総 説 (学会賞受賞)

GABA_A受容体構築と多機能性分子 PRIP

兼 松 隆

九州大学大学院歯学研究院口腔常態制御学講座口腔細胞工学分野

Multifunctional Role of PRIP Involved in Dynamic Regulation of GABA_A Receptors

Takashi Kanematsu

*Laboratory of Molecular and Cellular Biochemistry, Faculty of Dental Science,
and Station for Collaborative Research, Kyushu University,
3-1-1, Maidashi, Higashi-ku, Fukuoka 812-8582, Japan*

はじめに

現代社会の加速度的な技術革新や高度情報化の波は、現代人にきわめて強いストレスを与え、処方される抗不安薬などの使用量は、増加の一途をたどっているという。現在、臨床で頻用される抗不安薬の1つに、ベンゾジアゼピン系の薬物がある。この薬物は、 γ -アミノ酪酸 (GABA) をトランスマITTERとする抑制性神経伝達を増強することで、その薬理作用 (抗不安作用) を発揮する。また GABA 受容体の異常は、不眠・不安・緊張・けいれん・てんかんなどのさまざまな病態を引き起こすことが知られ、GABA 受容体の正常な働きは、複雑な脳・精神機能を形成する分子的基盤の重要な一角をなしている。すなわち、GABA 受容体を含めた抑制性シナプス構築の分子メカニズムを解明することは、人間の情動・精神活動を理解するうえで非常に重要である。

最近、GABA_A受容体の構築や輸送にかかわる分子の報告が相次いでおり、その分子基盤を解明する機運が高まっている。われわれは、当教室で発見したイノシトール 1,4,5-三リン酸 [Ins(1,4,5)P₃] 結合性タンパク質 (PRIP-1) が、GABA_A受容体の情報伝達系を調節する分子でもあることを最近明らかにした。本稿では、PRIP-1 発見から GABA_A受容体の構築や輸送に PRIP-1 がいかにかかわるか、これまでの知見と今後の展望についてまとめる。

新しいタンパク質ファミリー (PRIP) の発見

細胞外のアゴニスト刺激に応答して活性化されたホスホリパーゼ C は、細胞膜の構成リン脂質の1つであるホスファチジルイノシトール 4,5-二リン酸 [PI(4,5)P₂] を加水分解して、生理活性物質 Ins(1,4,5)P₃ を生成する。そして Ins(1,4,5)P₃ は、小胞体内に貯蔵されている Ca²⁺ を細胞質中に放出させる。このように、Ins(1,4,5)P₃ が細胞内情報伝達機構の重要な一角を担っていることは、周知のとおりである (図 1 A)。この Ins(1,4,5)P₃ の機能が発表されたのは、1983 年であった¹⁾。その後、Ins(1,4,5)P₃ 誘発性 Ca²⁺ 放出の分子機構の解明には多くの研究者が参画し、当該分野における研究の進展のみならず、今日における広範囲にわたる細胞内情報伝達研究の推進力ともなった。

われわれも、この生理活性物質にいち早く注目し、Ins(1,4,5)P₃ アナログを合成・利用するといった独創的な方法で、Ins(1,4,5)P₃ 結合タンパク質のリガンド認識機構を研究してきた²⁾。そして、このアナログ合成の延長線上で、Ins(1,4,5)P₃ をリガンドとする親和性レジンを作成し、このレジンの3種類の既知の Ins(1,4,5)P₃ 認識タンパク質 [Ins(1,4,5)P₃ 受容体、Ins(1,4,5)P₃ 5-ホスファターゼ、Ins(1,4,5)P₃ 3-キナーゼ] を効率よく精製できると報告した³⁾。続いて、このレジンを用いることで、ラット脳より新たに2種類の Ins(1,4,5)P₃ 認識タンパク質 (分子量 85 k と 130 k) を精製した⁴⁾。両分子の部分アミノ酸配列を決め相同性の検索を行った結果、85 k

図1 Ins(1,4,5)P₃-Ca²⁺シグナリング

A: Ins(1,4,5)P₃の産生—小胞体のCa²⁺放出の模式図を示す。

B: PRIPを介するIns(1,4,5)P₃-Ca²⁺シグナリングの調節モデルを示す。

分子はホスホリパーゼC δ (PLC- δ) であり、一方、130 k 分子はデータベースには未登録の新規分子であった。両分子は、細胞質分画および膜分画からともに精製が可能であった^{4,5)}。

130 k 分子は、未知のタンパク質分子であったので、部分アミノ酸配列をもとにラット脳cDNAライブラリーよりその遺伝子を単離した⁶⁾。遺伝子の相同性検索の結果、130 k 分子はPLC- δ と全体的に38.2%と高い相同性を示した。図2に示すように、PLC- δ 1がもつドメイン構造（プレックストリンホモロジー（PH）ドメイン、EFハンドモチーフ、活性中心X、Yドメイン、C2ドメイン）は配列上保持されており、アミノ末端側とカルボキシル末端側に延長部分を有する分子であった。この分子は、PLC酵素の新しいタイプであると思われたが、脳から調製した精製標品や、哺乳類細胞などに発現させたりコンビナントタンパク質とともにPLCの酵素活性を有していなかった⁴⁻⁶⁾。

