

- 19450.
- 3) Tajiri, T., Maki, H., & Sekiguchi, M. (1995) *Mutat. Res.*, 336, 257-267.
 - 4) Nunoshiba, T., Watanabe, T., Nakabeppu, Y., & Yamamoto, K. (2002) *DNA Repair*, 1, 411-418.
 - 5) Shimizu, M., Gruz, P., Kamiya, H., Kim, S.-R., Pisani, F.M., Masutani, C., Kanke, Y., Harashima, H., Hanaoka, F., & Nohmi, T. (2003) *EMBO Rep.*, 4, 269-273.
 - 6) Kamiya, H., Maki, H., & Kasai, H. (2000) *Biochemistry*, 39, 9508-9513.
 - 7) Inoue, M., Kamiya, H., Fujikawa, K., Ootsuyama, Y., Murata-Kamiya, N., Osaki, T., Yasumoto, K., & Kasai, H. (1998) *J. Biol. Chem.*, 273, 11069-11074.
 - 8) Satou, K., Kawai, K., Kasai, H., Harashima, H., & Kamiya, H. (2007) *Free Rad. Biol. Med.*, 42, 1552-1560.
 - 9) Maki, H. & Sekiguchi, M. (1992) *Nature*, 355, 273-275.
 - 10) Kamiya, H., Ishiguro, C., & Harashima, H. (2004) *J. Biochem.*, 136, 359-362.
 - 11) Iida, E., Satou, K., Mishima, M., Kojima, C., Harashima, H., & Kamiya, H. (2005) *Biochemistry*, 44, 5683-5689.
 - 12) Kamiya, H., Iida, E., Murata-Kamiya, N., Yamamoto, Y., Miki, T., & Harashima, H. (2003) *Genes Cells*, 8, 941-950.
 - 13) Hori, M., Fujikawa, K., Kasai, H., Harashima, H., & Kamiya, H. (2005) *DNA Repair*, 4, 33-39.
 - 14) Hori, M., Asanuma, T., Inanami, O., Kuwabara, M., Harashima, H., & Kamiya, H. (2006) *Biol. Pharm. Bull.*, 29, 1087-1091.
 - 15) Kobayashi, M., Ohara-Nemoto, Y., Kaneko, M., Hayakawa, H., Sekiguchi, M., & Yamamoto, K. (1998) *J. Biol. Chem.*, 273, 26394-26399.
 - 16) Nunoshiba, T., Ishida, R., Sasaki, M., Iwai, S., Nakabeppu, Y., & Yamamoto, K. (2004) *Nucleic Acids Res.*, 32, 5339-5348.
 - 17) Fujikawa, K., Kamiya, H., Yakushiji, H., Fujii, Y., Nakabeppu, Y., & Kasai, H. (1999) *J. Biol. Chem.*, 274, 18201-18205.
 - 18) Tsuzuki, T., Egashira, A., Igarashi, H., Iwakuma, T., Nakatsuru, Y., Tominaga, Y., Kawate, H., Nakao, K., Nakamura, K., Ide, F., Kura, S., Nakabeppu, Y., Katsuki, M., Ishikawa, T., & Sekiguchi, M. (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 98, 11456-11461.
 - 19) Suzuki, T., Yamamoto, K., Harashima, H., & Kamiya, H. (2008) *DNA Repair*, 7, 88-94.
 - 20) Hori, M., Ishiguro, C., Suzuki, T., Nakagawa, N., Nunoshiba, T., Kuramitsu, S., Yamamoto, K., Kasai, H., Harashima, H., & Kamiya, H. (2007) *DNA Repair*, 6, 1786-1793.

