

論文審査の要旨

| | | | |
|--|--|----|-------|
| 報告番号 | ①・乙 第 2974 号 | 氏名 | 壇辻 昌典 |
| 論文審査担当者 | 主査 教授 美島 健二 副査 教授 馬場 一美 副査 教授 榎 宏太郎 副査 教授 泉崎 雅彦 | | |
| (論文審査の要旨) | | | |
| <p>学位申請論文「5-HT_{2A} receptor activation enhances NMDA receptor-mediated glutamate responses through the Src kinase in the dendrites of rat jaw-closing motoneurons」について、上記の主査 1 名、副査 3 名が個別に審査を行った。</p> <p>本研究ではグルタミン酸刺激による閉口筋運動ニューロン (MMN) 興奮制御におけるセロトニン (5-HT) ニューロン関与について解析した。生後 2~5 日齢の Wistar 系ラットの MMN を蛍光トレーサーによる逆行性軸索輸送を利用して標識し、三叉神経運動核を含む脳幹スライス標本を作製した。さらに、MNI-caged L-glutamate を用いて局所的に解離したグルタミン酸によって誘発された興奮性シナプス応答時における 5-HT の影響について解析した。その結果、5-HT を灌流投与によりグルタミン酸応答の振幅は増大した。また、グルタミン酸受容体の 1 種である NMDA 受容体に対する拮抗薬存在下では、5-HT を投与してもグルタミン酸応答は増大しなかった。さらに、細胞内シグナルである Src の抑制剤存在下では 5-HT 投与によるグルタミン酸応答の増大効果は抑制された。電子顕微鏡を用いて、三叉神経運動ニューロン樹状突起上に NMDA 受容体と 5-HT_{2A} 受容体が近接し存在することが明らかとなった。したがって、5-HT は MMN 樹状突起上の 5-HT_{2A} 受容体を活性化し、Src を介して近接する NMDA 受容体の機能亢進することでグルタミン酸入力を増強することが明らかとなった。この増幅機構は大きな咬合力の発生や、咀嚼、吸啜などの持続的な顎運動の調節に関与する可能性が示唆された。</p> <p>本論文の審査において、副査の馬場委員、榎委員および泉崎委員から多くの質問があり、その一部とそれらに対する回答を以下に示す。</p> <p>馬場委員の質問とそれらに対する回答：</p> <p>1. グルタミン酸刺激をしたグルタミン酸受容体に近接した 5-HT_{2A} 受容体の活性でしかグルタミン酸応答は増大しなかったがその機能的意義は。</p> <p>(5-HT_{2A} 受容体が存在しない樹状突起では、グルタミン酸応答の増大は起こらないことから受容体の分布の違いにより、入力を調節することが可能であると考えられる。また、セロトニンによる運動ニューロンの調節は、細胞外のセロトニンの濃度上昇により活性化するセロトニン受容体が変わり、その効果は興奮性の増大から抑制へと変化することが報告されている。低濃度のセロトニンでは樹状突起に存在する 5-HT_{2A} 受容体が活性化し興奮性を増大させるが、細胞外のセロトニンが過剰になるとシナプス結合部位とは外れた軸索の初節に存在する 5-HT_{1A} 受容体が活性化され、運動ニューロンから筋への出力を抑制する。この抑制作用は中枢性筋疲労のメカニズムの一つとして考えられている。以上から、5-HT_{2A} 受容体が近接したグルタミン酸受容体を増強する限局した作用は、セロトニン濃度により効果が変化する 1 つの要因である可能性が考え</p> | | | |

られる。)

榎委員の質問とそれらに対する回答：

1. 今回の実験には細胞内シグナルとしてSrcの関与が報告されていたが、その他のシグナルの可能性や未知のタンパクシグナルの検討法を考察せよ。

(5-HT_{2A}受容体はSrc以外のシグナルが存在し、5-HT_{2A}受容体が活性化するとGqタンパクを介してホスホリパーゼC (PLC) を活性化する。PLCはホスファチジルイノシトール4,5-二リン酸 (PIP₂) をイノシトール1,4,5-三リン酸 (IP₃) とジアシルグリセロール (DAG) に分解する。IP₃は細胞内Ca²⁺濃度を上昇させ、DAGはプロテインキナーゼC (PKC) を活性化する。本研究では、PLC抑制剤 (U73122)、PKC抑制剤 (chelerythrine)、さらにCa²⁺キレート剤 (BAPTA) を用いて別の経路のシグナルを調べたが、セロトニンによるグルタミン酸応答の増大への関与はみられなかった。また、未知タンパクの関与を調べる方法として、RNAシーケンシング (RNA-seq) が挙げられる。三叉神経運動核へのセロトニン投与群と非投与群それぞれのmRNAを抽出し、RNA-seqで解析を行う。投与群、非投与群で遺伝子発現を比較することで、セロトニン投与による未知の遺伝子発現の可否を検討することが可能である。)

泉崎委員の質問とそれらに対する回答：

1. ケージドグルタミン酸は何も処理することなく組織間に浸透するのか。

(本研究で使用したMNI-caged-L-glutamateの分子量は323.3であり、組織間に浸透する大きさであると考えられる。さらに、2光子励起法を使用し、限局したレーザー光照射でもグルタミン酸応答が確認できるため組織間には浸透していると考えられる。)

3名の副査は、上記を含めた質問に対する回答が、いずれも満足のいくものであることを確認した。

主査 美島委員の質問とそれらに対する回答：

1. 咬筋支配神経におけるセロトニンレセプターfamilyの発現分布はどのようになっているか述べて。

(咬筋運動ニューロンは5-HT_{1A}受容体、5-HT₂受容体、5-HT₇受容体を持ち、興奮性の調節に関与し、三叉神経運動核に5-HT₃受容体が存在する。本研究では、免疫電子顕微鏡を用いて三叉神経運動ニューロン樹状突起上に5-HT_{2A}受容体が存在することが明らかとなった。)

2. NR2Aのリン酸化によりNMDARの開口時間が延長するメカニズムについてわかっているのか

(NR2Aのリン酸化によるNMDA電流の増大については数多く報告されている。その機序については、NR2AにはZn²⁺の結合部位が存在し、Zn²⁺が結合するとNMDA受容体の活性を抑制する。SrcによるNR2Aのリン酸化はZn²⁺による抑制を減少させるという報告がある。一方、NR2Aのリン酸化によるNMDA電流の増大にはZn²⁺は関与しないという報告もあり、NR2Aのリン酸化による開口制御のメカニズムの詳細は不明である。本研究でも明らかにされていないが、今後解析すべき研究項目であると考えられる。)

主査の美島委員は、3名の副査の質問に対する回答の妥当性を確認するとともに、本論文の主張をさらに確認するために上記の質問をしたところ、明確かつ適切な回答が得られた。

以上の審査結果から、本論文を博士(歯学)の学位授与に値するものと判断した。

(主査が記載)