発現が上記4種類の嗅球神経細胞の成熟度に対応していたことから、申請者は両mRNAが発達期嗅球における抑制性神経回路の形成に重要であると結論している。

これに対し審査委員会では、本研究は受容体クラスタリング蛋白ゲフィリンおよびコリビスチン1mRNAの嗅球における発現パターンがこの領域における個々の神経細胞の発生・成熟時期に一致することを初めて明らかにしたものであり、嗅球における抑制性シナプス回路の形成機序の解明のための基礎的知見を提供するものと高く評価された。

本論文の審査過程において、主として次のような質疑が行われた。

- 1) mRNAシグナルの濃淡とその領域の細胞数は比例するか
- 2) ゲフィリンを発現しないシナプスにはGABA_A受容体は存在しないか
- 3) ゲフィリンおよびコリビスチン蛋白の発現はどうなるか
- 4) グリシン α サブユニットとクラスタリングする蛋白はあるか
- 5) 発達期の対比染色の結果はあるか
- 6) ゲフィリンとコリビスチンがシナプス後膜に集積するメカニズムは
- 7) ゲフィリン欠損動物のGABA_Aおよびグリシン受容体のクラスタリングはどうなるか
- 8) ゲフィリンとコリビスチンは他の脳領域や末梢組織にも存在するか
- 9) 発達期の嗅球にグリシンシナプスはあるか

これらの質問に対する申請者の解答は適切であり、問題点もよく把握しており、博士(医学)の学位論文にふさわしいと審査員全員一致で評価した。

論文審査担当者 主査 中原 大一郎
副査 三浦 直行 副査 福田 敦夫