紙谷 浩之

(北海道大学大学院薬学研究院)

Mutations induced by damaged DNA precursors and their prevention by nucleotide pool sanitization and DNA repair enzymes

Hiroyuki Kamiya (Faculty of Pharmaceutical Sciences, Hokkaido University, Kita-12, Nishi-6, Kita-ku, Sapporo 060-0812, Japan)

代謝型グルタミン酸受容体の細胞膜への輸送メカニズム

—足場タンパク質 Tamalin による自己阻害機構の構造機能解析を通じて—

1. はじめに

記憶・学習などの高次脳機能において、グルタミン酸を認識する受容体 (GluR) は、神経細胞間の興奮性神経伝達に重要な役割を担っている。GluR は、イオンチャネル型受容体 (iGluR) と代謝型グルタミン酸受容体 (mGluR) の2種類に大別され、これらが膜タンパク質として効率的に神経伝達を行うためには、適切に神経シナプス膜へ輸送されることが必要不可欠である。本稿では、mGluR のシナプス膜への局在に重要な役割を果たす足場タンパク質 Tamalin の構造解析を中心に、mGluR の細胞膜輸送の分子機構について紹介する。

2. mGluR 及びその膜輸送に関わる分子の構造・機能

mGluR はタイプC G タンパク質共役受容体であり、グルタミン酸依存的に神経細胞内でのセカンドメッセンジャーの代謝を変化させ、興奮性シナプス伝達を調節する。これまで、八つの mGluR サブタイプが報告されており、それらはアミノ酸配列の相同性、アゴニストの選択性、共役する細胞内エフェクターの違いなどに基づいて、三つのグループに分けられる。mGluR の構造は、グルタミン酸を結合する細胞外領域、7回膜貫通領域および細胞内領域からなり、ホモダイマーを形成している¹⁾。細胞外領域については、これまでX線結晶構造解析や fluorescent resonance energy transfer (FRET) 法により、筆者らのグループの研究も含めて多くの解析が行われ、G タンパク質を結合できる活性化状態と結合できない不活性化状態の動的平衡が、グルタミン酸の結合により活性化状態にシフトし、セカンドメッセンジャーの代謝を変化させると考えられている^{2,3)}。

細胞内領域については、マスマスペクトロメトリーや酵母ツーハイブリッド法などにより、Homer や Tamalin など多くの結合タンパク質が同定されている⁴⁾。Homer は、EVH1 ドメインを介して、グループI mGluR (mGluR1, 5) の細胞内領域に存在する PPXXF モチーフと結合する⁵⁾。また、Homer はコイルドコイル領域により多量体化し、mGluR

やその他のタンパク質のシナプス膜での局在化に参与していると考えられている⁶⁾。他方, Tamalin は PDZ ドメインを介し, グループ I mGluR の細胞内領域の C 末端配列と結合する。最近, Tamalin を欠損させたマウスにおいて, コカインやモルヒネへの感受性が低下することが報告されている⁷⁾。Tamalin は, PDZ ドメイン, コイルドコイル領域, ITAM モチーフなど複数のタンパク質結合領域を持つことから, 受容体と機能的活性を持つ様々なシグナリングタンパク質を近接させ, シグナリングタンパク質が受容体の機能を調節するための場を提供する足場タンパク質と考えられている。酵母ツーハイブリッド法と免疫沈降法により, 結合分子として, Cytohesin-2, Syk キナーゼ, S-SCAM, キナーゼドメイン欠損型 Trk 受容体などが同定されている⁸⁻¹⁰⁾。COS-7 細胞及び培養神経細胞において, Tamalin を Cytohesin-2 及び mGluR と共発現させると, Tamalin の PDZ ドメインを含む N 末端側領域を共発現させた場合に比べ, mGluR の細胞膜発現量が増加する¹¹⁾。このことから, Tamalin は mGluR を細胞膜へ輸送する機能があることが示されている。このように Homer や Tamalin は, mGluR との結合の生理学的意義が明らかになりつつあるものの, 他のタンパク質の mGluR への結合の意義については, 多くが未解明であり, 膜輸送機構への関わりも含め, さらなる解明が期待される。

3. mGluR の膜輸送における Tamalin の自己阻害

Tamalin は, PDZ ドメインの内在性リガンドとして, 自らの C 末端領域にも PDZ ドメイン結合モチーフを有している。筆者らは, 酵母ツーハイブリッド法により, 内在性リガンドと PDZ ドメインの相互作用が, mGluR の Tamalin への結合を阻害していること, つまり Tamalin が自己阻害状態を形成していることを明らかにした¹²⁾。また同手法によるさらなる解析から, Tamalin は, 他のタンパク質に一般的に見られる分子内相互作用による自己阻害ではなく, PDZ ドメインを介して自己会合し, 阻害状態を形成していることが明らかとなった。

