

Title	Localization of nectin-2 α at the boundary between the adjacent somata of the clustered cholinergic neurons and its regulatory role in the subcellular localization of the voltage-gated A-type K ⁺ channel Kv4.2 in the medial habenula
Author(s)	塩谷, 元
Citation	大阪大学, 2018, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/70656
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 ＜a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"＞ 大阪大学の博士論文について ＜/a＞ をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

論文審査の結果の要旨及び担当者

(申請者氏名) 塩谷 元

論文審査担当者	(職) 氏 名
主 査	大阪大学教授 望 月 香 樹
副 査	大阪大学教授 佐 藤 真
副 査	大阪大学教授 河 原 行 郎

論文審査の結果の要旨

脳の実馬CA3領域透明層において、苔状繊維終末と錐体細胞の樹状突起には接着分子ネクチン-1とネクチン-3がそれぞれ発現し、ヘテロフィリックに結合することが巨大シナプス構造プンクタアドヘレンシアジャンクションの形成に重要であることはよく知られているが、ファミリー分子であるネクチン-2に関して神経細胞における機能は不明であった。本研究では、内側手綱核(MHb)の神経細胞においてネクチン-2の特異的な局在と高い発現量を見出したことから、その局在と機能解析を行った。局在パターンは、糸球体様構造に見られるドット状パターン、集合化したコリン作動性神経細胞の細胞体境界に見られる線状パターンに分けられたが、申請者は後者の局在に焦点を絞り解析を行った。光学顕微鏡下で電位依存性A型カリウムチャネルKv4.2とは高い共局在率を示したが、免疫電顕解析において、Kv4.2は膜特殊化構造(MS)と呼ばれる領域への局在が、ネクチン-2はMSの外側への局在が明らかとなり、両者の局在する接着装置は全く異なることが示唆された。コリン神経細胞の細胞体境界においてその他の接着分子が見いだせなかったことから、MSは未知の接着分子が、ネクチン-2はホモフィリックな結合が神経細胞体同士の接着構造を形成していることが示唆された。成獣マウスにおいて、ネクチン-2欠損マウスのKv4.2シグナルの局在に差異は認められなかったが、14日齢以降の発達期のマウスにおいて、Kv4.2シグナルの集積に顕著な低下が認められた。このことから、ネクチン-2はKv4.2局在に対する必須分子ではないが、発達期においてKv4.2の集積を促進することを明らかとした。

MHbは不安・うつ病・ニコチン離脱症に関与する重要な神経核であるが、機能的な報告はまだ少ない。本研究は接着分子ネクチン-2の神経細胞における初めての機能報告であるとともに、今後のMHbの機能解析において重要な所見を見出したことは博士(医学)の学位の授与に値すると考えられる。

