

Lurcher 型変異を用いたグルタミン酸受容体 δ サブユニットのチャネル特性解析

新潟大学脳研究所細胞神経生物学分野（主任：崎村建司教授）

池野 観 寿

The Lurcher Mutation Reveals Ca^{2+} Permeability and PKC
Modification of the GluR δ Channels

Kanju IKENO

*Department of Cellular Neurobiology,
Brain Research Institute, Niigata University
(Director: Prof. Kenji SAKIMURA)*

The physiological function of the GluR δ subfamily which is one of the glutamate receptor channel subunits has not yet been clarified, because no GluR channel activity was detected in heterologous expression systems. The Lurcher mutation, a point mutation of the GluR δ 2 subunit, converts it into a functional channel. We introduced this mutation into GluR δ , AMPA- and NMDA-type GluR channel subunits, and characterized their channel properties. It was shown that the Lurcher mutation exerts effects only on the AMPA- and NMDA-type channel gating, but not on their ionic channel permeabilities. These findings support the idea that the Lurcher mutant GluR δ 1 and GluR δ 2 channels are permeable to Ca^{2+} , reflecting their original channel properties. It was also found that the ionic permeability of the mutant GluR δ 1 channels was modulated by TPA.

Key words: グルタミン酸受容体 δ サブユニット, Ca^{2+} 透過性, Lurcher, PKC

1. はじめに

グルタミン酸受容体（以下 GluR）チャネルは、脊

椎動物の中樞神経系において速い興奮性シナプス伝達を仲介する事が知られている。GluR チャネルを構成するサブユニットは、アミノ酸配列の相同性によって、7

Reprint requests to: Kanju IKENO,
Department of Cellular Neurobiology,
Brain Research Institute,
Niigata University Niigata City,
951-8585 JAPAN.

別刷請求先： 〒951-8585 新潟市旭町通1番町
新潟大学脳研究所細胞神経生物学分野

池野 観 寿

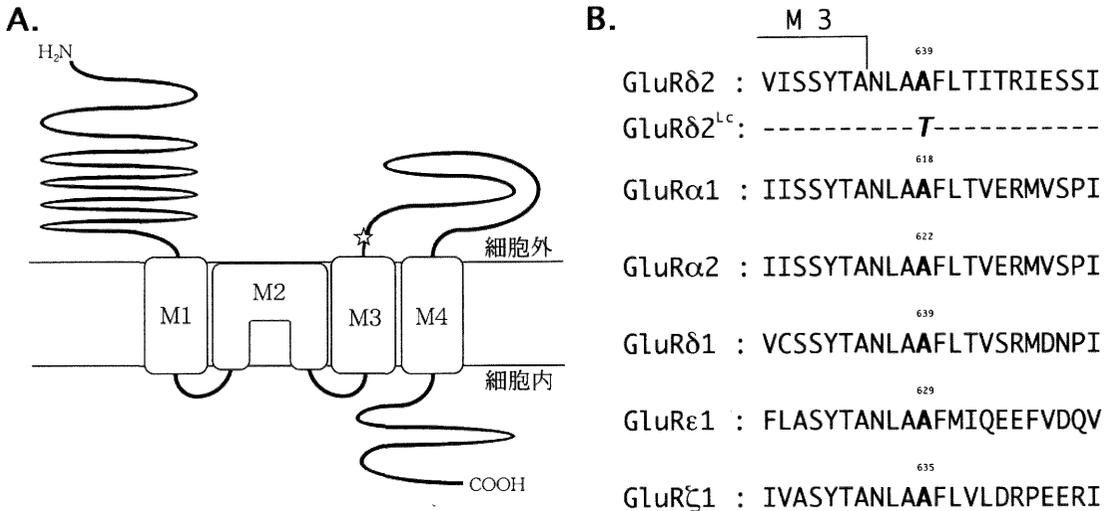


図1 Lurcher マウスで同定されたグルタミン酸受容体 δ 2 サブユニットの変異。

- A. Lurcher マウス中のグルタミン酸受容体 δ 2 サブユニットの変異の概略図。Lurcher 型変異 (☆) は δ 2 サブユニットの M3 領域の C 末側に生じている。
- B. Lurcher 型変異部位の周辺のグルタミン酸受容体のアミノ酸配列。Lurcher 型変異は、G 1915 A 置換がマウスの 639 番目のアラニン残基をスレオニン残基に変化させる事に起因する。部位特異的突然変異誘発法を用いて、 δ 2, α 1, α 2, δ 1, ϵ 1 及び ζ 1 サブユニット cDNA のそれぞれ 1915, 1852, 1864, 1915, 1885 及び 1903 番目のグアニンをアデニンに置換する事により、それぞれ 639, 618, 622, 639, 629 及び 635 番目のアラニン残基からスレオニン残基へ置換した。

つのサブファミリー、 α (GluR 1-4), β (GluR 5-7), γ (KA), δ , ϵ (NR 2), ζ (NR 1), χ (NR 3) に分けられる。これらは、薬理学的、電気生理学的な特徴によって、 α サブユニットは AMPA 型に¹⁾²⁾, β , γ サブユニットはカイニン酸型に²⁾⁴⁾, ϵ , ζ , χ は NMDA 型に²⁾⁵⁾¹⁰⁾ 分類される。一方、 δ サブユニットは、アフリカツメガエルの卵母細胞や哺乳類の細胞に、単独あるいは他の GluR チャネルサブユニットと一緒に発現させても、チャネル活性を検出する事ができず、また特異的に結合するリガンドも未だ明らかでない。そのため、 δ サブユニットはどのサブファミリーにも分類されず、その機能は未だ不明である¹¹⁾。しかし、GluR δ 2 遺伝子のノックアウトマウスの解析により、 δ 2 サブユニットが協調運動、平行線維-Purkinje 細胞間シナプスと登上線維-Purkinje 細胞間シナプスの形成、平行線維-Purkinje 細胞間シナプス伝達の長期抑圧 (LTD) に関与している事が示されている¹²⁾¹⁴⁾。また *in vitro* の実験で、 δ 2 サブユニット遺伝子に対するアンチセンスオリゴヌクレオチドが、LTD 誘導を抑制す

る事が示されている¹⁵⁾ ので、 δ 2 サブユニットは重要な生理機能的を担っていると考えられる。

近年、Lurcher 変異マウスの原因遺伝子が、自然発生的に点変異を起こした GluR δ 2 サブユニット遺伝子である事が明らかにされた (図 1)¹⁶⁾。この変異 GluR δ 2 サブユニットは、持続的に開口するチャネルを形成する。この変異が、チャネルポアに近くかつ GluR サブユニット間で保存された領域に生じている事から、私はこの変異がチャネル開口にのみ関与していると仮定した。もしこの仮定が正しければ、Lurcher 型変異 δ サブユニットチャネルのイオン透過性などのチャネル特性は野生型のものを反映している事になり、野生型 δ サブユニットの機能を推定できると考えた。本論文では、この仮定を証明するために、チャネル特性の明らかな AMPA 型及び NMDA 型受容体チャネルに Lurcher 型変異を導入し検証を行う。更に δ サブユニットチャネルの特性について、電気生理学的解析に基づいて考察する。

