

学 位 論 文 題 名

Differential expression of isoforms of PSD-95 binding protein(GKAP/SAPAP1)during rat brain development

(“PSD-95 結合蛋白質(GKAP/SAPAP1)の
ラット脳発育過程における発現の多様性”)

学位論文内容の要旨

postsynaptic density(PSD)はシナプス後膜直下に見出される電子密度の高い特徴的な構造物である。PSDの構成成分として現在までに、アクチン、チューブリン、spectrin、MAP2等いくつかの蛋白質が明らかにされているが、それらの詳細な分子構築や機能については未だに不明な点が多い。近年、PSDを構成する主要な蛋白質の一つとしてPSD-95/SAP90が同定され、その後同じファミリーに属する蛋白質が相次いで報告された。これらの蛋白質はいずれもN末側から順に三つのPDZドメイン、Src homology domain 3 (SH3ドメイン)、guanylate kinase (GK)ドメインを持つ。さらに、PSD-95はPDZドメインを介してNMDAレセプターやShaker type カリウムチャンネルに結合し、これらのレセプターの凝集に関与する可能性が報告されている。一方、SH3ドメインとGKドメインに関する解析についてはこれまでほとんど報告が無い。今回、私はPSDの分子構築を明らかにする目的でこれらのドメインに結合する蛋白質の検索を行った。方法として、PSD-95のC末側のSH3ドメインとGKドメインを含む領域をbaitに酵母のtwo hybrid systemを用い、adult ラット脳cDNAライブラリーをスクリーニングした。この結果1260bpから成るclone(clone2-2)を得た。さらに、5'及び3'rapid amplification of cDNA ends (RACE) 法を行い、得られたcloneのcoding regionの全長を明らかにした。その結果、この蛋白質には少なくとも四種類の塩基配列のバリエーション(clone2-2A, B, C, D)が存在することが明らかとなった。clone2-2A-Dは、分子の大部分において配列は共通であるが、N末に三種類の異なった配列を有し、中央部分に欠失を持つものも存在していた。clone2-2A-Dの全てに共通して存在している配列は、私の研究の途中で、PSD-95のGKドメインに結合する新しい蛋白質として二つのグループから報告されたguanylate kinase-associated protein (GKAP) と SAP90/PSD-95-associated protein 1 (SAPAP1)にも存在していることが解り、今回私が報告した蛋白質を含む三者は、いずれも同一の遺伝子のオルターナティブスプライシングによるアイソフォームであると考えられた。すなわち、このPSD-95結合蛋白質のN末には、既に報告されたものを含めて四種類(GKAP/clone2-2A・C, clone2-2B, clone2 2D, SAPAP1)の異なった配列が存在することが明らかになった。次に、PSD-95とこのcloneとの直接の結合について確認し、

さらにこの蛋白質がPSD-95のどの部位と結合するかを明らかにするためにgel overlay assayを行った。この結果、clone2-2はPSD-95と直接に結合することが確認され、その結合部位はGKドメインであることが明らかになった。この結果はtwo-hybrid systemで得られた結果に一致するものであった。次にこの蛋白質の組織分布についてNorthern blotで検討した。adult ラットの各組織におけるこのPSD-95結合蛋白質のmRNAの発現を検討したところ、脳と精巣にのみ発現を認め、他の組織には全く発現を認めなかった。脳では主にシグナルの強い5.4kbと、これよりも弱い7.6kbの二種類のmRNAを認め、精巣では弱い3.9kbのmRNAの発現を認めるのみであった。次にこのPSD-95結合蛋白質のラット脳発育過程における発現についてNorthern blotで解析した。共通配列の部分のプロープとして使用すると7.6kbのmRNAは生直後より発現し、その後adultまではほぼ同一の発現を示した。一方、5.4kbのmRNAは生後より発現し、発育にともない増強していた。さらに、このPSD-95結合蛋白質の多様なN末の関与について検討するため、それぞれのN末に特異的なプロープを使用してNorthern blotを行った。clone2-2A-CのN末に特異的な配列のプロープを用いると7.6kbと5.4kbの二種類のmRNAを認め、いずれも生後からadultまで次第に発現が増強した。clone2-2DのN末特異的なプロープを用いると5.4kbのmRNAのみが生後15日頃から認められ、発育にともない発現が増強した。一方、SAPAP1のN末に特異的なプロープでは、7.6kbのmRNAのみを認め、これは生直後に強発現し、その後adultになるに従い漸減した。すなわち、共通配列のプロープを使用した時に認められた7.6kbのmRNAはclone2-2A-CとSAPAP1の二つのmRNAから構成され、5.4kbのmRNAは、clone2-2A-Cとclone2-2DのmRNAから構成されていると考えられた。また、このPSD-95結合蛋白質は、ラット脳発育過程における発現パターンから、大きく二つのグループに分けられることが解った。一つはclone2-2A-Dに見られる発現が次第に増強して行くグループで、もう一つはSAPAP1に見られる発現が漸減するグループである。以上のようにこのPSD-95結合蛋白質の遺伝子はN末に特徴的な四種類の異なった配列を持っており、これら異なったN末を有するアイソフォームが、脳の発育過程において異なった転写制御をうけていることが明らかとなった。

