The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Identification and characterization of a novel hDLG/PSD-95- binding protein, SPAL
Author(s)	Roy, Badal Chandra
Citation	大阪大学, 1999, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/41631
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。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

【30】

氏　　名	Roy Badal Chandra（ロイ バダル チャンドラ）
博士の専攻分野の名称	博　士（医　学）
学 位 記 番 号	第　14459　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	Identification and characterization of a novel hDLG／PSD-95-binding protein, SPAL （hDLG／PSD-95結合蛋白質 SPAL の同定と機能解析）
論 文 審 査 委 員	（主査） 教 授 秋山　徹 （副査） 教 授 野島　博　教 授 仲野　徹

論 文 内 容 の 要 旨

【目的】

Drosophila の癌抑制遺伝子 dlg のヒトホモログの産物 hDLG やシナプスの post-synaptic density（PSD）に多量に存在する PSD-95をはじめとした hDLG／PSD-95ファミリーの蛋白質は，大腸癌の癌抑制遺伝子 APC の産物，グルタミン酸レセプターの一種 NMDA レセプターあるいは Shaker 型K＋チャンネル等と複合体を形成することが知られている。hDLG／PSD-95ファミリーの蛋白質は，3つの PDZ ドメイン，SH3ドメインおよびグアニレートキナーゼ様ドメインからなり，PDZ ドメインで上記の蛋白質と結合する。特に，NMDA レセプターやK＋チャンネルについては，これらのクラスタリングを引き起こす活性をもつことが知られている。また，hDLG は APC と複合体を形成することにより細胞増殖の負の制御に関与している可能性があると考えられる。我々は，hDLG／PSD-95ファミリーの蛋白質の機能をさらに明らかにすることを目的として，新規 hDLG／PSD-95結合蛋白質を同定しその機能を解析した。

【方法ならびに成績】

hDLG を bait とした yeast two-hybrid system により HeLa 細胞 cDNA ライブラリーより hDLG／PSD-95に結合する蛋白質を検索した。その結果，アミノ末端側に GAP ドメイン，その下流に PDZ ドメイン，カルボキシ末端側にロイシンジッパー構造をもつ200kDa の新規蛋白質が同定された。特に，リンパ球で発現の高い GAP の一種 Spa-1とアミノ酸配列の相同性が高いことから SPAL と命名した。両者が実際に細胞内で複合体を形成していることは，SPAL に対する特異的抗体を調製し，マウス脳抽出液を用いて pull-down assay を行うことにより証明した。すなわち，抗 SPAL 抗体による免疫沈降物を hDLG あるいは PSD-95に対する抗体で Western blotting を行うことにより両者の結合を証明した。また，in vitro の pull-down assay により PSD-95のグアニレートキナーゼドメインと SPAL のロイシンジッパーの上流の領域が相互作用することが明らかになった。さらに，PSD-95は上記のように NMDA レセプターや APC 蛋白質と結合することが知られているが，SPAL-PSD-95複合体には NMDA レセプターや APC も含まれていることが見出された。

Northern blotting をおこなうことにより，SPAL mRNA はほとんどすべての組織で発現していることが判明した。さらに，抗 SPAL 抗体を用いて，大腸，膵臓，肝臓，食道，心臓での SPAL の発現パターンを検討した結果，大腸，

膵臓では上皮細胞の tight junction, adherens junction 等細胞接着面に，食道では spinous layer, granular layer, 細胞接着面に，心筋では interacalated disk にそれぞれ局在することが明らかになった。また，海馬培養神経細胞を染色すると PSD-95, NMDA レセプター同様シナプスに濃縮して局在していることが観察された。SPAL が実際に GAP 活性をもつかどうか，さらにどのようなG蛋白質に特異的に作用するかを明らかにするために，Rab, Rap 1, Rho, Rac, Ran に対する GAP 活性を測定したところ Rap 1 に特異的に GAP 活性を示すことが明かとなった。

【総括】

以上の結果より，SPAL は NMDA レセプターの細胞質側に PSD-95を介して結合し Rap 1 に作用する GAP の一種で，NMDA のシグナル伝達に重要な役割を果たしている可能性があると考えられた。また，神経以外の組織でも細胞接着面からのシグナル伝達に関与している可能性があると推測される。

論文審査の結果の要旨

ショウジョウバエの癌抑制遺伝子 dlg のヒトホモログ，hDLG は大腸癌の癌抑制遺伝子として知られる APC や，NMDA レセプター等のイオンチャンネルと会合することが知られているが，その機能には未だ不明な点が多い。

申請者は hDLG に結合する蛋白質を yeast two-hybrid system を用いて検索し，amall G 蛋白質 Rap 1 に対する GAP 活性をもつ新規遺伝子，SPAL を発見した。またこの遺伝子産物が生体内でも hDLG や PSD-95等の蛋白質と結合し，さらに APC や NMDA レセプターとも複合体を構築してそれらの情報伝達経路を担う因子であることを示した。

以上の研究は，癌抑制遺伝子を hDLG ファミリーと APC が smallG 蛋白質を介した情報伝達を行なうという概念を世界に先駆けて提示したものであり，神経系だけでなく細胞の癌化機構の解明に大きく貢献するものである。よって，この研究は学位の授与に値すると考えられる。