2. 材料及び方法

1. 変異 GluR サブユニットの作成

GluR $\alpha 2$ ¹⁾ と、GluR $\delta 1$ ¹⁷⁾ 及び GluR $\delta 2$ ¹¹⁾ サブユニット cDNA のコーディング領域をそれぞれ、プラスミド pSPT1¹⁸⁾ と、pSP35T¹⁹⁾ の *NcoI*-*XbaI* の間に挿入し、プラスミド pSPGR $\alpha 2$ と、pSPGR $\delta 1$ 及び pSPGR $\delta 2$ を作製した。図1B に示されるように、プラスミド pSPGR 1¹⁾, pSPGR $\alpha 2$, pSPGR $\delta 1$, pSPGR $\delta 2$, pSPGR $\epsilon 1$ ²⁰⁾, pSPGR $\zeta 1$ ¹⁸⁾ に、PCR による部位特異的突然変異誘発法²¹⁾ を用いて Lurcher 型変異 (Lc) を導入し、それぞれプラスミド pSPGR $\alpha 1$ Lc, pSPGR $\alpha 2$ Lc, pSPGR $\delta 1$ Lc, pSPGR $\delta 2$ Lc, pSPGR $\epsilon 1$ Lc, pSPGR $\zeta 1$ Lc を作製した。DNA シークエンシングにより、Lurcher 型変異の導入と、正確な PCR の実行を確認した。

2. 電気生理学的機能解析

サブユニット特異的 mRNA は、cap dinucleotides 7mGpppG 及び SP6 RNA polymerase (Ambion MEGAscript) を用いて、*in vitro* で合成した。各サブユニット特異的 mRNA は、*Hind*III 消化で直線化した pSPGR 1 \cdot pSPGR $\alpha 1$ Lc, *NotI* 消化で直線化した pSPGR $\alpha 2$ \cdot pSPGR $\alpha 2$ Lc \cdot pSPGR $\zeta 1$ \cdot pSPGR $\zeta 1$ Lc, *EcoRI* 消化で直線化した pSPGR $\delta 1$ \cdot pSPGR $\delta 1$ Lc \cdot pSPGR $\delta 2$ \cdot pSPGR $\delta 2$ Lc \cdot pSPGR $\epsilon 1$ \cdot pSPGR $\epsilon 1$ Lc をそれぞれテンプレートとして用いて合成した。野生型もしくは変異型サブユニット特異的 mRNA は、アフリカツメガエルの卵母細胞に、単独もしくは組み合わせて注入した。 $\alpha 1$, $\alpha 1$ ^{Lc}, $\alpha 2$, $\alpha 2$ ^{Lc}, $\delta 1$, $\delta 1$ ^{Lc}, $\delta 2$, $\delta 2$ ^{Lc} サブユニット特異的 mRNA は各々、卵母細胞1個当たり約8, 約9, 約7, 約7, 約23, 約22, 約17, 約17 ng を単独で注入した。野生型または変異型 $\alpha 1$ 及び $\alpha 2$ サブユニット mRNA は、1:1 のモル比で約10 ng, 卵母細胞に注入した。野生型または変異型 $\epsilon 1$ 及び $\zeta 1$ サブユニット mRNA も、1:1 のモル比で、卵母細胞1個当たり約0.8 ng 注入した。各卵母細胞は、約19°C で2-3日間培養した後、二電極膜電位固定法で膜電位を -70 mV に固定し、全細胞電流を記録した¹⁾。イオン透過性を調べるために、120 mM *N*-methyl-D-glucamine (NMG), 0.2 mM BaCl₂, 10 mM HEPES-HCl (pH 7.2) から成る NMG 灌流液を使用した。Na⁺ の透過性を測定するために用いた Na⁺/NMG 灌流液は、

Na⁺濃度の増加に相当する NMG 濃度を減少させた。また、Ca²⁺の透過性を測定するために用いた Ca²⁺/NMG 灌流液は、NMG 灌流液中の Ca²⁺濃度を増加させ、そのイオン強度を合わせるために NMG 濃度を減少し、更に浸透圧を合わせるためにショ糖を加えた。細胞外陽イオン濃度を変化させた時の電流応答より、流入するイオンの量を推定した。この電流を、mRNA を注入しなかった卵母細胞 (□), 野生型 mRNA を注入した卵母細胞 (○) または Lurcher 型変異 mRNA を注入した卵母細胞 (●) から測定し比較する事で、陽イオン透過性を評価した。

APV, MgCl₂, MK-801 をそれぞれ、120 mM Na⁺ 灌流液中で 100 μ M, 1 mM, 1 μ M の濃度に希釈して用いた。6-cyano-7-nitroquinoxiline-2,3-dione (CNQX) を 20 mM の濃度で dimethyl sulphoxide (DMSO) に溶かし、このストックを 120 mM Na⁺ 灌流液中で 20 μ M の濃度に希釈して用いた。12-O-tetradecanoyl phorbol 13-acetate (TPA) を 20 mM の濃度で DMSO に溶かした。この DMSO ストックを NMG 灌流液中に 1 μ M の濃度に希釈して用いた⁶⁾、また、0.005 % DMSO の NMG 灌流液をコントロールとして用いた。アンタゴニストを用いた実験では、アンタゴニスト存在下と非存在下で、120 mM Na⁺ 灌流液で流れる電流の比を取った。TPA を用いた実験では、TPA もしくは mock 処理する前後の 120 mM Na⁺ 灌流液で流れる電流の比を取った。

3. 結 果

1. アゴニスト非存在下における Lurcher 型変異受容体チャネルの陽イオン透過性

Lurcher 変異マウスでは、図1に示すように、グルタミン酸受容体 $\delta 2$ サブユニットの M3 領域の C 末端側にある 639 番目のアミノ酸が、アラニン残基からスレオニン残基に置換されている。この変異は $\delta 2$ 受容体チャネルを常時開口しているチャネルに変える¹⁶⁾。この変異が GluR 間で保存された領域に生じているので、この変異を他のサブユニットに導入しても同様にチャネルを常時開口させるのではないかと考えた。そこで、変異型 δ サブユニットの機能を解析するために、SP6 プロモーター下で発現する Lurcher 型変異を導入したグルタミン酸受容体 $\delta 1$ 及び $\delta 2$ サブユニット cDNA を作製した。続いて、変異型及び野生型 δ サブユニット特異的 mRNA を合成し、アフリカツメガエルの卵母細胞にマイクロインジェクションし、二電極膜電位固定法¹⁾ に

