

学 位 審 査 報 告 書

(ふ り が な) 氏 名	やながわ まさたか 柳川 正隆
学位 (専攻分野)	博 士 (理 学)
学 位 記 番 号	理 博 第 号
学位授与の日付	平成 年 月 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	理学研究科 生物科学専攻
(学位論文題目) 代謝型グルタミン酸受容体の膜貫通領域における活性化制御機構の解析	
論 文 調 査 委 員	(主査) 七田芳則 教授 (准教授・講師) 平野丈夫 教授 (") 高田彰二 准教授 (")

理 学 研 究 科

(続紙 1)

京都大学	博士 (理学)	氏名	柳川 正隆
論文題目	代謝型グルタミン酸受容体の膜貫通領域における活性化制御機構の解析		
(論文内容の要旨) 代謝型グルタミン酸受容体 (mGluR) は我々の記憶や学習、感覚情報処理の基盤となるシナプス伝達制御に重要な役割を果たす G 蛋白質共役型受容体 (GPCR) であり、様々な神経疾患の治療薬の標的分子としても注目されている。mGluR はすべての GPCR に共通する七回膜貫通領域に加え、細胞外に大きなリガンド結合ドメインを持ち、構造的に二量体を形成して機能する。mGluR の細胞外領域は X 線結晶構造解析により構造が解かれており、グルタミン酸結合に伴う二量体の配向変化が受容体の活性化に関わることが詳細に議論されている。しかしながら、その細胞外領域の構造変化がいかにして膜貫通領域へと伝わり、G 蛋白質活性化に結びつくのかについての分子機作は不明である。そこで本研究では、mGluR の膜貫通領域における活性化制御機構の解明を目的とし、網羅的な変異体解析および蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET) を利用した構造変化解析を行った。 まず、申請者は mGluR の膜貫通領域の網羅的な変異体解析を行い、複数の構造的活性化変異 (CAM) を同定した。また、それらの CAM を組み合わせた二重変異体解析を通じて mGluR の活性化制御を担うアミノ酸残基間相互作用を探索した。その結果、mGluR のヘリックス III, V においてそれぞれ保存されるチロシン-スレオニン残基間の相互作用が、アゴニスト依存的な細胞外領域の構造変化を G 蛋白質活性化能に変換する活性化スイッチとして機能していることが示された。さらに、ヘリックス V において蛋白質の外側にも CAM 部位が同定され、ヘリックス V を介したプロトマー間相互作用が G 蛋白質活性化能の制御に関与していることが示唆された。そこで、mGluR の各細胞質ループ領域に蛍光蛋白質を挿入し、網羅的な FRET 解析を行うことで各ループ間距離の相対関係、およびそのグルタミン酸依存的な変化を解析した。その結果、膜貫通領域の二量体配置および活性化過程における配置転換が推定され、ヘリックス V が二量体のインターフェース形成に関わり、グルタミン酸結合に伴い 2 つのプロトマーが互いに近づくことが示唆された。さらに、一方の細胞外領域にリガンド結合能を欠損させる変異を入れたヘテロ二量体の FRET 解析から、2 つのグルタミン酸結合が相乗的に膜貫通領域の配置転換を促すことが示された。 以上の結果を総合すると、次のような mGluR の活性化機構が推定される。まず、グルタミン酸結合に伴い細胞外領域の二量体の配向変化が生じる。この配向変化に伴い、膜貫通領域において二量体の配置転換が生じ、インターフェースを形成しているヘリックス V の様態が変化する。ヘリックス V の様態変化が各プロトマー内側に伝播し、ヘリックス III-V 間に形成される活性化スイッチが切り替わる。最終的に、G 蛋白質との相互作用部位が細胞質側に提示され、G 蛋白質が活性化される。さらに、この一連の構造変化を 2 つのグルタミン酸結合が相乗的に制御することで、グルタミン酸刺激に対する高い応答を実現していることが示唆された。			

(論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨)

代謝型グルタミン酸受容体 (mGluR) は G タンパク質共役型受容体 (GPCR) のファミリー 3 に属するメンバーであり、すべての GPCR に共通する 7 回膜貫通 α -ヘリックス領域に加えて、細胞外に大きなリガンド結合領域を持つのが特徴である。mGluR は、我々の記憶や学習、感覚情報処理の基礎となるシナプス伝達制御に重要な役割を果たすことから、その構造・機能相関に関する研究が切望されてきた。これまでの研究から、細胞外のリガンド結合領域に関して X 線結晶解析が行われ、グルタミン酸の結合に伴う二量体構造の配向変化により、mGluR が G タンパク質を活性化する状態になると想像されてきた。一方、G タンパク質と相互作用する領域は細胞内領域にあり、細胞外に結合したグルタミン酸のシグナルが膜貫通領域のどのような構造変化を誘起して最終的に G タンパク質を活性化する構造になるのかについては、今後の問題として残されていた。このような状況で、本研究では、グルタミン酸結合により誘起される膜貫通領域の構造変化について、網羅的な変異体解析と蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET) 法を利用して解析した。

GPCR についてのこれまでの研究から、GPCR の特定のアミノ酸残基に変異を加えると、GPCR の活性状態への構造変化を模倣することができることがわかっていった。そこで、本研究では mGluR の膜貫通領域に網羅的に変異を入れ、活性状態を模倣するアミノ酸残基の変異 (CAM 変異) を選び出すことを試みた。その結果、ヘリックス V に存在するアミノ酸残基とヘリックス III に存在するアミノ酸残基とが相互作用しており、このペアの相互作用の変化が、mGluR 自身の活性状態への変化のスイッチとなっていることを発見した。また、ヘリックス V には mGluR の分子間の相互作用変化に関与するアミノ酸残基のあることを発見した。さらに、FRET 法を利用して mGluR ダイマー間の動きを測定した結果、ダイマーはそれぞれの mGluR のヘリックス V 間で近接して存在し、細胞外領域へのグルタミン酸の結合によって、両者の距離が変化することにより、それぞれの mGluR 分子の構造変化が誘起され、活性状態になることを発見した。以上の結果は、mGluR の機能発現の研究に重要な知見を与えると評価できる。

よって、本論文は博士 (理学) の学位論文として価値あるものと認める。また、平成 23 年 1 月 25 日に論文内容とそれに関連した事項について試問を行った結果、合格と認めた。