

氏 名 石 川 健 治  
 学位(専攻分野) 博 士 (医 学)  
 学位記番号 医 博 第 2154 号  
 学位授与の日付 平成 11 年 7 月 23 日  
 学位授与の要件 学位規則第 4 条第 1 項該当  
 研究科・専攻 医学研究科生理系専攻  
 学位論文題目 Competitive interaction of Seven in absentia homolog-1 A and Ca<sup>2+</sup>/Calmodulin with the cytoplasmic tail of group 1 metabotropic glutamate receptors  
 (グループ 1 代謝型グルタミン酸受容体 C 末細胞内領域への, Seven in absentia homolog-1 A と Ca<sup>2+</sup>/Calmodulin の競合的結合に関する研究)

論文調査委員 (主査)  
 教授 影山龍一郎 教授 成宮 周 教授 中西重忠

### 論 文 内 容 の 要 旨

グルタミン酸は、哺乳類の中枢神経系の代表的な興奮性神経伝達物質の一つである。グルタミン酸受容体はイオンチャネル型と代謝型に分類され、代謝型 (mGluR) は G 蛋白質と共役する 7 回膜貫通型受容体に属し、8 つの異なるサブタイプからなり、3 つのグループに分けられる。mGluR1 と mGluR5 は group 1 mGluR に属し、IP<sub>3</sub>/Ca<sup>2+</sup> 細胞内情報伝達系と共役する。group 1 mGluR は、記憶と学習の基礎と考えられている長期のシナプスの可塑性に重要な役割を果たすことが示されてきた。すなわち、標的遺伝子破壊、薬理学的解析、及びブロッキング抗体による実験により、mGluR1 あるいは mGluR5 の機能欠落は、小脳での LTD (long term depression) あるいは海馬での LTP (long term potentiation) を阻害し、空間学習、運動学習を障害することが示されてきた。しかし、これらの結果が、単に mGluR1/mGluR5 の IP<sub>3</sub>/Ca<sup>2+</sup> 情報伝達系の欠落に起因するか否かは疑問のあるところである。申請者らは mGluR1/mGluR5 の機能を解明する鍵が、受容体の制御と細胞内情報伝達系にかかわる蛋白質相互作用にあると考えて yeast two-hybrid screening をおこない、group 1 mGluR の C 末細胞内領域が Siah-1 A (seven in absentia homolog-1 A) と特異的結合を示すことを明らかにした。

Siah は、ショウジョウバエの sina (seven in absentia) に対応する哺乳類のホモログとして同定された。sina は、Ras/Raf/MAPK によって誘導される phyl (PhylloPod) と共に Ras/Raf/MAPK 情報伝達系の下流に位置する。一方、ttk (tramtrack) とよばれる転写抑制因子は、視細胞分化を抑制することが知られている。sina, phyl は、ttk と複合体を形成し、ubiquitin/proteasome 機構を介して ttk を分解する。その結果、ttk による分化抑制が解除され、視細胞分化へつながる。また、Siah は、哺乳動物細胞においてネトリン受容体と複合体を形成し、ubiquitin/Proteasome 機構により、本受容体の蛋白質分解を促進する。すなわち、sina と Siah は、ともに ubiquitin/proteasome 機構を介した蛋白質分解機能をもつことが知られている。

申請者らは、yeast two-hybrid assay と GST 融合蛋白質を用いた変異実験をおこない、group 1 mGluR C 末細胞内領域の相同性の高い 27 ないし 28 アミノ酸残基が、Siah-1 A の C 末端側 2/3 と結合することを示した。さらに、myc tag を付加した Siah-1 A と、flagtag を付加した mGluR1 C 末細胞内領域を COS-7 細胞に共発現させ、免疫沈降法により Siah-1 A と mGluR1 C 末細胞内領域が細胞内で結合していることを示した。mGluR1/mGluR5 における Siah-1 A との結合部位は、Ca<sup>2+</sup>/calmodulin との結合部位と一致するが、Siah-1 A との結合は、calmodulin によって、Ca<sup>2+</sup> に依存した競合的な阻害をうけることも、in vitro の実験により明らかにした。

以上のような group 1 mGluR と Siah-1 A の特異的結合を示した結果は、group 1 mGluR の新しい調節機構を示唆し、

神経系における group 1 mGluR の多様な機能を理解するための新しい手がかりになるものと考えられる。

#### 論文審査の結果の要旨

本研究は、グループ 1 代謝型グルタミン酸受容体 (group 1 mGluR (metabotropic glutamate receptor)) の C 末細胞内領域への Siah-1 A (Saven in absentia homolog-1 A) の特異的結合を示したものである。

申請者は、yeast two-hybrid screening によって、Siah-1 A が group 1 mGluR の mGluR 1 と mGluR 5 の両者の C 末細胞内領域と特異的に結合する事を見だし、さらに yeast two-hybrid assay と GST 融合蛋白質を用いた実験によって、group 1 mGluR C 末細胞内領域の相同性の高い約 30 アミノ酸残基が、Siah-1 A の C 末端側 2/3 の部分と結合することを示した。又、group 1 mGluR における Siah-1 A との結合部位と、Ca<sup>2+</sup>/calmodulin との結合部位がほぼ一致し、Siah-1 A との結合は、calmodulin によって Ca<sup>2+</sup> 依存性の競合的な阻害をうけることを、GST 融合蛋白質を用いた実験により明らかにした。また、myc-Siah-1 A と、flag tag を付加した mGluR 1 C 末細胞内領域を共発現させた COS-7 細胞抽出液の免疫沈降によって、myc-Siah-1 A と mGluR 1 C 末細胞内領域が細胞内でも結合していることを明らかにした。

以上の研究結果は、Siah-1 A と Ca<sup>2+</sup>/calmodulin による group 1 mGluR の新しい調節機構を示し、神経系の研究に貢献する所が大きいと考えられる。

したがって、本論文は博士 (医学) の学位論文として価値あるものと認める。

なお、本学位授与申請者は、平成 11 年 6 月 22 日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。