



Title	Localization of the Novel GAP Family Protein SPAL in Epithelial Cells
Author(s)	河府, 和義
Citation	大阪大学, 2001, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/42591">https://hdl.handle.net/11094/42591</a>
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">https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed</a> 大阪大学の博士論文について

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

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

The University of Osaka

氏名	河 府 和 義
博士の専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	第 16044 号
学位授与年月日	平成13年3月23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	Localization of the Novel GAP Family Protein SPAL in Epithelial Cells (hDLG および PSD-95のグアニレートキナーゼ様領域に結合する新規遺伝子産物 SPAL の同定と機能解析)
論文審査委員	(主査) 教授 仲野 徹
	(副査) 教授 岡田 雅人 教授 米田 悅啓

### 論文内容の要旨

#### 【目的】

DLG蛋白質は *Drosophila* の変異体の研究から癌抑制遺伝子産物として同定された分子である。その遺伝子変異は成虫原基の腫瘍性過形成、細胞極性の消失およびシナプス構造の異常を引き起こすことが明らかとなっている。ヒト、ラット、マウスにおいてもその相同体、ファミリー分子群 (PSD-95、Chapsyn-110など) が単離されており精力的に機能解析が行われている。代表的な知見として、1) 家族性大腸腺腫症の研究から同定された癌抑制遺伝子産物 APC と会合して細胞周期制御に関与すること、2) 子宮頸癌発生に関わるパピローマウイルスの癌遺伝子産物 E 6 により蛋白質分解をうけること、3) 神経細胞特異的な発現をする PSD-95などは興奮性シナプス伝達の中心的役割を果たすグルタミン酸受容体の機能を維持するために重要な役割を担っており、記憶・学習に深く関わる神経伝達長期増強に関与することなどが報告されている。以上のことから DLG およびそのファミリー分子群は、細胞癌化・記憶学習などの極めて複雑でかつ重要な生命現象に深く関与していると考えられている。

構造上 DLG はアミノ末端側から PDZ 領域 (3回繰り返し)、SH 3 領域、およびグアニレートキナーゼ (GK) 様領域を有している。これらのコア構造は DLG ファミリーに高度に保存されており、それぞれが重要な機能を担っていると考えられている。特に、他の蛋白質との会合領域として機能する PDZ 領域には、上述のとおり APC、E 6、NMDA 型グルタミン酸受容体、ポタシウムチャネルなど多くの分子が結合することが報告されており機能の解析が進展している。一方で、SH 3 領域および GK 様領域が担う機能については未だ多くの知見は得られていない。DLG および PSD-95 と複合体を形成する蛋白質を見い出すこと、特に SH 3 領域および GK 様領域に着目した研究を通して、細胞増殖・細胞極性の維持、神経高次機能における DLG および PSD-95 の役割をさらに明らかにすることが本研究の目的である。

#### 【方法ならびに成績】

我々は、yeast two-hybrid screening 法により DLG と複合体を形成する蛋白質をコードする遺伝子を *HeLa* 細胞株由来 cDNA ライブラリーから検索した。その結果、1804アミノ酸残基の蛋白質 (推定分子量20.00万) をコードする新規遺伝子を同定した。アミノ酸配列上、ras ファミリーに属する G タンパク質 Rap 1 に対して特異的に GTPase 活性化活性 (GAP 活性) を示す SPA-1 と高い相同意を示すことから、我々はこの新規遺伝子産物を SPAL (SPA-1 like) と命名した。発現ベクター、特異抗体、リコンビナント蛋白質などを調整することにより、以下に示した

諸々の知見を得た。

1) 相同性検索の結果、SPAL はアミノ末端側から GAP 領域、PDZ 領域、Leucine Zipper 領域などの既存のコア構造を有する。それらはファミリー分子である SPA-1 とはそれぞれ、62.4%、62%、47% の相同性を示す。2) 各種組織、各種培養細胞株において mRNA および遺伝子産物は ubiquitous に発現分布する。3) 特異抗体による蛍光抗体染色実験から、上皮系細胞株およびラット組織（脳臍、大腸など）では細胞-細胞接着面に分布し、これは細胞間接着部位マーカーとしての  $\beta$ -Catenin と局在が一致する。4) DLG との分子会合は、SPAL のカルボキシ末端領域（約120アミノ酸残基）および DLG の GK 様領域を介しておこることが明らかとなった。5) これらの分子間会合は、in vitro および in vivo（培養細胞および組織）の両者において示され、さらには DLG 以外のファミリー分子 PSD-95 および Chapsyn-110 とも会合することが示された。6) GAP 領域を含む約100KDa 領域のリコンビナント蛋白質を用いた生化学解析の結果、Rap 1 A および Rap 1 B に対して特異的な GAP 活性を有することが示された。7) ラット大脳シナプス後肥厚（PSD）画分にも含まれること、ラット海馬初代培養細胞ではシナプスに局在しており PSD-95、NMDA 型グルタミン酸受容体などと局在が一致することが示された。8) ラット大脳シナプス PSD 画分においては PSD-95 との会合を介して NMDA 型グルタミン酸受容体複合体に含まれることが示された。9) ラット海馬初代培養細胞では高リン酸化状態にあり、グルタミン酸および NMDA、AMPA 処理により一過性に脱リン酸化されることが示された。またこのことは、SPAL の標的分子である Rap 1 A の一過性の不活化と相關することも示された。

#### 【総括】

SPAL は DLG およびそのファミリー分子群の GK 様領域に会合し、標的分子として Rap 1 の不活化制御を担うことが示唆された。SPAL は 1) 上皮系細胞、各種の組織においては細胞-細胞接着面（特にアドヘレンスジャンクション）に局在すること、2) 神経細胞ではシナプス PSD 部位に局在することが明らかとなった。GK 様領域の欠失変異は Drosophila において成虫原基の腫瘍性過形成、細胞極性の消失およびシナプス構造の異常を引き起こすという知見と本研究の結果をあわせて考えると、DLG ファミリー分子は Rap 1 などの GTP 結合タンパク質の制御を介して、細胞増殖制御や神経伝達などの細胞間の情報伝達機構において重要な役割を担うと推測される。

#### 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 および PSD-95 は、NMDA 受容体、シェイカー型カリウムチャ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 GK 様ドメインに結合する蛋白質 SPAL が同定された。SPAL はラット海馬のシナプスに局在し、PSD-95 を介して NMDA 受容体と複合体を形成していることが確認された。さらに、海馬初代神経細胞では高度にリン酸化修飾を受けていることや、NMDA 型受容体アゴニスト刺激により脱リン酸化されることも明らかとなった。SPAL 標的蛋白質としての Rap 1 A 活性制御を通して、MAP キナーゼ経路の制御を行っていることが示唆された。

本研究は、DLG ファミリーと複合体を形成する SPAL を同定することにより、NMDA 受容体の情報伝達機構において DLG ファミリーは Rap 1 A 活性制御に関与することを解明したものであり、博士の学位論文に値するものと認められる。