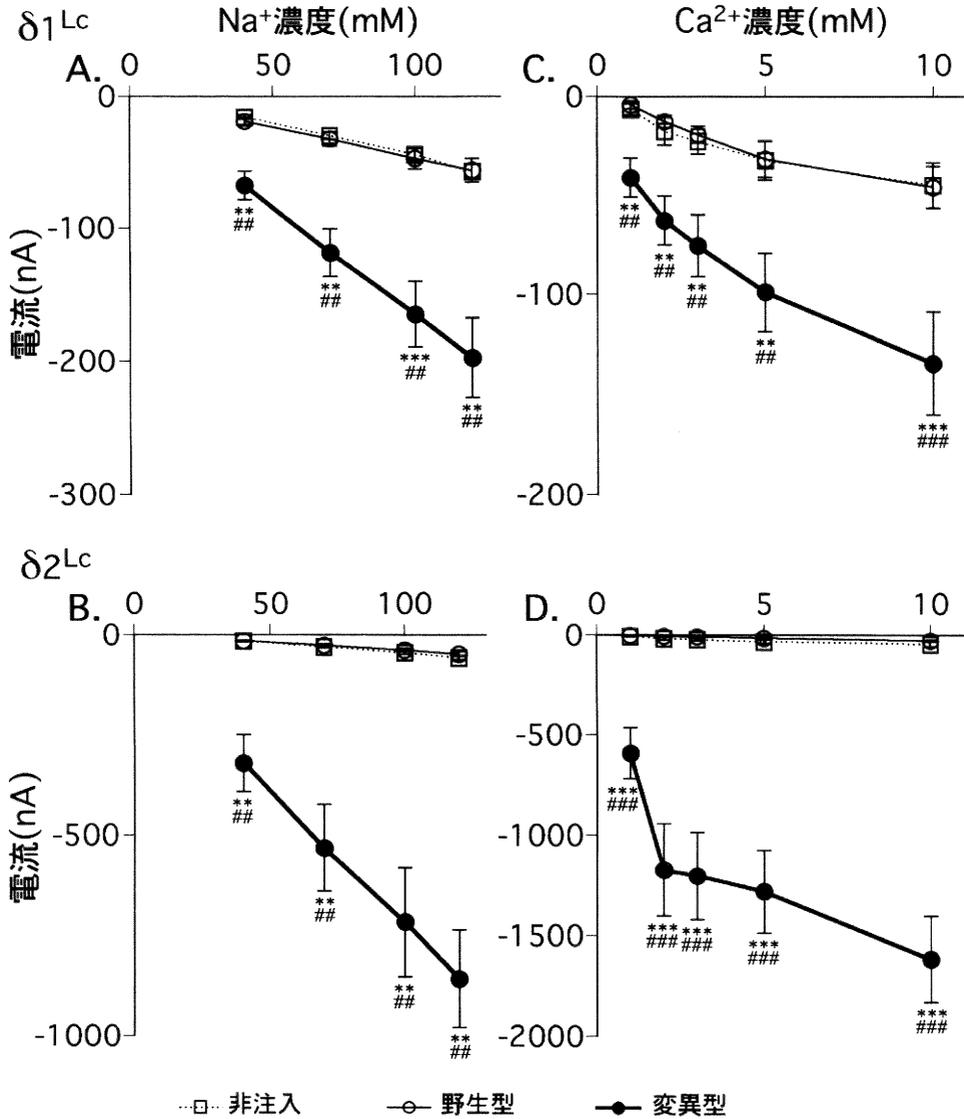


図2 Lurcher 型変異 δ サブユニットチャネルの陽イオン透過性。

アフリカツメガエルの卵母細胞に mRNA を注入した後、膜電位を -70 mV に固定し、全細胞電流を記録した。アゴニスト非存在下で、NMG 灌流液を様々な濃度の Na^+ /NMG 灌流液に置換して、卵母細胞から持続的な Na^+ 電流を記録した。A. $\delta 1^{Lc}$: 非注入, 野生型, 変異型: $n = 8, 9, 9$, B. $\delta 2^{Lc}$: 非注入, 野生型, 変異型: $n = 8, 8, 7$. NMG 灌流液を Ca^{2+} /NMG 灌流液に置換してアゴニスト非依存的電流を記録し、持続的 Ca^{2+} 透過性を評価した。C. $\delta 1^{Lc}$: 非注入, 野生型, 変異型: $n = 8, 9, 23$, D. $\delta 2^{Lc}$: 非注入, 野生型, 変異型: $n = 8, 8, 15$. 各点は平均 \pm 標準誤差を示している。* 及び *** はそれぞれ、mRNA を注入しなかった卵母細胞と比較して $p < 0.01$ 及び 0.001 である事を、# 及び ## はそれぞれ、野生型の mRNA を注入した卵母細胞と比較して $p < 0.01$ 及び 0.001 である事を示している (unpaired t-test).

よって陽イオン透過性を調べた。

灌流液を NMG 灌流液から Na^+ /NMG 灌流液に交換した時、ホモメリック $\delta 1^{\text{Lc}}$ 及び $\delta 2^{\text{Lc}}$ サブユニットを発現した卵母細胞は、アゴニストの刺激無しに、細胞外 Na^+ 濃度依存的に内向き電流を示した。その程度は、120 mM Na^+ に対して、ホモメリック $\delta 1^{\text{Lc}}$ チャンネルでは -197.6 ± 29.7 nA ($n=9$)であり、野生型 $\delta 1$ チャンネルの -56.3 ± 8.9 nA ($n=9$)、及び非注入卵の -57.4 ± 5.4 nA ($n=8$)より有意に ($p < 0.01$)大きかった (図2A)。一方、ホモメリック $\delta 2^{\text{Lc}}$ チャンネルでは -857.4 ± 121.5 nA ($n=7$)であり、野生型 $\delta 2$ チャンネルの -48.3 ± 5.4 nA ($n=8$)、及び非注入卵の -57.4 ± 5.4 nA ($n=8$)より有意に ($p < 0.001$)大きな値であった (図2B)。また、灌流液を NMG 灌流液から Ca^{2+} /NMG 灌流液に交換した時、ホモメリック $\delta 1^{\text{Lc}}$ 及び $\delta 2^{\text{Lc}}$ サブユニットを発現した卵母細胞は、アゴニストの刺激無しに、細胞外 Ca^{2+} 濃度依存的に内向き電流を示した。その程度は、10 mM Ca^{2+} に対して、ホモメリックチャンネル $\delta 1^{\text{Lc}}$ チャンネルでは -134.5 ± 25.9 nA ($n=23$)であり、野生型 $\delta 1$ チャンネルの -46.2 ± 10.6 nA ($n=9$)、及び非注入卵の -45.1 ± 11.4 nA ($n=8$)より有意に ($p < 0.01$)大きかった (図2C)。一方、ホモメリック $\delta 2^{\text{Lc}}$ チャンネルでは -1613.5 ± 213.8 nA ($n=15$)であり、野生型 $\delta 2$ チャンネルの -26.8 ± 4.2 nA ($n=8$)、及び非注入卵の -45.1 ± 11.4 nA ($n=8$)より有意に ($p < 0.001$)大きな値であった (図2D)。mRNA を注入していない卵母細胞や、野生型サブユニット mRNA を注入した卵母細胞で見られるリーク電流は、灌流液を交換する事によって能動輸送と受動的な流出入のバランスが変化した事に起因すると考えられる²²⁾。

Lurcher 型変異は、 $\delta 2$ サブユニットだけでなく、 $\delta 1$ サブユニットも常時開口するチャンネルを形成する事が明らかになった。また Ca^{2+} に対する透過性は、ホモメリック $\delta 2^{\text{Lc}}$ チャンネルよりは小さいが、ホモメリック $\delta 1^{\text{Lc}}$ チャンネルでも明らかに認められた。

