

Title	Molecular Cloning of Mouse Doc2 α and Distribution of its mRNA in Adult Mouse Brain
Author(s)	内藤, 陽
Citation	大阪大学, 2000, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/42714
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"〉 大阪大学の博士論文について 〈/a〉 をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

氏名	ないとう藤あきら陽
博士の専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	第 15689 号
学位授与年月日	平成12年8月7日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学位論文名	Molecular Cloning of Mouse Doc2 α and Distribution of its mRNA in Adult Mouse Brain (マウス Doc2 α の分子クローニングとその mRNA の成体マウス脳内における発現分布)
論文審査委員	(主査) 教授 高井 義美 (副査) 教授 岡野 栄之 教授 遠山 正彌

論文内容の要旨

[目的]

神経伝達物質の放出は、脱分極後、Ca²⁺チャンネルから細胞内に流入したCa²⁺によってシナプス小胞とシナプス前膜とが融合することにより引き起こされる。この過程には、Ca²⁺濃度を感知して神経伝達物質の放出を制御するCa²⁺センサーとして機能する分子が存在すると考えられている。最近、C2領域と呼ばれるCa²⁺結合領域を二つ有する一群の蛋白質がCa²⁺センサーとして関与していることが明らかになりつつある。このグループに属する蛋白質として、私共の研究室はRabphilin-3AおよびDoc2を、他の研究室はシナプトタグミンを見い出しており、実際に、神経伝達物質の放出の調節分子として機能していることを報告している。したがって、これらの蛋白質の機能を詳細に解析することにより、神経伝達物質の放出機構が明らかになると期待される。特に、脳におけるこれらの蛋白質の発現分布を知ることは、その機能を考える上で重要な情報となる。

C2領域を二つ有する一群の蛋白質の中でもシナプトタグミンおよびRabphilin-3Aに関してはその脳での発現分布について既に報告がある。一方、Doc2に関しては、脳での発現分布についての解析はされていない。Doc2は、ヒトにおいてDoc2 α およびDoc2 β の2種類の蛋白質が見出されており、Doc2 α は脳で特異的に、Doc2 β はほとんどすべての組織で発現している。そこで、本研究において、私は、脳で特異的に発現しているDoc2 α に注目して、マウスDoc2 α のcDNAをクローニングし、*in situ*ハイブリダイゼーション法を用いてマウス脳でのDoc2 α の発現分布を検討することとした。

[方法ならびに成績]

1) マウスDoc2 α のcDNAのクローニング マウス脳由来cDNAライブラリーより、ヒトDoc2 α の配列をもとに合成したプライマーを用いてPCR法を行い、マウスDoc2 α のcDNA断片を得た。さらに、このcDNA断片をプローブとして同じcDNAライブラリーのスクリーニングを行った。その結果、405アミノ酸から成る推定分子量44,547の蛋白質をコードするcDNA断片を得た。予測されるアミノ酸配列はヒトDoc2 α の配列と92%一致し、マウスとヒトの間ではDoc2 α の一次構造が高度に保存されていることが明らかになった。

2) ノーザンハイブリダイゼーション法による解析 マウスにおけるDoc2 α のmRNAの組織分布をノーザンハイブリダイゼーション法により調べた。プローブは、マウスDoc2 α のcDNA断片を鋳型として、ランダムヘキサマー法により³²P標識したDNAを用いた。その結果、マウスにおいてもヒトと同様に脳で特異的に発現していた。また、

Doc2 α の mRNA は、大脳で強く発現しているのに対し、小脳では発現していなかった。一方、Doc2 α の cDNA のそれぞれの鎖に特異的な RNA プローブを用いてノーザン解析を行ったところ、Doc2 α をコードする mRNA 以外に逆方向の転写物も存在することが明らかになった。

