

論文の内容の要旨

論文題目 NMDA 受容体チロシンリン酸化の生理学的解析

指導教官 山本 雅 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 10 年 4 月入学

医学博士課程

病因・病理学専攻

氏名 中澤 敬信

グルタミン酸は哺乳類中枢神経系における主要な興奮性神経伝達物質である。その受容体はイオンチャネル型と代謝（G 蛋白共役）型に分類される。イオンチャネル型受容体の 1 つである *N*-methyl-D-aspartate (NMDA) 型受容体はシナプス可塑性、神経細胞の発達、及び神経細胞死などに重要な役割を果たすことが知られている。NMDA 型受容体は NMDAR1 (NR1) ファミリー（マウスでは Glutamate receptor (GluR) ζ 1）、NR2 (GluRe) ファミリー及び NR3A の 3 種類の相同性の高いサブユニットから構成されている。GluR ζ 1 (NR1) は、チャネルの活性に必須なサブユニットである。一方、調節サブユニットと呼ばれている GluRe (NR2) は GluRe1-GluRe4 (NR2A-2D) の 4 種類があり、GluRe の構成の相違によりチャネルの特性にも相違が見られる。また NR3A もチャネルの特性を調節していると考えられている。

Src 型チロシンキナーゼの 1 つである Fyn の欠損マウスが LTP の減弱や空間記憶の障害、海馬構造の形成不全、ミエリン形成不全、恐怖心の亢進、エタノール感受性の亢進など様々な神経機能の異常を示すことから Fyn の神経系における重要性が指摘されている。また、NMDA 型受容体のチャネル活性が Src により増強される。さらに、NMDA 受容体サブユニットの 1 つである GluRe2 のチロシンリン酸化レベルは高頻度刺激による LTP 誘導時や味覚の記憶の際に上昇することが示されている。これらの知

見は Src 型チロシンキナーゼによる NMDA 受容体のチロシンリン酸化がグルタミン酸作働性ニューロンの機能、また脳活動に関与することを示唆している。しかしながら、NMDA 受容体チロシンリン酸化の生理的意義についてはほとんど未解明である。そこで NMDA 受容体 GluRe2 サブユニットの Fyn によるリン酸化の生理的意義を個体レベルで検証し、またその裏付けとなるメカニズムを分子・細胞レベルで明らかにすることを目的とし本研究を行った。

1) NMDA 型グルタミン酸受容体 GluRe2 サブユニットのチロシンリン酸化の意義の解析¹⁾

GluRe2 は細胞質領域に 25 個のチロシン残基を持つ。まず、*in vitro* における Fyn による GluRe2 の細胞質領域のリン酸化残基を検討したところ、Tyr-932、Tyr-1039、Tyr-1070、Tyr-1109、Tyr-1252、Tyr-1336、Tyr-1472 の 7 つであった。さらに HEK293T 細胞再構成系を用いて上記 7 つの残基のリン酸化を検討したところ、Tyr-1472 が一番主要なリン酸化残基であり、Tyr-1252、Tyr-1336 はわずかではあるがリン酸化されることがわかった。次に Tyr-1472 を含むリン酸化ペプチドをウサギに免疫することによってリン酸化 Tyr-1472 を特異的に認識する抗体を得た。抗リン酸化 Tyr-1472 抗体の特異性を確認した後、この抗体を用いて調べたところ、実際マウス脳内においても GluRe2 の Tyr-1472 がリン酸化されていることが明らかになった。また、Fyn 欠損マウス由来の GluRe2 はほとんど Tyr-1472 のリン酸化が検出されなかったことから、マウス脳内において GluRe2 の Tyr-1472 のリン酸化に Fyn が深く関与していることが示された。さらに、Tyr-1472 のリン酸化レベルは生後 3、7、16、28 日と脳の発達に応じて上昇することがわかった。

次に、海馬 CA1 領域における LTP 誘導時における Tyr-1472 のリン酸化レベルの変動について検討した。LTP 誘導後 60 分後では Tyr-1472 のリン酸化レベルは刺激前のそれに比べて 1.5 倍 ($p < 0.002$) 上昇していることが明らかになった。刺激後 5 分後では Tyr-1472 のリン酸化の上昇は見られなかった。以上のデータは Tyr-1472 のリン酸化が LTP の発現に関与していることを示唆している。