もし Lurcher 型変異を導入した δ サブユニットのチャンネル特性が野生型の δ サブユニットのチャンネル特性を保持しているのならば、 δ サブユニットは Ca^{2+} を流入するチャンネルを形成する可能性がある。そこで私は、すでにチャンネル特性を調べられてきた AMPA 型及び NMDA 型受容体チャンネルサブユニットに Lurcher 型変異を導入し (図1B)、これら変異受容体チャンネルのチャンネル特性を解析した (図3, 4)。

ホモメリック $\alpha 1^{\text{Lc}}$ 受容体チャンネルは、アゴニスト非存在下で Na^+ にも Ca^{2+} にも濃度依存的な透過性を示した。その程度は、120 mM Na^+ に対しては -57.9 ± 6.1 nA ($n=34$)であり、野生型 $\alpha 1$ チャンネルの -36.5 ± 4.0 nA ($n=27$)より有意に ($p < 0.01$)、また非注入卵の -29.1 ± 2.8 nA ($n=43$)より有意に ($p < 0.001$)大きかった (図3A)。10 mM Ca^{2+} に対しては -78.8 ± 13.1 nA ($n=21$)であり、野生型 $\alpha 1$ チャンネルの -41.3 ± 9.7 nA ($n=11$)、及び非注入卵の -42.7 ± 7.7 nA ($n=15$)より有意に ($p < 0.05$)大きな値であった (図3D)。一方、ホモメリック $\alpha 2^{\text{Lc}}$ 受容体チャンネルは、アゴニスト非存在下で Na^+ も Ca^{2+} も透過性を示さなかった (図3B; 120 mM Na^+ ; 変異型: -50.7 ± 3.9 nA, $n=23$, 非注入: -40.8 ± 3.9 , $n=20$, 野生型: -49.5 ± 5.9 , $n=19$, 図3E; 10 mM Ca^{2+} ; 変異型: -42.6 ± 6.4 nA, $n=27$, 非注入: -47.5 ± 11.8 , $n=10$, 野生型: -49.3 ± 6.9 , $n=8$)。また、ヘテロメリック $\alpha 1^{\text{Lc}}/\alpha 2^{\text{Lc}}$ 受容体チャンネルでは、120 mM Na^+ に対する電流応答は -67.9 ± 12.4 nA ($n=9$)であり、野生型 $\alpha 1/\alpha 2$ チャンネルの -31.3 ± 4.3 nA ($n=12$)より有意に ($p < 0.05$)、また非注入の -21.0 ± 2.4 nA ($n=8$)より有意に ($p < 0.01$)大きく (図3C)、アゴニスト非存在下で Na^+ は濃度依存的な透過性を示した。しかし、 Ca^{2+} に対する透過性を示さなかった (図3F; 10 mM Ca^{2+} ; 変異型: -15.5 ± 2.6 nA, $n=11$, 非注入: -12.1 ± 5.9 , $n=7$, 野生型: -11.4 ± 2.9 , $n=10$)。一方、NMDA 型受容体では、変異受容体ホモメリックチャンネル $\epsilon 1^{\text{Lc}}$ 及び $\zeta 1^{\text{Lc}}$ は、アゴニスト非存在下では Na^+ も Ca^{2+} も透過しなかった (データ未掲載)が、変異 NMDA 受容体ヘテロメリックチャンネル $\epsilon 1^{\text{Lc}}/\zeta 1^{\text{Lc}}$ は、アゴニスト非存在下で Na^+ にも Ca^{2+} にも濃度依存的な透過性を示した。その程度は、120 mM Na^+ に対しては -153.2 ± 18.4 nA ($n=13$)であり、野生型 $\epsilon 1/\zeta 1$ チャンネルの -48.0 ± 16.3 nA ($n=6$)、及び非注入卵の -24.3 ± 4.7 nA ($n=6$)より有意に ($p < 0.01$)大きかった (図4A左)。10 mM Ca^{2+} に対しては -492.6 ± 111.8 nA ($n=8$)であり、野生型 $\epsilon 1/\zeta 1$ チャンネルの -30.8 ± 6.0 nA ($n=4$)、及び非注入卵の -28.8 ± 7.3 nA ($n=6$)より有意に ($p < 0.01$)大きな値であった (図4A右)。これらの結果は、アゴニスト非存在下での変異 AMPA 型及び NMDA 型受容体チャンネルの陽イオン透過性が、アゴニスト存在下の野生型の陽イオン透過性^{7) 23)}と変わらない事を示している。次

