The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	The postsynaptic density and dendritic raft localization of PSD-Zip70, which contains an N-myristoylation sequence and leucine-zipper motifs
Author(s)	今野, 大治郎
Citation	大阪大学, 2003, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/43919
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。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

氏　　名　今野　大治郎（こんの　だいじろう）

博士の専攻分野の名称　博　士（医　学）

学位記番号　第　17662　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

医学系研究科生体統合医学専攻

学位論文名　The postsynaptic density and dendritic raft localization of PSD-Zip70, which contains an N-myristoylation sequence and leucine-zipper motifs
（ミリストイル化配列及びロイシンジッパーモチーフを有するPSD-Zip70の後シナプス肥厚部及び樹状突起ラフトへの局在）

論文審査委員　（主査）
教　授　祖父江憲治

（副査）
教　授　津本　忠治　　教　授　遠山　正彌

論文内容の要旨

＜目的＞

成熟した哺乳類において脳の神経細胞を電子顕微鏡で観察すると、興奮性シナプス構造の後部に電子密度の高い後シナプス肥厚部（postsynaptic density ; PSD）と呼ばれる構造が認められる。PSDはグルタミン酸などの各種神経伝達物質の受容体とそれらに結合する分子、さらに各種シグナル伝達分子などが高密度に集積しており神経伝達に重要な役割を担っている。また PSD は生化学的には各種界面活性剤に不溶性の強固な蛋白質間相互作用を示す特有な構造を形成しているにもかかわらず、生体内では LTP の誘導などによりその構造がダイナミックに変化することが明らかとなってきた。そこで本研究ではこのような PSD のダイナミクスを担う分子基盤を明らかにすることを目的として新たに単離した新規PSD蛋白質であるPSD-Zip70の性状を解析した。

＜方法および結果＞

［モノクローナル抗体の作製とPSD-Zip70 cDNAの単離］

ラット大脳より生化学的に単離した PSD 画分を臭化シアンで限定分解し、それらを抗原としたマウスモノクローナル抗体を定法により作製した。これにより得られたモノクローナル抗体204Hを用い、ラット脳cDNAライブラリーより204Hの認識する抗原（PSD-Zip70と名付けた）のcDNAを単離した。

［PSD-Zip70のミリストイル化］

PSD-Zip70はN末端側にミリストイル化配列を有している。そこでPSD-Zip70を発現させたCOS7にトリチウムラベルしたミリスチン酸を添加しその PSD-Zip70 への取り込みによりミリストイル化を検討した。その結果PSD-Zip70はミリストイル化配列依存性にミリストイル化されることがわかった。

［ラット脳の発生段階及び各種組織における発現］

ラット脳の発生段階及び各種組織におけるPSD-Zip70 mRNA及びタンパク質の発現をノーザンブロット及びウエスタンブロット法により解析した。その結果、成熟脳の大脳や生後1週から3週の小脳に強い発現が認められたが、

他の臓器にはほとんど発現が認められなかった。

［脳組織及び神経細胞内における PSD-Zip70 の局在］

成熟脳における PSD-Zip70 mRNA 及びタンパク質の発現を in situ hybridization と免疫染色により検討した結果、大脳皮質や海馬などに強い発現が認められた。また初代培養海馬神経細胞における PSD-Zip70 の局在を検討したところシナプス後部に局在する PSD-95 や F-アクチンと良く一致し、シナプス前部のマーカーであるシナプトタグミンと隣接していた。ラット脳海馬の免疫電顕法による観察では、PSD-Zip70 は PSD 領域に局在していた。

［脳膜画分における PSD-Zip70 の生化学的性状］

ラット脳膜画分を調製し内在性 PSD-Zip70 の可溶性を検討した。その結果、各種非イオン性界面活性剤および高塩濃度処理に対し不溶性であったがイオン性界面活性剤には可溶性であった。このことから PSD-Zip70 が脳膜画分においてラフト脂質マイクロドメインに局在することが示唆されたため、ショ糖密度勾配遠心法により局在画分を検討した。その結果、PSD-Zip70 は界面活性剤不溶性の低比重画分として分離されるラフトに豊富に存在することが明らかとなった。

［神経細胞及び非神経細胞における外来性 PSD-Zip70 の局在］

COS7 細胞に発現させた PSD-Zip70 は細胞膜表層に存在する微絨毛様構造に局在し、同じく微繊毛様構造に豊富に局在する F-アクチンやエズリンなどとその局在が良く一致した。また、その局在化には PSD-ZiP70 のミリストイル化が必須であった。初代培養海馬神経細胞においてもシナプス後部への局在にミリストイル化が必須であった。これらの結果は PSD-Zip70 の局在にミリストイル化が重要であることを示している。

＜総括＞

ラフトは細胞膜中に存在し細胞外の刺激を細胞内へ伝達する場として重要な役割を担っていることが近年明らかとなってきたが、神経細胞におけるラフト構造と PSD の関連に関しては現在も不明である。PSD-Zip70 はラット神経細胞においてその成熟段階に豊富に発現し、PSD 及び樹状突起ラフトに局在していた。この結果から、ラフトは PSD 領域にも存在しシナプス伝達において何らかの機能を担っていることが示唆された。また、PSD-Zip70 はこれらの両構造を繋ぐ重要な候補分子の１つであると考えられる。

論文審査の結果の要旨

哺乳類の興奮性シナプスのシナプス後部には後シナプス肥厚部（Postsynaptic density ; PSD）と呼ばれる構造が存在し、神経伝達に重要な役割を担っている。本研究では PSD の分子機構とその機能の分子的基盤を明らかにする目的で、ラット脳 PSD 分画を抗原とした多数のモノクローナル抗体を作製し PSD 分子群を単離してきた。今回そのなかの新規な PSD 分子である PSD-Zip70 に関してその性状を解析した。その結果、PSD-Zip70 がミリストイル化修飾されることを見いだした。また、脳内や神経細胞内での局在を検討し、PSD 辺縁部にユニークな局在を示すことを明らかにした。ショ糖密度勾配遠心法と樹状突起ラフト及び PSD 分画の解析から、PSD-Zip70 は PSD とともに樹状突起ラフトにも存在することを明らかにした。神経細胞で外来性の遺伝子を発現させて機能解析するため、本研究ではマイクロインジェクション法を用いた神経細胞への遺伝子導入法を確立した。この手法を用いて PSD-Zip70 のシナプスへの局在化機構を解析し、シナプス局在化に N 末端のミリストイル化と C 末端配列が重要であることを見出した。さらに C 末端に結合する 200 kDa の PSD 蛋白質が特異的に結合することを明らかにした。本論文は PSD-Zip70 による PSD 分子構築の一端を明らかにし、また現在まで不明であった PSD とラフトの関連を示唆する新たな知見を得た。さらに新しい実験手法の確立などを通して PSD 分子の性状解析に新たな手法を提供した点でも重要であり、学位に値すると考えられる。