PLC- δ 分子の構造生物学的解析により、その分子構造が明らかにされた⁷⁾。そこで、130 k 分子がPLC酵素活性を有しない理由を検討するため、われわれは、PLC- δ 分子の構造をもとにこの分子のドメイン構造の推定を行った。トリプシンでこの分子を酵素処理し、経時的にみられる酵素消化断片の電気泳動パターンから、PRIP分子はPLC- δ と類似の構造をもつと推定された⁸⁾。またカルボキシル末端側にある130 k 分子の固有配列は、トリプシンで非常に消化されにくい構造をしていることがわかった。われわれはこの部分をDドメイン(C2ドメイン

の後にあるため)と名付けた(図2)。さらに詳しく酵素活性をもたない理由を検討するため、PLC- δ の各ドメインを130 k 分子のものに置き換えたキメラタンパク質を大腸菌に発現させ、PLCの酵素活性を測定した⁸⁾。図2に示すように、130 k 分子のYドメインに置き換えたPLC- δ キメラ分子[PLC δ 1(Y_{p130})]は酵素活性を有したが、Xドメインを置き換えると酵素活性がなくなった。PLC- δ のX線結晶解析において、その酵素活性発現に2つのヒスチジン(His 311・His 356)と2つの酸性アミノ酸(Asp 343・Glu 390)が重要であることが明らかにされている⁷⁾。130 k 分子では、PLC- δ のHis 356とGlu 390に相当するアミノ酸がAsnとGlyに置換していた^{6,8)}。そこでこれらのアミノ酸をPLC- δ 型に置換したミュータントキメラタンパク質[PLC δ 1(X_{m p130})]を作製し、酵素活性を測定したが、なお活性を示さなかった。また、130 k 分子に固有のDドメインをPLC- δ のカルボキシル末端側に融合したキメラタンパク質[PLC δ 1(plusD_{p130})]では、PLCの酵素活性は80%減少した。つまり、DドメインはPLC酵素活性を抑制するような構造をとっているようである⁸⁾。以上の結果から、130 k 分子は、PLC類似タンパク質であるが、その酵素活性をもたない新しい分子種であることがわかった。そこでこの分子を PLC Related Catalytically Inactive Protein (略してPRIP)と命名した。

われわれの遺伝子クローニングと時を同じくして、国立がんセンターの横田博士のグループが、ヒトの肺癌細胞株の多くの例で欠失している染色体領域(2q33)があ

図 2 PRIP-1 と PLC-δ1 のドメイン比較と PLC 酵素活性

p130：PRIP-1 分子の旧呼称，PH：プレックストリン相同ドメイン，EF hand：EF ハンドモチーフ，X，Y：PLC 酵素活性中心，C2：C2 ドメイン，D：D ドメイン。PLCδ1 (Xp130)，PLCδ1 (Yp130)：PLCδ1 に PRIP-1 の X，Y ドメインを組み換えたキメラタンパク質。PLCδ1 (plus Dp130)：PLCδ1 に PRIP-1 の D ドメインを組み込んだキメラタンパク質。PLCδ1 (Xmp130)：PLCδ1 に PRIP-1 の Xm (Asn 459/Arg 460, Gly 493 を His/Gly, Glu に置換) を組み換えたキメラタンパク質。

図中数値 (%) は各ドメイン間の相同性を示す。右側 PLC 活性値は PLCδ1 の活性 (100%) に対する各キメラタンパク質の相対値を示す。

り，その遺伝子を調べたところ，ホスホリパーゼ C-δ と相同性の高い遺伝子があることを報告した⁹⁾。この遺伝子は，癌抑制遺伝子の候補として PLC-L と名付けられ，PRIP 分子とは，アミノ酸レベルで 94% という高い相同性を示した。これらは，同一タンパク質であると考えられる。その後，東京大学竹縄博士のグループは，マウスの脳ライブラリーより，PLC-L に相同性のある遺伝子を単離し報告した¹⁰⁾。データベース検索の結果をもとに，哺乳類においてはわれわれが報告した遺伝子タイプを type 1，竹縄博士らが報告したものを type 2 と名付けて表 1 に整理した。PRIP-1 は，ヒト⁹⁾・ラット⁴⁻⁶⁾・マウス (EST データベースで確認) で，PRIP-2 は，ヒト¹¹⁾・ラット (EST データベースで確認)・マウス¹⁰⁾でその遺伝子が認められ，いずれも PLC の酵素活性を示さなかった^{4,6,10)}。また，PRIP 相当遺伝子は，線虫にも見いだされており (表 1)，酵素活性をもたない PLC-δ 類似タンパク質として，PLC ファミリーから進化の早い段階で分離したものと考えられる。

PRIP-1・PRIP-2 の組織分布は，ノーザンやウェスタン解析の結果，type 1 は比較的特異的に脳に存在し¹²⁾，type 2 はユビキタスな存在パターン (脳・脾臓・肺・骨格筋など) を呈した^{10,13)}。脳における PRIP-1・PRIP-2 の発現様式を *in situ* hybridization 法により確認したところ，ともに同じような発現パターンをとり，大脳では海馬や皮質の神経細胞に，小脳では Purkinje 細胞や顆粒細胞に発現していた^{12,13)}。

イノシトール情報伝達系における PRIP 分子の役割

線虫から哺乳動物にいたるまで広く見いだされる PRIP 分子ファミリーは，PLC 酵素活性を有していない。それでは，どのような細胞内機能をもつのであろうか。PRIP 分子は，Ins(1,4,5)P₃ 結合タンパク質として同定された。そこでまず，イノシトール情報伝達系における役割を検討した。

