

Title	SAPAPs A FAMILY OF PSD-95/SAP90-ASSOCIATED PROTEINS LOCALIZED AT POSTSYNAPTIC DENSITY
Author(s)	竹内, 勝一
Citation	大阪大学, 1999, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/42909">https://hdl.handle.net/11094/42909</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">〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉</a> 大阪大学の博士論文について <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈/a〉</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	竹内 勝一
博士の専攻分野の名称	博士 (医学)
学位記番号	第 14964 号
学位授与年月日	平成 11 年 9 月 30 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	SAPAPs A FAMILY OF PSD-95/SAP90-ASSOCIATED PROTEINS LOCALIZED AT POSTSYNAPTIC DENSITY (後シナプス肥厚に局在する PSD-95/SAP90 結合分子 SAPAPs の解析)
論文審査委員	(主査) 教授 高井 義美 (副査) 教授 倉智 嘉久 教授 岡野 栄之

## 論文内容の要旨

### [目的]

脳における神経シナプス結合を電子顕微鏡で観察すると、前シナプスには active zone、後シナプスには postsynaptic density (PSD、後シナプス肥厚) と呼ばれる特徴的な構造が認められる。この active zone から放出された神経伝達物質が PSD に集積している受容体に結合することにより神経細胞間の刺激伝達が行なわれている。したがって、神経細胞間の刺激伝達の分子機構を理解するためには、active zone と PSD の分子構造の解明が重要であると考えられる。なかでも PSD は神経伝達物質の受容体、細胞骨格系の分子、リン酸化酵素や脱リン酸化酵素などが集積しており、後シナプス側のシグナル伝達の基盤を担っていると考えられる。しかし、これらの既知の PSD 構成分子だけでは、シグナル伝達の分子機構を完全に説明することはできない。まだ同定されていない未知の PSD 構成分子が存在すると考えられる。

そこで、本研究では、PSD の主要なタンパク質の一つである PSD-95/SAP90 に着目し、新たな PSD 構成分子の同定を試みることにした。PSD-95 は membrane-associated guanylate kinase (MAGUK) の一つであり、3 個の PDZ 領域、SH3 領域、guanylate kinase 領域を持つ。PSD-95 は PDZ 領域を介して、NMDA 型グルタミン酸受容体やシェーカー型カリウムチャンネルのクラスター形成に重要な働きをしていることが明らかにされている。しかしながら、PSD-95 の SH3 領域と guanylate kinase 領域に結合する分子は同定されていない。そこで、本研究では、yeast two-hybrid 法を用いて PSD-95 の SH3 領域と guanylate kinase 領域に結合する分子の探索を通じて、新たな PSD 構成分子の同定を試みた。

### [方法ならびに結果]

PSD-95 の SH3 領域と guanylate kinase 領域を bait として、ラット脳由来のライブラリーに対して yeast two-hybrid 法によるスクリーニングを試みた。140 万クローンをスクリーニングした結果、6 つの独立な陽性クローンが得られた。その中の相同性があり、guanylate kinase 領域に結合する 4 つのクローンについて、SAPAPs (SAP90/PSD-95-Associated Proteins) と命名し、さらに詳しい解析を行なった。

完全長の cDNA をクローニングした結果、SAPAP1、-2、-3、-4 は、約1000アミノ酸からなる新規タンパクで、お互いに約50%の相同性があることが明らかになった。配列上のモチーフは SH3 領域に結合すると考えられるプロリンに富む配列が存在する以外には特徴的な配列は存在せず、既知の分子とは相同性のない新規のファミリーであることがわかった。また、いずれも分子も脳特異的な発現を示した。

SAPAPs と PSD-95 の結合について yeast two-hybrid 法を用いた詳細な解析を行なった。SAPAPs は PSD-95 の SH3 領域には結合しなかったが、PSD-95 とそのアイソフォームの guanylate kinase 領域に結合した。しかし、他の MAGUK の CASK や ZO-1 には結合しなかった。これらのことから、SAPAPs は PSD-95 とそのアイソフォームの guanylate kinase 領域に特異的に結合すると考えられた。

そこで、実際に SAPAPs と PSD-95 の guanylate kinase 領域が結合することを直接証明し、アフィニティーを算出するために、表面プラズモン共鳴を利用した分析機器である BIACORE を用いた解析を行なった。その結果、SAPAPs は PSD-95 の guanylate kinase 領域に結合することが確認された。SAPAP1、-2 については、解離平衡定数、Kd を求めたところ、それぞれ、 $2.1 \times 10^{-7}$  M、 $2.3 \times 10^{-7}$  M であり、生体内での生理的な結合を反映していると考えられた。

次に SAPAPs の生体内での局在について、それぞれの分子に特異的な抗体を用いて検討した。SAPAPs は難溶性であり、ラットの脳分画では、PSD 画分に著明に集積していた。さらに、ラット初代海馬神経細胞でも、PSD-95 と SAPAPs は同じところに分布していた。

以上のことから、SAPAPs は PSD-95 の guanylate kinase 領域と直接結合し、PSD において局在をともにすることが明らかとなった。そこで、SAPAPs の機能を探るために、HEK293細胞を用いた実験を行なった。まず、PSD-95 を単独で発現させると、PSD-95 は細胞質に存在した。一方、SAPAPs を単独で発現させると、細胞膜に局在した。両者を共発現させると、PSD-95 は SAPAPs と局在をともにして、細胞膜への局在変化が認められた。したがって、SAPAPs は PSD-95 を PSD に局在させる機能を持つ可能性が考えられた。

[総括]

新たな PSD 構成分子として、PSD-95 の guanylate kinase 領域と結合する分子群を同定し、SAPAPs と命名した。SAPAPs は新規のファミリーであり、PSD に非常に集積していた。SAPAPs は PSD-95 を PSD に固定している可能性が考えられる。さらにプロリンに富む配列を介して SH3 領域を含む分子を PSD に集積させていると予想される。今後、SAPAPs を手掛かりにすることにより、新たな PSD 構成分子の同定が進み、PSD の構造の解明につながると思われる。

なお、SAPAP1 は GKAP、DAP-1 という名前で、同時期に他のグループからも報告されている。

## 論文審査の結果の要旨

本申請者は、本研究において、後シナプス肥厚 (postsynaptic density ; PSD) の構成分子を明らかにする目的で、PSD に局在する裏打ち分子の PSD-95/SAP90 に結合する分子の探索を行った。その結果、PSD-95 の guanylate kinase 領域に結合する分子を同定し、SAPAP1、-2、-3、-4 と命名した。SAPAPs は互いに相同性がある新規のファミリーであり、脳特異的に発現し、PSD に非常に集積していることを明らかにした。さらに、培養細胞において、PSD-95 は、単独では細胞質に存在するが、SAPAPs と共発現させると、細胞膜へ移行することを示した。これらのことから、SAPAPs は PSD-95 などの PSD の構成分子を PSD に集積していると考えられた。

PSD は、後シナプス側のシグナル伝達を効率よく行うために、神経伝達物質の受容体や細胞内シグナル伝達に関与する分子などが秩序よく集積されている。したがって、PSD の構成分子を明らかにして、その集積の機構を解明することは重要であると考えられる。今回、新しい PSD の構成分子として SAPAPs が同定され、PSD-95 の PSD への集積機構を明らかにできたことは、PSD-95 がシグナル伝達や細胞骨格の制御を行っているという最近の見解と考え合わせると、PSD の研究に極めて重要な意義を持つと考えられる。今後の発展性や生命科学への貢献度から鑑み、学位授与に十分に値するものと認められる。