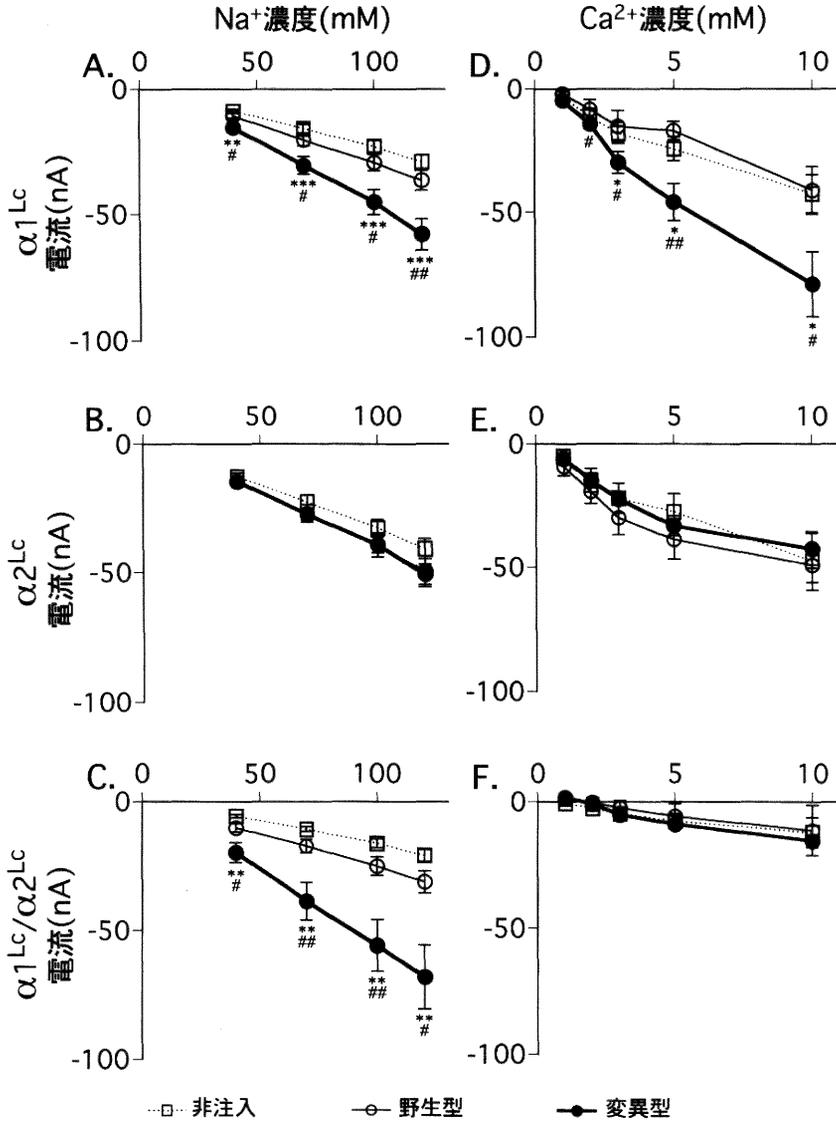


図3 Lurcher 型変異 AMPA 型受容体チャネルの陽イオン透過性。

図2と同じ方法で全細胞電流を記録した。アゴニスト非存在下で、卵母細胞から持続的な Na⁺ 電流を記録した。A. $\alpha 1^{Lc}$: 非注入, 野生型, 変異型: n=43, 27, 34, B. $\alpha 2^{Lc}$: 非注入, 野生型, 変異型: n=20, 19, 23, C. $\alpha 1^{Lc} / \alpha 2^{Lc}$: 非注入, 野生型, 変異型: n=8, 12, 9. 持続的な Ca²⁺ 透過性を評価するために, アゴニスト非依存電流を卵母細胞から記録した。D. $\alpha 1^{Lc}$: 非注入, 野生型, 変異型: n=15, 11, 21, E. $\alpha 2^{Lc}$: 非注入, 野生型, 変異型: n=10, 8, 27, F. $\alpha 1^{Lc} / \alpha 2^{Lc}$: 非注入, 野生型, 変異型: n=7, 10, 11. 各点は平均 \pm 標準誤差を示している。*, ** 及び *** はそれぞれ, mRNA を注入しなかった卵母細胞と比較して p<0.05, 0.01 及び 0.001 である事を, # 及び ## はそれぞれ, 野生型の mRNA を注入した卵母細胞と比較して p<0.05 及び 0.01 である事を示して (unpaired t-test)。

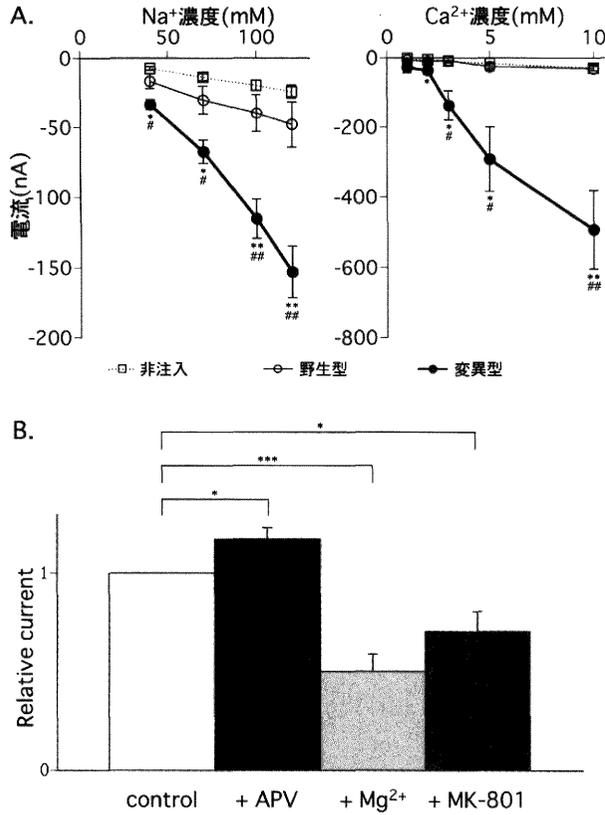


図4 Lurcher型変異NMDA型受容体のチャネル特性.

- A. 図2と同じ方法で全細胞電流を記録した。アゴニスト非存在下で、ヘテロメリックな $\epsilon 1^{Lc}/\zeta 1^{Lc}$ (左, 非注入, 野生型, 変異型: n=6, 6, 13) を発現した卵母細胞から Na^+ 電流を記録した。ヘテロメリックな $\epsilon 1^{Lc}/\zeta 1^{Lc}$ (右, 非注入, 野生型, 変異型: n=6, 4, 8) を発現した卵母細胞から、アゴニスト非依存的電流を記録して、持続的な Ca^{2+} 透過性を評価した。各点は平均±標準誤差を示している。*及び**はそれぞれ、mRNAを注入しなかった卵母細胞と比較して $p < 0.05$ 及び 0.01 である事を、#及び##はそれぞれ、野生型のmRNAを注入した卵母細胞と比較して $p < 0.05$ 及び 0.01 である事を示して (unpaired t-test)。
- B. NMDA型受容体アンタゴニスト APV (n=9), Mg^{2+} (n=13) 及び MK-801 (n=9) の Na^+ 内向き電流への作用を、 $\epsilon 1^{Lc}/\zeta 1^{Lc}$ を発現し膜電位を -70 mV に固定された卵母細胞から、アンタゴニスト存在下及び非存在下で測定する事により調べた。アンタゴニスト非存在下に流れた電流を1とした時の比を取り、各カラムはその平均±標準誤差を示している。*及び***はそれぞれ、アンタゴニスト非存在下と比較して $p < 0.05$ 及び 0.001 である事を示して (paired t-test)。

