

平成 23 年 6 月 13 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20500292

研究課題名(和文)

デルタ2グルタミン酸受容体の新たなシグナル伝達機構 N末端、C末端領域の機能解析  
 研究課題名(英文) Functional analysis of GluD2 signal transduction

研究代表者

幸田 和久 (KOHDA KAZUHISA)

慶應義塾大学・医学部・講師

研究者番号：40334388

研究成果の概要(和文):

$\delta 2$  グルタミン酸受容体は長らくその機能が不明であった。我々は、細胞外 N 末端及び細胞内 C 末端の変異体を  $\delta 2$  グルタミン酸受容体欠損マウスにシンドビスウイルスによって導入し、表現型回復法による解析を行なうことで、細胞外 N 末端はシナプス形成・維持には関与するが、長期抑圧の誘導には関与しないことを明らかにした。また細胞内 C 末端は PTPMEG と結合し、PTPMEG による 2 型グルタミン酸受容体の脱リン酸化が LTD 誘導に必要であることが分かった。

研究成果の概要(英文):

We performed functional analysis of the  $\delta 2$  glutamate receptor ( $\delta 2$ ) through phenotype-rescue method. By transducing an N-terminal mutant of  $\delta 2$  into  $\delta 2$ -null Purkinje cells, we demonstrated that the extracellular N-terminal region of  $\delta 2$  was indispensable for parallel fiber (PF)-Purkinje cell (PC) synapse formation and/or maintenance, but not for long-term depression (LTD), a form of plasticity in PF-PC synapses. We also found that PTPMEG, a tyrosine phosphatase interacting with the C-terminal region of  $\delta 2$ , dephosphorylated type-2 glutamate receptors in the induction of LTD.

交付決定額

(金額単位:円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：神経科学・神経科学一般

キーワード：デルタ2グルタミン酸受容体、長期抑圧、小脳、シナプス可塑性

1. 研究開始当初の背景

(1)  $\delta 2$  グルタミン酸受容体 ( $\delta 2$  受容体) は、プルキンエ細胞樹状突起に特異的に発

現しているグルタミン酸受容体で、 $\delta 2$  受容体遺伝子欠損マウスの解析から、平行線

維 プルキンエ細胞間シナプスの形成・維持及びその可塑性に必須であることが明らかになっているが、 $\delta 2$  受容体を特異的に活性化あるいは阻害する薬剤が存在しないために、どのような分子機構によってこれらの機能を発揮するのかは長年の謎であった。

(2) 申請者らは近年この問題に対して、異常表現型回復法という新しいアプローチ法を適用した。すなわち、ウイルスベクターやトランスジェニックマウスによって、様々な部位に変異を導入した $\delta 2$  受容体を $\delta 2$  受容体欠損プルキンエ細胞に導入し、異常表現型(シナプス可塑性や形態障害)が回復するかどうかを検討することにより、 $\delta 2$  受容体の構造活性相関を決定した。

## 2. 研究の目的

$\delta 2$  受容体の各モジュールごとの変異体を作成し、表現型回復法により、 $\delta 2$  受容体の機能を解明する。特に細胞内 C 末端部位に関しては、その下流に想定されるシグナル伝達分子を同定し、解析を行なう。

## 3. 研究の方法

(1) シンドビスウイルスを用いた遺伝子導入

(2) 急性スライス切片を用いた電気生理学的解析

(3) *in vitro* 系におけるタンパク質のリン酸化・脱リン酸化の解析

(4) 電子顕微鏡によるシナプスの形態の解析

(5) 瞬目条件付け等の行動解析

## 4. 研究成果

(1) 細胞外 N 末端領域の機能解析

$\delta 2$  受容体の LIVBP ドメインの *in vivo* で機能を明らかにするために、LIVBP ドメインの欠失変異体を、シンドビスウイルスベクターを用いて $\delta 2$  受容体欠損プルキンエ細胞に導入し、表現型回復法により解析を行なったところ、非常に興味深いことに、 $\delta 2\Delta$ LIVBP は LTD を回復させたが、形態的なシナプスの異常は回復させなかった。このことは $\delta 2$  受容体の N 末端のシナプス形成能と C 末端のシナプス可塑性誘導能とが、1 分子の中で乖離していることを示している。

