

氏 名	むら た やす のぶ 村 田 康 信
学位(専攻分野)	博 士 (理 学)
学 位 記 番 号	理 博 第 2931 号
学位授与の日付	平 成 17 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	Postsynaptic Density のプロテオーム解析によって同定された NMDA 受容体および PSD-95 と相互作用する新規タンパク質 PRR7 の機能解析
論文調査委員	(主 査) 教 授 藤 吉 好 則 教 授 平 野 丈 夫 教 授 金 久 實

論 文 内 容 の 要 旨

我々の脳における神経細胞間の情報伝達を効率良く正確に行うために、各シナプスの後膜側には神経伝達物質の受容体をはじめとした多様な分子群が高密度に集積してシナプス後肥厚(PSD)と呼ばれる一種のタンパク質複合体を形成している。この様に多彩なタンパク質が協調的に機能することによって、高度で柔軟性を有する神経伝達が制御されている。この PSD に注目して神経伝達に関わるタンパク質を出来る限り多く明らかにすること、そして、そこに局在する個々のタンパク質の役割とそれらの繋がりを知ることは、神経活動を分子のレベルから理解するために実施すべきアプローチである。

PSD は強固なタンパク質複合体であり、その性質を利用して脳から PSD を単離する方法がすでに確立していた。この PSD 画分のプロテオーム解析によって、300 を越えるタンパク質を同定した。しかし、PSD 以外のタンパク質も混在していることが考えられたので、精製途中に得られるシナプトソーム画分に対しても解析を行い、PSD 画分の解析と比較検討することによって、シナプスに存在するタンパク質に対してのプロファイリングを実現した。この様な方法によって、PSD 画分に特異的に存在するタンパク質群を解析した。その結果、PSD は NMDA 受容体や PSD-95, shank, GKAP など主成分とするタンパク質群からなり、40 を越えるシグナル伝達系のタンパク質を含むことを明らかにした。その中から興味深い28個の新規のタンパク質を選別した。

上記の解析で明らかになった新規タンパク質の中で、PSD 画分への濃縮の程度、既知タンパク質との相同性、配列の新規性などの点から、最も特徴的であったタンパク質について、機能解析を行った。この分子は、プロリンリッチ配列を有する膜タンパク質で、新たに PRR7 と命名された。PRR7 は、既知のタンパク質に対して相同性を有さず、予測アミノ酸配列からも非常に特徴的な二次構造を有することが予測されている。抗体を用いた生化学的な機能解析によって、PRR7 は、界面活性剤に対して、強い不溶性を示す典型的な PSD タンパク質であることが明らかになった。さらに、その発現部位は、脳と海馬のみであり、生後の神経発達にともなって増加すること、ラットの海馬神経細胞内においては PSD-95 と共局在することが確認された。免疫沈降の実験から、NMDA 受容体のサブユニットである NR1 と NR2B との相互作用が認められた。また、PSD-95 との結合も確認されたが、さらに GST プルダウンアッセイから、その相互作用は第三番目の PDZ ドメイン(PDZ3)との結合によることが解明された。以上のように質量分析システムを活用することで、PSD に存在しプロリンリッチ配列を有する全く新しい膜タンパク質 PRR7 を発見し、これが、PSD-95 や NMDA 受容体と相互作用することを明らかにした。

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

神経細胞間の情報伝達を効率良く正確に行うためには神経シナプスが重要であり、各シナプスの後膜側には未知のタンパク質を含む分子群が高密度に集積してシナプス後肥厚(PSD)と呼ばれる特殊なタンパク質複合体を形成している。この PSD では多種多彩なタンパク質が協調的に機能することによって、神経における情報伝達が制御されている。この PSD に

注目して神経伝達に関わるタンパク質を網羅的に解析して新しいタンパク質を発見し、そのタンパク質の役割と既知のタンパク質との繋がりなどを解明することは、神経活動を分子のレベルから理解するためには重要である。

申請者は、脳から PSD を単離する方法を用いて PSD 画分を作製し、プロテオーム解析を行うことで、300を越えるタンパク質を同定した。しかし、この中には PSD 以外のタンパク質も混在していることが考えられたので、それらから、PSD だけに存在するタンパク質を同定する方法を工夫した。すなわち、精製途中に得られるシナプトソーム画分に対しても同様のプロテオーム解析を行い、シナプトソーム画分と PSD 画分の両方の解析結果を比較して差し引きを行うことによって、シナプスに存在するタンパク質を選び出すことに成功した。この様な工夫によって、PSD 画分に特異的に存在するタンパク質群を解析した結果、PSD には NMDA 受容体や PSD-95, shank, GKAP などを含む40を越えるシグナル伝達系のタンパク質が存在することを明らかにした。その中でも、興味深い新規のタンパク質28個を選別した。

申請者は、上記の解析で明らかになった新規タンパク質の中で、特徴的で興味深いタンパク質の1つを、プロリンリッチ配列を有する膜タンパク質であるので、新たに PRR7と命名すると共に、機能の解析も行った。この PRR7 は、既知のタンパク質に対して相同性を有さず、予測アミノ酸配列からも非常に特徴的な二次構造を有することが予測されている膜タンパク質である。抗体を用いた生化学的な機能解析も行ふことによって、PRR7 が界面活性剤に対して、強い不溶性を示す典型的な PSD タンパク質であることを明らかにした。さらに、PRR7 の主な発現部位が、大脳と海馬であることを示した。また、生後の神経発達にともなって PRR7 が増加すること、ラットの海馬神経細胞内においては PSD-95 と共局在することを明確に示した。申請者は免疫沈降の実験から、PRR7 が NMDA 受容体のサブユニットである NR1 と NR2B と相互作用することを示した。申請者は、PRR7 が PSD-95 と結合することを確認するだけでなく、GST プルダウンアッセイから、その相互作用部位は第三番目の PDZ ドメイン (PDZ3) であることを明らかにした。本研究では、質量分析システムを活用して、神経シナプスの後膜を含むシナプス後肥厚について解析を進め、プロリンリッチ配列を有する全く新しい膜タンパク質 PRR7 を発見すると共に、これが、PSD-95 や NMDA 受容体と相互作用する機能を明らかにした。以上の審査結果を総合して、本論文が博士(理学)の学位論文として価値あるものと認める。また、論文内容とそれに関連した事項について試問を行った結果、合格と認めた。