

Title	Interaction of S-SCAM with Neural Plakophilin-Related Armadillo-Repeat Protein/ $\delta$ -Catenin
Author(s)	井手, 陳之
Citation	
Issue Date	
Text Version	none
URL	<a href="http://hdl.handle.net/11094/42991">http://hdl.handle.net/11094/42991</a>
DOI	
rights	

*Osaka University Knowledge Archive : OUKA*

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

氏名	井手 陳之
博士の専攻分野の名称	博士 (医学)
学位記番号	第 15089 号
学位授与年月日	平成 12 年 2 月 29 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	Interaction of S-SCAM with Neural Plakophilin-Related Armadillo-Repeat Protein/ $\delta$ -Catenin (S-SCAM と神経特異的 Plakophilin 関連アルマジロリピートタンパク質/ $\delta$ -Catenin の相互作用)
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]

神経シナプスの後部には、電子顕微鏡上高密度な構造物として観察される後シナプス肥厚(PSD)が存在する。PSDには神経伝達物質受容体、細胞接着因子、シグナル伝達物質、そして細胞骨格が集積していると考えられる。このような多彩な分子が、どのように空間的に配列され機能的な神経シナプスを形成しているかは、未だ十分に明らかではない。

最近、PSDの構造維持に PSD-95 と呼ばれる蛋白質が重要であることが明らかになってきている。PSD-95は、3つの PDZ 領域、SH3 領域、グアニル酸キナーゼ (GK) 領域という蛋白質結合領域を持っている。PSD-95は、複数の蛋白質を融合し、それらに空間的秩序を与える足場蛋白質として機能している。PSDには、PSD-95の他にも synaptic scaffolding molecule (S-SCAM) という足場蛋白質が存在している。S-SCAMは、6つの PDZ 領域と、2つの WW 領域、1つの GK 領域を持ち、PDZ 領域でグルタミン酸受容体と細胞接着因子に結合する点で PSD-95に類似している。しかし、PSD-95に結合する分子は多数報告されているが、S-SCAMに結合する分子については、未だ十分に解析が行われていない。そこで、本研究において、私は、S-SCAMの PDZ 領域に結合する分子の探索を行なった。

### [方法ならびに成績]

#### 1) S-SCAM の PDZ 領域に結合する分子の探索

Yeast two-hybrid 法を用いて、S-SCAM の PDZ 領域に結合する分子の探索を行なった。その結果、12個の陽性クローンを得た。そのうち9個は既知の遺伝子であった。既知の遺伝子の中で、神経特異的 Plakophilin 関連アルマジロリピートタンパク質 (NPRAP)/ $\delta$ -catenin が神経特異的な発現様式を示していたので、以下 S-SCAM と NPRAP/ $\delta$ -catenin との結合を解析した。

#### 2) PCR 法による NPRAP/ $\delta$ -catenin の遺伝子の調整

Yeast two-hybrid 法により得られたクローンは、NPRAP/ $\delta$ -catenin の C 末端の148アミノ酸のみを含んでいた。そこで、まず PCR 法により、NPRAP/ $\delta$ -catenin の全長 cDNA をクローニングすることとした。私がこの研究を開始し

た時点では、792アミノ酸からなる分子がヒトの  $\delta$ -catenin として報告されていた。一方、NPRAP については、マウスの1247アミノ酸からなる分子が報告されていた。792アミノ酸の  $\delta$ -catenin は、NPRAP の431番目の methionine に相当する位置からスタートして、C末端までを含んでいた。すなわち、この時点でデータベースに登録されていた  $\delta$ -catenin は、完全長でなく部分配列であったと考えられる。実際その後、より長いN末端を持ち1275アミノ酸からなる蛋白質が、ヒトの  $\delta$ -catenin として登録し直されている。私は、ヒト脳 cDNA を鋳型にもちいて PCR 法を行いC末端部分を含む792アミノ酸からなる  $\delta$ -catenin cDNA を得た。NPRAP/ $\delta$ -catenin はC末端に PDZ 結合モチーフを持ち、S-SCAM との相互作用はC末端を介していると予測されたので、以後の解析は、クローニングしたヒト脳 cDNA から得られた792アミノ酸の分子を用いて行なうことにした。

### 3) ラット脳からの S-SCAM と NPRAP/ $\delta$ -catenin の免疫沈降

ラット脳の粗シナプトソームから S-SCAM を免疫沈降して、NPRAP/ $\delta$ -catenin が共に沈降するか否かを、ウエスタンブロット法で調べた。その結果、S-SCAM と共に、NPRAP/ $\delta$ -catenin が沈降することが確認された。