内在性リガンドへの結合が報告されていた S-SCAM を⁹⁾, mGluR 及び Tamalin と COS-7 細胞で共発現させ, 免疫沈降実験及び細胞膜表面ビオチン化実験を行った結果, mGluR, Tamalin, S-SCAM が三者複合体を形成することにより, mGluR が細胞膜へ輸送されることが示された。S-SCAM は, キネシンスーパーファミリー KIF1B α と結合することにより, 結合した積荷受容体を細胞膜へ輸送する機能が報告されている¹³⁾。iGluR の膜輸送において, iGluR

が積荷受容体/足場タンパク質/モータータンパク質の複合体の一部として, 細胞膜へ運ばれることが知られていることから, mGluR も Tamalin を介して同様の複合体を形成し, 細胞膜へ輸送されることが予想される。

4. Tamalin による mGluR 膜輸送の構造的基盤

筆者らは Tamalin の自己阻害機構を詳細に明らかにするため, PDZ ドメインのフレキシブルな C 末端に内在性リガンドを連結したタンパク質 (以下, small Tamalin) の X 線結晶構造を決定した (図 1A)。得られた構造において, プロトマー間の配向が, 内在性リガンドを融合したことによる摂動を受けていないことから, 同構造は, 野生型 Tamalin の自己阻害会合における構造のコアな部位に相当すると考えた。また同構造は, 二つの PDZ ドメイン二量体からなる四量体であり, 二量体の構造は, 過去に報告された PDZ ドメインの二量体の構造とは異なり, プロトマー間の疎水性相互作用により形成された新規構造であった (図 1B, C, D)。動的散乱測定とゲルろ過解析により, small Tamalin の会合状態を確認した結果から, Tamalin が四量体と二量体の平衡状態にあることが示唆された。

重要なことに, 得られた構造において, 内在性リガンドは 2 種類の結合様式 conventional mode (CM) と unconventional mode (UM) で, 隣接するプロトマーに結合していた。CM においては, 内在性リガンドが, 他の PDZ-リガンド相互作用に見られる一般的な様式で結合していたが (図 2A), UM では, 内在性リガンドが, リガンド結合部位に垂直な配向で安定化される珍しい結合様式であった (図 2B)。両様式は, リガンド相互作用に関与する原子数が少なく, ビアコアを用いた解析により, 内在性リガンドは非常に弱い親和性で結合していることが示された。

筆者らは mGluR が Tamalin の自己阻害をどのように解放するかを明らかにするため, mGluR の C 末端リガンドと PDZ ドメインの複合体の結晶構造を決定した。C 末端リガンドは, CM で PDZ ドメインに結合しており, 主に C 末端から 2 残基目と 4 残基目のセリンが, PDZ ドメインのリガンド結合部位と特異的な静電的相互作用を形成していた (図 2C, D)。したがって, mGluR の細胞内領域は静電的相互作用を利用して, 内在性リガンドと競合的に Tamalin に結合し, 解放された内在性リガンドは S-SCAM と結合すると考えられる。

