



Title	Involvement of unique leucine-zipper motif of PSD-Zip45 (Homer 1c/vesl-1L) in group 1 metabotropic glutamate receptor clustering
Author(s)	田所, 智子
Citation	大阪大学, 2000, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/43074">https://hdl.handle.net/11094/43074</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">大阪大学の博士論文について</a>をご参照ください。

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

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

The University of Osaka

氏 名	田 所 智 子
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	第 1 5 5 8 3 号
学 位 授 与 年 月 日	平成12年 3 月 27 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	Involvement of unique leucine-zipper motif of PSD-Zip45 (Homer 1 c/vesl-1 L) in group 1 metabotropic glutamate receptor clustering (PSD-Zip45によるロイシンジッパー構造を介した1型代謝型グルタミン酸レセプターのクラスター形成)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 祖父江憲治  (副査) 教 授 米田 悦啓    教 授 不二門 尚

## 論 文 内 容 の 要 旨

### 【目的】

近年、神経伝達物質受容体やチャンネルのクラスター形成、およびシナプスへの局在化に関与する蛋白群が注目されているが、その分子機構については未だ明らかでない。PSD-Zip45は、シナプス後肥厚部 (postsynaptic density、以下PSD) 分画を抗原に作製したモノクローナル抗体を用いて我々の研究室で分離・同定した新規 Homer/ves 1 蛋白質ファミリーで、N末側の EVH1 ドメインで1型代謝型グルタミン酸受容体 (以下 mGluR) に結合し、C末端側には二つのロイシンジッパーモチーフを含む独自の配列を有している。今回私は、1型 mGluR のクラスター形成における PSD-Zip45 の役割を解析した。

### 【方法ならびに成績】

ラット脳組織を抗 PSD-Zip45抗体、および抗 mGluR 1  $\alpha$  或いは mGluR 5 抗体を用いて免疫染色を行い、共焦点顕微鏡で観察した。PSD-Zip45は、小脳皮質分子層のシナプスにおいて mGluR 1  $\alpha$  と同一の局在を示し、mGluR 1  $\alpha$  のシナプスにおける局在化決定に関与している可能性を示唆した。一方、海馬では PSD-Zip45 と mGluR 1  $\alpha$ ・mGluR 5 の局在は共に一致せず、さらに海馬神経細胞の初代培養系を用いた免疫染色により、PSD-Zip45はむしろ NMDA 受容体と同一箇所にも局在する事が明らかになった。

次に、PSD-Zip45の1型 mGluR クラスター形成能について検討した。マイクロインジェクション法を用いて、COS7細胞に mGluR 1  $\alpha$  或いは mGluR 5 を単独で発現させると、いずれもび漫性の局在を示した。一方、PSD-Zip45単独の発現では、び漫性の局在に加えて斑点状の染色像が観察され、この傾向は PSD-Zip45 の発現時間が経過するほど増強した。更に1型 mGluR と PSD-Zip45を共発現させると、両者は多数の著明なクラスター形成を示し、両者の局在は一致した。又、このクラスターは Triton X-100に不溶性であり、細胞骨格系に結合している事が示唆された。

次に、PSD-Zip45の多量体形成および1型 mGluR クラスター形成に関与する PSD-Zip45 分子内ドメインの検討を行った。PSD-Zip45および各種欠失変異蛋白質をグルタルアルデヒドで架橋後電気泳動分離し、その多量体形成能について検討した。その結果 PSD-Zip45はC末端のロイシンジッパー構造を介して非常に高分子量の多量体を形成することが明らかになった。このC末端ロイシンジッパーは、ロイシンが3側面に並ぶ特有の構造をしている。一方、上記以外のコイルドコイル構造やロイシンジッパー構造は PSD-Zip45の2量体や4量体の形成には関与するものの、

高分子多量体形成には必要でなかった。

更に、同様の各種 PSD-Zip45欠失変異蛋白質を COS7 細胞に mGluR 1  $\alpha$  と共発現させ、mGluR 1  $\alpha$  のクラスター形成を検討した結果、PSD-Zip45による mGluR 1  $\alpha$  のクラスター形成にも C 末端ロイシンジッパー構造が必須である事が判明した。

一方、PSD-Zip45と共通の N 末端側175残基の配列を有し、神経活性化に依存して一過性の発現上昇が知られている Homer 1a/ves1-1 S は、PSD-Zip45と競合して mGluR 1  $\alpha$  に結合する事で、PSD-Zip45による mGluR 1  $\alpha$  のクラスター形成を阻害した。

#### 【総括】

今回、PSD に特異的に局在する PSD-Zip45が C 末端ロイシンジッパー構造を介して高分子多量体を形成し、N 末端側に結合する 1 型 mGluR のクラスター形成を引き起こす事を示した。この結果から、シナプス領域の蛋白間相互作用の中で、ロイシンジッパー構造が神経伝達物質受容体のクラスター形成や局在化決定に重要な役割を担う分子内モチーフの一つである事を初めて明らかにするとともに、PSD-Zip45が神経伝達物質受容体の PSD への局在化に関与する重要な蛋白質であることを示唆した。

### 論文審査の結果の要旨

PSD-Zip45は、シナプス後肥厚部 (postsynaptic density、以下 PSD) 分画を抗原に作製したモノクローナル抗体を用いて分離・同定した新規 Homer/ves1 蛋白質ファミリーで、N 末側の EVH1 ドメインで 1 型代謝型グルタミン酸受容体 (以下 mGluR) に結合し、C 末端側には二つのロイシンジッパーモチーフを含む独自の配列を有している。本研究では、PSD-Zip45が小脳皮質分子層のシナプスにおいて mGluR 1  $\alpha$  と同一の局在を示す事を明らかにした。一方海馬では、PSD-Zip45の局在は mGluR 1  $\alpha$ ・mGluR 5 とは一致せず、むしろ NMDA 受容体と同一箇所が存在した。又、PSD-Zip45は C 末端のロイシンジッパー構造 (ZipB) を介して高分子多量体を形成し、N 末端側に結合する 1 型代謝型グルタミン酸受容体のクラスター形成を起こした。更に PSD-Zip45と同一の N 末側を有する Homer 1a は、PSD-Zip45と競合して mGluR 1  $\alpha$  に結合する事で PSD-Zip45による mGluR 1  $\alpha$  のクラスター形成を阻害した。本研究より、PSD-Zip45は、小脳皮質における 1 型代謝型グルタミン酸受容体の例を始めとして、広く神経伝達物質受容体のクラスター形成や PSD への局在化に関与する重要な蛋白質であることが示唆された。更に本研究はロイシンジッパー構造が神経伝達物質受容体のクラスター形成や局在化決定に重要な役割を担う分子内モチーフの一つである事を初めて明らかにしており、今後 PSD の分子構築を解明する重要な教唆になるとと思われる。よって本研究を学位に値するものと認める。