(2) 細胞内 C 末端領域の機能解析

$\delta 2$  受容体の細胞内 C 末端を介した PDZ タンパクとの結合が、長期抑圧 (LTD) 誘導に必要であることを我々は既に明らかにしているが、特に PTPMEG との相互作用が必要であることを、シンドビスウイルスを用いた PTPMEG 及びその変異体の導入によって示した。チロシン脱リン酸化酵素である PTPMEG の基質を、substrate trap 法によって探索したところ、2 型グルタミン酸受容体 (GluR2) がその 1 つであることが分かった。即ち、小脳 LTD の誘導において、GluR2 のチロシン残基の脱リン酸化の必要性を我々は初めて明らかにした。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計5件)

1. Kakegawa W, Miyoshi Y, Hamase K, Matsuda S, Matsuda K, Kohda K, Emi K, Motohashi J, Konno R, Zaitzu K, Yuzaki M. D-Serine regulates cerebellar LTD and motor coordination through the delta2 glutamate receptor. Nat Neurosci 14: 603-6011, 2011 (査読あり)
2. Emi K, Kohda K, Kakegawa W, Yuzaki M. A New Rapid Protocol for Eyeblink Conditioning to Assess Cerebellar Motor Learning. Neurochemical Res 2011 [E-pub ahead of print] (査読あり)
3. Kakegawa W, Miyazaki T, Kohda K, Matsuda K, Emi K, Motohashi J, Watanabe M, Yuzaki M. The N-terminal domain of GluR2 (GluRδ2) recruits presynaptic terminals and regulates synaptogenesis in the cerebellum in vivo J Neurosci 29: 5738-48, 2009 (査読あり)
4. Kakegawa W, Miyazaki T, Emi K, Matsuda K, Kohda K, Motohashi J, Mishina M, Kawahara S, Watanabe M, Yuzaki M. Differential regulation of synaptic plasticity and cerebellar motor learning by the C-terminal PDZ-binding motif of GluRdelta2. J Neurosci 28: 1460-68, 2008 (査読あり)

5. Nakagami, R., Kohda, K., Kakegawa, W., Kondo, T., Kato, N., and Yuzaki, M., Phosphorylation of delta2 glutamate receptors at serine 945 is not required for cerebellar long-term depression. Keio J Med 57:105-110, 2008 (査読あり)

[学会発表](計4件)

1. 野村 寿博、掛川 渉、松田 信爾、幸田 和久、柚崎 通介 小脳長期抑制と TARP による制御 第33回日本神経学会 2010年9月4日、神戸
2. 江見 恭一、三浦 会里子、掛川 渉、幸田 和久、渡辺 雅彦、柚崎 通介 瞬目条件付け学習の消去と保持には平行線維 プルキンエ細胞シナプスは関与しない Cbln1 欠損マウスを用いた解析 第32回日本神経科学会 2009年9月16日、名古屋
3. 江見恭一、石田綾、近藤哲郎、幸田和久、柚崎通介 Cbln1 欠損マウスにおける瞬目条件付け学習障害は成熟後の Cbln1 投与により急速に回復する 第31回日本神経科学会 2008年7月11日、東京
4. 掛川渉、幸田和久、柚崎通介 内在性 D-セリンは NMDA 受容体とデルタ 2 受容体を介して小脳 LTD を制御する 第31回日本神経科学会 2008年7月10日、東京

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

幸田 和久 (KOHDA KAZUHISA)

慶應義塾大学・医学部・講師

研究者番号：40334388

### (2) 研究分担者

江見 恭一 (EMI KYOICHI)

慶應義塾大学・医学部・研究員(非常勤)

研究者番号：70468495

### (3) 連携研究者

なし