

Title	神経活動依存的に発現制御される2つのC2-domainを持つ新規蛋白質N-copineの解析
Author(s)	中山, 隆志
Citation	大阪大学, 2000, 博士論文
Version Type	VoR
URL	<a href="https://doi.org/10.11501/3169590">https://doi.org/10.11501/3169590</a>
rights	
Note	

*Osaka University Knowledge Archive : OUKA*

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

Osaka University

氏 名	中 山 隆 志
博士の専攻分野の名称	博 士 (薬 学)
学 位 記 番 号	第 15078 号
学 位 授 与 年 月 日	平 成 12 年 2 月 21 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	神経活動依存的に発現制御される 2 つの C2-domain を持つ新規蛋白質 N-copine の解析
論 文 審 査 委 員	(主査) 教授 真弓 忠範 (副査) 教授 山元 弘 教授 馬場 明道 教授 松田 敏夫

## 論 文 内 容 の 要 旨

記憶、学習などに代表される脳の適応変化の基盤は、神経ネットワークをつなぐシナプス情報伝達効率の変化、すなわちシナプス可塑性であると考えられる。海馬 CA1 領域の長期増強 (long-term potentiation; LTP) は最もよく研究されているシナプス可塑性のモデルである。海馬 CA1-LTP の誘導には NMDA 型グルタミン酸 (NMDA) 受容体を介した細胞内への  $Ca^{2+}$  流入が必須である。さらに長時間持続するような CA1-LTP が成立するためには新たな遺伝子発現が必要である。これまでにシナプス可塑性成立に伴い発現誘導されるいくつかの遺伝子が同定されている。しかしながら、このような発現遺伝子産物のシナプス可塑性における具体的な役割については殆ど報告されておらず、シナプス可塑性の成立、維持機構に関してはまだ十分な解析がなされていない。そこでシナプス可塑性成立のメカニズムを明らかにすることを目的とし、シナプス可塑性成立に伴い発現増強する遺伝子の解析を行った。

カイニン酸は神経伝達物質グルタミン酸のアナログであり、カイニン酸投与はマウス海馬において LTP 様のシナプス増強を誘導することが知られている。そこでシナプス可塑性に関わる遺伝子を同定するため、カイニン酸投与によりマウス海馬で発現増強し、NMDA 受容体拮抗薬 MK801 前投与によりその増強が阻害される遺伝子、すなわちカイニン酸投与によりマウス海馬において NMDA-R 依存的に発現増強する遺伝子の探索を行った。方法としては、新規の cDNA 2 次元展開法 RLCS (restriction landmark cDNA scanning) を利用した。得られた新規遺伝子の中の 1 つ、N-copine は、脳特異的な発現を示し、2 つの C2-domain を持つ蛋白質をコードしていた。N-copine は  $Ca^{2+}$  依存的リン脂質結合蛋白質ヒト Copine I と高い相同性を示すことから、Copine ファミリーの脳特異的なメンバーであると考えられる。N-copine mRNA の発現はカイニン酸投与により海馬で NMDA 受容体依存的に発現増強された。さらに、N-copine mRNA の発現が CA1-LTP を誘導する高頻度刺激により増強されることを明らかとした。これらの結果より、N-copine はシナプス可塑性に関与すると考えられる。In situ ハイブリダイゼーション解析と免疫組織染色の結果は、N-copine がマウス脳において海馬と嗅球の神経細胞に局限して発現していることを示した。マウスにおいて海馬や嗅球は記憶や学習のために重要な領域である。このように N-copine の脳における発現分布はシナプス可塑性との関連がきわめて高い領域に局限されており、N-copine がシナプス可塑性や記憶形成に重要な役割を果たすと

いう考えを支持する。

N-copine はシグナル配列や膜貫通領域を持たないにも関わらず、細胞質画分と膜画分に存在していた。その膜画分への局在は  $\text{Ca}^{2+}$  に依存していた。これらの結果は、N-copine が細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  の上昇に伴い細胞質から膜に移行することを示唆する。N-copine の 2 番目の C2-domain 領域と GST との融合蛋白質が  $\text{Ca}^{2+}$  依存的なフォスファチジルセリンとの結合を示すため、この特性は 2 番目の C2-domain によるものと考えられる。さらに、酵母 two-hybrid system を用いた N-copine 結合蛋白質の探索から、N-copine の 2 番目の C2-domain がヒト骨肉腫において高頻度に増幅している遺伝子として同定された OS-9 と  $\text{Ca}^{2+}$  依存的に結合することを明らかとした。これらの結果より、N-copine は  $\text{Ca}^{2+}$  センサーとして機能し、細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  の上昇に伴い細胞質から膜に移行し、細胞膜上で OS-9 と結合すると考えられる。OS-9 の機能や生理的役割は殆ど知られていないが、N-copine と OS-9 結合はシナプス可塑性の  $\text{Ca}^{2+}$  依存的な段階に関与することが推測される。

