Osaka University Knowledge Archive

Title	Synaptic Targeting of PSD-Zip45 (Homer1c) and its Involvement in the Synaptic Accumulation of F-actin
Author(s)	臼井, 審一
Citation	大阪大学, 2003, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/43836
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、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

【110】

氏　　名	臼井審一（うすい しんいち）
博士の専攻分野の名称	博　士（医　学）
学位記番号	第　17680　号
学位授与年月日	平成15年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 医学系研究科臓器制御医学専攻
学位論文名	Synaptic Targeting of PSD-Zip45 (Homer1c) and its Involvement in the Synaptic Accumulation of F-actin （PSD-Zip45（Homer1c）のシナプスターゲティング及びF-アクチンのシナプス集積）
論文審査委員	（主査） 教　授　田野　保雄 （副査） 教　授　祖父江憲治　　教　授　津本　忠治

論文内容の要旨

〔目的〕

哺乳類中枢神経系において神経細胞間情報伝達の場であるシナプスを電子顕微鏡観察すると、興奮性シナプス後部領域にシナプス後肥厚部 postsynaptic density（以下 PSD）と呼ばれる電子密度の高い領域が認められる。この PSD を構成する蛋白質（以下 PSD 蛋白質）群は、シナプス前部から放出される情報伝達物質の各種受容体及び関連分子を PSD に集積させ機能制御することにより、シグナル伝達の調節に関与しているものと考えられている。また、PSD は通常の界面活性剤では可溶化されにくい強固な集合体を形成している反面、種々のシナプス刺激に反応してダイナミックな再構築を示す。我々の研究で発見した PSD 蛋白質の1つである PSD-Zip45（Homer1c）は、N 末端側の Enable/VASP ホモロジー1（EVH1）領域でⅠ型代謝性グルタミン酸受容体及び shank と結合し、C 末端側のロイシンジッパーモチーフ（ZipB）は PSD-Zip45 の自己多量体形成に関与している。いっぽう、N-methyl-D-aspartate（NMDA）受容体に結合する PSD-95 も GKAP を介して shank に結合すると報告されている。しかし、生体内における PSD 蛋白質間の相互作用の意義については未だ不明な点が多い。今回私は、PSD-Zip45 に着目してシナプスへのターゲティング機構を明らかにし、その結果をもとに関連 PSD 蛋白質（shank、GKAP、PSD-95）とアクチンフィラメント（F-アクチン）のシナプス局在様式について解析した。

〔方法ならびに成績〕

ラット胎児脳由来の成熟した初代培養海馬神経細胞を用いて、PSD 蛋白質群の局在・シナプスターゲティングを解析した。免疫染色は、各種 PSD 蛋白質特異抗体を用い蛍光抗体法により行った。また、目的の遺伝子を導入する方法としてマイクロインジェクション法を用い、導入量と固定までの時間により蛋白質発現量を調節した。

Green fluorescent protein（GFP）を N 末端側に挿入した PSD-Zip45（野生型）を少量発現させたところ、発現した GFP-PSD-Zip45 蛋白質は樹状突起スパイン（シナプス後部）に集積し、シナプスターゲティングが培養海馬神経細胞で正確に行われていることを見い出した。いっぽう、EVH1 領域における shank 結合能を欠如させた変異体（G89A）と C 末端ロイシンジッパーモチーフ（ZipB）が欠損した変異体（ΔZipB）は、シナプスターゲティングが

阻害された。また、これらの変異体（G89A またはΔZipB）を過剰に発現させた細胞のシナプスでは、野生型発現時と比較して内在性 shank のシナプス局在が著しく低下した。この現象は、内在性 PSD-95 と GKAP では見られなかった。次に、野生型及び shank 結合能を欠いた GKAP 変異体を海馬神経細胞に発現させたところ、両者ともにシナプスターゲティングを示した。更に、両者をそれぞれ過剰発現しても内在性 shank のシナプス局在に影響を及ぼさなかった。PSD-Zip45 及び shank はアクチン骨格系への関与が示唆されている。そこで、アクチン重合阻害剤である latrunculin A による PSD 蛋白質群のシナプス局在を検討したところ、PSD-Zip45 と shank はアクチンとともにシナプス局在が抑制され、PSD-95 と GKAP のシナプス局在には大きな影響を与えなかった。逆に、PSD-Zip45 を過剰発現すると内在性 F-アクチンはシナプスに集積し、PSD-Zip45 と CortBP1（shank family の一種）の共発現で更に著明なシナプス後部の肥大化と F-アクチンのシナプス集積を認めた。これらの現象は、G89A 及びΔZipB では認められなかった。

〔総括〕

PSD-Zip45 のシナプスターゲティングには EVH1 領域での分子結合能及び ZipB（多量体形成能）が必須で、この両ドメインが shank のシナプス局在化にも重要であることを見い出した。また、シナプス内で PSD-Zip45 及び shank はアクチン骨格系を足場として F-アクチン集積をはじめとするシナプス成熟機構に関与していること、また両 PSD 蛋白質系は PSD-95/GKAP 系とは異なるコンパートメントを形成していることを明らかにした。

論文審査の結果の要旨

成熟した哺乳類中枢神経系における興奮性シナプスの後部にはシナプス後肥厚部 postsynaptic density（PSD）と呼ばれる構造が存在し、シナプスの情報伝達に重要な役割を果たしている。本研究は PSD を構成する主要な足場蛋白質である PSD-Zip45（Homer1c）を中心として、初代培養海馬神経細胞におけるシナプス局在化機構とそのダイナミクスについて追究した。PSD-Zip45 は N 末端側の Enabled/VASP ホモロジー 1（EVH1）領域で I 型代謝性グルタミン酸受容体及び shank と結合し、C 末端例のロイシンジッパーモチーフ（ZipB）は強力な自己多量体形成能を有している。マイクロインジェクション法を用いて外来性に PSD-Zip45 を発現させ、シナプスターゲティングに必要な領域について解析した。その結果、EVH1 領域の shank 結合能と ZipB の双方が必須であることを見出した。次に、PSD-Zip45 が他の主要な PSD 足場蛋白質のシナプス局在に及ぼす影響について解析したところ、shank の結合しない EVH1 変異型または ZipB 欠損型の過剰発現により内在性 shank のシナプス局在が著明に減少した。一方、shank が結合する GKAP と GKAP が結合する PSD-95 のシナプス局在には影響を及ぼさなかった。また、GKAP と shank は互いに独立してシナプス局在化を示した。以上の結果より、PSD-95/GKAP 系と PSD-Zip45/shank 系はシナプス内で異なるコンパートメントを形成することが判明した。更に、このコンパートメントの由来として PSD-Zip45 及び shank がアクチン系細胞骨格に関与していることを明らかにし、PSD-Zip45 が shank に先行して内在性 F-アクチンのシナプス集積とシナプス成熟に重要であることを見出した。本研究は、PSD-Zip45 を中心に PSD 足場蛋白質のシナプス内ダイナミクスとアクチン系細胞骨格およびシナプス成熟の関係を明らかにしたもので、学位に値すると考えられる。