3) *In situ* ハイブリダイゼーション法による解析 *In situ* ハイブリダイゼーション法により詳細な Doc2 α の mRNA の脳内分布を調べた。プローブはマウス Doc2 α の cDNA の 3' 非翻訳領域を含む断片を鋳型として、*in vitro* 転写により ³⁵S 標識した RNA を用いた。また、マウス脳切片は、摘出直後に凍結した成体マウスの脳から作製した。*In situ* ハイブリダイゼーション後の切片は、マイクロオートラジオグラフィーの後、暗視野顕微鏡下で観察した。その結果、Doc2 α の mRNA は、海馬や大脳皮質の神経細胞が多く存在する領域では検出されるが、脳弓や小脳の白質などのグリア細胞が多く存在する領域では検出されないことから、神経細胞特異的に発現していることが明らかになった。終脳では、嗅球、海馬、大脳皮質、扁桃体において発現が認められ、特に嗅球の内顆粒神経細胞、海馬錐体細胞、歯状回顆粒細胞では強い発現が観察されたが、線状体では発現が認められなかった。間脳では、視床下部腹内側核で強い発現が認められたが、背側視床での発現は弱く、腹側視床では発現が認められなかった。一方、中脳、脳幹および脊髄での発現は弱く、小脳では全く発現していなかった。

[総括]

私は本研究により、マウス Doc2 α の cDNA をクローニングしてその一次構造を明らかにすると共に、その組織分布について検討した。その結果、マウスとヒトの間で Doc2 α の一次構造は高度に保存されており、かつその発現は、ヒトと同様、脳特異的であることを明らかにした。さらに、マウス脳の *In situ* ハイブリダイゼーション法による解析の結果、Doc2 α は脳内において神経細胞でのみ発現していること、および、嗅球、海馬、大脳皮質、扁桃体および視床下部腹内側核で強く発現しているのに対し、線状体、腹側視床、および小脳では発現していないことを明らかにした。最近、本研究により明らかとなったマウス Doc2 α の cDNA をもとに得られたゲノム DNA を用いて Doc2 α 遺伝子欠損マウスが作製された。このマウスは、本研究において Doc2 α の強い発現が認められた海馬において、神経伝達物質の放出に異常があり、記憶形成の基礎過程と考えられている長期増強が障害されていた。実際、このマウスでは記憶形成に異常があることが行動学的解析により確認されている。以上のことから、Doc2 α が神経細胞において神経伝達物質の放出に関与し、この機能を通じて個体レベルでの記憶形成に関係していることが示された。また、本研究により明らかとなった Doc2 α の脳内分布は、既に報告されているシナプトタグミンや Rabphilin-3A の脳内分布とは異なっている。これまでの神経細胞の電気生理学的解析により、神経伝達物質の放出には複数の Ca^{2+} センサーが存在すると考えられていることから、各神経細胞により異なった Ca^{2+} センサーの組み合わせが存在し、その結果、神経細胞の多様性が形成される可能性がある。

論文審査の結果の要旨

本申請者は、C2 様ドメインを 2 個有する蛋白質 Doc2 を見出ししている。Doc2 には、Doc2 α と β の 2 個のアイソフォームが存在するが、本申請者は、Doc2 α が神経組織特異的に発現していることを明らかにしている。本研究では、さらに、*In situ* hybridization 法を用いて Doc2 α のマウス脳内分布を明らかにしており、特に、海馬 CA3 領域錐体細胞においては、2 個のアイソフォームのうち Doc2 α のみが特異的に発現していることを見出した。その後、この結果に基づき、Doc2 α 遺伝子欠損マウスのシャッフラー側枝（海馬 CA3 領域錐体細胞-CA1 領域錐体細胞）の神経生理学的解析が行われ、Doc2 α が神経伝達物質放出の調節を介してシナプスの可塑性に関与することが明らかになった。本研究をはじめとする本申請者の一連の研究成果により、現在、Doc2 α はシナプス伝達の調節因子として高次神経機能の制御に機能する分子として注目されるに至っている。したがって、本研究は実験結果自体の意義もさることながら、今後のこの分野の研究に極めて重要な意義を持つものと考えられ、今後の発展性や生命科学の貢献度から鑑み、学位授与に十分値するものと認める。