### 4) 試験管内での S-SCAM と NPRAP/ $\delta$ -catenin の相互作用：結合領域の同定

S-SCAM と  $\delta$ -catenin の結合領域を同定するため、N末端に Myc タグを添付した NPRAP/ $\delta$ -catenin の様々な部分を含む融合蛋白質を COS 細胞で発現させ、 $^{35}\text{S}$ -メチオニンで標識した S-SCAM との結合をオーバーレイ法により検討した。その結果、S-SCAM は、NPRAP/ $\delta$ -catenin のC末端を含む領域と結合することが明らかとなった。同様に、S-SCAM の各 PDZ 領域を GST との融合蛋白質として発現させ、 $^{35}\text{S}$ -メチオニンで標識した NPRAP/ $\delta$ -catenin との結合を検討した。その結果、NPRAP/ $\delta$ -catenin は、S-SCAM の一番C末端の PDZ 領域にのみ結合した。さらに表面プラズモン共鳴法を用い、S-SCAM と NPRAP/ $\delta$ -catenin の相互作用を確認し、同様の結果を得た。

### 5) NPRAP/ $\delta$ -catenin の神経細胞内の局在

NPRAP/ $\delta$ -catenin の神経細胞内の局在について検討した。まず、ラット脳の細胞分画を定法に従って行ない、各画分に含まれる NPRAP/ $\delta$ -catenin をウエスタンブロット法で検出した。NPRAP/ $\delta$ -catenin は、S-SCAM と同様に、神経シナプス膜ならびに PSD 画分に多く分布していた。また、ラット海馬神経細胞においては、神経細胞体と神経突起に分布していた。その分布は、S-SCAM と同様に、N-methyl-D-aspartate (NMDA) 型グルタミン酸受容体の分布に一致していた。

#### [総括]

私は本研究により、S-SCAM の結合蛋白質として、NPRAP/ $\delta$ -catenin を同定した。さらに NPRAP/ $\delta$ -catenin は、そのC末端領域を介して、S-SCAM のC末端の PDZ 領域と結合することを明らかにした。また、ラット海馬神経細胞において両分子の局在が一致することを示した。すなわち、私は、S-SCAM には、神経伝達物質受容体や細胞接着因子以外の分子が結合する可能性を初めて示した。NPRAP/ $\delta$ -catenin は、広く armadillo family と呼ばれる蛋白質群に属し、その中でも p120ctn を代表とするサブファミリーに属している。p120ctn サブファミリーに属している分子は、いずれも細胞間結合の構造の維持に関与し、特に細胞骨格による膜の裏打ちと関係が深いと予測されている。よって NPRAP/ $\delta$ -catenin も、神経シナプスにおいて細胞骨格を S-SCAM に連結して、S-SCAM によって配列されている神経伝達物質受容体や細胞接着因子に細胞骨格の裏打ちを与えているのかもしれない。したがって NPRAP/ $\delta$ -catenin と細胞骨格との関係を解明するのが、今後の課題である。

## 論文審査の結果の要旨

本申請者は、本研究において、postsynaptic density に局在し、神経伝達物質受容体や細胞接着因子の集積に重要である足場蛋白質 S-SCAM の機能を明らかにする目的で、その結合分子の解析を行った。S-SCAM に結合する蛋白質を yeast two hybrid 法を用いてスクリーニングした結果、細胞接着への関与が示唆されている蛋白質 NPRAP/ $\delta$ -catenin を同定した。NPRAP/ $\delta$ -catenin は、そのC末端の PDZ 領域結合モチーフを介して、S-SCAM の5番目の

PDZ 領域と結合した。さらに、NPRAP/ $\delta$ -catenin は、in vitro と in vivo の系において S-SCAM に結合し、神経細胞内での局在も S-SCAM とほぼ一致した。NPRAP/ $\delta$ -catenin は、細胞骨格による膜の裏打ちに関与する p120ctn ファミリーに属している。したがって、本研究の結果より、NPRAP/ $\delta$ -catenin は、S-SCAM により集積された神経伝達物質受容体や細胞接着因子に細胞骨格による膜の裏打ちを与えている可能性が示唆された。

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る。したがって、今後の発展性や生命科学への貢献度から鑑み、学位授与に十分値するものと認める。