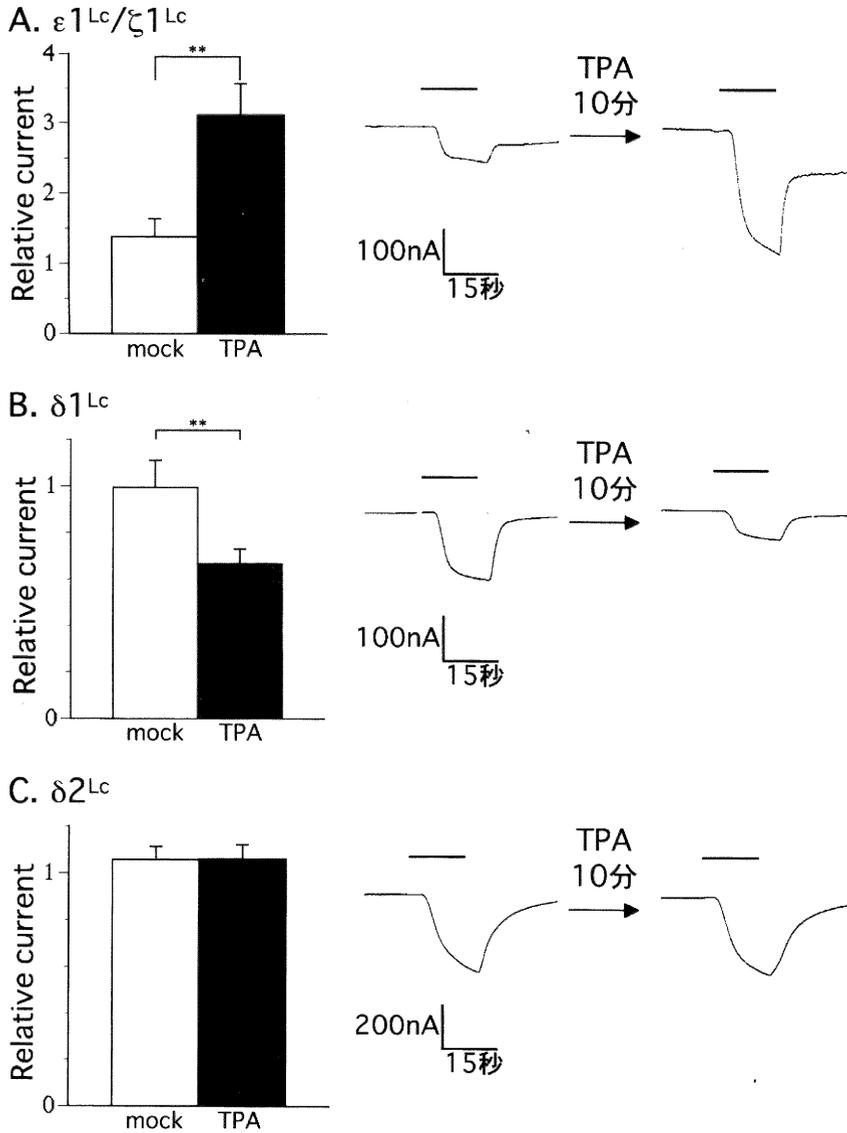


図5 Lurcher 型変異チャネルへの TPA 処理の効果.

膜電位を -70 mV に固定した卵母細胞から, NMG 灌流液を 120 mM Na^+ /NMG 灌流液に置換して, 全細胞電流を記録した. A. $\epsilon 1^{Lc}/\zeta 1^{Lc}$: mock 処理, TPA 処理: $n=5, 7$, B. $\delta 1^{Lc}$: mock 処理, TPA 処理: $n=5, 11$, C. $\delta 2^{Lc}$: mock 処理, TPA 処理: $n=5, 5$. バーは 120 mM Na^+ /NMG 灌流液で灌流している事を示している. 持続的 Na^+ 内向き電流を, TPA 処理または mock 処理を 10 分間行う前後で測定した. TPA 処理もしくは mock 処理を行う前の持続的 Na^+ 電流の大きさを 1 とした時の処理後の電流の大きさの比を取り, 各カラムはその平均 \pm 標準誤差を示している. 処理前の構造的 Na^+ 電流の大きさは, $\epsilon 1^{Lc}/\zeta 1^{Lc}$, GluR $\delta 1^{Lc}$, GluR $\delta 2^{Lc}$ それぞれ, $21-146$ nA, $49-618$ nA, $98-338$ nA である. **は対照と比較して $p < 0.01$ である事を示している (unpaired t-test).

に、変異 NMDA 型受容体チャネルに対するアンタゴニストの影響を調べた(図4B)。その結果、変異 NMDA 受容体 $\epsilon 1^{Lc}/\zeta 1^{Lc}$ チャネルを通過する内向き電流は、チャネルブロッカーである Mg^{2+} (0.50 ± 0.09 倍, $n=13$, $p<0.001$) と MK-801 (0.70 ± 0.10 倍, $n=9$, $p<0.05$) によって抑制された。しかし、競合的拮抗薬の APV は、変異 NMDA 受容体 $\epsilon 1^{Lc}/\zeta 1^{Lc}$ チャネルを通過する内向き電流を抑制せず、逆に増強した (1.17 ± 0.06 倍, $n=9$, $p<0.05$)。一方、これら Mg^{2+} , MK-801, APV, 及びホモメリック $\alpha 1^{Lc}$ を活性化すると報告の在る CNQX²⁴⁾ は、ホモメリック $\delta 1^{Lc}$ サブユニット受容体チャネルにも、ホモメリック $\delta 2^{Lc}$ サブユニット受容体チャネルにも影響しなかった(データ未掲載)。以上より、Lurcher 型変異は AMPA 型及び NMDA 型受容体チャネルサブユニットの開口機構にのみ影響し、陽イオン透過性には影響しない事が示された。この事は、この変異がグルタミン酸受容体チャネルのチャネル特性を変えないという仮定を支持し、従って、野生型の $\delta 1$ 及び $\delta 2$ サブユニットが、 Na^+ も Ca^{2+} も透過する機能的なチャネルを形成する可能性を支持する。

2. 変異受容体チャネル活性化の修飾

NMDA 型受容体チャネル $\epsilon 1/\zeta 1$ 及び $\epsilon 2/\zeta 1$ は、PKC のアクチベーターである TPA によって一過性に活性化される事が知られている⁶⁾。そこで、変異 NMDA 受容体 $\epsilon 1^{Lc}/\zeta 1^{Lc}$ チャネルに対する TPA の効果を調べた(図5A)。TPA を $1 \mu M$, 10分間作用させる事によって、アゴニスト非存在下の Na^+ 内向き電流の透過性は増強された(mock 処理: 1.38 ± 0.25 倍, TPA 処理: 3.12 ± 0.46 倍, $p<0.01$)。従って、TPA による NMDA 受容体チャネルに対するチャネル活性の修飾は、Lurcher 型変異によって変化しないと考えられる。同様に、変異ホモメリックチャネル $\delta 1^{Lc}$ (図5B) または $\delta 2^{Lc}$ (図5C) をアフリカツメガエルの卵母細胞に発現させ、その卵母細胞に $1 \mu M$ の TPA を10分間作用させて、アゴニスト非存在下の Na^+ 内向き電流の変化を調べた。その結果、 $\delta 1^{Lc}$ サブユニットホモメリックチャネルを発現した卵母細胞から記録した電流は TPA 処理により減少した(mock 処理: 0.99 ± 0.12 倍, TPA 処理: 0.65 ± 0.06 倍, $p<0.01$)。一方、 $\delta 2^{Lc}$ サブユニットホモメリックチャネルを発現した卵母細胞から記録した電流は TPA 処理により変化しなかった(mock 処理: 1.06 ± 0.06 倍, TPA 処理: 1.08 ± 0.06 倍)。以上の結果から、 $\delta 1$ サ

ブユニットを含む受容体チャネルは、PKC による制御を受ける可能性が示唆される。

4. 考 察

1. Lurcher 型変異グルタミン酸受容体チャネルの活性

ポジショナルクローニングにより、Lurcher マウスの原因がグルタミン酸受容体チャネル $\delta 2$ サブユニットの点変異であり、これにより $\delta 2$ サブユニットが常時開口するチャネルを形成するようになる事が明らかにされた¹⁶⁾。この点変異は、サブユニット間でアミノ酸配列がよく保存された M3 ドメインの C 末側非極性のアラニン残基を極性のスレオニン残基へ置換するものである。この部位が、チャネルポアの近くであり、またリガンド結合部位の S2 セグメントと隣接しているため、このアミノ酸の置換がチャネルの開口を誘導する構造変化を引き起こすと考えられる。これらの事から、Lurcher 型変異はチャネルの開口にのみ作用し、イオン透過性などのチャネル特性に影響しないと仮定した。この仮定を検証するために、AMPA 型及び NMDA 型受容体チャネルに Lurcher 型変異を導入し解析した結果、これら変異チャネルは変異 δ サブユニットチャネルと同様、持続的に開口する事が明らかになった。更に、これら変異サブユニットの陽イオン透過性やブロッカーに対する応答などのチャネル特性が、野生型のチャネル特性⁷⁾²³⁾ と基本的に変わらない事が明らかになり、本研究での仮定を支持する結果となった。