PRIP-1・PRIP-2 とともに，Ins(1,4,5)P₃ の結合部位は

表 1 PRIP ファミリー

() 内の数字は ACC. No を示す。

両矢印の%は相互の相同性を示す。

PH ドメインである¹³⁻¹⁵⁾。PH ドメインとは、1993 年に発表されたドメイン構造で¹⁶⁾、イノシトールリン脂質、とりわけ PI(4,5)P₂や PI(3,4,5)P₃に結合する構造モジュールとして、にわかに脚光をあびたドメイン構造である。イノシトールリン酸もまた PH ドメインのリガンドになることが、われわれの研究^{4,15,17,18)}やほかのグループ¹⁹⁾により確かめられた。現在では、PH ドメインは、イノシトールリン脂質およびイノシトールリン酸を共通のリガンドとすることがわかっている。*in vitro* の結合実験において、PH ドメインの各種リガンドに対する結合親和性は、PRIP-1 では Ins(1,4,5)P₃と Ins(1,4,5,6)P₄に強い親和性を示した¹⁴⁾。一方、PRIP-2 の Ins(1,4,5)P₃結合親和性は、PRIP-1 のそれよりも 10 倍程度低かった¹³⁾。また、PI(4,5)P₂に対する結合親和性は、PRIP-1・PRIP-2 ともに Ins(1,4,5)P₃よりも同程度に低かった^{13,14)}。一方、新規 Ins(1,4,5)P₃結合タンパク質として PRIP-1 とともに同定された PLC- δ は、Ins(1,4,5)P₃・PI(4,5)P₂ともに高い親和性をもって結合した¹⁷⁾。現在 PLC- δ の酵素活性発現には、PH ドメインを介して PI(4,5)P₂に結合し、細胞質から細胞膜へ移行するモデルが提唱され⁷⁾、かつ細胞刺激により PLC- δ が細胞膜へ移行することも確認されている²⁰⁾。これは、PLC- δ の Ins(1,4,5)P₃と PI(4,5)P₂に対する結合親和性が同程度であることで理解できる説明がなされている。

それでは、Ins(1,4,5)P₃への結合親和性が PI(4,5)P₂よりも高い PRIP 分子の細胞内局在はどうなるであろうか。グリーン蛍光タンパク質 (GFP) を融合させた PRIP-1 の COS-1 細胞への強制発現実験において、この分子は細胞質内に発現し、細胞外刺激を加えても膜への局在を示さなかった²¹⁾。このことは、PRIP-1 分子が細胞質に局在して機能する分子であることを意味している。そこでこの分子は、PLC による加水分解で産生された Ins(1,4,5)P₃を細胞質中で PH ドメインを介して結合

し、小胞体への Ins(1,4,5)P₃シグナル入力を調節すると仮説をたて実験を行った。COS-1 細胞に PRIP-1 を恒常的に発現している細胞を作製し、プラジキニンや上皮成長因子 (EGF) で刺激をしたところ、ともに細胞内 Ca²⁺濃度変化が対照細胞に比べて減少した。この効果は、PH ドメイン欠失ミュータントでは観察されなかった。さらに、細胞内の Ins(1,4,5)P₃代謝速度は、PRIP-1 過剰発現細胞で遅延することが確認できた。事実、Ins(1,4,5)P₃が PRIP-1 分子に結合すると、Ins(1,4,5)P₃代謝酵素 (Ins(1,4,5)P₃ 5 phosphatase や Ins(1,4,5)P₃ 3 kinase) による Ins(1,4,5)P₃代謝遅延を引き起こした²¹⁾。最近、PRIP-1 ノックアウト (*PRIP-1*^{-/-}) マウス的大脑皮質神経細胞を用い、刺激時の細胞内 Ca²⁺濃度およびイノシトールリン酸の量的変化を測定する実験を行った。*PRIP-1*^{-/-}細胞では、野生型に比べて刺激時の細胞内 Ca²⁺濃度変化が小さく、この原因が Ins(1,4,5)P₃代謝亢進によるものであることを明らかにした (投稿準備中)。以上の PRIP-1 の過剰発現実験とノックアウト実験より、PRIP-1 分子は、Ins(1,4,5)P₃の代謝速度を調節し、Ins(1,4,5)P₃受容体へのシグナル入力を制御して、小胞体からの Ca²⁺放出を調節する分子であることがわかった (図 1 B)。すなわち Ins(1,4,5)P₃を代謝系 (シグナル OFF) に向かわせるか、Ins(1,4,5)P₃/Ca²⁺放出系 (シグナル ON) に向かわせるかの分子スイッチであるといえる。

一方、PRIP-2 分子がイノシトール情報伝達系に関与するかどうかは、今後の実験結果を待たねばならないが、PRIP-2 は、PRIP-1 でみられた生理機能を有すると考えている。しかし、Ins(1,4,5)P₃に対する親和性の違い (PRIP-1 の方が親和性は 10 倍ほど高い) から、両分子とともに発現している神経細胞においては、遊離の Ins(1,4,5)P₃の量を厳密に調節して、小胞体からの Ca²⁺放出をコントロールすると思われる。

