

Title	Collabration of PSD-Zip70 with Its Binding Partner, SPAR, in Dendritic Spine Maturity
Author(s)	丸岡, 久人
Citation	大阪大学, 2006, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/46362
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。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

氏名	丸 岡 久 人
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	第 20160 号
学 位 授 与 年 月 日	平成 18 年 3 月 24 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第 4 条第 1 項該当 医学系研究科未来医療開発専攻
学 位 論 文 名	Collaboration of PSD-Zip70 with Its Binding Partner, SPAR, in Dendritic Spine Maturity (樹状突起スパイン成熟における PSD-Zip70 とその結合因子である SPAR との協調作用)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 祖父江憲治 (副査) 教 授 遠山 正彌 教 授 武田 雅俊

論 文 内 容 の 要 旨

〈目的〉

哺乳類において成熟脳の神経細胞の興奮性シナプス後部は、電子顕微鏡観察で電子密度の高い後シナプス肥後部 (postsynaptic density ; PSD) と呼ばれる構造が存在する。PSD は生化学的に各種界面活性剤不溶性の強固な蛋白質間相互作用を示す構造体であるが、一方で長期増強 (LTP) 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知られている。本研究では、PSD のダイナミクスを担う分子基盤を明らかにする目的で、当研究室で単離された新規 PSD 構成蛋白質である PSD-Zip70 の機能について検討した。

〈方法ならびに成績〉

[初代培養神経細胞における各種 PSD-Zip70 変異体長期発現の影響]

子宮内電気穿孔法 (in utero electroporation) を用いて、PSD-Zip70 各種変異体発現ベクターを GFP 発現ベクターとともに胎生 15 日 (E15) マウス胎児脳に導入し、E16 に初代培養を行った。培養 21 日目 (21 DIV) に PSD-Zip70 変異体発現神経細胞の観察を行い、GFP のみを発現させたコントロールではマッシュルーム様の成熟型スパイン (後シナプス) であるのに対して、PSD-Zip70C 末端を強制発現させた神経細胞はフィロポディア様の未熟型スパインを示した。C 末端を更に詳細に検討したところ、PSD-Zip70C 末端の coiled-coil 領域が未熟型スパインの表現型に重要である事が確認された。

[In vivo における PSD-Zip70C 末端の神経細胞長期発現の影響]

子宮内電気穿孔法により、E13 マウス胎児脳に PSD-Zip70C 末端発現ベクターを GFP 発現ベクターとともに導入した。生後 21 日目 (P21) に灌流固定、免疫組織染色にて PSD-Zip70C 強制発現神経細胞を観察したところ、GFP のみを発現させたコントロールで成熟型スパインが多く観察されるのに対して、in vitro と同様に著明なフィロポディア様未熟型スパインの形態を示した。

[神経細胞における PSD-Zip70C 末端一過性強制発現の影響]

成熟した初代培養ラット海馬神経細胞 (21DIV) にマイクロインジェクション法により PSD-Zip70C 末端を GFP

とともに一過性に強制発現し、スパイン形態への影響を検討した。長期強制発現と同様にフィロポディア様未熟型スパインを示した。

[RNA interference (RNAi) による内在性 PSD-Zip70 の発現抑制効果]

マイクロインジェクション法により成熟した初代培養海馬神経細胞に siRNA 発現ベクターを導入し、72 時間後に免疫染色にて内在性 PSD-Zip70 の発現抑制を確認した。同時に、GFP 発現ベクターを導入し形態を観察した。内在性 PSD-Zip70 の発現抑制が確認された神経細胞は GFP のみを発現させたコントロールと比して未熟型スパインが観察された。

[ラット脳における PSD-Zip70 とアクチン細胞骨格制御蛋白質である SPAR との結合]

7 週齢ラット脳抽出液を用いて PSD-Zip70 アフィニティカラムにより標的蛋白質を検索した。アフィニティカラムに結合した 200 kDa 蛋白質のアミノ酸配列を解析したところ、アクチン骨格制御蛋白質の一つである SPAR であることを同定した。そこで、COS7 細胞を用いて外因性に PSD-Zip70 変異体と SPAR 変異体をそれぞれ発現させ共免疫沈降法により結合ドメインを検討したところ、PSD-Zip70 末端の coiled-coil 領域と SPAR の GK 結合ドメインを介して結合することを明らかにした。

[PSD-Zip70 と SPAR 結合阻害によるスパインへの影響]

PSD-Zip70C 末端を長期強制発現させた初代培養神経細胞において、SPAR に対して免疫染色を行ったところ、本来後シナプスに集積している SPAR の局在が神経細胞に一樣に拡散して存在することが判明した。また RNAi により内在性 PSD-Zip70 発現を抑制した神経細胞でも同様に SPAR の局在が拡散していた。これらの結果から PSD-Zip70C 末端強制発現および発現抑制でみられる未熟型スパインの表現型は、PSD-Zip70/SPAR 間結合阻害により起こる事が示唆された。更に SPAR GK 結合ドメインのみをマイクロインジェクション法により成熟初代培養ラット海馬神経細胞に強制発現させたところ、PSD-Zip70 末端の表現型と類似し未熟型の細長いスパイン形態を示した。

(総括)

神経細胞において PSD-Zip70C 末端過剰発現によりシナプス成熟が阻害されることが明らかになった。また内在性 PSD-Zip70 の発現抑制でも同様にシナプス成熟の阻害が認められ、以上の結果から PSD-Zip70 がスパイン成熟化に重要な役割を果たすことが示唆された。更に PSD-Zip70 の標的蛋白質として SPAR を同定し、PSD-Zip70 と結合する SPAR の GK 結合ドメインの過剰発現により PSD-Zip70/SPAR 相互作用を阻害しても神経細胞でも類似した未熟型スパインが認められた。以上の結果より、PSD-Zip70 と SPAR との協調作用が正常なシナプス成熟に必須である事が示唆された。

論文審査の結果の要旨

成熟脳において記憶や学習といった高次機能は、神経細胞間の要であるシナプスより発揮される。本研究で丸岡君は、当研究室で見出した後シナプス肥後部 (PSD) の構成蛋白質である PSD-Zip70 について、シナプス成熟との関連を *in vitro* と *in vivo* で検討した。スパイン成熟過程にある神経細胞に、PSD-Zip70 の C 末端のみを過剰発現させるとシナプス成熟が阻害され、未熟型スパインの形態を示した。既に成熟したスパインを有する成熟神経細胞においても、PSD-Zip70C 末端の過剰発現はスパイン形態の未熟化を来した。更に、PSD-Zip70 の標的蛋白質を検索し、細胞骨格制御蛋白質である SPAR を同定し、PSD-Zip70C 末端を介して SPAR と結合している事を明らかにした。次いで、PSD-Zip70C 末端によるスパイン成熟の阻害は、内在性 PSD-Zip70 と SPAR との結合阻害による事を見出した。また、神経細胞において内在性 PSD-Zip70 自体の発現を抑制によって未熟型スパインを形成した。以上の結果から、正常なシナプス形成とその成熟シナプスの形態維持に PSD-Zip70 と SPAR の協調作用は必須である事を明らかにした。本研究はシナプス形成異常による精神遅滞や精神疾患の病因解明の基礎的根拠を与えるものであり、学位授与に値するものと考えられる。