2. δ サブユニットチャネルの生理学的性質

$\delta 1$ サブユニットも $\delta 2$ サブユニットも、その生理学的性質は未だよく知られていない。これらは、グルタミン酸と結合せず、またグルタミン酸やその他のグルタミン酸受容体アゴニストによって活性化されず、特異的なリガンドも見つかっていない。それ故、 δ サブユニットがイオンチャネルとして働くのか、それとも、他の受容体チャネルで報告されているように²⁵⁾⁻²⁷⁾、シグナル伝達蛋白としてのみ働くのか、謎のままである。Lurcher 型変異 $\delta 2$ サブユニット及び変異 $\delta 1$ サブユニットは Ca^{2+} を透過するチャネルを形成するので、私は、本来の δ サブユニットも Ca^{2+} を透過するイオンチャネルを形成すると考える。この考えは、Kohda²⁸⁾ や Wollmuth²⁹⁾ によっても論じられ、支持されている。一方で、 $\delta 2$ サブユニット特異的な結合蛋白 PTPMEG³⁰⁾ や delphinin³¹⁾ の発見により、AMPA 型受容体²⁵⁾²⁶⁾ や NMDA 型受容体²⁷⁾ で報告されてい

るように、δ2サブユニットが細胞内シグナル蛋白として働く事も示唆されている。

TPA によって誘導される野生型 NMDA 型受容体チャネルの電流応答の増強¹⁸⁾は、変異 NMDA 型受容体チャネルでも認められた。従って、Lurcher 型変異は TPA によるグルタミン酸受容体チャネル特性の修飾に影響しないと考えられる。この考えに基づくと、TPA によって誘導された変異δ1サブユニットチャネルの抑制は、野生型δ1サブユニットを含むチャネルが PKC によって制御される可能性を示唆する。

成熟した小脳プルキンエ細胞では、δ1サブユニット mRNA の発現が高いにも関わらず、NMDA 型受容体チャネルによって仲介される電流応答が全く観察されない。更に、プルキンエ細胞では、α2サブユニットの存在により、AMPA 型受容体チャネルは Ca^{2+} を透過しえない。グルタミン酸受容体を介した Ca^{2+} の流入はシナプス可塑性やシナプス形成といった多くの神経活動に重要であるので、NMDA 型受容体チャネルの代わりとして、 Ca^{2+} を透過するδ2サブユニットを含むチャネルが存在するのかもしれない。

3. 異種発現系

本研究では、哺乳類の細胞での実験結果²⁸⁾と異なり、Lurcher 型変異δ2サブユニットを発現したアフリカツメガエル卵母細胞は、大きな Ca^{2+} 透過性を示した。この違いの一部は、 Ca^{2+} 流入によって活性化される内因性の Cl^- チャネルの存在³²⁾によって証明される。しかし、その他のまだ知られていない因子の存在も否定できない。δ1サブユニットを単独で発現させた時、アフリカツメガエルの卵母細胞では機能的な NMDA 受容体チャネル活性が観察されたが、HEK 293 細胞では全く観察されなかった。これは、アフリカツメガエルの卵母細胞に発現しているグルタミン酸受容体サブユニット XenU1 がεサブユニットの代役を勤めているからである³³⁾。これと同様に、卵母細胞中にδ2サブユニットと結合する未知の蛋白が存在し、 Ca^{2+} 透過性の高いチャネルを形成している可能性も考えられる。従って、マウスの脳においても、未知の蛋白がδサブユニットと結合し、機能的なチャネルを形成する可能性がある。

謝 辞

本稿を終えるにあたり、実験室を御提供して頂きました医学部麻酔科の下地恒毅教授、実験手技を御指導頂きました医学部麻酔科の山倉智宏助手、統計処理のアドバイスを頂きました医学部保健学科

検査技術科学専攻基礎生体情報学講座の仲澤幹雄教授、直接御指導を頂きました崎村建司教授に深謝致します。

参 考 文 献

- 1) Sakimura, K., Bujo, H., Kushiya, E., Araki, K., Yamazaki, M., Yamazaki, M., Meguro, H., Warashina, A., Numa, S. and Mishina, M.: Functional expression from cloned cDNAs of glutamate receptor species responsive to kainate and quisqualate. *FEBS Lett.*, **272** (1-2): 73~80, 1990.
- 2) Hollmann, M. and Heinemann, S.: Cloned glutamate receptors., *Annu Rev Neurosci.*, **17**: 31~108, 1994.
- 3) Morita, T., Sakimura, K., Kushiya, E., Yamazaki, M., Meguro, H., Araki, K., Abe, T., Mori, K.J. and Mishina, M.: Cloning and functional expression of a cDNA encoding the mouse β2 subunit of the kainate-selective glutamate receptor channel., *Brain Res Mol Brain Res.*, **14** (1-2): 143~146, 1992.
- 4) Sakimura, K., Morita, T., Kushiya, E. and Mishina, M.: Primary structure and expression of the γ2 subunit of the glutamate receptor channel selective for kainate., *Neuron.*, **8** (2): 267~274, 1992.
- 5) Ikeda, K., Nagasawa, M., Mori, H., Araki, K., Sakimura, K., Watanabe, M., Inoue, Y. and Mishina, M.: Cloning and expression of the ε4 subunit of the NMDA receptor channel., *FEBS Lett.*, **313** (1): 34~38, 1992.
- 6) Kutsuwada, T., Kashiwabuchi, N., Mori, H., Sakimura, K., Kushiya, E., Araki, K., Meguro, H., Masaki, H., Kumanishi, T., Arakawa, M. and Mishina, M.: Molecular diversity of the NMDA receptor channel., *Nature.*, **358** (6381): 36~41, 1992.
- 7) Meguro, H., Mori, H., Araki, K., Kushiya, E., Kutsuwada, T., Yamazaki, M., Kumanishi, T., Arakawa, M., Sakimura, K. and Mishina, M.: Functional characterization of a heteromeric NMDA receptor channel expressed from cloned cDNAs., *Nature.*, **357** (6373): 70~74, 1992.
- 8) Yamazaki, M., Mori, H., Araki, K., Mori, K.J. and Mishina, M.: Cloning, expression and modulation of a mouse NMDA receptor subunit., *FEBS Lett.*,

