論文内容の要旨

申請者氏名 秋月 さおり

神経可塑性現象は、記憶・学習、情動ならびに薬物耐性依存に密接に関係する重要な生理現象であるが、その詳細な分子機構は未だ不明な点が多い。記憶形成には、cAMP Response Element (CRE)結合タンパク質 (CREB) による転写調節機構が深く関係することが知られている。同様に、モルヒネ反復投与による長期的な薬理作用の発現にも、CREB による転写調節機構が深く関係していることが知られている。我々はこの類似点に着目し、モルヒネ反復投与時に特異的に発現量が増加する CREB 後期遺伝子群の同定とその機能解析を行うことにより、神経可塑性現象の分子機構の解明を試みている。本研究では、モルヒネ耐性依存マウスの扁桃体を材料としたサブトラクションクローニングにより得られた新規神経可塑性候補因子の同定と、その機能解析を行った。

まず、クローニング操作により、1.4kb の新規 mRNA の同定に成功し、これを addicsin (アディクシン) と名付けた。addicsin は2ヶ所の PKC リン酸化モチーフと2ヶ所の疎水性領域を有する分子量 23kDa のタンパク質をコードすることが予測された。addicsin は、脳をはじめとする心臓、腎臓、肝臓等の器官にユビキタスに発現しているが、特に、脳内においては、海馬、嗅球、大脳皮質をはじめとする神経細胞に発現すること、海馬では興奮性神経細胞において発現することなどが明らかとなった。さらに、発生期においては、神経新生期からシナプス形成期である E14 から P5 にかけて発現量が増大し、P5 で最高値を示す。一方、その産物 Addicsin は、小胞体付近での強い局在が認められた。

次に、酵母ツーハイブリッド法を用いて Addicsin 結合タンパク質の同定を試みた。その結果、Addicsin 自身に加え、神経細胞発現型グルタミン酸トランスポーター Excitatory amino-acid carrier 1 (EAAC1)、ADP ribosylation like factor 6 interacting protein 1 (Arl6ip1) を同定した。Arl6ip1 は、203 アミノ酸からなる分子量約 25kDa の機能未知なタンパク質であり、Addicsin と同様に、脳をはじめとする各組織でのユビキタスな発現が見られた。欠損変異体を用いた免疫沈降実験より、Arl6ip1 は、Addicsin の疎水性ドメイン中の 103-117 アミノ酸の領域を介して直接結合することでヘテロ二量体を形成することが明らかとなった。この領域は Addicsin のホモ二量体を形成する際にも同様に必要であることから、ホモ、ヘテロそれぞれの二量体が拮抗して存在することが示唆された。

さらに、これらの二量体形成が EAAC1 によるグルタミン酸取り込み能に及ぼす効果を検討した。その結果、Addicsin の発現量を増大させた場合には減少し、Arl6ip1 を発現させた場合には増大すること、Addicsin と Arl6ip1 が EAAC1 の機能に対して拮抗阻害関係にあることが明らかとなった。さらに、二量体形成領域に変異をもつ Addicsin Y110A/L112A では、EAAC1 を介したグルタミン酸の取り込み量に変化は観察されなかった。これらのことから、Arl6ip1 は、Addicsin と EAAC1 の会合に対し拮抗的に作用することで EAAC1 の細胞膜上でのグルタミン酸に対する親和性を増大させ、その結果 EAAC1 を介したグルタミン酸の取り込み量を増加させることが判明した。

本研究の結果、1) Addicsin が神経細胞に発現するモルヒネ耐性依存形成関連因子である、2) Addicsin ホモ二量体と addicsin-Arl6ip1 ヘテロ二量体が拮抗的に働くことによって EAAC1 を介した細胞外グルタミン酸の取り込み能が調節される、という二つの新たな知見が見いだされ、神経可塑性現象の分子機構を理解する上で、新しい手がかりとなる成果をあげることが出来た。

論文審査結果の要旨

申請者氏名 秋月 さおり

神経可塑性現象は、記憶・学習、情動ならびに薬物耐性依存に密接に関係する重要な生理現象であるが、その詳細な分子機構は未だ不明な点が多い。申請者は、記憶形成には、cAMP Response Element (CRE)結合タンパク質 (CREB)による転写調節機構が深く関係すること、ならびに、モルヒネ反復投与による長期的な薬理作用の発現にも CREB による転写調節機構が深く関係していることの類似点に着目し、モルヒネ反復投与時に特異的に発現量が増加する CREB 後期遺伝子群の同定とその機能解析を通して、神経可塑性現象を分子レベルで理解する目的で本研究を行った。

まず、モルヒネ耐性依存マウスの扁桃体を材料としたサブトラクションクローニングにより新規遺伝子の同定に成功し、これを addicisin (アディクシン)と名付けた。addicisin は2ヶ所の PKC リン酸化モチーフと2ヶ所の疎水性領域を有する分子量 23kDa のタンパク質をコードし、脳内においては、海馬、嗅球、大脳皮質をはじめとする神経細胞に発現すること、海馬では興奮性神経細胞において発現する。さらに、発生期においては、神経新生期からシナプス形成期である E14 から P5 にかけて発現量が増大し、P5 で最高値を示す。一方、その産物 Addicisin は、ホモ二量体を形成し、小胞体付近での強い局在が認められた。

次に、Addicisin の機能を明らかにする目的で、酵母ツーハイブリッド法を用い、Addicisin 結合タンパク質の同定を試みた。その結果、Addicisin 自身に加え、神経細胞発現型グルタミン酸トランスポーター Excitatory amino-acid carrier 1 (EAAC1)、ADP ribosylation like factor 6 interacting protein 1 (Arl6ipl1) を同定することに成功した。Addicisin が、神経伝達制御において中枢的な役割を果たしているグルタミン酸の輸送に関わる分子 EAAC1 と会合することが明らかとなったため、これら3種類のタンパク質間の相互作用が EAAC1 の機能とどのように関わるのかに注目し、生化学的、細胞生物学的な解析を行った。その結果、Arl6ipl1 は、Addicisin の疎水性ドメイン中の 103-117 アミノ酸の領域を介して直接結合することでヘテロ二量体を形成すること、この領域は Addicisin のホモ二量体を形成する際にも同様に必要であることなどから、ホモ、ヘテロそれぞれの二量体が拮抗して存在することが示唆された。そこで、これらの二量体形成が EAAC1 によるグルタミン酸取り込み能に及ぼす効果を検討した結果、Arl6ipl1 は、Addicisin と EAAC1 の会合に対して拮抗的に作用することで Addicisin のホモ二量体の形成を抑制することにより、EAAC1 の細胞膜上でのグルタミン酸に対する親和性を増大させ、EAAC1 を介したグルタミン酸の取り込み量を増加させることが判明した。

本研究の結果、1) Addicisin が神経細胞に発現するモルヒネ耐性依存形成関連因子である、2) Addicisin ホモ二量体と addicisin-Arl6ipl1 ヘテロ二量体が拮抗的に働くことによって EAAC1 を介した細胞外グルタミン酸の取り込み能が調節される、という二つの新たな知見が見いだされた。これらの研究成果は神経可塑性現象の分子機構を理解する上で大きな手がかりを与えるものであり、学術上、応用上貢献するところが少なくない。よって審査委員一同は、本論文が博士(バイオサイエンス)の学位論文として価値あるものと認めた。