論 文 内 容 の 要 旨
Synopsis of Thesis

氏 名 Name	塩谷 元
論文題名 Title	Localization of nectin-2 α at the boundary between the adjacent somata of the clustered cholinergic neurons and its regulatory role in the subcellular localization of the voltage-gated A-type K ⁺ channel Kv4.2 in the medial habenula (ネクチン-2 α の内側手綱核内で集合化した隣り合うコリン作動性神経細胞の細胞体境界への局在と電位依存性A型カリウムチャネルKv4.2の細胞内局在化機能)
論文内容の要旨	
〔目的〕	
<p>免疫グロブリン様細胞接着分子ネクチンファミリーはネクチン-1、-2、-3、-4の四つのメンバーから構成されており、細胞の接着、極性、増殖、生存、移動など種々の重要な細胞機能を制御している。海馬CA3領域ではネクチン-1と-3がシナプスの形成に関与することは明らかにされているが、脳におけるネクチン-2はほとんど解析されていない。申請者はネクチン-2が内側手綱核(MHb)のコリン作動性神経細胞に高度に発現していることを見出した。MHbは中隔核からの入力を脚間核へ出力してモノアミン系の神経核を制御する神経核であり、記憶やストレス、うつ病やニコチン離脱症の発症に関与している。本研究では免疫組織学的手法を中心にMHbにおけるネクチン-2の局在と機能について解析した。</p>	
〔方法ならびに成績〕	
<p>ネクチン-2の発現は成熟マウス脳を用いて免疫組織学的手法で解析した。ネクチン-2はMHbに高度に発現していた。ネクチン-2にはαとδの2種類のバリエーションがあるが、MHbにはネクチン-2αのみが発現していた。ネクチン-2αのMHbでの局在には線状と点状パターンが観察されたが、線状パターンはMHb副核のうち主にMHbIとMHbCvに、点状パターンはMHbSと散在的にMHb全域に観察された。線状パターンのネクチン-2αは集合したコリン作動性神経細胞の細胞体境界に濃縮していた。一方、点状パターンのネクチン-2αはシナプス分子のバスーンの局在と似ていた。したがって、ネクチン-2αはコリン作動性神経細胞の細胞体同士の境界部位とシナプス近傍に存在すると考えられ、本研究ではコリン作動性神経細胞の細胞体境界のネクチン-2αについて解析した。電位依存性A型カリウムチャネルKv4.2はMHbの神経細胞の細胞体境界に局在することが報告されている。そこで、成熟野生型マウスでのネクチン-2αとKv4.2の共染色を行ったところ、MHbIでは両分子は概ね共局在していた。ネクチン-2遺伝子座にβ-ガラクトシダーゼ遺伝子を導入したネクチン-2変異遺伝子座(Nectin-2^{+LacZ})を持ったマウスを交配して作成したネクチン-2遺伝子欠損マウス(KOマウス)において、β-ガラクトシダーゼを指標としてKv4.2を観察したが、野生型マウスに比べ、その局在に明らかな差異は認められなかった。免疫電子顕微鏡法でKv4.2とネクチン-2αの局在を詳細に観察したところ、Kv4.2は、隣接するコリン作動性神経細胞の細胞体の細胞形質膜同士が特に密に近接し、直下の細胞質の暗化を伴う膜特殊化(MS)という構造に局在していた。一方、ネクチン-2αはMSにはほとんど局在せず、その隣接部位あるいはMSとMSとの間に局在していた。Kv4.2は細胞膜に対して非対称に局在していたので、このMSの接着分子として機能していないと考えられた。ネクチンファミリーはNect1-1、-2、-3、-4、-5から構成されるNect1ファミリーとスーパーファミリーを形成しており、これらのメンバーは同種および異種同士間で結合する。ネクチン-2αの細胞内領域を認識する抗体がないため、本分子のMHbでの結合様式と他の細胞間接着装置との関係を検討するため、ネクチン-2αとネクチンスーパーファミリーの分子やその他の接着分子(N-カドヘリン、E-カドヘリン、P-カドヘリン、カドヘリン-13、カドヘリン-8)および接着分子の裏打ち分子(I-アファディン、β-カテニン、p120-カテニン)との多重免疫染色を行った。ネクチン-2αと細胞体境界に染色が観察された分子はNect1-2とNect1-3のみであったが、ネクチン-2αはこれらの分子と結合しないことと、ネクチン-2 KOマウスにおいてもこれらの分子の局在の変化が見られなかったことから、ネクチン-2αは細胞体境界において同種間で結合しており、従来から知られている細胞間接着装置とは異なった新規の細胞間接着装置を形成していると考えられた。最後に、発達過程(1日齢、7日齢、14日齢、28日齢)のMHbにおけるネクチン-2αとKv4.2の局在の関係を検討した。ネクチン-2ヘテロマウスのコリン作動性神経細胞の細胞体境界にはネクチン-2αの局在は7日齢から観察されたのに対して、Kv4.2の局在は14日齢から観察された。また、14日齢のネクチン-2 KOマウスにおける、細胞体境界でのKv4.2の局在はネクチン-2ヘテロマウスと比べて著しく低下していた。</p>	
〔総括〕	
<p>本研究では、(1)ネクチン-2αはMHbに特異的に発現している。(2)ネクチン-2αはMHbの集合化したコリン作動性神経細胞の細胞体境界でKv4.2が局在するMSに隣接した部位と、MSとMSとの間に局在している。(3)ネクチン-2αは同種間で結合して新規の細胞間接着装置を形成している。(4)発達過程では、ネクチン-2αは、集合したコリン作動性神経細胞の細胞体境界へKv4.2より早く集積し、Kv4.2のMSへの局在を促進する役割を果たしている。ことが明らかになった。</p>	