5. mGluR の膜輸送の分子モデル

Tamalin による mGluR の膜輸送について以下の機構が考

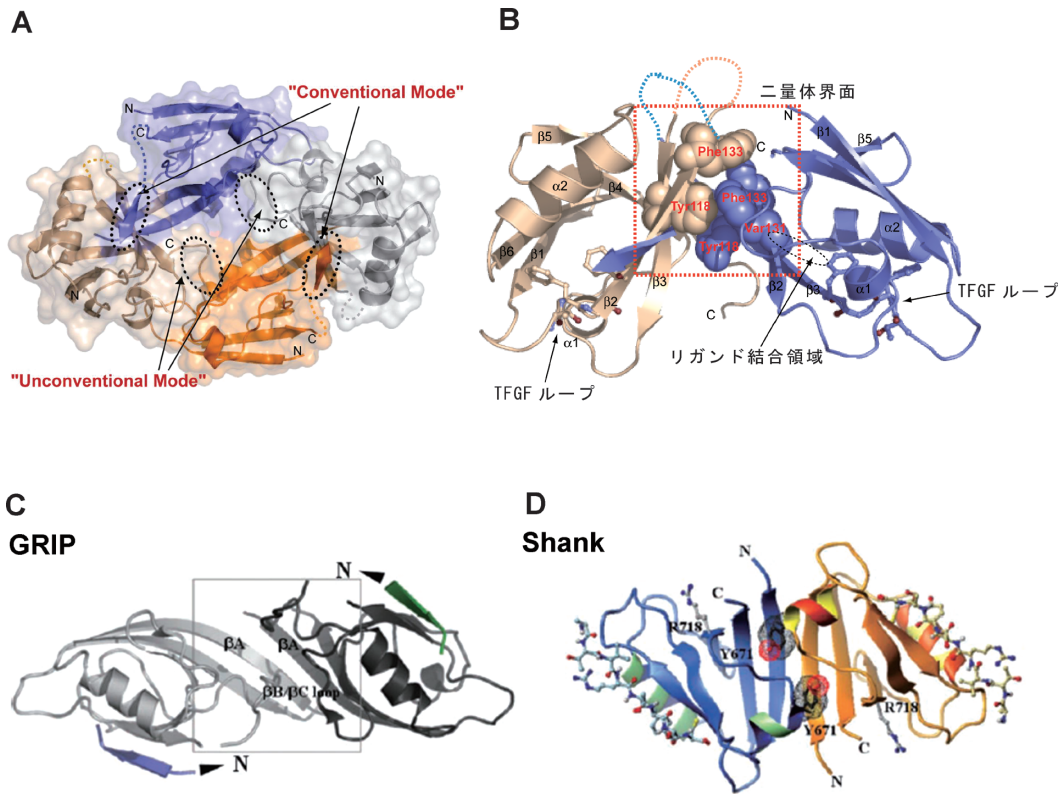


図1 Tamalinの自己阻害型会合状態のコアの結晶構造

(A)構造内のそれぞれの色(青, 灰色, オレンジ, 淡赤色)は一つのsmall Tamalinに相当. 点線で囲まれた領域が内在性リガンドに対応. (B)四量体内におけるPDZ二量体の構造. 二量体界面の疎水性残基を表記. (C)GRIPのPDZドメインの二量体構造. (D)ShankのPDZドメインの二量体構造. 共に, N末端のβストランドβ1間で逆平行の分子間βシートを形成. Imらの報告(2003)より引用, 改変¹⁾.

