

Title	Isolation of PSD-Zip45, a novel Homer / vesl family protein containing leucine zipper motifs, from rat brain
Author(s)	孫, 杰
Citation	大阪大学, 1999, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/41628
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、 〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉 大阪大学の博士論文について〈/a〉をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

氏名	孫 杰
博士の専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	第 14442 号
学位授与年月日	平成11年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 医学系研究科生理系専攻
学位論文名	Isolation of PSD-Zip45, a novel Homer/vesl family protein containing leucine zipper motifs, from rat brain (ロイシンジッパー構造を持つ新規の Homer/vesl 蛋白質ファミリー PSD-Zip45の分離)
論文審査委員	(主査) 教授 祖父江憲治 (副査) 教授 宮坂 昌之 教授 米田 悦啓

論文内容の要旨

【目的】

シナプス後肥厚部 (Postsynaptic density, 以下PSD) はシナプス後膜直下に認められる電子密度の高い特徴的な構造物で、シグナル伝達やシナプスの形成・可塑性を担う物質的基盤として重要な役割を担っている。私達は、PSD 構成蛋白質の同定とその分子間相互作用の解明の為に、PSD 分画を抗原としたモノクローナル抗体の作製を行っており、今回ロイシンジッパー構造を持つ45kDa の新規蛋白質を分離し、その解析を行った。

【方法ならびに成績】

私達は CNBr で限定分解した PSD 分画を抗原にモノクローナル抗体の作製を行い、分子量45kDa の蛋白質を認識する抗体を得た。この蛋白質は PSD の精製過程において PSD 分画に著しく局在していた。

この抗体を用いて、6週齢のラット大脳 cDNA ライブラリーをスクリーニングしたところ、366残基、推定分子量 41.3kDa の蛋白質をコードするクローンが得られた。ホモロジーサーチの結果、N末端側の175残基は、Homer/vesl と呼ばれる蛋白質の C末端11アミノ酸のみを除いた部分と全く同一の配列であった。Homer/vesl は、神経の活性化に依存して一過性に発現が増加する蛋白質で、PDZドメインを中心とする領域で代謝型グルタミン酸受容体1型および5型 (mGluR 1, 5) の C末端と結合する事が報告されている。一方、今回分離した蛋白質の C末端191残基は、この蛋白質に固有の配列で、特にC末端には二つの特徴的なロイシンジッパー構造が認められた。また中央部の12残基を欠失したアイソフォームをコードするクローンも得られた。当研究室では、同様の方法でロイシンジッパー構造を有する幾つかの PSD 蛋白質を同定しており、ロイシンジッパー構造が PSD の分子構築に関わる重要なモチーフの一つではないかと考え、この45kDa の蛋白質を PSD-Zip45 と命名した。

PSD-Zip45及び Homer/vesl の各々に特異的なプローブを用いてノザンブロットティングを行うと PSD-Zip45は約5.6kbと3.8kb、Homer/vesl は約8kbと異なる高さにバンドを検出し、共に神経系を中心とする組織分布を示した。同じプローブを用いた脳組織のインサイチュアハイブリダイゼーションでは、PSD-Zip45は嗅球・大脳皮質・海馬・線条体系・小脳皮質に発現しており、mGluR 1 および mGluR 5 の発現部位を合わせた領域とほぼ一致した局在を示した。また PSD-Zip45とシナプトフィジンの抗体を用いた脳組織の二重染色を共焦点顕微鏡で観察すると、両者は隣接した局在を示し、PSD-Zip45は PSD に特異的に局在している事が示唆された。

次に、COS 7 細胞に PSD-Zip45 と mGluR 1 を同時に発現させ抗 PSD-Zip45 抗体で免疫沈降を行うと mGluR 1 も沈降する事より、Homer/ves1 と同様 PSD-Zip45 も mGluR 1 との結合能を有する事が明らかになった。小脳組織の二重染色で PSD-Zip45 は mGluR 1 の一部と同一の局在を示す事から、両者の結合は生体内においても機能していると予想される。一方、PSD-Zip45 の各種フラグメントの in vitro translation 産物をグルタルアルデヒドで架橋し、その多量体形成能について検討すると、PSD-Zip45 はロイシンジッパー構造を介して多量体を形成する事が明らかになった。そこで、PSD-Zip45 がこの多量体形成能によって N 末端側に結合する mGluR 1 のクラスター形成を起こす可能性を検討した。COS 7 細胞に mGluR 1 と PSD-Zip45 を同時に発現させると、両者は同一部位でクラスターを形成したが、mGluR 1 単独もしくはロイシンジッパー構造を欠く各種フラグメントとの共発現ではクラスター形成は認められなかった。

【総括】

今回私達は、PSD 分画に対するモノクローナル抗体を用いて、PSD に局在する新規の Homer/ves1 蛋白質ファミリー、PSD-Zip45 の同定を行った。PSD-Zip45 は Homer/ves1 と共通の配列を持つ N 末端側で mGluR 1 と結合する一方、C 末端側には多量体形成能を持つ 2 カ所の特徴的なロイシンジッパー構造を有しており、代謝型グルタミン酸受容体のクラスター形成や PSD での局在の決定を担っていると考えられる。

論文審査の結果の要旨

PSD は神経の情報伝達やシナプス形成・可塑性の維持に重要な役割を担っていると考えられているが、その分子構造には未だ不明の点が多い。本研究では、PSD の構成蛋白質を同定しその機能を解析するために独自の方法で PSD 分画に対するモノクローナル抗体を作成し、今回 PSD に局在する新規の Homer/ves1 蛋白質ファミリー、PSD-Zip45 を分離、更にその分子機能を明らかにした。PSD-Zip45 は Homer/ves1 と共通の配列を持つ N 末端側で代謝型グルタミン酸受容体と結合する一方、C 末端側には 2 カ所のロイシンジッパー構造を含む独自の配列を有しており、このロイシンジッパーを介して多量体を作り、代謝型グルタミン酸受容体のクラスター形成を誘導した。本研究は、シナプスにおいて代謝型グルタミン酸受容体のクラスター形成や局在の決定を担うる蛋白質として PSD-Zip45 を同定すると同時に、PSD の特徴的な構造を作る上でロイシンジッパー構造が分子間を結ぶ重要なモチーフとして機能している可能性を示唆しており、今後 PSD の分子構築を解明する重要な教唆になると思われる。よって本研究を学位に値するものと認める。