Osaka University Knowledge Archive

Title	小脳特異的蛋白質 （P400蛋白質） の精製と性質
Author(s)	前田, 信明
Citation	大阪大学, 1988, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/35954
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

Osaka University

【23】

氏名・(本籍)	前田信明（まえだ のぶあき）
学位の種類	理学博士
学位記番号	第 8071 号
学位授与の日付	昭和63年3月25日
学位授与の要件	理学研究科生物化学専攻 学位規則第5条第1項該当
学位論文題目	**小脳特異的蛋白質（P_{400}蛋白質）の精製と性質**
論文審査委員	(主査) 教授 御子柴克彦 (副査) 教授 堀尾 武一　教授 崎山 文夫

論文内容の要旨

極めて複雑に組織化された脳の構造は，様々な脳特異蛋白質の発現によって形成されると考えられる。このような蛋白質の内で，P_{400}蛋白質は，小脳に特異的に存在する分子量250Kの糖蛋白質であり，またプルキンエ細胞と顆粒細胞間のシナプスが形成されないstaggerer突然変異マウスの小脳では，この蛋白質が著減していることが知られている。このことから，P_{400}蛋白質は小脳におけるシナプス形成に関与する蛋白質であることが示唆されている。このような可能性を検討するために，P_{400}蛋白質の精製とその性質の解析を行い，得られた知見をまとめたのが本論文である。

（1） P_{400}蛋白質の精製とモノクローン抗体の作製

P_{400}蛋白質は、次のようにして精製した。マウス小脳よりミクロソーム画分を調製し，4M塩酸グアニジンと4％Zwittergent 3－14を含む溶液で，蛋白質を可溶化した。これをSepharose CL－4BとCon A Sepharoseによるカラムクロマトグラフィーで分画し，ほぼ均一なP_{400}蛋白質を単離できた。次に，精製P_{400}蛋白質を抗原として，モノクローン抗体を作製した。3種類のモノクローン抗体が得られたが，これらはP_{400}蛋白質上の異なった抗原決定部位を認識する。

（2） P_{400}蛋白質の性質

P_{400}蛋白質に対するモノクローン抗体を用いた解析によって，次のような知見を得た。P_{400}蛋白質は小脳に多量に発現しているが，大脳，肝臓，脾臓等の組織にも，ごく少量ながら存在するかなり普遍的な成分である。また，小脳の中でもプルキンエ細胞のみに例外的に多く発現している。プルキンエ細胞の発達とP_{400}蛋白質の発現との関係を調べたところ，プルキンエ細胞の樹状突起形成とシナプス形成の時期に一致して，P_{400}蛋白質の発現が増大していくことが明らかとなった。また，樹状突起形成とシ

ナプス形成に異常を示す，staggererマウスのプルキンエ細胞ではP_{400}蛋白質の発現増大が起こらない。さらに，P_{400}蛋白質の細胞内局在を調べたところ，プルキンエ細胞の細胞膜，シナプトソーム，シナプス結合部位に局在が見られた。P_{400}蛋白質は，その可溶化にZwittergent 3－14のような界面活性剤と塩酸グアニジンのような変性剤を要するためかなり堅固な構造を形成する内在性の膜蛋白質であると考えられるが，3種のモノクローン抗体の内の一つは，生きた培養プルキンエ細胞にも結合するため，P_{400}蛋白質の一部は細胞外に突出していると考えられる。また，P_{400}蛋白質は，cAMPによって，そのリン酸化が著しく促進されるが，Ca^{++}やcGMPは，リン酸化にほとんど影響を与えないことが明らかとなった。

以上の結果は，P_{400}蛋白質がプルキンエ細胞のシナプス形成やシナプス伝達に重要な役割を演じていることを示唆するものと考える。

論文の審査結果の要旨

脊椎動物の中枢神経系の特異的シナプス形成機構は，未だ未解決な重要な問題である。この問題を分子レベルで解析していくことは，脳の高次機能の理解の為に必須であると考えられる。

前田君は，小脳における特異的シナプス形成機構を解析する目的で，プルキンエ細胞と顆粒細胞間のシナプス形成異常を示すstaggerer突然変異マウスに着目した。この突然変異マウスにおいてはP_{400}蛋白質と名づけられた膜蛋白質が著減しており，当蛋白質がプルキンエ細胞と顆粒細胞間の特異的なシナプス形成に関与することが示唆されてきた。しかしながらP_{400}蛋白質は極めて難溶性の蛋白質であり，発見以来10年以上も完全精製がなされておらず，その性質については，非常に限られた知識しか得られていなかった。

本研究で，前田君はP_{400}蛋白質の完全な可溶化に成功し，当蛋白質を単一にまで精製することが出来た。更にP_{400}蛋白質に対する一群のモノクローン抗体を作製し，当蛋白質の性質を免疫学的手法を用いて，詳細に解析した。その結果，1）P_{400}蛋白質はプルキンエ細胞の樹状突起，細胞体，軸索に多量に発現しており，特にシナプス結合部位に比較的濃縮されていること，2）P_{400}蛋白質はプルキンエ細胞のシナプス形成と樹状突起形成の時期に一致して発現が増大していくが，staggerer突然変異マウスのプルキンエ細胞においては，この発現増大がおこらないこと，3）P_{400}蛋白質はその一部を細胞外に突出させた膜内在性の糖蛋白質であり，cyclic AMPにより，そのリン酸化が著しく促進されることを明らかにした。

以上のように，本研究は，P_{400}蛋白質がプルキンエ細胞のシナプス形成に密接な関連を有する蛋白質であることを初めて明らかにし，また，当蛋白質の遺伝子解析の方途を開いたものであり，理学博士の学位論文として十分価値あるものと認める。