The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	nArgBP 2, A Novel Neural Member of Ponsin/ArgBP 2/Vinexin Family That Interacts with Synapse-associated Protein90/Postsynaptic Density-95-associated Protein (SAPAP)
Author(s)	川辺, 浩志
Citation	大阪大学, 2000, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/41755
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

【21】

氏　　名	川　辺　浩　志（かわべ　ひろし）
博士の専攻分野の名称	博　士（医　学）
学　位　記　番　号	第　15226　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 医学系研究科生理系専攻
学　位　論　文　名	nArgBP 2, A Novel Neural Member of Ponsin／ArgBP 2／Vinexin Family That Interacts with Synapse-associated Protein 90／Postsynaptic Density-95-associated Protein (SAPAP) （SAPAP に結合する神経特異的分子 nArg BP 2 のクローニングと性状解析）
論　文　審　査　委　員	（主査） 教　授　高井　義美 （副査） 教　授　岡野　栄之　　教　授　米田　悦啓

論　文　内　容　の　要　旨

【目的】

シナプスを中心とした神経伝達機構の分子レベルにおける解明は、記憶・学習のメカニズムを明らかにする上で重要であり、また種々の神経疾患の病態の理解に寄与するものと考えられる。神経伝達物質によるシナプス伝達が効率的に行われるには、神経伝達物質受容体やイオンチャネルが、後シナプス膜に存在する postsynaptic density (PSD) に集積して局在することが重要であるとされている。特に、これらの分子の局在化にはPSD−95／SAP90や、私共が見い出したS−SCAM などの membrane-associated guanylate kinase が重要であることが示唆されている。さらに、私共は、PSD−95／SAP90 と S−SCAM の guanylate kinase 領域に結合する分子として SAPAP を同定している。SAPAP には4個のアイソフォームが存在し、2カ所のプロリンに富んだ領域をもち、神経特異的な発現様式を示す。SAPAP は PSD−95／SAP90 や S−SCAM をはじめとする PSD の構成蛋白質を detergent 不溶性構造物にリクルートするという性質を持っている。このことから、PSD−95／SAP90 と S−SCAM は SAPAP を介して PSD に固定されている可能性があり、SAPAP は PSD の構造維持に中心的役割を示す蛋白質であると想定される。しかしながら、その生理的な機能に関しては未だ十分に解明されてはいない。そこで、本研究では、SAPAP の機能をさらに明らかにする目的で、SAPAP に結合する蛋白質分子のクローニングとその性状解析を行った。

【方法ならびに成績】

1）SAPAP 結合蛋白質の同定とクローニング

SAPAP 結合蛋白質を SAPAP 3 を bait として、rat brain cDNA library から酵母 two-hybrid 法を用いて探索した。その結果得られたクローンの中の1個の全長 cDNA をクローニングして一次構造を決定した。この遺伝子がコードする蛋白質は分子量約160,000で1,196個のアミノ酸からなっていた。この蛋白質のN末端部位は sorbin というペプチドホルモンに相同性があり、中央部に zinc finger motif をもっていた。さらに、C末端部位には3個の SH 3 領域があった。Data base の検索によると、この蛋白質はヒト遺伝子 ArgBP 2 のラットタイプの splicing variant であることが明らかとなった。後述するとおり、この蛋白質は神経特異的発現を示したので、nArgBP 2（neural ArgBP 2）と命名した。

2）nArgBP 2 と SAPAP との結合

nArgBP 2 と SAPAP との結合を免疫沈降法で検討した。ラット大脳シナプス膜画分を可溶化後、抗 nArgBP 2 抗

体と抗SAPAP抗体でそれぞれ免疫沈降した。その結果、nArgBP 2 とSAPAP は共に免疫沈降された。次に私共は、nArgBP 2 とSAPAP の結合領域を決定するために、大腸菌に発現させたnArgBP 2 の欠損変異体のGST 融合蛋白質と、COS 7細胞に発現させたSAPAP の欠損変異体を用いて、これらの結合をアフィニティーカラム法で検討した。その結果、SAPAP は中心部のプロリンに富む領域を介してnArgBP 2 の3番目のSH 3 領域と結合していることが明らかとなった。