GABA_A受容体

GABA_A受容体は、脳における抑制性シナプス伝達 (fast inhibitory synaptic transmission) の主役であり、この情報伝達系を修飾する薬物 (ベンゾジアゼピン類、バルビツール酸類、ニューロステロイドなど) の標的分子である²²⁾。現在この受容体は、てんかんなどの病態との関連が注目されており、この受容体機能を制御する分子メカニズムの解明が急がれている。

GABA_A受容体とは、イオンチャンネル内蔵型の受容体で、4 回膜貫通型のサブユニットからなるヘテロ五量体構造をとる。各サブユニットは、ほぼ同じような分子構造をしている。すなわち、細胞外に GABA やベンゾジアゼピンなどのモジュレーターが結合する長いアミノ末端領域があり、4 つの膜貫通領域 (TM 1–4) に続いて細胞外に短いカルボキシル末端領域を有するという構造である。TM 3 と TM 4 の間のループ部分は、長く細胞質中につきだしており、この部位は、細胞内のさまざまなシグナル分子と結合したり、リン酸化/脱リン酸化されることで生理機能を発揮したりと重要な領域である。サブユニットのタイプは、 α : 6 種 (α 1–6)、 β : 3 種 (β 1–3)、 γ : 3 種 (γ 1–3) と $\delta\epsilon\theta\pi$ が 1 種類ずつ報告されている。受容体を構成するサブユニットの組み合わせの違いは、異なる薬理作用 (機能) を生むことが知られており、特に受容体が γ サブユニットを含むと、ベンゾジアゼピン系の薬剤に対する感受性を獲得する。また、組合せの違いが受容体の細胞内局在を変え、サブユニットに依存する細胞内輸送経路の存在が示唆されている。しかし、その分子基盤はほとんど明らかにされていない。サブユニットの各組織における発現パターンもさまざまで、組織 (部位) 特異性がある。中枢神経系では α 1/ β 2/ γ 2 が 2: 2: 1 で構成される受容体が最も多く発現している。

抑制性シナプス可塑性の分子機構の研究が進むなか、GABA_A受容体の発現量や生理機能を調節する分子が次々に明らかになってきた。そこでその分子機構を PRIP 分子との関係を含めてまとめる。

GABA_A受容体構築と PRIP 分子

われわれは、yeast two-hybrid screening で PRIP-1 と相互作用する分子を検索し、GABARAP (GABA_A receptor γ 2 subunit associated protein) を同定した²³⁾。GABARAP²⁴⁾は、GABA_A受容体の γ 2 サブユニットに結合する分子として見いだされた 117 アミノ酸よりなる

分子である。構造解析の結果²⁵⁾ GABARAP は、アミノ末端領域 (1–26) のチューブリン/微小管結合領域と、27–117 アミノ酸領域のユビキチン様構造をもつ 2 つの部分から構成されている。GABARAP の細胞内分布をみると細胞内に局在することから、チューブリン結合部位を介して、GABA_A受容体を細胞骨格系につなぎ止める役割があると考えられている。また興味深いことに、この分子は、酵母のオートファジー経路にかかわる分子 Apg 8/Aut 7 の哺乳類ホモログの 1 つである²⁶⁾。

さて、GABA_A受容体の γ 2 サブユニットのループ部分 (TM 3 と TM 4 の間) が、GABARAP 分子の 36–68 アミノ酸領域に結合することがわかっている²³⁾。興味深いことに、PRIP-1 は γ 2 サブユニットのループ部位と競合的に GABARAP (36–68) に結合した。この GABARAP への競合的結合が何をもたらすかを明らかにするために、PRIP-1 のノックアウト (*PRIP-1^{-/-}*) マウスを作製し、GABA_A受容体情報伝達経路に及ぼす PRIP-1 の影響を調べた。*PRIP-1^{-/-}* の海馬細胞を用いた電気生理学的研究 (ジアゼパムの影響)、動物個体を用いた行動学的解析 (ロタロッドテスト、オープンフィールドテスト、プラス迷路テスト)、いずれの解析においても、GABA_A受容体の γ 2 サブユニットを介する情報伝達機能の異常を示唆するものであった。すなわち、PRIP-1 は受容体の γ 2 サブユニットがもつ機能を調節する分子である²³⁾。

それでは、どのような分子メカニズムで PRIP-1 が GABA_A受容体の機能を調節するのであろうか。まず受容体構築と膜へのターゲティング過程への関与を検討した。上述のように、Apg 8/Aut 7 の哺乳類ホモログには、GABARAP、GATE-16、LC 3 が知られる。そのうち、生理機能がよくわかっているものが LC 3 で、オートファゴソーム膜形成に関与する²⁶⁾。一方、GATE-16 は、ゴルジ層板間の輸送を調節すると考えられているものの²⁶⁾、GABARAP 同様その生理機能は不明である。さて、GABARAP は GATE-16 同様、vacuolar fusion に関係する分子 NSF (N-ethylmaleimide-sensitive factor) と結合することが報告され²⁷⁾、GABARAP・NSF・SNARE タンパク質が共役して GABA_A受容体の膜へのトランスポートを制御すると考えられるにいたった (図 3)。そこで、われわれは PRIP-1 が GABARAP を結合することで、GABARAP/NSF 複合体形成に影響を及ぼすかを調べた。その結果 PRIP-1 は、GABARAP/NSF 複合体形成を阻害した (未発表)。すなわち PRIP-1 は、GABA_A受容体の膜へのトランスポートを制御すると考