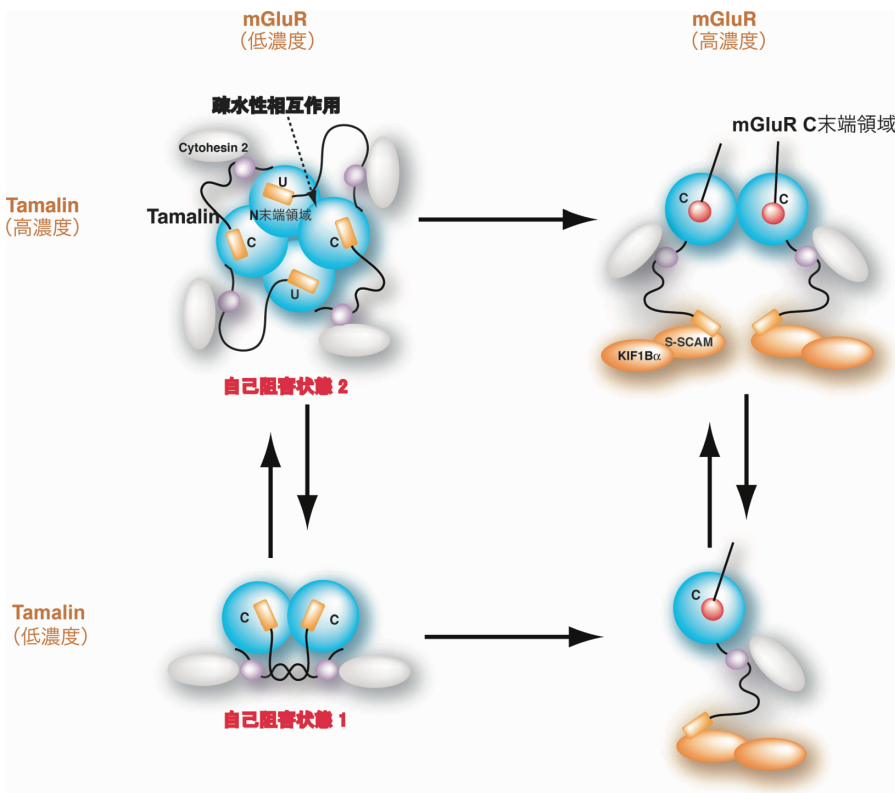


図3 足場タンパク質 Tamalin による mGluR の膜輸送のモデル

内在性リガンドの結合における unconventional な様式と conventional な様式をそれぞれ U 及び C と略記. ロイシンジッパー領域は紫色で表記. N末端領域は, PDZドメインを含む. 内在リガンドは黄色の四角で示す. 詳細は本文中に記載.