NMDA 受容体はクラスリン依存性のエンドサイトーシスにより後シナプス膜から取

り込まれる。AP-2 複合体 μ 2 鎖はクラスリン被覆小胞の重要な成分の一つであり標的基質の認識に関与している。 μ 2 鎖が標的とするコンセンサス配列は YXX Φ (Φ は L や I などの疎水性のアミノ酸) であることから Tyr-1472 を含む YKEL 配列は μ 2 鎖の標的部である可能性が考えられた。そこで HEK293T 細胞を用いた再構成系において GluRe2 と μ 2 鎖の結合を検討したところ、野生型 GluRe2 は μ 2 鎖と結合したが、GluRe2Y1472F 変異体は結合しなかった。従って Tyr-1472 のリン酸化は GluRe2 と μ 2 鎖の結合を制御していると考えられた。

2) NMDA 受容体 GluRe2 サブユニット Y1472F ノックインマウスの作製

1) の結果から Tyr-1472 のリン酸化は海馬における LTP の発現、ひいてはマウス個体の記憶形成・学習に関与している可能性が考えられた。そこで、Tyr-1472 のリン酸化の生理的意義を解明することを目的として GluRe2 の Tyr-1472 をフェニルアラニンに置換したノックインマウスを作製した。ホモノックインマウス (ホモマウス) はやや体格は小さいが、その他の目立った表現型はなく正常に生育する。また、ホモマウスにおける海馬の構造異常は見いだされなかった。さらに海馬における GluRe2、GluRe1、AMPA 受容体 GluR1 サブユニット、PSD-95 の各蛋白質の発現について、それぞれの抗体を用いた組織染色により検討を行ったところ、光学顕微鏡レベルの観察ではいずれの蛋白質においてもその発現場所、発現レベルに有意な差は見られなかった。

次にホモマウスにおける GluRe2 のチロシンリン酸化レベルについて検討したところ、ホモマウスにおいて GluRe2 のチロシンリン酸化レベルは野生型マウスのその約 30%に減少していた。以上の結果は Tyr-1472 がマウス脳 GluRe2 において最も主要なチロシンリン酸化残基であることを示している。

3) NMDA 受容体複合体に局在する神経系特異的新規 Rho GTPase activating protein (GAP)蛋白質の同定と解析

GluRe2 の Tyr-1472 のリン酸化の意義として、Tyr-1472 のリン酸化依存的に結合する蛋白質を想定した。そこで、その分子を Yeast Tri Hybrid System を用いて検索した。

Yeast Tri Hybrid System における第 3 の蛋白質として Fyn を用いた。

GluRε2 の Tyr-1472 を含む細胞質領域を Fyn によりリン酸化したものをベイトとし、ヒト脳 cDNA ライブラリーをスクリーニングしたところ、陽性クローンの 1 つは新規 Rho GTPase activating protein (GAP) 様蛋白質をコードしていた。新規 RhoGAP 蛋白質 (p250) はアミノ末端に RhoGAP ドメインが存在する。HEK293T 細胞を用いた再構成実験の結果、p250 は GluRε2 と PSD-95 に会合することが明らかになった。また、HEK293T 細胞中では Fyn によってリン酸化された。次に p250 の GAP 活性を検討したところ、p250 は Rho と Cdc42 に対する GAP 活性が検出された。また神経芽細胞腫細胞 Neuro2A に p250 を過剰発現させたところ、血清飢餓の条件で誘導される神経突起の伸長が阻害された。

次に p250 の発現場所について検討を加えた。マウス組織レベルのノザン解析により、p250 は脳特異的な発現を示すことがわかった。また、脳内では NMDA 受容体同様、シナプス後膜肥厚部に濃縮して局在していた。以上の結果から、神経細胞では p250 は NMDA 受容体複合体に局在し、NMDA 受容体からのシグナルを Rho ファミリー GTPase に伝達している RhoGAP 蛋白質である可能性が考えられた。

本研究では、NMDA 受容体 GluRε2 サブユニットの Fyn によるリン酸化残基の同定とそのリン酸化の意義の解析、さらには GluRε2Y1472F ノックインマウスの作製を行った。またその過程で NMDA 受容体複合体に局在すると考えられる神経系特異的新規 RhoGAP 蛋白質を同定し、機能解析を行った。本研究で作製した GluRε2Y1472F ノックインマウスの電気生理学的手法、行動学的手法を用いた解析は、NMDA 受容体チロシンリン酸化の意義を包括的に理解する上で重要な位置を占めると考えられる。また、同定した新規 RhoGAP の解析は、NMDA 受容体を介したスパイン形成、更にはシナプス形成の制御のメカニズムを明らかにする上で重要であると考えられる。

1) Nakazawa T. et al., (2001) Characterization of Fyn-mediated tyrosine phosphorylation sites on GluRε2 (NR2B) subunit of the N-methyl-D-aspartate receptor. *J. Biol. Chem.* **276**: 693-699.