

## 論文内容の要旨

獣医学専攻

平成9年度博士課程 入学

氏名 山田 篤

指導教官名 勝木元也

論文題目 『海馬の NMDA 受容体および Ras-MAPK 経路を介したシグナル伝達の解析』

Ras タンパク質は細胞の増殖や分化に重要な役割を果たしている低分子量 GTP 結合タンパク質である。Ras タンパク質をコードするがん遺伝子 *ras* はその活性型変異が多く、ヒトのがん細胞から検出される。ほ乳類では3種類の *ras* 遺伝子(*H-ras*, *N-ras*, *K-ras*)が同定されている。これらの3種類は、それぞれのアミノ酸配列の相互間での相同性が高い 21kDa のタンパク質である。Ras タンパク質はグアニンヌクレオチド変換酵素(guanine nucleotide exchange factor : GEF)によって GTP 結合型に変換すると活性化する。また、GTP 加水分解酵素活性化タンパク質(GTPase activating protein : GAP)により自身の持つ GTP 加水分解酵素としての機能を活性化し、GDP 結合型に変換すると不活性型となる。Ras タンパク質はこうした作用機構により、細胞外からのシグナルに対して、分子スイッチとしての役割を果たしていると考えられる。

Ras タンパク質は中枢神経系で多く発現している。細胞の増殖に関与する Ras タンパク質が、分裂の停止している神経細胞においてどのような働きをするのかはよくわかっていない。しかし、神経細胞は分裂停止後も学習を通して神経回路網をダイナミックに形成し、その回路網を構成する細胞間では迅速な情報伝達が行われていることを考えると、分子スイッチとしての Ras タンパク質が

いかに関与しているか興味を持たれる。そこで、中枢神経系における Ras タンパク質の作用機構に注目した。その解析手段として脳で特に発現の多い H-Ras タンパク質に着目し、H-ras 遺伝子欠損マウスを用い、海馬における H-Ras タンパク質の役割、特に NMDA 受容体を介するシナプス応答、長期増強に対する影響およびリン酸化による受容体の活性化の制御について解析した。

その結果、H-ras 遺伝子欠損マウスの海馬 CA1 領域での長期増強の大きさが野性型マウスに比べて約2倍であった(図 1)。その効果は、NMDA 受容体を介するシナプス応答の選択的増強によるものであることが明かとなった(図 2)。H-ras 遺伝子欠損マウスのこのような生理学的現象の分子生物学的なメカニズムを検討した。リガンド結合実験およびウェスタンブロットティングにより NMDA 受容体の数に変化はないことがわかった。次に、NMDA 受容体の翻訳後修飾による変化、なかでも NMDA 受容体のリン酸化修飾による変化を確かめた。NR2サブユニットのチロシンリン酸化を調べたところ、NR2A および NR2B のチロシンリン酸化が上昇していた(図 3-a)。また、NMDA 受容体の構成要素を変化させずに NR2 サブユニットのチロシンリン酸化を増加させた(図 3-b)。

