

論文内容の要旨

論文題目：グルタミン酸受容体 $\delta 2$ のシグナル伝達系の解析

氏名 廣中克典

グルタミン酸は哺乳類において主要な興奮性の神経伝達物質として機能しており、神経系の発生や学習、記憶といった高次機能において重要な役割を果たしている。その受容体であるグルタミン酸受容体は大きくチャネル型グルタミン酸受容体と G 蛋白質と共役した代謝型グルタミン酸受容体に分類される。このうちチャネル型グルタミン酸受容体は、その薬理特性や一次配列上の類似性より更に7つのサブファミリーに分類される(表1)。 α サブユニットは AMPA を選択的にアゴストとする AMPA 受容体を形成し、 β, γ サブユニットはカイニン酸(KA)受容体を、 ζ, ϵ, χ サブユニットは NMDA 受容体を構成する。しかし GluR $\delta 1$ 及び GluR $\delta 2$ からなる δ ファミリーは、その一次構造上の類似性からクローニングされたが、その薬理特性やチャネル活性について全く明らかになっていない。本研究の対象となる GluR $\delta 2$ は、小脳プルキンエ細胞に限局して発現している。三品らにより作製された GluR $\delta 2$ ノックアウトマウスが、運動失調、プルキンエ細胞の LTD の消失、登上線維によるプルキンエ細胞多重支配などの表現型を示すことから、GluR $\delta 2$ は小脳における正常な神経回路形成や運動学習に必須であることが明らかとなっている。従って GluR $\delta 2$ のシグナル伝達系について明らかにすることは、GluR $\delta 2$ を介した小脳依存性の運動学習システムの分子メカニズムを明らかにする上で非常に重要な意味を持つと考えられた。

これまで他のサブファミリーに属するグルタミン酸受容体サブユニットについては、相互作用する分子が多数クローニングされてきた。代表的な例として、GluR α サブファミリーに結合する GRIP、GluR ζ サブファミリーに結合するカルモジュリン、GluR ϵ サブファミリーに結合する PSD-95 等が挙げられる。これら相互作用分子の同定は、それぞれのグルタミン酸受容体複合体による脳機能制御の分子メカニズムの理解に多大な貢献を果たしてきた。そこで私は、GluR $\delta 2$ 相互作用分子を同定し、その分子が GluR $\delta 2$ の生理学的機能にどのように関わっているかを研究

することにした。ヒト脳 cDNA ライブラリーを用いて GluR δ 2 に相互作用する分子を yeast two-hybrid system によりスクリーニングした結果、band4.1 ドメイン、PDZ ドメインを持つ細胞質型チロシンフォスファターゼファミリーの一員である PTPMEG を同定した(図 1)。

グルタミン酸受容体を介するシグナル伝達系にはタンパク質リン酸化/脱リン酸化反応がシナプス可塑性、学習、記憶といった神経高次機能を調節する上で非常に重要なメカニズムを担っている。例えば、NMDA 受容体依存型の海馬 CA1 領域における長期増強(LTP)及び長期抑圧(LTD)はセリン/スレオニンキナーゼであるカルモジュリンキナーゼ II とセリン/スレオニンフォスファターゼであるカルシニューリンの活性によって制御されている。更に近年 Fyn ノックアウトマウスのシナプス可塑性異常や NMDA 受容体の Src による増強が報告され、Src 型キナーゼによるチロシンリン酸化反応の重要性が認識されるようになってきた。しかしグルタミン酸受容体シグナル伝達系へのチロシンフォスファターゼの関与については全く解析がなされていなかった。従って私は、今回得られた PTPMEG に着目し、グルタミン酸受容体との物理的及び機能的相互作用について検討することにした。

