

細胞性粘菌をモデル生物とするグルタメートレセプターの比較ゲノム研究

● 檜井栄一

金沢大学自然科学研究科

＜研究の目的と進め方＞

グルタミン酸受容体は、高等生物の中樞神経系のシナプスにおいて、主要な興奮性情報伝達を担っている。グルタミン酸受容体には、大別してイオンチャンネル型受容体(iGluR)と代謝型受容体(mGluR)が存在するが、iGluRはその起源と考えられるカリウムチャンネル内蔵のGluR0が原核生物で発見された。それに対して、mGluRはDrosophilaから高等生物で保存されている。細胞性粘菌は単細胞生物でありながら、飢餓状態では集合体を経て柄と胞子からなる子実体と呼ばれる多細胞生物様の形態をとる。このような性質から、細胞分化のモデルとして広く研究に用いられている。本研究課題では、細胞性粘菌におけるグルタミン酸受容体の存在の可能性を探り、その分子の構造、機能について高等生物のものと比較検討することを目的とした。

＜研究開始時の研究計画＞

高等生物mGluRのリガンド結合部位や膜貫通部位などのアミノ酸配列を基に、Dicty Genome Databaseをスクリーニングし、相同性の高い遺伝子を同定する。また同定した遺伝子について、cDNAクローニングを行い、発現や分化への関与について解析を行う。

＜研究期間の成果＞

ラットmGluR1のリガンド結合領域(アミノ酸残基33-522)を基に、Dicty Genome Databaseをスクリーニングし、高い相同性を有する遺伝子DDB0231976を見いだした。この遺伝子DdmXRは、816個のアミノ酸からなる蛋白質をコードしており、そのhydrophobicityから7回膜貫通型の膜受容体構造をもつものと推察された。mGluR1のリガンド結合領域の結晶解析から、Ser165、Thr188、Asp208、Tyr236、Asp318が、グルタミン酸の α アミノ基と α カルボキシル基との結合に、Arg78、Lys409が γ カルボキシル基との結合に必須であり、また種を越えて保存されている。DdmXRでは、グルタミン酸の α アミノ基と α カルボキシル基との結合に必須のアミノ酸残基は保存されていたが、 γ カルボキシル基との結合に必須なアミノ酸残基は保存されていなかった(図1)。DdmXRのリガンド結合領域は高等生物のmGluRの中では、マウスmGluR3と最も高い相同性を示し、グルタミン酸の α アミノ基と α カルボキシル基との結合に必須の領域に限れば、27.5%の一致、52.1%の相同性が認められた。これに対して、膜貫通領域は、ラットGABABR2と最も高い相同性を示し、30%の一致、60%の相同性であった。GABAB受容体遺伝子とmGluRファミリー遺伝子は、共通の祖先からまずGABABRが派生し、その後mGluRファミリーが派生してきたと考えられている。さまざまなG蛋白質共役型classIII遺伝子とDdmXRのアミノ酸配列を基に分子系統樹を作成すると、DdmXRはGABABRの派生後に現れ、その後全てのmGluRファミリーが派生してくるという結果となった。これらの結果から、DdmXRはmGluRの起源となる分子ではないかと考えられた。