- 300 (1): 39~45, 1992.
- 9) Ciabarra, AM., Sullivan, J.M., Gahn, L.G., Pecht, G., Heinemann, S. and Sevarino, K.A.: Cloning and characterization of $\chi - 1$: a developmentally regulated member of a novel class of the ionotropic glutamate receptor family., *J Neurosci.*, **15** (10): 6498~6508, 1995.
 - 10) Sucher, N.J., Akbarian, S., Chi, C.L., Leclerc, C.L., Awobuluyi, M., Deitcher, D.L., Wu, M.K., Yuan, J.P., Jones, E.G. and Lipton, S.A.: Developmental and regional expression pattern of a novel NMDA receptor-like subunit (NMDAR-L) in the rodent brain., *J Neurosci.*, **15** (10): 6509~6520, 1995.
 - 11) Araki, K., Meguro, H., Kushiya, E., Takayama, C., Inoue, Y. and Mishina, M.: Selective expression of the glutamate receptor channel $\delta 2$ subunit in cerebellar Purkinje cells, *Biochem Biophys Res Commun.*, **197** (3): 1267~1276, 1993.
 - 12) Hirano, T., Kasono, K., Araki, K. and Mishina, M.: Suppression of LTD in cultured Purkinje cells deficient in the glutamate receptor $\delta 2$ subunit., *Neuroreport.*, **6** (3): 524~526, 1995.
 - 13) Kashiwabuchi, N., Ikeda, K., Araki, K., Hirano, T., Shibuki, K., Takayama, C., Inoue, Y., Kutsuwada, T., Yagi, T., Kang, Y., Aizawa, S. and Mishina, M.: Impairment of motor coordination, Purkinje cell synapse formation, and cerebellar long-term depression in GluR $\delta 2$ mutant mice., *Cell.*, **81** (2): 245~252, 1995.
 - 14) Kurihara, H., Hashimoto, K., Kano, M., Takayama, C., Sakimura, K., Mishina, M., Inoue, Y. and Watanabe, M.: Impaired parallel fiber→Purkinje cell synapse stabilization during cerebellar development of mutant mice lacking the glutamate receptor $\delta 2$ subunit., *J Neurosci.*, **17** (24): 9613~9623, 1997.
 - 15) Hirano, T., Kasono, K., Araki, K., Shinozuka, K. and Mishina, M.: Involvement of the glutamate receptor $\delta 2$ subunit in the long-term depression of glutamate responsiveness in cultured rat Purkinje cells., *Neurosci Lett.*, **182** (2): 172~176, 1994.
 - 16) Zuo, J., De Jager, P.L., Takahashi, K.A., Jiang, W., Linden, D.J. and Heintz, N.: Neurodegeneration in Lurcher mice caused by mutation in $\delta 2$ glutamate receptor gene., *Nature.*, **388** (6644): 769~773, 1997.
 - 17) Yamazaki, M., Araki, K., Shibata, A. and Mishina, M.: Molecular cloning of a cDNA encoding a novel member of the mouse glutamate receptor channel family., *Biochem Biophys Res Commun.*, **183** (2): 886~892, 1992.
 - 18) Mori, H., Yamakura, T., Masaki, H. and Mishina, M.: Involvement of the carboxyl-terminal region in modulation by TPA of the NMDA receptor channel., *Neuroreport.*, **4** (5): 519~522, 1993.
 - 19) Amaya, E., Musci, T.J. and Kirschner, M.W.: Expression of a dominant negative mutant of the FGF receptor disrupts mesoderm formation in *Xenopus* embryos., *Cell.*, **66** (2): 257~270, 1991.
 - 20) Yamakura, T., Mori, H., Masaki, H., Shimoji, K. and Mishina, M.: Different sensitivities of NMDA receptor channel subtypes to non-competitive antagonists., *Neuroreport.*, **4** (6): 687~690, 1993.
 - 21) Ho, S.N., Hunt, H.D., Horton, R.M., Pullen, J.K. and Pease, L.R.: Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction., *Gene.*, **77** (1): 51~59, 1989.
 - 22) Costa, P.F., Emilio, M.G., Fernandes, P.L., Ferreira, H.G. and Ferreira, K.G.: Determination of ionic permeability coefficients of the plasma membrane of *Xenopus laevis* oocytes under voltage clamp., *J Physiol.*, **413**: 199~211, 1989.
 - 23) Mishina, M., Sakimura, K., Mori, H., Kushiya, E., Harabayashi, M., Uchino, S. and Nagahari, K.: A single amino acid residue determines the Ca^{2+} permeability of AMPA-selective glutamate receptor channels., *Biochem Biophys Res Commun.*, **180** (2): 813~821, 1991.
 - 24) Taverna, F., Xiong, Z.G., Brandes, L., Roder, J.C., Salter, M.W. and MacDonald, J.F.: The Lurcher mutation of an α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid receptor subunit enhances potency of glutamate and converts an antagonist to an agonist., *J Biol Chem.*, **275** (12): 8475~8479, 2000.
 - 25) Wang, Y., Small, D.L., Stanimirovic, D.B., Morley, P. and Durkin, J.P.: AMPA receptor-mediated

- regulation of a G_i -protein in cortical neurons., *Nature.*, **389** (6650): 502~504, 1997.
- 26) Hayashi, T., Umemori, H., Mishina, M. and Yamamoto, T.: The AMPA receptor interacts with and signals through the protein tyrosine kinase Lyn., *Nature.*, **397** (6714): 72~76, 1999.
- 27) Sprengel, R., Suchanek, B., Amico, C., Brusa, R., Burnashev, N., Rozov, A., Hvalby, O., Jensen, V., Paulsen, O., Andersen, P., Kim, J.J., Thompson, R.F., Sun, W., Webster, L.C., Grant, S.G., Eilers, J., Konnerth, A., Li, J., McNamara, J.O. and Seeburg, P.H.: Importance of the intracellular domain of NR 2 subunits for NMDA receptor function in vivo., *Cell.*, **92** (2): 279~289, 1998.
- 28) Kohda, K., Wang, Y. and Yuzaki, M.: Mutation of a glutamate receptor motif reveals its role in gating and δ 2 receptor channel properties., *Nat Neurosci.*, **3** (4): 315~322, 2000.
- 29) Wollmuth, L.P., Kuner, T., Jatzke, C., Seeburg, P.H., Heintz, N. and Zuo, J.: The Lurcher mutation identifies δ 2 as an AMPA/kainate receptor-like channel that is potentiated by Ca^{2+} ., *J Neurosci.*, **20** (16): 5973~5980, 2000.
- 30) Hironaka, K., Umemori, H., Tezuka, T., Mishina, M. and Yamamoto, T.: The protein-tyrosine phosphatase PTPMEG interacts with glutamate receptor δ 2 and ϵ subunits., *J Biol Chem.*, **275** (21): 16167~16173, 2000.
- 31) Kawamoto, S., Miyagi, Y., Yamashita, T., Watanabe, M., Sonoda, T., Okuno, T., Okuda, K. and Mishina, M. Delphilin, a novel PDZ protein interacting with glutamate receptor δ 2 subunit. *Society for Neuroscience Abstracts* 26, 1918, 2000.
- 32) Leonard, J.P. and Kelso, S.R.: Apparent desensitization of NMDA responses in *Xenopus* oocytes involves calcium-dependent chloride current., *Neuron.*, **4** (1): 53~60, 1990.
- 33) Soloviev, M.M. and Barnard, E.A.: *Xenopus* oocytes express a unitary glutamate receptor endogenously., *J Mol Biol.*, **273** (1): 14~18, 1997.

(平成13年 1月30日受付)