

審査の結果の要旨

氏名 植村 健

本研究は、小脳平行線維-プルキンエ細胞間のシナプス可塑性である長期抑圧 (LTD)、シナプス形成および運動学習に重要な役割を担っているグルタミン酸受容体 GluR δ 2 の機能を分子的に解明する目的で、GluR δ 2 と細胞質内で結合する分子の同定を試みたものであり、下記の結果を得ている。

1. GluR δ 2 細胞質内 C 末端領域を bait とし細胞質内領域に結合する分子を yeast two-hybrid screening 法により探索した。小脳 cDNA ライブラリーをスクリーニングした結果、GluR δ 2 結合分子として Shank を同定した。
2. スクリーニングで得られた Shank1 および Shank2 遺伝子断片の N 末端に EGFP を付加した蛋白を GluR δ 2 と COS7 細胞に共発現させると Shank1、Shank2 は GluR δ 2 と共に膜付近へ集積する事が観察された。また、共発現 COS7 細胞を用い免疫沈降法により GluR δ 2 と Shank1、Shank2 が yeast 細胞内のみならず遺伝子導入した哺乳類細胞においても結合している事が示された。
3. Shank1、Shank2 のプルキンエ細胞での発現及び局在を培養プルキンエ細胞を用い免疫組織化学法により調べた結果、プルキンエ細胞の樹状突起において GluR δ 2 と Shank1、Shank2 が共存する事が示された。さらに抗 GluR δ 2 抗体を用いて小脳シナプトゾームから免疫沈降を行った結果、GluR δ 2-Shank 複合体が共沈された。この結果から小脳内において GluR δ 2 と Shank が結合している事が示された。
4. スクリーニングで得られた Shank 遺伝子断片がコードするアミノ酸配列を解析した結果、得られた Shank は全て PDZ 領域を有しており、さらに PDZ 領域でのみ重なり合うクローンがあった。これらの結果から Shank の PDZ 領域が GluR δ 2 と結合する事が示された。
5. GluR δ 2C 末端領域内の Shank との結合部位を yeast two-hybrid 法により解析した。その結果、GluR δ 2 の C 末端細胞質内の中間に位置する 29 残基 (アミノ酸 893~921 番) が Shank との結合に必須である事が示された。また遺伝子導入した哺乳類細胞においても同じ領域が結合に必要であることが免疫沈降法により示された。さらに点変異導入により結合に重要なアミノ酸を調べた結果、GluR δ 2 の Ser-905、Thr-915、Phe-917 が Shank との結合に

重要である事が示された。

6. 大腸菌で発現させた精製蛋白を用いて GST pull-down assay を行ったところ、GluR δ 2 の細胞質内領域を含む精製蛋白と Shank1、Shank2 との結合が確認された。さらに Shank との結合に重要な GluR δ 2 の 29 残基 (GluR δ 2 のアミノ酸 893~921 番) からなる合成ペプチドは濃度依存的に GluR δ 2 と Shank2 の結合を阻害する事が示された。

7. GluR δ 2 遺伝子ノックアウトマウス小脳において GluR δ 2 と直接的または間接的に結合すると考えられる後シナプス肥厚部に存在する蛋白の発現量を調べた。その結果、Shank2、Homer、mGluR1a、GluR α 2/3、PSD-93、PSD-95 が小脳ホモジネートで有意に増加している一方、Delphinin が PSD 画分において激減している事が示された。

以上、本論文は GluR δ 2 と結合する新たな蛋白として Shank を同定し、結合部位の解析から GluR δ 2C 末端細胞質内領域の中間に位置する部位が Shank の PDZ 領域と結合することを見いだした。今回見出した GluR δ 2 と Shank の結合の結果と、これまでに報告されている Shank 結合蛋白の知見を合わせると、GluR δ 2 は Shank を介して小脳 LTD に重要な分子である AMPA 型 GluR、mGluR1、IP3R と間接的に結合しうることを示しており、本論文における GluR δ 2 と Shank の結合の発見は LTD に重要な蛋白群の新たな複合体の存在を示唆するものである。本研究はこれまでに未知に等しかった、GluR δ 2 の分子機能の解明に重要な貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。