

氏 名	矢 和 多 智
学位(専攻分野)	博 士 (理 学)
学 位 記 番 号	理 博 第 3076 号
学位授与の日付	平 成 18 年 5 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	理 学 研 究 科 生 物 学 専 攻
学 位 論 文 題 目	小脳長期抑圧におけるイオン透過型グルタミン酸受容体デルタ 2 サブユニットと PICK 1 の相互作用

論文調査委員	(主 査) 教 授 平 野 丈 夫	教 授 七 田 芳 則	教 授 藤 吉 好 則
--------	----------------------	-------------	-------------

論 文 内 容 の 要 旨

小脳は運動制御・運動学習に関わる脳部位である。運動学習の細胞レベルでの一基礎過程としてプルキンエ細胞で起こる長期抑圧が知られている。グルタミン酸受容体 $\delta 2$ サブユニット (GluR $\delta 2$) は小脳プルキンエ細胞でのみ特異的に発現しており, GluR $\delta 2$ 欠損型プルキンエ細胞では長期抑圧が起こらないことが報告されている。しかしながら, GluR $\delta 2$ がどのように長期抑圧誘導に関わっているかはわかっていなかった。私は, GluR $\delta 2$ の小脳長期抑圧誘導に必要な分子内部位を明らかにすることにより, GluR $\delta 2$ の長期抑圧誘導への関与メカニズムを解明することをめざして研究を行った。

まず, GluR $\delta 2$ 欠損型プルキンエ細胞で後天的に GluR $\delta 2$ を発現させたところ, 強制発現させた GluR $\delta 2$ は野生型細胞における内在性の GluR $\delta 2$ と同様の局在を示し, またそのプルキンエ細胞では長期抑圧が回復した。この結果は, GluR $\delta 2$ が長期抑圧誘導に必須であることを支持するだけでなく, GluR $\delta 2$ が直接的に長期抑圧誘導に関与することを示唆した。次に, 細胞内 C 末領域の様々な部位を欠失させた変異 GluR $\delta 2$ を作製し, 細胞内 C 末領域各部位の欠失が長期抑圧発現に与える影響を調べた。GluR $\delta 2$ の C 末細胞内領域を徐々に短くしていったところ, 873番目のアミノ酸以降を欠失させた (C 末細胞内領域に21アミノ酸を持つ) 変異 GluR $\delta 2$ は細胞膜に局在し, その発現によって長期抑圧誘導も回復することがわかった。一方, 865番目のアミノ酸以降を欠失させた (C 末細胞内領域に13アミノ酸を持つ) 変異 GluR $\delta 2$ を発現させても, 長期抑圧が回復しないことも分かった。これらの結果から, 細胞内 C 末領域の膜貫通部位近傍領域 (865~872) が, 長期抑圧誘導に関わっていると考えた。また, この領域と EGFP を融合させたタンパク質 (SKEDDKE-EGFP) の発現や, 記録用ガラス電極から SKEDDKE の合成ペプチドを細胞内に浸透させることで, 野生型プルキンエ細胞において長期抑圧が阻害されるという結果を得た。GluR $\delta 2$ はこの部位を介して細胞膜または細胞内に存在する分子と相互作用し, その相互作用が長期抑圧誘導に必要なのではないかと推測した。GluR $\delta 2$ の細胞内領域に結合する分子はすでにいくつか同定されていた。しかしながら, 長期抑圧誘導に重要であることがわかった膜近傍領域に結合する分子はまだ報告されていなかった。そこで, この領域をベイトにしてイーストツーハイブリッドスクリーニングを行い, 結合分子を探索した。その結果, PICK1 (protein interacting with C-kinase 1) を結合分子の候補として得た。PICK1 は海馬における可塑性や小脳長期抑圧において重要な役割を果たすことが知られている分子である。小脳プルキンエ細胞において PICK1 は GluR $\delta 2$ とスパインで共局在していた。また, 共免疫沈降法により GluR $\delta 2$ は PICK1 と SKEDDKE 部位を介して結合することが明らかになった。さらに, SKEDDKE-EGFP 分子が GluR $\delta 2$ と PICK1 の結合を阻害することもわかった。これらの結果は, GluR $\delta 2$ が膜近傍領域の SKEDDKE 配列を介して PICK1 と結合し, それが長期抑圧の誘導において重要な役割を果たしていることを示唆している。

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

神経細胞間の情報伝達を担うシナプスでは, 神経細胞活動に依存した情報伝達効率の変化が起こることが知られており,

この現象はシナプス可塑性と呼ばれている。小脳プルキンエ細胞では長期抑圧として知られるシナプス可塑性が起こり、それは運動学習の細胞レベルでの一基礎過程と考えられている。グルタミン酸受容体 $\delta 2$ サブユニット (GluR $\delta 2$) は、プルキンエ細胞上の長期抑圧を起こす平行線維とのシナプスに局在し、長期抑圧発現に必要であることが知られていた。申請者は GluR $\delta 2$ がどのような分子機構で長期抑圧発現に関与しているかを研究した。GluR $\delta 2$ 欠損型のプルキンエ細胞では長期抑圧が起こらないことは報告されていたが、申請者は、まず GluR $\delta 2$ を欠損型プルキンエ細胞で後天的に発現させることにより長期抑圧が回復することを確認した。次に、GluR $\delta 2$ 細胞内 C 末領域の様々な部位を欠失させた変異分子を作製し、それを GluR $\delta 2$ 欠損型プルキンエ細胞で発現し、長期抑圧が回復するか否かを調べた。そして、細胞内 C 末領域151アミノ酸のうち膜近傍の21アミノ酸を持つ変異 GluR $\delta 2$ によって長期抑圧が回復することを示した。また、C 末細胞内領域に13アミノ酸をもつ変異 GluR $\delta 2$ を発現させても、長期抑圧が回復しないことも明らかにした。さらに C 末細胞内領域の14から20番目のアミノ酸と EGFP を融合させたタンパク質 (SKEDDKE-EGFP) の発現や、記録用ガラス電極から SKEDDKE の合成ペプチドを細胞内に浸透させることで、野生型プルキンエ細胞において長期抑圧が阻害されることも示した。これらの結果から、細胞内 C 末領域の膜貫通部位近傍領域 (865~872) の SKEDDKE 配列が、長期抑圧誘導に関わっており、GluR $\delta 2$ はこの部位を介して細胞膜または細胞内に存在する分子と相互作用し、その相互作用が長期抑圧誘導に必要なのではないかと推測した。GluR $\delta 2$ の細胞内領域に結合する分子はいくつか同定されていたが、今回長期抑圧誘導に重要であると同定した膜近傍領域に結合する分子は報告されていなかった。そこで、この領域をベイトにしたイーストツーハイブリッドスクリーニングを行い、PICK1 (protein interacting with C-kinase 1) を結合分子候補として得た。小脳プルキンエ細胞において PICK1 は GluR $\delta 2$ とスパインで共局在し、また共免疫沈降法により GluR $\delta 2$ は PICK1 と SKEDDKE 配列を介して結合することを示した。これらの結果は、GluR $\delta 2$ が C 末細胞内膜近傍領域の SKEDDKE 配列を介して PICK1 と結合し、それが長期抑圧誘導において重要な役割を果たしていることを示唆している。

本研究は、運動学習の一細胞機構と推定されている長期抑圧発現の分子メカニズム解明に寄与する重要な成果と評価できる。したがって、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られる。また、論文内容とそれに関連した試問を行い、合格と認めた。