今回私は、PSD-95のSH3ドメインとGKドメインを含む領域をbaitとしたtwo hybrid systemと5'及び3'RACE法を用い、PSD-95のGKドメインに結合する複数のクローンを単離した。これらと、先に報告されたGKAPとSAPAP1とはいずれも同一の遺伝子に由来すると考えられるが、これまでに報告されていないN末の配列を持つものを含め、四種類のアイソフォームの存在を明らかにした。さらに、これらのアイソフォームのラット脳発育過程における発現をNorthern blotで解析し、異なったN末を有するアイソフォームが、それぞれ特徴的な発現パターンを示すことを明らかにした。これらの結果から、このPSD-95結合蛋白質の異なったN末を有する各アイソフォームが、脳の発育の各段階においてどのような役割を果たしているかを解析して行く上で有用な知見を提示したものと考えられた。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 長 嶋 和 郎

副 査 教 授 阿 部 和 厚

副 査 教 授 北 畠 顯

学 位 論 文 題 名

Differential expression of isoforms of PSD-95 binding protein(GKAP/SAPAP1)during rat brain development

(“PSD-95 結合蛋白質(GKAP/SAPAP1)の
ラット脳発育過程における発現の多様性”)

postsynaptic density(PSD)は中枢神経系のシナプス後膜直下に見出される電子密度の高い特徴的な構造物である。現在までに、PSDを構成する蛋白質もいくつか明らかにされて来ているが、詳細な分子構築や機能については未だに不明な点が多い。近年、PSDを構成する主要な蛋白質の一つとしてPSD-95/SAP90が発見された。この蛋白質はN末側に三つのPDZドメイン、C末側にSrc homology domain 3 (SH3ドメイン)、及びguanylate kinase (GK)ドメインを一つずつ持つ。また、PSD-95はPDZドメインを介してNMDAレセプターやShaker type カリウムチャンネルと結合し、これらの分子の凝集に関与する可能性が報告されている。一方、これまで、C末側に存在するSH3ドメインとGKドメインの機能を解析した報告はほとんど無かった。そこで、今回、申請者らはPSDの分子構築を明らかにすることを目的として、これらのドメインに結合する蛋白質を検索した。方法として、酵母のtwo-hybrid systemを用いた。PSD-95のC末側のSH3ドメインとGKドメインの両方を含む領域をbait(餌)にadultラット脳cDNAライブラリーをスクリーニングし、その結果、694アミノ酸からなる蛋白質を同定した。この蛋白質は、最近PSD-95のGKドメインに結合する新しい蛋白質として二つのグループより報告されたguanylate kinase-associated protein (GKAP) と SAP90/PSD-95-associated protein 1 (SAPAP1)と基本的に同一のものであると考えられたが、これまでに報告されていない新しいアイソフォームの存在(clone2-2A, B, C, D)を明らかにした。次に、酵母のtwo-hybrid systemとgel overlay assay によって、PSD-95とこのcloneとが直接に結合することを確認し、さらにPSD-95の、この蛋白質との結合部位がGKドメインであることを明らかにした。次に、*in situ* hybridizationによって、このPSD-95結合蛋白質の脳内における局在を明らかにした。次いで、この蛋白質の組織分布についてNorthern blotで検討し、このPSD-95結合蛋白質のmRNAは脳と精巣にのみ発現を認め、他の組織には全く発現を認めないことを示した。さらに、このPSD-95結合蛋白質の、多様なN末を有する

アイソフォームの意義を検討するため、それぞれのN末に特異的な配列をプローブとして、脳の発育過程における発現パターンをNorthern blotで解析した。その結果、clone2-2A-Cは出生直後からadultまで次第に発現が増強し、clone2-2Dは生後15日頃より発現が増強し、一方SAPAP1は生後発現が漸減して行くという、異なったN末を有するこれらのアイソフォームが、脳の発育過程の各段階で異なった発現様式を示すことが明らかにした。

公開発表は約30人の聴衆の前で行われ、最初に副査の北畠教授より、このPSD-95結合蛋白質の発育過程での発現変化と電子顕微鏡上の形態の関連についての質問がなされた。次に副査の阿部教授より、この蛋白質と細胞骨格との関連、PSD-95とこのPSD-95結合蛋白質の脳内における局在の違いの意義などを問う質問がなされた。その後、第二病理学教室の澤講師、長谷川先生から、それぞれ、各アイソフォームの組織分布と、*in vivo*での結合を問う質問がなされた。さらに、第一生化学教室の酒井助教授から、両者の結合に必要なとされる条件、及び、GKドメインの酵素活性への影響などを問う質問がなされた。最後に再び北畠教授より、このPSD-95結合蛋白質の心臓血管系における発現の有無を問う質問がなされた。申請者はこれらの質問に対して、実験状況の説明を的確に行い、実験結果の解釈やその生理的意義に関しては他の論文や自己の研究を引用し、豊富な知識に基づいて明解に回答した。

本研究は、PSD-95結合蛋白質の多様なアイソフォームの存在を明らかにし、それぞれのアイソフォームが脳の発育過程において異なった発現制御をうけていることを示したもので、今後、この蛋白質の機能を解析し、PSDの分子構築を明らかにして行くうえで、有用な知見を提供するものと期待される。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ申請者が博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。