

審査の結果の要旨

氏名 中澤 敬信

本研究は、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、NMDA 受容体 GluRe2 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と GluRe2Y1472F ノックインマウスの作製を行ったものである。またその過程において、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 蛋白質の同定と機能解析を行ったものであり、以下の結果を得ている。

1. GluRe2 は細胞質領域に 25 個のチロシン残基を持つ。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うることを示した。
2. リン酸化 Tyr-1472 を特異的に認識する抗体を作製し調べたところ、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を示した。
3. 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ところ、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 倍上昇していることが明らかになった。この結果は 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。
4. HEK293T 細胞を用いた再構成系において GluRe2 と AP2 複合体の $\mu 2$ 鎖の結合を検討したところ、野生型 GluRe2 は $\mu 2$ 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 $\mu 2$ 鎖の結合を制

御していると考えられた。

5. 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した。
6. 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。
7. GluRe2 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新規 Rho GTPase activating protein (GAP) 様蛋白質を得た。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 GluRe2 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。
8. 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。
9. 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。

以上、本論文では NMDA 受容体 GluRe2 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 GluRe2Y1472F ノックインマウスの作製、表現型の解析を行った。また 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。本研究はこれまで不明な点が多かった 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、学位の授与に値するものと考えられる。