

博士（人間科学）学位論文概要書

マウス脳におけるガストリン放出ペプチド受容体の
発現部位に関する免疫組織化学的解析

Immunohistochemical localization of gastrin-releasing
peptide receptor in the mouse brain

2005年1月

早稲田大学大学院 人間科学研究科

上地 さり

Kamichi, Sari

研究指導教員： 木村 一郎 教授

哺乳類ボンベシン様ペプチドにはガストリン放出ペプチド (gastrin-releasing peptide:GRP) とニューロメジン B の 2 つがあり、受容体を介して、内外分泌の調節、ホメオスターシスの調節等、様々な生理作用を持つことが知られている。ボンベシン受容体には GRP 受容体 (GRP receptor:GRP-R)、ニューロメジン B 受容体、さらに両者に相同性を示すものの内在性の高親和性のリガンドがまだ判明していないボンベシン受容体サブタイプ 3 の 3 種類が知られている。

近年、GRP-R 遺伝子欠損マウスが聴覚性恐怖条件付け試験において、恐怖記憶の保持の延長を呈することが観察され、同遺伝子欠損マウスの扁桃体における記憶形成の素過程とされるシナプス伝達の長期増強の亢進が確認された。その現象が扁桃体外側核においてガンマーアミノ酪酸 (γ -aminobutyric acid:GABA) 作動性インターニューロンに GRP-R が発現し、GABA の分泌を調節していることに起因することが、行動学や電気生理学的な研究によって示されている。さらに、GABA の作動薬を扁桃体基底外側核へ注入すると、ボンベシン/GRP の拮抗薬投与による記憶の低下が改善されることから、扁桃体基底外側核がボンベシン/GRP による記憶の形成に関与していること、さらにボンベシン/GRP による記憶保持効果は GABA 作動性ニューロンが調節されることにより行われている可能性が示唆されている。

脳の各部位における GRP-R の発現パターンを明らかにすることはきわめて重要であるが、特異的抗体がなかったため、これまで明らかにされていなかった。そこで本研究では、世界で初めて免疫組織化学的手法に適した抗

GRP-R 抗体を作製し、マウス脳における GRP-R の発現パターンについて、特にこれまでに記憶に関わると報告されている部位を中心に解析を試みた。

作製した抗 GRP-R 抗体は、GRP-R の第二細胞外ループ 179-190 番目のアミノ酸配列 (FSDLHPFHVKDT) を認識し、アフィニティーカラムクロマトグラフィーを用いて精製した。GRP-R cDNA を導入した COS-7 細胞を、作製した抗 GRP-R 抗体で免疫染色したところ、免疫陽性反応が観察された。また GRP-R 遺伝子欠損マウス切片を用いて検討したところ、GRP-R 免疫陽性反応は観察されなかった。これらのことから、作製した抗 GRP-R 抗体が GRP-R に特異的であることが確認された。さらに GRP-R 免疫陽性細胞が MAP-2 および NeuN 免疫陽性ではあるが、GFAP 免疫陽性ではなかったことから、GRP-R は主としてニューロンに発現していることが確認された。

抗 GRP-R 抗体を用いて、マウス脳における GRP-R タンパク質の発現パターンについて検討を行った。その結果、GRP-R 免疫陽性反応は大脳皮質、海馬、扁桃核、視床下部、脳幹と広範囲に観察された。大脳皮質においては GRP-R 免疫陽性反応はその全ての層で、また海馬においては CA1・CA2・CA3 領域の錐体細胞層と歯状回の顆粒細胞層で観察された。さらに梨状皮質と背側内梨状皮質においては強い GRP-R 免疫陽性反応が観察され、扁桃核では多くの神経核において広範囲に GRP-R 免疫陽性反応観察された。そこで扁桃核の神経核について詳しく解析を行ったところ、GRP-R 免疫陽性反応が基底外側核、基底内側核、内側核において観察され、その他にも外側核、中心核、皮質核、介在核、外側嗅索核、海馬領域等の大部分の神経核で観察された。脳幹においても孤束

核や網様核、楔状束核、迷走神経背側核などを含む広い範囲で GRP-R 免疫陽性反応が観察された。これらの結果により、GRP-R は従来の行動学的な研究により、記憶調節に関与すると報告されている海馬や扁桃体などに発現していることが明らかになり、記憶の保持において GRP-R が重要な役割を果たしている可能性が示唆された。

近年、GRP-R が GABA 作動性ニューロンを調節している可能性が示唆されていることから、GABA 作動性ニューロンに特異的な抗 GAD67 抗体を用いて解析を行ったところ、海馬や扁桃体の外側核、基底外側核、内側核、中心核などを含む神経核に、GRP-R 免疫陽性細胞の一部が GAD67 免疫陽性であることが明らかとなった。このことから扁桃体全域で、GRP-R 発現細胞の一部が GABA 作動性ニューロンでもあることが明らかとなった。

本研究におけるマウス脳における GRP-R の発現パターンの解析結果は、記憶保持に関与すると考えられている脳の部位で GRP-R が発現されていることを示し、また GRP/GRP-R システムが GABA 作動性システムを調節している可能性があることを強く示唆するものである。