先ずマウス PTPMEG cDNA 断片をクローニングし、*in situ* hybridization により脳における PTPMEG mRNA の発現部位を検討した。その結果 PTPMEG mRNA は視床及び GluR δ 2 の発現しているブルキンエ細胞において強く発現していることを見出した(図 2)。免疫沈降法により 293T 細胞を用いた再構成系及び脳内において PTPMEG が GluR δ 2 と相互作用することを示した(図 3)。またこれまで唯一同定されている GluR δ 2 相互作用分子 PSD-93 が GluR ϵ サブファミリー相互作用分子でもあることや PTPMEG が強く発現している視床で全ての GluR ϵ サブファミリーが発現していることから、PTPMEG が GluR ϵ サブファミリーと相互作用するかを検討した。その結果、293T 細胞を用いた再構成系及び脳内において PTPMEG が GluR ϵ 1 と相互作用することを示した(図 3)。更に PTPMEG、GluR δ 2 及び GluR ϵ 1 の欠失変異体を作製して、PTPMEG とこれら受容体の相互作用が、PTPMEG の PDZ ドメインと受容体のカルボキシ末端との相互作用によることを明らかにした。また GluR ϵ サブファミリーのカルボキシ末端はサブユニット間で良く保存されていることから、PTPMEG が GluR ϵ 1 以外にも GluR ϵ 2-4 とも相互作用することが示唆された。GluR δ 2 及び NMDA 受容体に相互作用する分子として、これまで PSD-93、PSD-95、S-SCAM などの分子が同定されているが、これらは PDZ ドメインを複数持っており scaffold protein として機能している。しかし PTPMEG は、PDZ ドメインを 1 個しか持たないこと、またチロシンフォスファターゼ活性を持っていることなどから、scaffold protein としてではなくグルタミン酸受容体シグナルを担う伝達分子もしくは受容体の機能制御分子として機能していると考えた。そこで PTPMEG のグルタミン酸受容体シグナル伝達における機能を検討するため、NMDA 受容体のチャンネル活性を増強することが報告されている Src 型キナーゼ Fyn による GluR ϵ 1 のチロシンリン酸化に PTPMEG がどのように寄与するかを調べた。293T 細胞を用いた再構成系で、予想に反して野生型 PTPMEG あるいは活性化型と考えられる PTPMEG 欠失変異体により Fyn による GluR ϵ 1 のチロシンリン酸化は上昇し、不活性型 PTPMEG では、そのような上昇は見られなかった(図 4)。このことから PTPMEG は、チロシンフォスファターゼ活性依存的に Fyn による GluR ϵ 1 のチロシンリン酸化を正に制御することが判明した。この分子メカニズムについては現在更に検討を加えて

いる。一方 GluR δ 2 のチロシンリン酸化は見られないことから、GluR δ 2 と相互作用している PTPMEG は GluR δ 2 以外のタンパク質のチロシンリン酸化を制御していると考えられる。

NMDA 受容体は、リガンド及び電位に依存して細胞内にカルシウムイオンを流入させることで、可塑性などにおいて重要な働きをしている。NMDA 受容体活性化に伴うカルシウムイオン濃度上昇によってカルシウム依存性プロテアーゼであるカルパインが活性化される。一方 PTPMEG は、血小板においてカルシウムイオノフォアやトロンビンによって活性化されたカルパインにより分解・活性化されることが知られている。これらのことから PTPMEG が NMDA 受容体刺激に伴いカルパインにより分解・活性化されることで NMDA 受容体活性制御などを行うというモデルが建てられる。現在私は、このモデルを培養細胞を用いた再構成系や神経細胞初代培養系で検証したいと考えている。

本研究で私は GluR δ 2 及び GluR ϵ 1 に相互作用する分子として PTPMEG を同定し解析を進めた。チロシンフォスファターゼによるチャンネル型グルタミン酸受容体シグナル伝達の制御という新しい視点からの研究により、シナプス可塑性などの脳高次機能に寄与するグルタミン酸受容体シグナルの理解が更に深まることを期待している。

サブファミリー	マウスサブユニット	薬理特性
GluR α	α 1, α 2, α 3, α 4	AMPA/KA
GluR β	β 1, β 2, β 3	KA
GluR γ	γ 1, γ 2	KA
GluR δ	δ 1, δ 2	不明
GluR ϵ	ϵ 1, ϵ 2, ϵ 3, ϵ 4	NMDA
GluR ζ	ζ 1	NMDA
GluR χ	χ 1	NMDA