図 3 GABA_A受容体の輸送や機能調節にかかわる分子達 (詳細は本文)

えられる。現在、この点に関して、受容体の膜発現調節機構の解明を行っている。

脱リン酸化酵素と PRIP 分子

細胞内のリン酸化/脱リン酸化反応が、どのように GABA_A受容体の情報伝達系に関与するか、その分子メカニズムは不明な点が多い。しかし、GABA_A受容体自身のリン酸化/脱リン酸化が、受容体のシャットリングやチャネル開閉機構の調節に影響するという多くの報告がある。実際に、GABA_A受容体と co-purify される分画にはリン酸化活性が見いだされており、関与が疑われる酵素には以下のものがある²⁸⁾。1つは、GABA_A receptor tubulin associated complex proteins (GTAPs) で、セリンキナーゼ活性をもち、 β 3サブユニットの Ser 409 をリン酸化する。PKC- β II は、受容体の β サブユニットに直接結合して受容体のベースのリン酸化程度を調節しているうえに、RACK-1 (receptor for activated C-kinase) 分子が活性化された PKC を結合することで、受容体のリン酸化レベルをさらにあげる役割を担うと考えられている。最近、AKAP 150 (A-kinase anchoring protein 150) が受容体の β 1 と β 3 サブユニットに結合し、PKA による受容体のリン酸化を調節することが示された²⁹⁾。また、興奮性神経伝達の受容体である NMDA 型グルタミン酸受容体において、リン酸化酵素 (PKA) と脱リン酸化酵素 [PP1 (protein phosphatase 1)] を受容体ヘリクルートし、足場タンパク質として受容体の

リン酸化・脱リン酸化過程を制御する分子 (Yotiao)³⁰⁾ が報告されているが、最近その Yotiao と PKA/PP1 複合体が、GABA_A受容体のリン酸化・脱リン酸化過程を調節すると、電気生理学的実験で示された³¹⁾。このように、PKC や PKA による受容体のリン酸化の分子メカニズムに加え、受容体の脱リン酸化のメカニズムについても実験的証拠が出始めている。

われわれは、PRIP-1 相互作用分子検索で、GABARAP のほかに PP1 が PRIP-1 に結合することを見いだした³²⁾。試験管内アッセイにより PRIP-1 と PP1 の結合は、PRIP-1 の 95—97 残基によってもたらされることを確かめた。また、PP1/PRIP-1 複合体ではホスファターゼ活性が抑制されており、PRIP-1 分子が PP1 による GABA_A受容体の脱リン酸化の過程を調節する可能性がある (図 3)。そこで、PRIP-1^{-/-}マウスを用いて PKA 活性化による GABA_A受容体のリン酸化の変化をみたところ、ノックアウトマウスではリン酸化程度が低かった。また COS-7 細胞での強制発現実験で、PRIP-1 が膜上に発現した GABA_A受容体に共局在する像が得られ、細胞膜上での PP1 による受容体の脱リン酸化過程に PRIP-1 分子が関与するものと考えられる (投稿中)。さらに最近、海馬 CA1 細胞で、LTD (long-term depression) を誘発するとプロテインホスファターゼである PP2B (calcineurin) が、受容体の γ 2 サブユニットに直接結合して、受容体のリン酸化程度を調節することが報告された³³⁾。このように、GABA_A受容体のリン酸化/脱リン酸化による調節の分子メカニズムは、現在多くの研究者に

より解析が進められており、受容体の質的变化によるシナプス可塑性への理解が深まりつつある。

以上われわれは、PRIP-1がGABA_A受容体の機能調節に深くかかわっていることを見いだしている。PRIP-2に関しても、PRIP-1で明らかにした分子間相互作用の関係が確認されたことで¹³⁾、両分子は互いに相補しあってGABA_A受容体の機能を調節すると考えられる。今後、PRIP分子ファミリーの生理機能を理解するうえで、ダブルノックアウトマウス作製とその解析が必要であり、最近そのマウスが完成し解析を開始した。

抑制性シナプス可塑性と PRIP 分子

ポストシナプスにおけるGABA_A受容体の発現量調節は、抑制性シナプス伝達効率を左右すること（シナプス可塑性）が知られている。現在、いくつかの増殖因子（insulin, BDNF など）がこの機構にかかわるといわれている。insulinは、GABA_A受容体を細胞内のcompartmentから形質膜へすばやく移動させ、受容体の膜発現量を上げる³⁴⁾。この現象は、受容体の構成に $\beta 2$ サブユニットが入っていることが重要であると、HEK 293細胞への再構成系の実験で示された。事実、海馬初代培養細胞をinsulinで処理すると、mIPSC（miniature inhibitory postsynaptic current）が増加することが確認されている。一方、BDNF（brain-derived neurotrophic factor）は、その受容体のtrkBを介してGABA_A受容体のシナプス伝達を抑えることが報告されている³⁵⁾。これは、初代培養海馬細胞にBDNFを作用させるとmIPSCが減少し、プロテインキナーゼ阻害剤によりこの効果が抑えられることで示された。分子メカニズムの詳細はわからないが、GABA_A受容体の細胞表面の受容体発現を負に制御すると考えられる。また、PKCは、後期エンドソームから細胞膜への受容体のリサイクリング過程を阻害することで、GABA_A受容体の膜発現量を負に制御している³⁶⁾。この制御は受容体の直接のリン酸化とはリンクしない。

