

氏 名	木 村 幸 司
学位(専攻分野)	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	医 博 第 2786 号
学位授与の日付	平 成 16 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	Hyperpolarization - activated, cyclic nucleotide - gated HCN2 cation channel forms a protein assembly with multiple neuronal scaffold proteins in distinct modes of protein-protein interaction (Hyperpolarization-activated, cyclic nucleotide-gated HCN2 陽イオンチャネルは、別個のタンパク-タンパク結合様式で複数の神経足場タンパクとタンパク複合体を形成する)
論文調査委員	(主 査) 教 授 月 田 承 一 郎 教 授 大 森 治 紀 教 授 井 出 千 東

論 文 内 容 の 要 旨

過分極応答陽イオン電流 (H 電流) は、ペースメーカー活動、静止膜電位の調節、樹状突起での情報統合等の生理機能に寄与する。特に H 電流は、神経細胞の樹状突起に沿って細胞体からの距離が増えるにつれ電流密度が増す不均一な分布を示し、入力位置の空間的違いから生ずる時間的な違いを調節する上で重要な役割を果たすと考えられている。しかし、H 電流を担うイオンチャンネル hyperpolarization-activated, cyclic nucleotide-gated cation channels (HCNs) の分布の違いを生じさせる分子機構は不明である。

Tamalin は、PDZ ドメイン等のタンパク結合部位をもち、代謝型グルタミン酸受容体等とタンパク複合体を形成する。申請者は、HCN2 が、tamalin 結合配列 (PDZ モチーフ) を C 末端に有することを見出し、両者の結合を yeast two hybrid assay にて検討したところ、HCN1-4 のうち、HCN2 導入酵母のみがレポーター活性を示し、結合することを示した。さらに両者の結合を共免疫沈降法を用い、COS-7 細胞中でタンパク複合体を形成することを確認した。

イオンチャネルは、多種のタンパクと複合体を形成し、一方 tamalin も種々の足場タンパクと結合する。そこで HCN2 が tamalin 複合体の足場タンパクと結合するか否かを、脳膜画分を用いた免疫沈降法で検討した。その結果、tamalin 結合分子のうち、S-SCAM、Mint2 が、HCN2 とタンパク複合体を形成することを示した。また、COS-7 細胞中で HCN2 と S-SCAM ないし Mint2 が同じタンパク複合体にあることを免疫沈降法にて確認した。

次に各足場タンパクの HCN2 結合部位を検討するため、各足場タンパクを分割した GST 融合タンパクを大腸菌から精製し、COS-7 細胞に発現させた HCN2 との結合を in vitro 結合実験にて検討した。その結果、HCN2 結合部位は tamalin の PDZ ドメインを含む領域、S-SCAM の PDZ ドメイン5、又 Mint2 の munc18 結合ドメインを含む領域であることを示した。一方、HCN2 の各足場タンパク結合部位を明らかにするため、各足場タンパクの HCN2 結合部位の GST ないし MAL 融合タンパクを、大腸菌から精製し、COS-7 細胞に発現させた HCN2 全長、欠失変異体を用い、in vitro 結合実験を行った。tamalin の PDZ ドメインは、HCN2 の PDZ 結合モチーフ及びカルボキシル末で結合し、一方 S-SCAM の PDZ ドメインは、HCN2 の cyclic nucleotide-binding domain (CNBD) とその下流において結合する。HCN2 と Mint2 との結合は、Mint2 の munc18 結合ドメインと HCN2 の CNBD の下流領域で形成されることが判った。

興味深いことに Mint2 を培養細胞に共発現すると HCN2 のタンパク量が Mint2 発現量依存的に増加することを見出した。この増加は、Mint2 結合部位欠損 HCN2 変異体では認められず、Mint2 との結合が必須であることが示唆された。

足場タンパクは、チャンネルの輸送、局在及び安定性を制御する上で重要である。本研究は、HCN2 が複数の足場タンパク tamalin、S-SCAM、Mint2 と異なった部位で異なった様式によってタンパク集合を形成していることを示しており、足場タンパクによる HCN2 機能調節の可能性を示唆している。

論文審査の結果の要旨

Hyperpolarization-activated, cyclic nucleotide-gated cation channel (HCN) は I_h 電流を誘発し、神経細胞の神経伝達の制御を含む幅広い生理機能を有するがその特異的な細胞膜局在のメカニズムは不明である。

申請者は、脳抽出液及び細胞発現系において HCN2 が脳の足場タンパクである tamalin, Mint2, S-SCAM とタンパク複合体を形成することを明らかにした。さらに GST 或いは MAL との融合タンパクを用いた *in vitro* タンパク結合系を用いて HCN2 は tamalin, S-SCAM, Mint2 と異なった部位で異なった様式によって結合すること、特に tamalin, S-SCAM のいずれも、HCN2 の環状ヌクレオチドが結合する cyclic-nucleotide binding domain (CNBD) 領域と結合することを明らかにし、足場タンパクを介した I_h 電流の環状ヌクレオチドによる調節の可能性を示唆した。

以上の結果は、HCN2 が神経の足場タンパクとタンパク複合体を形成することを始めて示したものであり、神経科学の発展に寄与する所が大きい。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16年6月29日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。