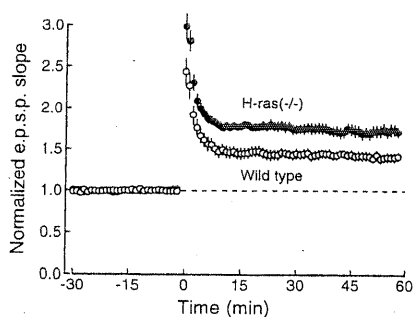


図1 野性型マウスおよび H-ras 遺伝子欠損マウスの海馬スライスにおける LTP の時間経過

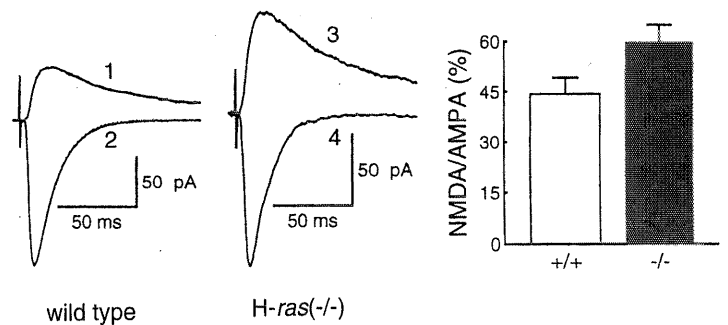


図2 NMDA 受容体および AMPA 受容体を介する EPSC

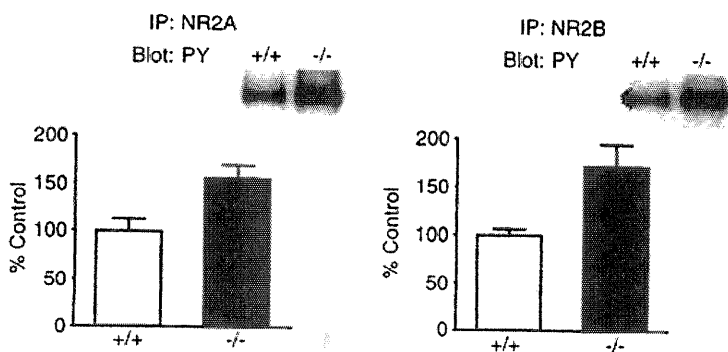


図3-a NR2A および NR2B サブユニットのチロシンリン酸化 +/+ は野性型マウス、 -/- は H-ras 遺伝子欠損マウスを表す。

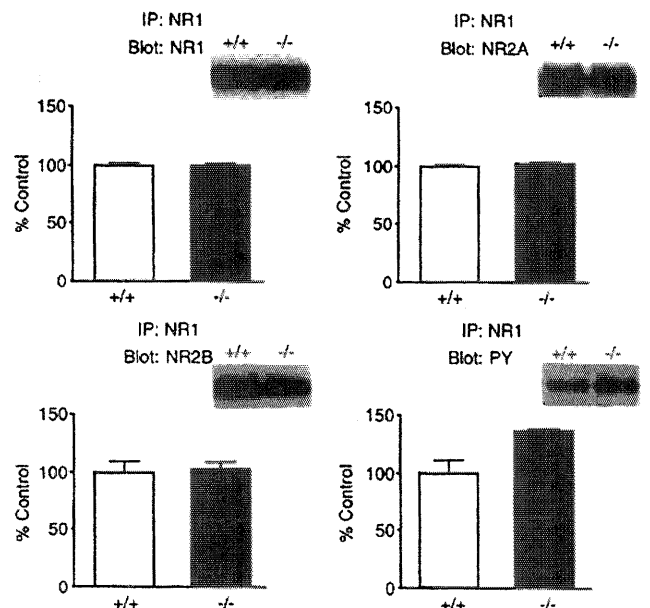


図3-b NMDA 受容体のサブユニット構成に対する影響について +/+ は野性型マウス、 -/- は H-ras 遺伝子欠損マウスを表す。

中枢神経系においてグルタミン酸受容体は興奮性神経伝達物質の受容体として働いているが、過度の刺激は細胞死を誘導する。神経細胞は、シナプスを興奮させつつも、過度のグルタミン酸による刺激は興奮毒性(excitotoxic)となり細胞死を誘導する。神経細胞には細胞自身の生死のバランスを保つ機構が存在すると考えられる。なかでも MAPK(mitogen-activated protein kinase)は神経細胞の生死のバランスを調節するタンパク質の一つであると考えられている。ラット海馬初代培養神経細胞において、NMDA 受容体はグルタミン酸刺激により ERK を活性化することが知られている。また、海馬切片に NMDA を処理した際、ERK が活性化する(図 4)。

NMDA 受容体を介した Ras タンパク質、および細胞内シグナル伝達においてその下流に存在する MAPK の活性化を誘導した時の NMDA 受容体のチロシンリン酸化に対する影響を調べた。海馬切片および海馬初代培養神経細胞を用い NMDA で刺激した時、Ras-MAPK を介するシグナル伝達および NMDA 受容体の修飾がどのようなになるか確かめた(図 4, 図 5)。その結果、NMDA で刺激した時の ERK の活性化は Ras-Gap である Gap1<sup>m</sup> により完全に阻害されることから Ras を介する経路によることが明らかとなった。この ERK の活性化とは独立した現象として NR2B サブユニット自身の脱リン酸化の現象が見られた。それはこの脱リン酸化の現象が ERK の阻害剤である U0126 で阻害されず、また ERK を活性化させる TrkB のリガンド BDNF でも起こらなかったことから明らかとなった(図 6)。また、NR2B サブユニットの脱リン酸化は 2 つの作用の異なる NMDA レセプターのアンタゴニスト MK801 および APV により阻害された。NR2B 遺伝子欠損マウスおよび NMDA 特異的な antagonist である ifenprodil 処理によって ERK の活性化が阻害されることから NMDA 刺激によるシグナル伝達には NR2B サブユニットが必要であることが明らかとなった(図 7)。