われわれは、PRIPダブルノックアウトマウスの海馬神経細胞を用いた電気生理学的解析で、BDNF刺激時のmIPSCを測定した結果、野生型でみられるmIPSCの減少がみられなかった（未発表）。詳しい解析はこれからであるが、PRIPファミリーを介した情報伝達系がGABA_A受容体の膜発現量調節に関与し、シナプス可塑性にかかわる証拠といえる。

てんかんと PRIP 分子

最近、ヒト家族性てんかん遺伝子の解析を進めるなかで、GABA_A受容体の $\gamma 2$ サブユニット³⁷⁻³⁹⁾と $\alpha 1$ サブユニット⁴⁰⁾に変異をもつ家系が相次いで報告された。各変異はそれぞれ異なる部位にあり、病態を引き起こすメカニズムの多様性が予想されている。ある変異の家系では、GABA_A受容体のGABA感受性の低下が、ほかの家系ではジアゼパムに対する感受性の低下が引き起こされる。さらに別の家系において、受容体のTM3とTM4間の細胞内ループ部分にナンセンス変異がみつき、この変異体ではGABA_A受容体の膜への発現が抑制された³⁹⁾。すなわち、GABA_A受容体のリガンドや薬物感受性への変化により引き起こされるチャンネル開口の異常のみならず、受容体の正しい構築や輸送が阻害されて引き起こされる家族性てんかんの例が示されたことで、GABA_A受容体構築および輸送の分子メカニズム解明の重要性をうかがわせる。

われわれは、PRIPダブルノックアウトマウスの解析を進めるなか、痙攣を起こすマウスを見だし、なかには強直-間代痙攣を起こすマウスがいることを確認した。現在、このマウスがてんかんのモデルとなるか検討している。

おわりに

GABA_A受容体の構築・輸送・分解の分子メカニズムの解明研究は始まったばかりで、解明すべき多くの問題が山積している。しかし、GABA_A受容体を介する情報伝達機構の解明は、てんかんなどの病態の理解を深め、新しい治療法・治療薬の開発につながる可能性があり、今後の展開がおおいに期待できる。

また、GABARAPの分布は必ずしもGABA_A受容体の存在するところに限られているわけでもなく、PRIP-2と同様に末梢の多くの組織にユビキタスに存在することが知られている。つまり、PRIPファミリーは、GABA_A受容体の機能調節のみならず、GABARAPと共役して一般的な細胞機能現象に関与する可能性がある。この点に関してもPRIPファミリーの生理的働きを解明していきたいと考えている。