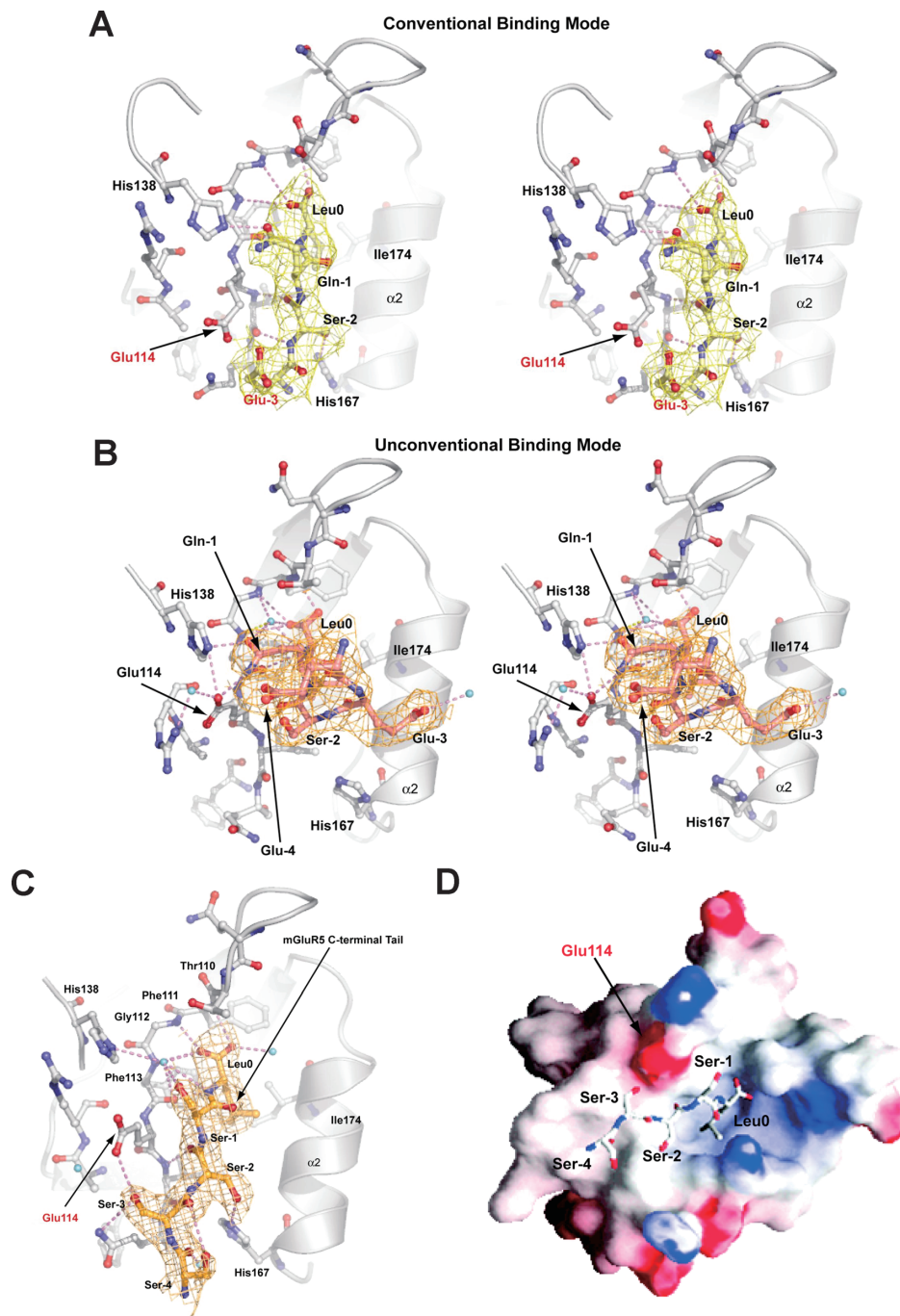


図2 Tamalin PDZ ドメインと内在性リガンド及び mGluR リガンドの相互作用様式

(A, B) 内在性リガンドの相互作用における conventional な結合様式と unconventional な結合様式のステレオ図。(A) conventional な結合様式。静電的反発に関わる Glu114 と Glu-3 を赤色で表記。(B) unconventional な結合様式。共に内在性リガンドに対応する電子密度を示す。(C, D) Tamalin PDZ ドメインと mGluR C 末端リガンドの複合体における静電的相互作用。(C) mGluR5 の C 末端リガンド周辺の拡大図。静電的相互作用に関与する Glu114 の側鎖を赤色で表記。mGluR5 の C 末端リガンドは黄色の ball-and-stick で示される。(D) 複合体構造表面における $-10\text{k}_B\text{T}^{-1}$ (赤色) から $+10\text{k}_B\text{T}^{-1}$ (青色) までの静電ポテンシャル図。

えられる (図3)。まず細胞内において, mGluRの局所濃度が低い場合, TamalinはPDZ-PDZ間の疎水性相互作用と2種類の内在性リガンド結合様式により, 自己阻害会合状態を形成する。膜輸送タンパク質による自己阻害の有名な例として, キネシンが挙げられるが, Tamalinの自己阻害もキネシンと同様に, mGluRを結合するまで, Tamalin単独での膜への輸送を抑制し, エネルギーの浪費を避ける役割を持つものと推測される¹⁴⁾。mGluRの局所濃度が高くなった時, mGluRはTamalinのPDZドメインに結合し, 自己阻害会合を解離させ, 内在性リガンドは解放される。解放された内在性リガンドはS-SCAMに結合し, mGluRを含む複合体として, 初めて細胞膜へ輸送されると考えられる。

6. おわりに

最近の筆者らの構造学的研究から, TamalinのPDZドメインのリガンド結合部位近傍に, 二つのリン酸イオン分子が結合していることが明らかとなった¹⁵⁾。いくつかのPDZタンパク質では, 脂質であるホスファチジルイノシトール4,5-二リン酸(PIP₂)が標的タンパク質のC末端リガンドと競合的に結合し, そのタンパク質の膜輸送を制御することが報告されていることから¹⁶⁾, Tamalinに見られた二つのリン酸イオンはPIP₂内のリン酸基に相当する可能性が示唆される。現段階では推測の域をでないが, mGluRがTamalinにより細胞膜へ輸送された後に, mGluRとTamalinの結合が, 細胞膜における脂質とPDZドメインの相互作用により競合的に解離する可能性が考えられる。今後, Tamalinへの脂質の結合能などを調べることにより, mGluRの膜輸送の分子機構がさらに明確になることが期待される。

本研究において, 終始議論し, 適切な御助言を頂いた大阪大学蛋白質研究所の大山拓次博士に深く感謝致します。

- 1) Bulenger, S., Marullo, S., & Bouvier, M. (2005) *Trends Pharmacol. Sci.*, **26**, 131-137.
- 2) Kunishima, N., Shimada, Y., Tsuji, Y., Sato, T., Yamamoto, M., Kumasaka, T., Nakanishi, S., Jingami, H., & Morikawa, K. (2000) *Nature*, **407**, 971-977.
- 3) Jingami, H., Nakanishi, S., & Morikawa, K. (2003) *Curr. Opin. Neurobiol.*, **13**, 271-278.
- 4) Farr, C.D., Gafken, P.R., Norbeck, A.D., Doneanu, C.E., Stapels, M.D., Barofsky, D.F., Minami, M., & Saugstad, J.A. (2004) *J. Neurochem.*, **91**, 438-450.
- 5) Beneken, J., Tu, J.C., Xiao, B., Nuriya, M., Yuan, J.P., Wor-

