

氏 名	いま むら ふみ あき 今 村 文 昭
学位(専攻分野)	博 士 (理 学)
学 位 記 番 号	理 博 第 2675 号
学位授与の日付	平 成 15 年 3 月 24 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	シナプス結合形成における PSD-95 機能の制御機構研究

論文調査委員 (主 査) 教 授 藤 吉 好 則 教 授 平 野 丈 夫 教 授 七 田 芳 則

論 文 内 容 の 要 旨

我々の脳内には膨大な数の神経細胞が存在しており、それらが複雑かつ精密な神経回路網を形成している。個々の神経細胞間の情報伝達を効率良く、正確に行うため、各シナプスの後膜側には神経伝達物質受容体をはじめとした多様な分子群が適切に局在している。PSD-95 は興奮性シナプス後膜のシナプス後肥厚 (PSD) に局在し、他の多くの分子を PSD に集積させる機能を持つと考えられている分子であり、シナプス結合形成において重要な役割を担っている。

PSD-95 は N 末側から順に 3 つの PDZ ドメイン (PDZ1, PDZ2, PDZ3), SH3 ドメイン, それに, GK ドメインを持ち, そのいずれもが細胞内タンパク質間相互作用に関与している。その内, PDZ1, PDZ2 は NMDA 型グルタミン酸受容体 (NR2 サブユニット), シェーカー型 K^+ チャネル (Kv1.4 サブユニット) と結合できることが明らかとなっている。培養細胞株である COS 細胞に PSD-95 と NR2B または Kv1.4 とを共発現させると, 両者が細胞膜上で集積し, 斑状の共クラスターが観察される。しかし, このような集積現象は, それぞれの単独発現では全く観察されない。本研究では, この COS 細胞を用いた共クラスター形成系をモデル系として, PSD-95 の分子集積機能について, 特に, PDZ1, PDZ2 の機能差を分子内での位置の違いという観点から明らかにすべく, 実験を行った。そのために, PSD-95 の各ドメインの分子内配置及び全体構造には影響を与えずに, Kv1.4 との結合を阻害するような部分欠失および置換変異を全長 PSD-95 の PDZ1, PDZ2 のどちらか一方または両方に導入し, クラスター形成に及ぼす影響を確認した。まず, 野生型 PSD-95 と Kv1.4 との共クラスター形成を調べると, 両者を共発現している細胞の約 30% が共クラスターを形成していた。次に, PDZ1 にのみ変異が導入された PSD-95 の Kv1.4 との共クラスター形成を調べたところその効率は約 20% であった。ところが一方, PDZ2 にのみ変異を導入した変異体では約 1% にまで効率が激減していた。これらの結果から, PSD-95 が Kv1.4 と共クラスターを形成するためには, PDZ2 が重要な役割を担っていることを明らかにした。さらに, 全長 PSD-95 における PDZ2 の分子内位置の重要性を調べるため, 作製した変異体の PDZ1 と PDZ2 の配置を反転させ, 同様に Kv1.4 との共クラスター形成効率を調べた。PDZ1 にのみ変異が導入された PSD-95 変異体の変異 PDZ1 と PDZ2 との分子内配置を反転させると, その Kv1.4 との共クラスター形成効率は約 7% にまでさらに減少した。しかし, PDZ2 にのみ変異が導入された PSD-95 変異体の PDZ1 と変異 PDZ2 との分子内配置を反転させた場合の Kv1.4 との共クラスター形成効率は約 4% で, 反転前と比べて大きな違いは見られなかった。本実験で得られたこれらの結果を通して, PSD-95 と Kv1.4 との共クラスター形成には PDZ2 が必要であるばかりでなく, その分子内配置もまた重要であることが明らかとなった。

以上の実験を通して, PSD-95 と Kv1.4 とが共局在しクラスター形成をするためには PDZ2 に Kv1.4 が結合することが重要であることを明らかにし, PSD-95 の持つ複数のドメインが分子内で適切に配置され, 分子内相互作用を介して協調して働くことが, PSD-95 の分子集積機能には重要であるという示唆を得た。そして, PDZ2 にリガンドが結合することで, PSD-95 の全体構造がクラスター形成可能な構造へと変化するというモデルを提唱した。

論文審査の結果の要旨

神経細胞間の情報伝達を正しく効率的に行うためには、神経シナプスが重要であり、特に、神経伝達物質受容体などの多様な分子群が、シナプスの後膜側において適切に局在することの重要性が明らかになってきた。中でも、PSD-95は興奮性シナプス後膜のシナプス後肥厚（PSD）に局在し、他の多くの分子をPSDに集積させる機能を持つと考えられている分子であり、シナプス結合形成において重要な役割を担っていると考えられている。このPSD-95は、3つのPDZドメイン（PDZ1, PDZ2, PDZ3）の内、PDZ1とPDZ2がNMDA型グルタミン酸受容体（NR2サブユニット）やシェーカー型K⁺チャンネル（Kv1.4サブユニット）と結合することによって、これらの膜蛋白質をシナプス後膜に局在させるいわゆる足場蛋白質である。PSD-95だけをCOS細胞などに発現させると、細胞全体に広がってしまうが、これをNR2BあるいはKv1.4と共発現させると、両者が細胞膜上で集積し、斑状の共クラスターを形成することが観察される。

申請者は、PSD-95の分子集積機能について、COS細胞を用いた共クラ不ター形成系と、構造生物学的視点から設計したPDZドメインの変異を駆使して、半定量的な解析を行った。PSD-95における、このような巧妙な変異導入に基づいて、これまでのPDZドメイン欠損などの変異ではわからなかった、PSD-95の興味深い分子機構を解明した。すなわち、PSD-95の各ドメインの分子内配置及び全体構造には影響を与えずに、Kv1.4との結合を阻害するような部分欠失および置換変異を全長PSD-95のPDZ1, PDZ2のどちらか一方、または、両方に導入し、クラスター形成に及ぼす影響を計測した。野生型PSD-95とKv1.4とを共発現させると約30%が共クラスターを形成する系を用いて、PDZ1にのみ変異が導入されたPSD-95のKv1.4との共クラスター形成を調べたところ、その効率は約20%であった。ところが、PDZ2にのみ変異を導入した変異体では約1%にまでクラスター形成効率が大きく減少していた。これらの結果から、申請者は、PSD-95がKv1.4と共クラスターを形成するためには、PDZ2が重要な役割を担っていることを示した。さらに、作製した変異体のPDZ1とPDZ2の配置を反転させ、同様にKv1.4との共クラスター形成効率を調べたところ、PSD-95とKv1.4との共クラスター形成にPDZ2が必要であるばかりでなく、本来のPDZ2が存在したその分子内位置もまた重要であることを明らかに示した。

以上の実験を通して、申請者は、PSD-95とKv1.4とが共局在してクラスター形成をするためには、K⁺チャンネルであるKv1.4がPDZ2の位置にそのドメインと結合することが重要であることを明らかにした。それゆえ、PSD-95の持つ複数のドメインが分子内で適切に配置され、分子内相互作用を介して協調して働くことが、シナプス後膜における分子集積機能には重要であるということを具体的に解明した。これらの結果から、申請者は、PDZ2にリガンドが結合することで、クラスター形成可能な構造へとPSD-95の全体構造における変化が生ずるというモデルを提唱した。本研究は、PSDへの分子集積機構におけるPSD-95が担う制御機構の重要な部分を解明し、注目すべき成果をあげた。以上の審査結果を総合して、本論文が理学博士の学位取得に十分な内容を持つものと結論した。