稿を終えるにあたり、本研究を終始ご指導くださり本学会賞の受賞候補者にご推薦くださいました九州大学大学院歯学研究院口腔常態制御学講座口腔細胞工学 平田雅人教授に深

謝いたします。また本研究は、教室員と学内外の多くの共同研究者のご協力により行われました。誌面をおかりして厚く御礼申し上げます。

文 献

- 1) Streb, H., Irvine, R. F., Berridge, M. J. and Schulz, I. : Release of Ca^{2+} from a nonmitochondrial intracellular store in pancreatic acinar cells by inositol-1,4,5-trisphosphate. *Nature* **306** : 67—69, 1983.
- 2) Ozaki, S., Watanabe, Y., Ogasawara, T., Hirata, M. and Kanematsu, T. : Synthesis and biological properties of 2-substituted *myo*-inositol 1,4,5-trisphosphate analogues directed toward affinity chromatography and photoaffinity labeling. *Carbohydr. Res.* **234** : 189—206, 1992.
- 3) Hirata, M., Watanabe, Y., Ishimatsu, T., Yanaga, F., Koga, T. and Ozaki, S. : Inositol 1,4,5-trisphosphate affinity chromatography. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **168** : 379—386, 1990.
- 4) Kanematsu, T., Takeya, H., Watanabe, Y., Ozaki, S., Yoshida, M., Koga, T., Iwanaga, S. and Hirata, M. : Putative inositol 1,4,5-trisphosphate binding proteins in rat brain cytosol. *J. Biol. Chem.* **267** : 6518—6525, 1992.
- 5) Yoshida, M., Kanematsu, T., Watanabe, Y., Koga, T., Ozaki, S., Iwanaga, S. and Hirata, M. : D-*myo*-inositol 1,4,5-trisphosphate-binding proteins in rat brain membranes. *J. Biochem.* **115** : 973—980, 1994.
- 6) Kanematsu, T., Misumi, Y., Watanabe, Y., Ozaki, S., Koga, T., Iwanaga, S., Ikehara, Y. and Hirata, M. : A new inositol 1,4,5-trisphosphate binding protein similar to phospholipase C- δ 1. *Biochem. J.* **313** : 319—325, 1996.
- 7) Essen, L. O., Perisic, O., Cheung, R., Katan, M. and Williams, R. L. : Crystal structure of a mammalian phosphoinositide-specific phospholipase C δ . *Nature* **380** : 595—602, 1996.
- 8) Kanematsu, T., Yoshimura, K., Hidaka, K., Takeuchi, H., Katan, M. and Hirata, M. : Domain organization of p 130, PLC-related catalytically inactive protein, and structural basis for the lack of enzyme activity. *Eur. J. Biochem.* **267** : 2731—2737, 2000.
- 9) Kohno, T., Otsuka, T., Takano, H., Yamamoto, T., Hamaguchi, M., Terada, M. and Yokota, J. : Identification of a novel phospholipase C family gene at chromosome 2 q 33 that is homozygously deleted in human small cell lung carcinoma. *Hum. Mol. Genet.* **4** : 667—674, 1995.
- 10) Otsuki, M., Fukami, K., Kohno, T., Yokota, J. and Takenawa, T. : Identification and characterization of a new phospholipase C-like protein, PLC-L₂. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **266** : 97—103, 1999.
- 11) Kikuno, R., Nagase, T., Ishikawa, K., Hirose, M., Miyajima, N., Tanaka, A., Kotani, H., Nomura, N. and Ohara, O. : Prediction of the coding sequences of unidentified human genes. XIV. The complete sequences of 100 new cDNA clones from brain which code for large proteins in vitro. *DNA Res.* **6** : 197—205, 1999.
- 12) Matsuda, M., Kanematsu, T., Takeuchi, H., Kukita, T. and Hirata, M. : Localization of a novel inositol 1,4,5-trisphosphate binding protein, p 130 in rat brain. *Neurosci. Lett.* **257** : 97—100, 1998.
- 13) Uji, A., Matsuda, M., Kukita, T., Maeda, K., Kanematsu, T. and Hirata, M. : Molecules interacting with PRIP-2, a novel Ins(1,4,5)P₃ binding protein type 2 : Comparison with PRIP-1. *Life Sci.* **72** : 443—453, 2002.
- 14) Takeuchi, H., Kanematsu, T., Misumi, Y., Yaakob, H. B., Yagisawa, H., Ikehara, Y., Watanabe, Y., Tan, Z., Shears, S. B. and Hirata, M. : Localization of a high-affinity inositol 1,4,5-trisphosphate/inositol 1,4,5,6-tetrakisphosphate binding domain to the pleckstrin homology module of a new 130 kDa protein : characterization of the determinants of structural specificity. *Biochem. J.* **318** : 561—568, 1996.
- 15) Takeuchi, H., Kanematsu, T., Misumi, Y., Sakane, F., Konishi, H., Kikkawa, U., Watanabe, Y., Katan, M. and Hirata, M. : Distinct specificity in the binding of inositol phosphates by pleckstrin homology domains of pleckstrin, RAC-protein kinase, diacylglycerol kinase and a new 130 kDa protein. *Biochim. Biophys. Acta* **1359** : 275—285, 1997.
- 16) Musacchio, A., Gibson, T., Rice, P., Thompson, J. and Saraste, M. : The PH domain : a common piece in the structural patchwork of signalling proteins. *Trends Biochem. Sci.* **18** : 343—348, 1993.
- 17) Yagisawa, H., Hirata, M., Kanematsu, T., Watanabe, Y., Ozaki, S., Sakuma, K., Tanaka, H., Yabuta, N., Kamata, H. and Hirata, H. : Expression and characterization of an inositol 1,4,5-trisphosphate binding domain of phosphatidylinositol-specific phospholipase C- δ 1. *J. Biol. Chem.* **269** : 20179—20188, 1994.