表1 チャンネル型グルタミン酸受容体サブファミリーとそれらの薬理特性



図1 PTPMEG の構造式及び two-hybrid screening により得られたクローンの構造

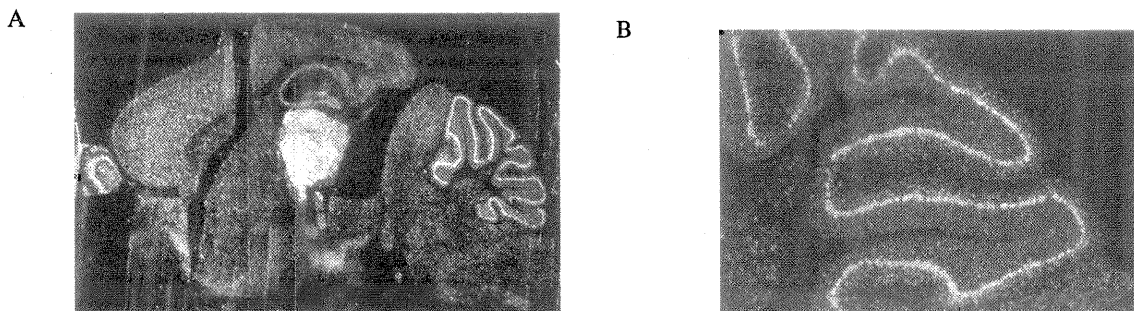


図2 PTPMEG mRNA のマウス脳内における発現分布の *in situ* hybridization 法による解析
 A) 全脳における発現分布 B) 小脳における発現分布

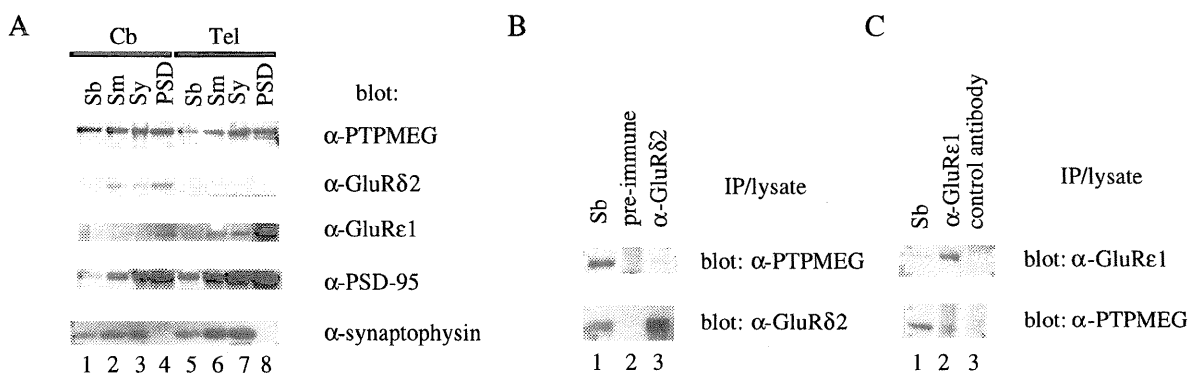


図3 PTPMEG のマウス脳における A) 細胞内分布、B) GluRδ2 との相互作用及び C) GluRε1 との相互作用。 Cb: 小脳, Tel: 終脳, Sb: 可溶性画分, Sm: シナプトソーム及びミトコンドリア画分, Sy: シナプトソーム画分, PSD: シナプス後膜画分

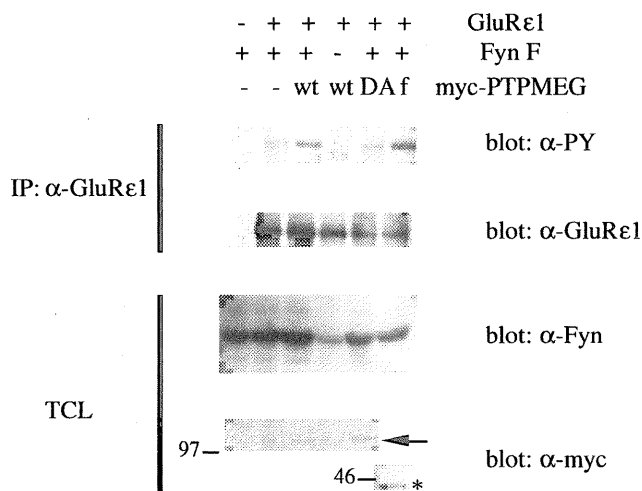


図4 PTPMEG の Src 型キナーゼ Fyn による GluRε1 のチロシンリン酸化への影響
 FynF: 活性型 Fyn, wt: 野生型 PTPMEG, DA: 不活性型 PTPMEG (PTPMEG D840A), f: 活性化型 PTPMEG (PTPMEG 517-926), α-PY: 抗リン酸化チロシン抗体, TCL: 細胞可溶性画分