N-copine は 2 つの C2-domain を持っている。Synaptotagmin、Rabphilin-3A、Doc2 等のいくつかの蛋白質は 2 つの C2-domain を持ち、“Double C2-domain protein family” と呼ばれる蛋白質ファミリーを形成している。

“Double C2-domain proteins” は神経細胞において主にプレシナプス部位に局在し、神経伝達物質の放出において役割を果たしている。N-copine は 2 つの C2-domain を持つにも関わらず、その構造的特徴から “Double C2-domain protein family” のメンバーに属さないと考えられる。さらに、免疫組織染色の結果は、N-copine と Synaptotagmin I が神経細胞において異なる局在を示すことを明らかにした。海馬 CA1-CA3 領域の錐体細胞において、N-copine は主に細胞体と樹状突起に強く発現していたが、Synaptotagmin I は軸索や神経終末部位で発現していた。以上の結果より、N-copine は、Synaptotagmin I や他の “Double C2-domain protein” がプレシナプス部位で役割を果たしているのに対し、主に細胞体と樹状突起に局在してポストシナプス部位で役割を果たしていると考えられる。

シナプス可塑性の分子機構を明らかとするため、神経活動依存的に発現制御される新規遺伝子、N-copine を同定し、その機能解析を進めた。N-copine が神経細胞のポストシナプス部位に発現し、 $\text{Ca}^{2+}$  センサーとして機能することを明らかとした。N-copine は他の Copine ファミリー蛋白質とともに 2 つの C2-domain を持つ新しい蛋白質ファミリーを形成する。Copine ファミリー蛋白質の生理的役割や N-copine と OS-9 との  $\text{Ca}^{2+}$  依存的結合の生理的意義はまだ分かっていないが、本研究の成果はシナプス可塑性成立の分子メカニズムを理解する上で重要な情報を与えるものであると考えられる。

## 論文審査の結果の要旨

シナプス可塑性成立に伴い発現誘導される遺伝子は、約 1% にもなることが報告されているが、さらに多くのシナプス可塑性に関連する遺伝子が存在すると考えられている。

しかし現在のところ、発現誘導される遺伝子が同定されているものは少なく、また、その様な発現遺伝子産物のシナプス可塑性における役割についても殆ど報告されていない。

そこで著者はシナプス可塑性に関わる遺伝子を同定するため、マウス海馬においてシナプスの長期増強を誘導することが知られているカイニン酸を用いて検討を開始した。カイニン酸投与によりマウス海馬で発現増強し、NMDA 受容体拮抗薬 MK801 の前投与によりその増強が阻害される遺伝子、すなわち、カイニン酸投与によりマウス海馬において NMDA-R 依存的に発現増強する遺伝子を探索し基礎的研究を行った。その結果、以下に示す成果が得られた。

- 1) 神経活動依存的に発現制御される新規遺伝子を同定、単離、解析し、N-copine と命名した。
- 2) N-copine は脳特異的な発現を示し、マウス脳において、海馬や嗅球の神経細胞に局限した発現を示すことを明らかにした。
- 3) N-copine は、神経細胞において主に細胞体と樹状突起に局在することを見出した。
- 4) N-copine はカルシウム依存的に、細胞質画分から膜画分に移行することを明らかにした。

5) N-copine の 2 番目の C2-domain が、カルシウム依存的フォスファチジルセリン結合を示すことを明らかにした。

6) N-copine の 2 番目の C2-domain が、ヒト骨肉腫において高頻度に増幅している遺伝子として同定された OS-9 とカルシウム依存的に結合することを明らかにした。

以上の結果は、シナプス可塑性成立の分子メカニズムを理解する上で重要な情報を与えるものであり、博士(薬学)の学位を授与するにふさわしいものとする。