- 18) Hirata, M., Kanematsu, T., Sakuma, K., Koga, T., Watanabe, Y., Ozaki, S. and Yagisawa, H. : D-*myo*-inositol 1,4,5-trisphosphate binding domain of phospholipase C- δ 1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **205** : 1563—1571, 1994.
- 19) Cifuentes, M. E., Delaney, T. and Rebecchi, M. J. : D-*myo*-inositol 1,4,5-trisphosphate inhibits binding of phospholipase C- δ 1 to bilayer membranes. *J. Biol. Chem.* **269** : 1945—1948, 1994.
- 20) Fujii, M., Ohtsubo, M., Ogawa, T., Kamata, H., Hirata, H. and Yagisawa, H. : Real-time visualization of PH domain-dependent translocation of phospholipase C- δ 1 in renal epithelial cells (MDCK) : response to hypo-osmotic stress. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **254** : 284—291, 1999.
- 21) Takeuchi, H., Oike, M., Paterson, H. F., Allen, V., Kanematsu, T., Ito, Y., Erneux, C., Katan, M. and Hirata, M. : Inhibition of Ca²⁺ signalling by p130, a phospholipase-C-related catalytically inactive protein : critical role of the p130 pleckstrin homology domain. *Biochem. J.* **349** : 357—368, 2000.
- 22) Moss, S. J. and Smart, T. G. : Constructing inhibitory synapses. *Nat. Rev. Neurosci.* **2** : 240—250, 2001.
- 23) Kanematsu, T., Jang, I., Yamaguchi, T., Nagahama, H., Yoshimura, K., Hidaka, K., Matsuda, M., Takeuchi, H., Misumi, Y., Nakayama, K., Yamamoto, T., Akaike, N., Hirata, M. and Nakayama, K. : Role of the PLC-related, catalytically inactive protein p130 in GABA_A receptor function. *EMBO J.* **21** : 1004—1011, 2002.
- 24) Wang, H., Bedford, F. K., Brandon, N. J., Moss, S. J. and Olsen, R. W. : GABA_A-receptor-associated protein links GABA_A receptors and the cytoskeleton. *Nature* **397** : 69—72, 1999.
- 25) Coyle, J. E., Qamar, S., Rajashankar, K. R. and Nikolov, D. B. : Structure of GABARAP in two conformations : implications for GABA_A receptor localization and tubulin binding. *Neuron* **33** : 63—74, 2002.
- 26) 水島 昇：オートファジーの分子機構. *生化学* **74** : 523—537, 2002.
- 27) Kittler, J. T., Rostaing, P., Schiavo, G., Fritschy, J. M., Olsen, R., Triller, A. and Moss, S. J. : The subcellular distribution of GABARAP and its ability to interact with NSF suggest a role for this protein in the intracellular transport of GABA_A receptors. *Mol. Cell. Neurosci.* **18** : 13—25, 2001.
- 28) Brandon, N. J., Jovanovic, J. N. and Moss, S. J. : Multiple roles of protein kinase in the modulation of GABA_A receptor function and cell surface expression. *Pharmacol. Ther.* **94** : 113—122, 2002.
- 29) Brandon, N. J., Jovanovic, J. N., Colledge, M., Kittler, J. T., Brandon, J. M., Scott, J. D. and Moss, S. J. : A-kinase anchoring protein 79/150 facilitates the phosphorylation of GABA_A receptors by cAMP-dependent protein kinase via selective interaction with receptor beta subunits. *Mol. Cell. Neurosci.* **22** : 87—97, 2003.
- 30) Westphal, R. S., Tavalin, S. J., Lin, J. W., Alto, N. M., Fraser, I. D., Langeberg, L. K., Sheng, M. and Scott, J. D. : Regulation of NMDA receptors by an associated phosphatase-kinase signaling complex. *Science* **285** : 93—96, 1999.
- 31) Wang, X., Zhong, P. and Yan, Z. : Dopamine D4 receptors modulate GABAergic signaling in pyramidal neurons of prefrontal cortex. *J. Neurosci.* **22** : 9185—9193, 2002.
- 32) Yoshimura, K., Takeuchi, H., Sato, O., Hidaka, K., Doira, N., Terunuma, M., Harada, K., Ogawa, Y., Ito, Y., Kanematsu, T. and Hirata, M. : Interaction of p130 with, and consequent inhibition of, the catalytic subunit of protein phosphatase 1 α . *J. Biol. Chem.* **276** : 17908—17913, 2001.
- 33) Wang, J., Liu, S., Haditsch, U., Tu, W., Cochrane, K., Ahmadian, G., Tran, L., Paw, J., Wang, Y., Mansuy, I., Salter, M. M. and Lu, Y. : Interaction of calcineurin and type-A GABA receptor gamma 2 subunits produces long-term depression at CA1 inhibitory synapses. *J. Neurosci.* **23** : 826—836, 2003.
- 34) Wan, Q., Xiong, Z. G., Man, H. Y., Ackerley, C. A., Brauton, J., Lu, W. Y., Becker, L. E., MacDonald, J. F. and Wang, Y. T. : Recruitment of functional GABA_A receptors to postsynaptic domains by insulin. *Nature* **388** : 686—690, 1997.
- 35) Brunig, I., Penschuck, S., Berninger, B., Benson, J. and Fritschy, J. M. : BDNF reduces miniature inhibitory postsynaptic currents by rapid downregulation of GABA_A receptor surface expression. *Eur. J. Neurosci.* **13** : 1320—1328, 2001.
- 36) Connolly, C. N., Kittler, J. T., Thomas, P., Uren, J. M., Brandon, N. J., Smart, T. G. and Moss, S. J. : Cell surface stability of gamma-aminobutyric acid type A receptors. Dependence on protein kinase C activity and subunit composition. *J. Biol. Chem.* **274** : 36565—36572, 1999.
- 37) Baulac, S., Huberfeld, G., Gourfinkel-An, I., Mitropoulou, G., Beranger, A., Prud'homme, J. F.,

- Baulac, M., Brice, A., Bruzzone, R. and LeGuern, E. : First genetic evidence of GABA_A receptor dysfunction in epilepsy : a mutation in the gamma 2-subunit gene. *Nat. Genet.* **28** : 46—48, 2001.
- 38) Wallace, R. H., Marini, C., Petrou, S., Harkin, L. A., Bowser, D. N., Panchal, R. G., Williams, D. A., Sutherland, G. R., Mulley, J. C., Scheffer, I. E. and Berkovic, S. F. : Mutant GABA_A receptor gamma 2-subunit in childhood absence epilepsy and febrile seizures. *Nat. Genet.* **28** : 49—52, 2001.
- 39) Harkin, L. A., Bowser, D. N., Dibbens, L. M., Singh, R., Phillips, F., Wallace, R. H., Richards, M. C., Williams, D. A., Mulley, J. C., Berkovic, S. F., Scheffer, I. E. and Petrou, S. : Truncation of the GABA_A-receptor gamma 2 subunit in a family with generalized epilepsy with febrile seizures plus. *Am. J. Hum. Genet.* **70** : 530—536, 2002.
- 40) Cossette, P., Liu, L., Brisebois, K., Dong, H., Lortie, A., Vanasse, M., Saint-Hilaire, J. M., Carmant, L., Verner, A., Lu, W. Y., Wang, Y. T. and Rouleau, G. A. : Mutation of GABRA 1 in an autosomal dominant form of juvenile myoclonic epilepsy. *Nat. Genet.* **31** : 184—189, 2002.