Drosophilaには、DmGluARとDmXRの2種類のmGluRファミリー遺伝子が存在する。DmGluARは、高等生物のmGluRのorthologであるが、DmXRはDdmXRと同様に、グルタミン酸の γ カルボキシル基との結合に必須なアミノ酸残基が保存されておらず、実際グルタミン酸とは反応しないことが示されている。分子系統樹による解析から、DmXRはさまざまなmGluRファミリー遺伝子の派生後に分岐しそこからmGluRが派生してくるという結果となった。DdmXRは、その構造から細胞膜に発現していることが予想される。そこで局在を調べるために、GFPTagのDdmXRをAx2細胞に発現させたところ、GFP単独では細胞質、核全体に渡って分布するのに対して、GFP-DdmXRは細胞表面に局在していた。次に、DdmXRの機能を解析するためにDdmXR遺伝子欠損株を作成した。DdmXR遺伝子coding領域のほぼ中央に存在するKpnI siteにBlasticidine耐性遺伝子を挿入したKO constructを作成し、遺伝子導入後相同組み換えをおこした細胞を選択した。DdmXR遺伝子欠損株の増殖能を調べると、Wildに比べて低密度では両者に差はなかったが、高密度では欠損株の増殖が早く、またより高密度で安定化した。GFP-DdmXR発現株で分布の変化を見てみると、低密度では細胞膜にpunctateな局在を示し、高密度では細胞膜全体に分布していた。しかしながら、prestarvation response遺伝子であるDiscoidinとcAR1の発現をWildとDdmXR欠損株で見たと、両者に差はなく、DdmXRはprestarvation responseに関した受容体ではないと考えられた。DdmXR遺伝子の飢餓状態によって誘導される分化過程での発現をNorthern blotにより解析すると、DdmXR mRNAは分化過程全体に渡って発現していたが、分化誘導後2-4時間で高い発現が認められた。この時期に集合体形成に必須のcAR1やacaの発現誘導が認められることからDdmXRの集合体形成機構への関与が考えられた。そこで次に、DdmXR欠損株の分化への影響について解析を行った。WildとDdmXR欠損株共に、飢餓状態によって集合体および子実体形成は誘導されたが、DdmXR欠損株では集合体形成に顕著な遅れが認められた。Northern blotで集合体形成に関与するcAR1とacaの発現を調べてみると、Wildでは分化誘導後2-4時間をピークにその後減弱するのに対して、DdmXR欠損株では発現誘導が持続し、cAR1のピークは8時間後に見られた。また、cAMPに対する走化性を比べると、DdmXR欠損株ではWildの約7割に減弱していることが明らかとなった。集合体の形成には細胞外因子として、細胞密度依存性機構に関与するconditioned medium factor (CMF)が必要である。このCMF受容体の内すくなくとも1種類はG蛋白質共役型受容体であると考えられている。CMFを高密度、飢餓状態で20時間振到培養により調整し、さまざまな細胞密度での液層培養下の集合体形成に対する効果を解析した。CMF存在下では、より低密度においても集合体形成が観察される。WildとDdmXR欠損株の両者共に同程度のCMFの効果が認められ、DdmXRはCMFに対する受容体ではないと考えられた。また、DdmXR欠損株から調整

したCMFもWildから調整したCMFと同程度の活性が認められたことから、DdmXR欠損株からのCMFの分泌にも影響がないものと推察された。DdmXRの α アミノ基と α カルボキシル基との結合に必須の領域が保存されていることから、DdmXRのリガンドがアミノ酸であることも考えられ、またそれらがアゴニストあるいはアンタゴニストとして作用する可能性もある。15種類の自然アミノ酸 (Glu、Arg、Gly、Lys、Asp、Gln、His、Pro、Ser、Thr、Ala、Asn、Leu、Met、Val) およびGABAの1mM存在下において分化への影響について解析を行ったが、集合体形成の促進あるいは遅延は観察されず、またcAMPにたいする走化性にも著変は認められなかった。このことから、単純アミノ酸がリガンドである可能性は低いと考えられた。

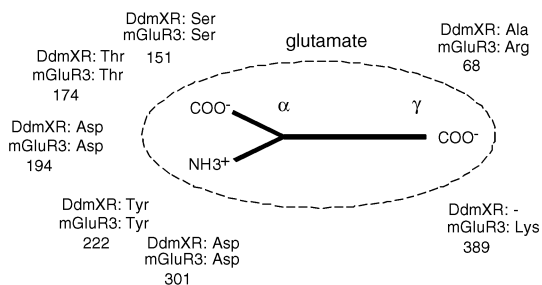


図1 ラット mGluR1 と DdmXR のリガンド結合必須アミノ酸残基の比較。

<国内外での成果の位置づけ>

現在論文は投稿中であるが、これらの結果が、G蛋白質共役型受容体研究の分野で有益な情報であるというコメントを得ている。

<達成できなかったこと、予想外の困難、その理由>

iGluRの起源と考えられる分子が原核生物で発見され、またArabidopsisにおいても複数のiGluR遺伝子の報告があることから細胞性粘菌にも同様の分子の存在が示唆される。iGluRには4つの膜結合領域 (M1-M4) が存在し、N末端細胞外領域とM3とM4の間のループの領域の2か所がリガンド結合に関与している。Arabidopsis GLR1や高等生物AMPA/KA、NMDA受容体のリガンド結合領域アミノ酸配列を基にDicty Genome Databaseを検索したが相同性の高い遺伝子は見いだせなかった。

<今後の課題>

今後の課題としては、リガンドの同定、どのG蛋白質と共役しているのか、またそのシグナル伝達機構を明らかにすることが挙げられる。DdmXRと最も相同性の高いmGluR3の膜貫通部位からC末端までとDdmXRの細胞外領域とのキメラ受容体を調整し、それをmGluRの発現していないCHO細胞の発現安定株を作成する。この細胞のDdmXRの最も発現の高い分化時期の細胞性粘菌からの抽出液との反応をcAMPあるいはPIの測定によってリガンドの解析をしていく予定である。

<研究期間の全成果公表リスト>

なし。