3）nArgBP 2 の組織分布

nArgBP 2 の組織分布をNorthern blot ならびにWestern blot で検討した。その結果、nArgBP 2 は脳にのみその発現が認められた。脳特異的な発現パターンはSAPAP と同様である。

4）nArgBP 2 の神経組織内分布

ラット脳におけるnArgBP 2 とSAPAP の分布が一致するか否かをラット脳細胞分画法で検討した。その結果、nArgBP 2 とSAPAP は共にPSD 画分に最も濃縮していた。さらに、ラット小脳におけるnArgBP 2 とSAPAP との局在をラット小脳の免疫組織化学法で検討した。その結果、nArgBP 2 とSAPAP はともにシナプスパターンの局在を示した。これらの結果から、nArgBP 2 はSAPAP 同様シナプスのPSD に局在していると考えられた。

5）nArgBP 2 と1－Afadin、Vinculin との結合

nArgBP 2 のSH 3 領域は、アクチンに結合する細胞膜裏打ち蛋白質である1－afadin の結合分子として同定されているponsin や、vinculin 結合分子として報告されているvinexin のSH 3 領域と相同性が高い。そこで、nArgBP 2 が1－afadin やvinculin と結合するか否かをアフィニティーカラム法で検討した。その結果、1－afadin とvinculin はnArgBP 2 にも結合することが明らかとなった。

【総括】

本研究では、酵母two-hybrid 法を用い、SAPAP 結合蛋白質としてnArgBP 2 を単離した。さらに、in vivo ならびにin vitro の系においてもnArgBP 2 とSAPAP が結合することを明らかにした。nArgBP 2 はSAPAP 同様、神経組織特異的に発現しており、シナプス、特にPSD に局在していた。nArgBP 2 は一次構造上、C末端部位に3個のSH 3 領域をもっていた。最近、C末端部位に3個のSH 3 領域をもつ蛋白質ファミリーが報告されている。アクチンに結合する細胞膜裏打ち蛋白質1－afadin の結合分子であるponsin、神経組織形成に重要なチロシンキナーゼArg／Abl の結合分子であるArgBP 2 a, b、vinculin の結合分子であるvinexin がこのファミリーに属し、nArgBP 2 もこのファミリーを構成する新たな一員であると考えられる。また、nArgBP 2 はアクチン結合蛋白質である1－afadin やvinculin に結合する。PSD における受容体の局在化には、アクチン細胞骨格系の再編成の関与も示唆されており、nArgBP 2 がPSD におけるアクチン細胞骨格の制御に関わる可能性も想定される。今後はnArgBP 2 とSAPAP、1－afadin、vinculin、Arg ／Abl との関係、およびPSD におけるアクチン細胞骨格の再編成時にnArgBP 2 がどのように機能するのかを明らかにしていく必要がある。

論文審査の結果の要旨

本申請者は、本研究により、postsynaptic density（PSD）の構成蛋白質であり、その構造維持に中心的役割を果たすと想定されるSAPAP の機能を明らかにする目的で、その結合分子について解析した。SAPAP 結合蛋白質を酵母two-hybrid 法を用いてスクリーニングした結果、nArgBP 2 を単離し、in vitro そしてin vivo の系においてもnArgBP 2 とSAPAP 蛋白質が結合することを明らかにした。また、nArgBP 2 がSAPAP と同様に神経特異的に発現しており、PSD にも存在すること、そして小脳においてnArgBP 2 がSAPAP とほぼ同様の局在を示すことを証明した。さらに、nArgBP 2 がアクチン結合蛋白質である1－afadin とvinculin にも結合することを明らかにした。これらの結果は、nArgBP 2 がSAPAP によってPSD に固定され、アクチン細胞骨格の制御を行っている可能性を示唆するものである。

本研究は、実験結果自体の意義もさることながら、今後の発展性にも期待できるものがあり、生命科学への貢献度が極めて高い研究であると言える。したがって、学位授与に十分値すると考えられる。