

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 山 田 篤

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。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を解析したところ、H-*ras* 遺伝子欠損マウスはNMDA 受容体を介するシナプス応答の選択的増強による長期増強 (LTP) の増大が起こった。

そこで申請者は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ティングによりNMDA 受容体の数に変化が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。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。この時、NMDA 受容体複合体のサブユニット構成に影響は認められなかった。

次に申請者は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になるか確かめた。その結果、NMDA で刺激した時のERK の活性化はRas-GapであるGap1^m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 を活性化させる受容体型チロシンキナーゼ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。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 受容体のアンタゴニスト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特異的なアンタゴニストである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。

以上、本研究はH-Rasタンパク質が海馬においてNR2サブユニットのチロシンリン酸化の制御に重要な役割を果たしていることを示唆し、また海馬初代培養神経細胞の系でNMDA刺激によるNR2Bサブユニットのチロシン脱リン酸化がERKの活性化と独立してNR2Bサブユニットを介して起こることを示唆した。これらは海馬におけるNMDA受容体およびRas-MAPKを介した新たな細胞内シグナル伝達の存在を明らかにしたと考えられる。よって本論文は博士（獣医学）の学位論文として価値あるものと認められる。