- ley, P.F., & Leahy, D.J. (2000) *Neuron*, **26**, 143-154.
- 6) Fagni, L., Worley, P.F., & Ango, F. (2002) *Sci. STKE*, 2002, RE8.
- 7) Ogawa, M., Miyakawa, T., Nakamura, K., Kitano, J., Furushima, K., Kiyonari, H., Nakayama, R., Nakao, K., Moriyoshi, K., & Nakanishi, S. (2007) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **104**, 14789-14794.
- 8) Esteban, P.F., Yoon, H.Y., Becker, J., Dorsey, S.G., Caprari, P., Palko, M.E., Coppola, V., Saragovi, H.U., Randazzo, P.A., & Tessarollo, L. (2006) *J. Cell Biol.*, **173**, 291-299.
- 9) Kitano, J., Yamazaki, Y., Kimura, K., Masukado, T., Nakajima, Y., & Nakanishi, S. (2003) *J. Biol. Chem.*, **278**, 14762-14768.
- 10) Hirose, M., Kitano, J., Nakajima, Y., Moriyoshi, K., Yanagi, S., Yamamura, H., Muto, T., Jingami, H., & Nakanishi, S. (2004) *J. Biol. Chem.*, **279**, 32308-32315.
- 11) Kitano, J., Kimura, K., Yamazaki, Y., Soda, T., Shigemoto, R., Nakajima, Y., & Nakanishi, S. (2002) *J. Neurosci.*, **22**, 1280-1289.
- 12) Sugi, T., Oyama, T., Muto, T., Nakanishi, S., Morikawa, K., & Jingami, H. (2007) *EMBO J.*, **26**, 2192-2205.
- 13) Mok, H., Shin, H., Kim, S., Lee, J.R., Yoon, J., & Kim, E. (2002) *J. Neurosci.*, **22**, 5253-5258.
- 14) Adio, S., Reth, J., Bathe, F., & Woehlke, G. (2006) *J. Muscle Res. Cell Motil.*, **27**, 153-160.
- 15) Sugi, T., Oyama, T., Morikawa, K., & Jingami, H. (2008) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **366**, 373-378.
- 16) Zimmermann, P. (2006) *Biochim. Biophys. Acta*, **1761**, 947-956.
- 17) Im, Y.J., Lee, J.H., Park, S.H., Park, S.J., Rho, S.H., Kang, G. B., Kim, E., & Eom, S.H. (2003) *J. Biol. Chem.*, **278**, 48099-48104.

杉 拓磨¹⁾, 森川 耿右²⁾, 陣上 久人³⁾

¹⁾名古屋大学大学院理学研究科生命理学専攻
分子神経生物学講座

²⁾大阪大学蛋白質研究所

生体分子認識(タカラバイオ)寄附研究部門

³⁾京都大学大学院医学研究科付属医学教育推進センター)

Metabotropic glutamate receptor trafficking mechanism—Autoinhibitory role of a scaffold protein Tamalin—

Takuma Sugi¹⁾, Kosuke Morikawa²⁾, and Hisato Jingami³⁾

¹⁾Group of Molecular Neurobiology, Graduate School of Science, Nagoya University (Furo-cho, Chikusa-ku, Nagoya, Aichi 464-8602, Japan)

²⁾Institute for Protein Research, Open Laboratories of Advanced Bioscience and Biotechnology (OLABB), Osaka University (6-2-3, Furuedai, Suita, Osaka 565-0874, Japan)

³⁾The Graduate Courses for Integrated Research Training, Kyoto University Faculty of Medicine (Yoshida, Sakyo-ku, Kyoto 606-8501, Japan)