The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

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（さとう きよとし）
博士の専攻分野の名称	博　士（医　学）
学位記番号	第　15259　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、シェイカー型ポ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い出し、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い出すことを通して、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リングを引き起こすラプシン、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なども存在し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ると、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。