

氏 名	しの はら よし あき 篠 原 良 章
学位(専攻分野)	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	医 博 第 2423 号
学位授与の日付	平 成 14 年 1 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	“Glutamate induces focal adhesion kinase tyrosine phosphorylation and actin rearrangement in heterologous mGluR1-expressing CHO cells via calcium/calmodulin signaling” (グルタミン酸は mGluR1 を発現させた CHO 細胞でカルシウム, カルモジュリンを介して接着斑キナーゼをチロシンリン酸化し, アクチンを再構成する)
論文調査委員	(主 査) 教 授 月 田 承 一 郎 教 授 成 宮 周 教 授 中 西 重 忠

論 文 内 容 の 要 旨

近年 G タンパク共役型受容体による細胞内タンパクのチロシンリン酸化に関して多くの報告がなされている。しかし中枢神経系における主要な G タンパク共役型受容体である代謝型グルタミン酸受容体 (mGluR) によるチロシンリン酸化に関してはあまり研究が進んでいない。中枢神経系においてはタンパク質のチロシンリン酸化が神経の回路形成や可塑性において重要であることは広く知られているので, 代謝型グルタミン酸受容体によるタンパク質リン酸化を解析することは, 神経情報伝達物質による神経回路形成や可塑性の制御機構の解明に繋がるものと考ええる。

実験の系としてはグループ 1 の mGluR1 あるいは mGluR5 を発現する培養細胞を用いた。このグループの受容体は G タンパクを介してホスホリパーゼ C (PLC) を活性化し, 細胞内カルシウムの上昇とプロテインキナーゼ C (PKC) の活性化を行う。これらの細胞をグルタミン酸により刺激することにより複数のタンパクがチロシンリン酸化を受けたが, 125kD 付近に顕著なリン酸化を受けるタンパクを見出し, それが接着因子である接着斑キナーゼ (Focal Adhesion Kinase = FAK) であることを同定した。さらに FAK がグルタミン酸刺激の時間および濃度依存的にリン酸化を受けることを確認した。

そこで代謝型グルタミン酸受容体が刺激を受けると, いかなるシグナリングにより FAK を活性化するかを阻害剤を用いて解析することにした。PLC 阻害剤の U73122, PKC 阻害剤の GF109203X, カルシウム阻害剤の thapsigargin や BAPTA-AM の効果から, PKC を阻害しても FAK のリン酸化は影響を受けないが, PLC 活性化に伴う細胞内カルシウムの上昇が FAK のリン酸化に必要であることを示した。これは G タンパク共役型受容体を介した FAK の活性化機構としては新しいものである。

そこでカルシウムによって制御され, 中枢神経系で重要な働きを持つシグナル伝達分子であるカルモジュリンの効果を 2 つの作用機序の異なるカルモジュリン阻害剤である calmidazolium と fluphenazine を用いて検証したところ, この両者とも FAK のリン酸化を効果的に抑制した。ところが, カルモジュリンの主要なターゲット分子である CaMKII を KN-62 で抑制しても効果がなかった。つまり, 代謝型グルタミン酸受容体刺激による FAK リン酸化にはカルシウムとカルモジュリン両方が必須であるが, PKC や CaMK II の活性化は必要ないと結論した。

最後に, FAK が代謝型グルタミン酸受容体を介してリン酸化された後, それが細胞に与える影響を細胞刺激後にアクチン繊維を染色して検証した。FAK はリン酸化されるとアクチン繊維の再構成を引き起こすことが知られており, この実験でもアクチンの再構成が非常に効果的に引き起こされることを証明した。さらに, 上記のリン酸化のアッセイで有効であった薬剤は, この再構成も打ち消すことが確認できた。従って, 代謝型グルタミン酸受容体は FAK を介して細胞骨格を再構築することが強く示唆された。

この実験はグルタミン酸受容体を培養細胞に発現させた系であるが、FAK は脳に他の組織と比較して多量に発現しているので、同様に中枢神経でアクチン繊維の再構成を促して growth cone の運動や dendrite の spine の形態変化をもたらすことが十分に予想できる。このことから、以上に示した情報伝達経路がグルタミン酸受容体を介した神経回路網の制御に重要な役割を果たしていると考えられる。

論文審査の結果の要旨

本論文は代謝型グルタミン酸受容体 mGluR1 および mGluR5 を発現させた CHO 細胞を用いて、これらの受容体の活性化以降の細胞内シグナリング機構を解析したものである。上記受容体を発現させた細胞をグルタミン酸で刺激すると接着斑キナーゼ (FAK) が濃度依存的にチロシンリン酸化されることを示した。さらに、阻害剤を用いた解析によって、この細胞内情報伝達はホスホリパーゼ C の活性化、次いで細胞内のカルシウムの上昇、さらにカルモジュリンの活性化が必要であるが、一方プロテインキナーゼ C 及びカルモジュリン依存性プロテインキナーゼ II の活性化を必要としないことを明らかにした。FAK のチロシンリン酸化はアクチン繊維の再構成を引き起こすが、上記細胞をグルタミン酸刺激すると、アクチンの再構成が起こること、さらにこの再構成は代謝型グルタミン酸受容体による FAK のリン酸化と同じ薬理的特性を示すことを示した。上記の結果から、代謝型グルタミン酸受容体は FAK を介して細胞のアクチン繊維の再構成を生じさせると結論された。

以上の研究は、代謝型グルタミン酸受容体の新しい細胞内シグナリング機構を明らかにしたものであり、神経科学の研究に寄与するところが大い。従って本論文は博士 (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13年11月29日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められた者である。