

氏 名	ほん じょ やす こ 本 庶 仁 子
学位(専攻分野)	博 士 (理 学)
学 位 記 番 号	理 博 第 2250 号
学位授与の日付	平 成 12 年 5 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	シナプス結合におけるカドヘリンの役割についての研究

論文調査委員 (主 査) 教 授 竹 市 雅 俊 教 授 七 田 芳 則 教 授 平 野 丈 夫

論 文 内 容 の 要 旨

シナプスにおける細胞間結合の機構は謎である。シナプスにおける接着分子について、様々な分子がその候補として研究されているが、その中で、カドヘリン分子群はシナプス結合部位における局在が明快に示されている。しかし、その実際の役割についてはわかっていなかった。本論文は、カドヘリンのシナプスにおける役割を、その阻害抗体を用いて細胞生物学的な手法により解析したものである。

申請者は、まず、ニワトリの網膜初代培養系を用いて、カドヘリン 6B とカドヘリン 7 の分布を調べた。個体での発現と同様に、これらのカドヘリンは、特定の神経細胞上で、種々のシナプスマーカーと重なる分布を示していた。このことは初代培養においてもカドヘリンがシナプスに存在することを示唆している。次に、カドヘリン 6B の阻害抗体を培養中に加え、シナプスマーカーのシグナルに何らかの影響があるかどうかを調べた。この阻害抗体を加えても、プレシナプスマーカーであるシナプトタグミンや SNAP-25 にはあまり顕著な影響はみられなかった。また、アクチンやチューブリンの分布、全体的な神経突起のパターン等にも影響を与えなかった。しかし、ポストシナプスのマーカーである PSD-95 ファミリータンパク質の局在が変化し、その抗体による染色シグナルが薄くなるか、ほとんど見えなくなるという傾向がみられた。

次に申請者は、上記の観察から、カドヘリンと PSD-95 ファミリータンパク質が相互作用している可能性を考え、それを検討するために、ヒヨコ脳の界面活性剤抽出液からこれらのタンパク質の免疫沈降を試みた。カドヘリンの免疫沈降物に PSD-95 は含まれなかったものの、カドヘリンの細胞質内結合分子であるカテニンの免疫沈降物中には PSD-95 が検出され、少なくとも、PSD-95/カテニン複合体が存在することが明らかになった。さらに、上皮細胞株 DLD-1 に PSD-95 を強制発現させると、細胞境界において E-カドヘリンと共局在すること、また、この細胞で、抗体により E-カドヘリンの活性を阻害すると、細胞境界における E-カドヘリンが消えるだけでなく PSD-95 も消え、同時に、移動した E-カドヘリンと PSD-95 が依然として共局在することを明らかにした。また、PSD-95 のアミノ末端側が、その細胞境界への局在に必要なことも明らかにしている。さらに、細胞を非イオン系界面活性剤で処理しても、E-カドヘリンと共局在する PSD-95 は溶出されず、両者が共に細胞骨格系と結びついていることを示唆している。

以上の観察結果から、シナプスにおいて、カドヘリンと PSD-95 が何らかの形で相互作用し、前者が後者の局在を制御していることが明らかとなり、シナプス結合におけるカドヘリンの役割を理解するための手がかりが得られたと結論している。

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

シナプス結合は神経細胞間の情報の伝達を担う重要な構造であるが、その形成機構についてはまったく理解されておらず、また、シナプス膜を結びつける接着分子の役割についても不明な部分が多い。申請者はシナプスに局在することが示された細胞間接着分子カドヘリンに注目し、その機能阻害抗体を用いてシナプス形成における役割について解析し、ポストシナプ

ス細胞側に存在する分子 PSD-95 とカドヘリンの相互作用について明らかにした。

まず、申請者はニワトリ胚の網膜初代培養系で、カドヘリン 6B とカドヘリン 7 がシナプスマーカーと重なる分布を示すこと、抗体でカドヘリン 6B の活性を阻害すると、プレシナプスマーカーであるシナプトタグミンや SNAP-25 は影響をうけないが、ポストシナプスマーカーである PSD-95 ファミリータンパク質の局在が変化し、その染色シグナルが弱くなること等を示した。カドヘリンの阻害がポストシナプス細胞側のタンパク質の局在に影響を与えるという発見は、カドヘリンが、シナプスにおいて単に接着を担うだけでなく、シナプスに存在する分子と相互作用し、その局在にも重要な役割をはたすことを示唆しており、接着分子のシナプスにおける役割を解明する上で重要な意義を持つものと評価できる。

次に、申請者は PSD-95 に注目し、ヒヨコ脳抽出液からの免疫沈降実験により、カドヘリンと PSD-95 の分子的相互作用の解析を進めている。その結果、カドヘリンの細胞内結合分子であるカテニンと PSD-95 とが複合体を形成していることを明らかにした。また、PSD-95 cDNA の上皮細胞へのトランスフェクションによる研究により、カドヘリンと PSD-95 との間の相互作用を確認し、同時に、この相互作用のためには PSD-95 のアミノ末端側が必要であることを示した。PSD-95 は NMDA レセプターなどと結合することによりシナプス活動に関与すると考えられる分子で、この PSD-95 とカドヘリンが相互作用するという発見は、カドヘリンがシナプスの生理機能にも関わると推測され、重要である。

カドヘリンがシナプス結合に局在することの発見以来、その実際の役割は不明のままであったが、本論文により始めてカドヘリンの役割の一端が明らかにされた。カドヘリンとシナプス活動に関与すると考えられる分子 PSD-95 との相互作用の発見は、シナプス結合の構造と機能の関心の分子的なメカニズムの解明に大きく寄与するものと考えられる。

よって、申請論文は博士（理学）の学位論文として価値あるものと認められる。なお、主論文に報告されている研究業績を中心とし、これに関連した研究分野について試問した結果、合格と認めた。