



Title	DAP-1, a novel protein that interacts with the guanylate kinase-like domains hDLG and PSD-95
Author(s)	佐藤, 清敏
Citation	大阪大学, 2000, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/41743
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

氏 名	佐藤 清敏
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	第 1 5 2 5 9 号
学 位 授 与 年 月 日	平成12年 3 月 24 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第4条第1項該当 医学系研究科病理系専攻
学 位 論 文 名	DAP-1, a novel protein that interacts with the guanylate kinase-like domains hDLG and PSD-95 (hDLG および PSD-95のグアニレートキナーゼ様ドメインに結合する蛋白質 DAP-1 の同定と解析)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 木下タロウ (副査) 教 授 永井 克也 教 授 野島 博

論 文 内 容 の 要 旨

【目的】

DLG ファミリーは、PDZ (DHR) ドメイン、SH3 ドメイン、グアニレートキナーゼ (GK) 様ドメインからなるマルチドメイン蛋白質でショウジョウバエからヒトにいたるまで広く存在する。ショウジョウバエでは *DLG* に変異が起こると、septate junction の異常、成虫原基上皮細胞の極性喪失、成虫原基の腫瘍性過形成およびシナプス構造の異常が生じ癌抑制遺伝子と考えられている。ヒトホモログ *hDLG* はさまざまな組織で発現して細胞接着部位に存在するのに対して *PSD-95* は脳特異的に発現しており、神経細胞の PSD (postsynaptic density) に局在する。また *hDLG* および *PSD-95* は、PDZ ドメインを介して記憶、学習において重要な役割を担う NMDA レセプター、シェイカー型ボタジウムチャンネルと複合体を形成し、受容体のクラスターリングを引き起こし、シナプスにおけるレセプターの局在および機能を制御していると考えられている。一方、我々は脳において *hDLG* は PDZ ドメインを介して大腸癌の癌抑制遺伝子 APC 産物の C 末に結合していることおよびともにシナプス局在していることを見出し、*hDLG* / APC 複合体が細胞増殖および神経細胞活動の制御において重要な機能を果たしている可能性を示した。*hDLG* および *PSD-95* と複合体を形成する蛋白質を見出すことを通して、NMDA レセプターの機能制御、情報伝達機構、シナプス可塑性における *hDLG* および *PSD-95* の役割をさらに明らかにすることを本研究の目的としている。

(方法ならびに成績)

我々は、yeast を用いた two-hybrid 法によりこれらと複合体を形成する蛋白質をコードする遺伝子を検索した。その結果、新規遺伝子 *DAP-1* およびこれとアミノ酸相同性が52%の蛋白質をコードする類縁遺伝子 *DAP-2* をクローニングし次のような知見を得た。1) *DAP-1* のアミノ酸配列は既知の蛋白質のアミノ酸配列と相同性がみられない。2) ノーザンブロット法により *DAP-1* の脳特異的な発現が検出された。3) alternative splicing により N 末端側が異なる二種類の ORF が存在する。*DAP-1* の C 末端側の共通領域を抗原とした抗体を作成し脳 lysate から *DAP-1* を検出したところ、これら二種類の ORF に対応する100kDa と150kDa の二種類の遺伝子産物が確認された。4) GST 融合蛋白質と *in vitro* translation 蛋白質を用いた *in vitro* 結合実験において *DAP-1* と *hDLG* の直接的な結合が確認できた。5) 14アミノ酸の5回のリピート構造が存在し、この14アミノ酸で *hDLG*、*PSD-95* の GK 様ドメインと結合する。6) 脳 lysate より *DAP-1* を免疫沈降すると *hDLG*、*PSD-95*、NMDA レセプターおよ

び APC が共沈した。7) 蛍光抗体法によりラット海馬初代培養細胞のシナプスにおける DAP-1、PSD-95 および NMDA レセプターの局在一致がみられた。8) 免疫電子顕微鏡法によりマウス小脳皮質細胞の PSD においても DAP-1、PSD-95 および APC の局在一致がみられた。

(総括)

これらの知見より、DAP-1 は hDLG および PSD-95 と結合することにより NMDA レセプター複合体中に存在していることが示された。*Drosophila* において DLG の GK 様ドメインの欠失は成虫原基の腫瘍性過形成およびシナプス構造の異常を引き起こすことから GK 様ドメインに結合する DAP-1 は hDLG ファミリーの機能においてきわめて重要であると考えられる。DAP-1 には分子中央付近にプロリンに富むリピート構造が 3 回存在し、DAP-2 においてもよく保存されていることから、SH3 ドメインあるいは WW ドメインなどを持つ分子との結合によりレセプターからのシグナルが伝達されているモデルが考えられる。一方アセチルコリンレセプター、グリシンレセプターそれぞれのクラスターリングを引き起こすラブシン、ゲフェリンの機能からの類推で DAP-1 がレセプター/PSD-95 複合体を細胞骨格に固定し局在を制御している可能性も考えられる。また hDLG ファミリーには PSD-95 の他、SAP102、Chapsyn-110 など存在し DAP ファミリーとの組み合わせによりシナプスの多様性を作り上げていることが考えられる。さらに DAP-1 の発現は脳特異的であるが脳以外の組織にも発現するホモログが存在するのなら hDLG の癌抑制機能に関連している可能性がある。

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 および PSD-95 は、NMDA 受容体、シェイカー型ポタジウムチャンネルと複合体を形成し、シナプスにおける局在および機能を制御していると考えられている。

本研究において、hDLG および PSD-95 のグアニレートキナーゼ様ドメインに結合する蛋白質 DAP-1 が同定された。さらに、DAP-1 は DLG ファミリーを介して、NMDA 受容体および大腸癌の癌抑制遺伝子 APC 産物と複合体を形成していることが確認された。また、免疫電子顕微鏡法によりマウス小脳皮質細胞の PSD においても DAP-1、PSD-95 および APC の局在の一致がみられた。ショウジョウバエでは、DLG のグアニレートキナーゼ様ドメインを欠損する変異が起これば、成虫原基の癌化およびシナプス構造の異常が生じることから、このドメインに結合する DAP-1 は DLG ファミリーの機能において極めて重要であると考えられる。

本研究は、DLG ファミリーと複合体を形成する蛋白質を同定することにより、NMDA 受容体の機能制御、情報伝達機構、シナプス可塑性における DLG ファミリーの役割の解明に大きく貢献するものであり、博士の学位論文に値するものと認められる。