

氏 名	野 中 美 応
学位(専攻分野)	博 士 (理 学)
学 位 記 番 号	理 博 第 3178 号
学位授与の日付	平 成 19 年 3 月 23 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
研 究 科 ・ 専 攻	理 学 研 究 科 生 物 科 学 専 攻
学 位 論 文 題 目	Ligand-binding of PDZ domains of PSD-95 in the regulation of the postsynaptic molecular clustering and dendritic spine morphology (PSD-95 の PDZ ドメインのリガンド結合が、後シナプスにおける高密度分子集積と樹状突起のスパイン (棘突起) 形態を制御する)
論文調査委員	(主 査) 教 授 藤 吉 好 則 教 授 平 野 丈 夫 教 授 阿 形 清 和

論 文 内 容 の 要 旨

PSD-95/SAP90 は、興奮性シナプスのシナプス後肥厚部 (PSD) に豊富に含まれ、3つの PDZ ドメインを持つ足場タンパク質であり、NMDA 型グルタミン酸受容体の近傍に関連するシグナル分子を多く集積させるはたらきを持つ。PSD-95 がシナプスに局在するためには N 末の2つのシステイン残基がパルミチン酸修飾を受けることと、少なくとも1つの PDZ ドメインが必要であると言われているが、PSD-95 の高密度分子集積がどのように形成・制御されているのか、未だ解明されていない。各 PDZ ドメインへのリガンド結合欠損の影響を調べることによって、PDZ ドメインのモジュール構造の意義を調べることを目的として研究が進められた。海馬初代培養神経細胞を用いて、PDZ1,2,3 ドメインのリガンド結合能を欠く全長の PSD-95 を過剰発現し、それら PSD-95 のクラスター形成効率を評価した。PSD-95 変異体の発現で、興奮性シナプスや制御性シナプスの形成には影響が見られなかった。しかし、PSD-95 変異体のクラスター形成効率は有意に低下していた。このとき、リガンド結合変異 PDZ ドメインは、数に応じて、ほぼ相加的に影響を及ぼした。さらに、PSD-95 の代謝回転に影響を与えることが知られている2つの薬剤、2-bromo-palmitate と latrunculin A への感受性も変異体 PSD-95 で高まっていた。さらに、PSD-95 の PDZ ドメイン結合欠損変異体の過剰発現によって、PSD-95 のクラスターは樹状突起から離れた位置に形成されており、長いスパインが形成された。このときのスパインの長さは、PSD-95 分子内における PDZ ドメインのリガンド親和性の総和に負に相関していた。また、リガンド結合欠損変異体の発現は PSD-95 のリガンドの1つである synGAP のシナプス局在を有意に減少させた。一方、他の足場タンパク質である Homer 1c, Shank/Synamon, そして、PSD-93/Chapsyn-110 のシナプス局在には影響が見られなかった。更に、PDZ 結合モチーフを欠く synGAP 変異体の発現によって、クラスター効率の低下とスパイン形態の両方の表現型が再現された。

論文では、PSD-95 の PDZ ドメインのリガンド親和性の総和が、一部、synGAP の C 末端との相互作用を介して、PSD-95 のクラスター形成と PSD への強固な組み込みとシナプスの形態成熟を制御していることが明らかにされた。

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

神経細胞はシナプスと呼ばれる細胞の接合構造を形成しており、シナプス前細胞には神経伝達物質を含んだシナプス小胞が存在し、シナプス後細胞には電子顕微鏡像において濃く染まって観察されるシナプス後肥厚が存在する。そのシナプス後肥厚には多くの足場タンパク質が存在して、受容体の局在制御などの機能を担っている。例えば、PSD-95 と名づけられる足場タンパク質がシナプスに局在するためには N 末端の2つのシステイン残基がパルミチン酸修飾を受けることと、少なくとも1つの PDZ ドメインが必要であると言われているが、PSD-95 の高密度分子集積がどのように形成・制御されているのか、未だ解明されていないことが多い。

申請者は、足場タンパク質の代表的な分子である PSD-95/SAP90 の機能解析を行った。PSD-95/SAP90 は、興奮性シナプスのシナプス後肥厚部 (PSD) に豊富に含まれ、3つの PDZ ドメインを有している。これは、NMDA 型グルタミン

酸受容体と結合し、その近傍に多くのシグナル分子を集積させる機能を担っている。各 PDZ ドメインを欠失した変異体を作製して研究すると、PSD-95 の構造が大きく変化してしまうために、PDZ ドメインと受容体等との結合と分子集積との関係を正しく理解することはできない。それゆえ、PDZ ドメインの欠失させるのではなく、受容体等を結合する機能だけを欠損させる各種変異体を作製し、それに蛍光性タンパク質をつないだ遺伝子を作製した。それらの遺伝子を海馬初代培養神経細胞に導入して、研究を行った。PDZ1,2,3 ドメインのリガンド結合能を欠く全長の PSD-95 を過剰発現し、それら PSD-95 のクラスター形成効率を評価した結果、PSD-95 変異体のクラスター形成効率が低下した。この場合に、PDZ ドメインのリガンド結合を欠失させる変異ドメイン数に応じて、ほぼ相加的に影響が現れた。さらに、PSD-95 の代謝回転に影響を与えることが知られている 2 つの薬剤、2-bromo-palmitate と latrunculin A への感受性も変異体 PSD-95 で高くなることを確認した。

また、PSD-95 の PDZ ドメイン結合欠損変異体の過剰発現によって、PSD-95 のクラスターは樹状突起から離れた位置に形成され、長いスパインが形成されることを見出した。これらスパインの長さは、PSD-95 分子内における PDZ ドメインのリガンド親和性の総和に負に相関することを発見した。また、リガンド結合欠損変異体の発現は PSD-95 のリガンドの 1 つである synGAP のシナプス局在を有意に減少させ、他の足場タンパク質である Homer 1c, Shank/Synamon, そして、PSD-93/Chapsyn-110 のシナプス局在には影響がないことを見出した。PDZ 結合モチーフを欠く synGAP 変異体の発現によって、クラスター効率の低下とスパイン形態の両方の表現型が再現されることを確認した。

以上のように、申請者は PSD-95 の PDZ ドメインのリガンド親和性の総和が、synGAP の C 末端との相互作用を介して、PSD-95 のクラスター形成と PSD への強固な組み込みとシナプスの形態成熟を制御していることを明らかにした。よって、本論文は博士（理学）の学位論文として価値あるものと認める。また、論文内容と発表内容に関連した試問を行った結果、合格と認めた。