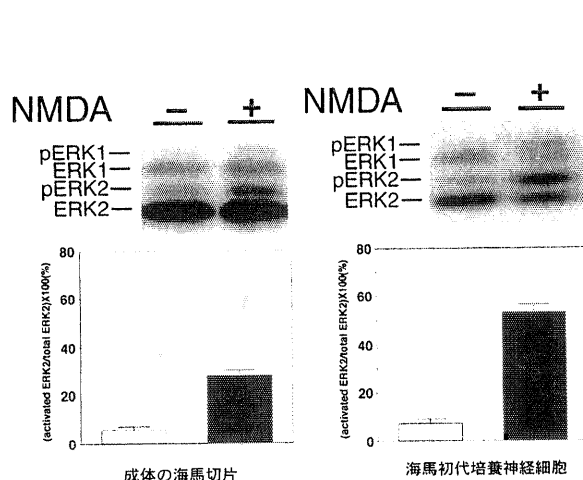


図 4 成体の海馬切片および海馬初代培養神経細胞に NMDA 処理した際の ERK の活性

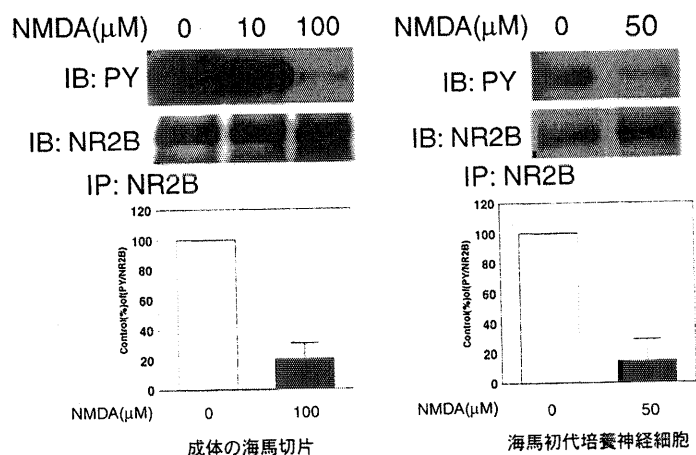


図 5 成体の海馬切片および海馬初代培養神経細胞に NMDA 処理した際の NR2B サブユニットのチロシンリン酸化

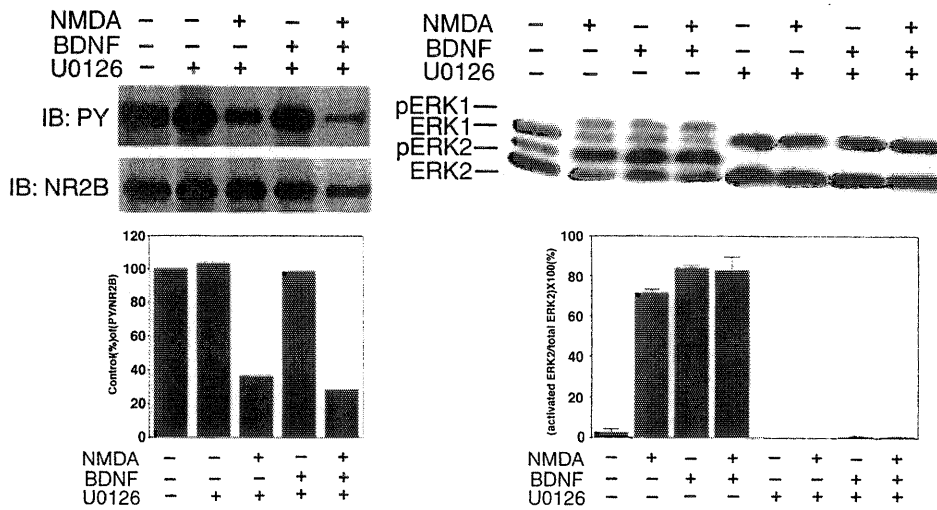


図6 U0126で処理した海馬初代培養神経細胞のNMDAおよびBDNF処理によるNR2Bサブユニットのチロシンリン酸化およびERKの活性

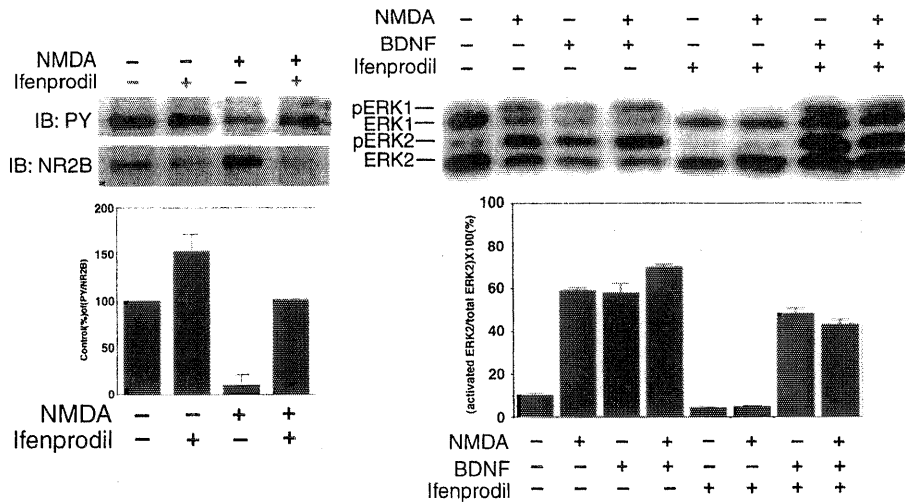


図7 lfenprodilで処理した海馬初代培養神経細胞にNMDAおよびBDNF処理によるNR2Bサブユニットのチロシンリン酸化およびERKの活性

以上の結果から、中枢神経系において H-Ras タンパク質は NMDA 受容体のチロシンリン酸化の制御や神経の可塑性に関与していると考えられる。また NMDA で刺激を与えたとき Ras-ERK シグナルの活性化が起こり、生存シグナルとしての活性化にも関与していることが示された。この ERK の活性化とは別に NR2B サブユニットの脱リン酸化が起こった。ERK の活性化および NR2B サブユニットの脱リン酸化は NR2B を介して起こることも明らかとなった。