

論文の内容の要旨

応用生命工学専攻

平成11年度博士課程進学

氏名 原口 景子

指導教官 秋山 徹

論文題目 hDLG/PSD-95 結合蛋白質 DAP-1 の機能解析

序論

dlg (*Drosophila discs-large*) 遺伝子はショウジョウバエ (*Drosophila melanogaster*) の癌抑制遺伝子の一種で、その産物 (DLG) はヒトの tight junction に相当する成虫原基上皮細胞の septate junction に局在する。dlg 遺伝子に変異が起きて失活すると、成虫原基上皮細胞において septate junction の崩壊、細胞接着と極性の喪失が起こり、細胞が異常増殖を起こして癌化することや、神経細胞のシナプス構造に異常が生じることが知られている。ヒトには様々な組織において発現し細胞接着部位に局在する DLG のヒトホモログ hDLG/synapse-associated protein (SAP)97 に加えて、シナプスに特異的かつ多量に存在する postsynaptic density (PSD)-95/SAP90、PSD-93/Chapsyn110、SAP102 など、構造が類似した多数の蛋白質が存在し、PSD-95 ファミリーを形成する。

PSD-95 ファミリーは PDZ (DHR)ドメイン、SH3 ドメイン、グアニレートキナーゼ (GUK)様ドメインから成るマルチドメイン蛋白質である。PSD-95 の PDZ ドメインは記憶、学習において重要な役割を担う N-methyl-D-aspartate レセプタ

ー (NMDA-R)の NR2 サブユニット (NMDA-R-2)や neuronal nitric oxide synthase (nNOS)、癌抑制遺伝子産物 adenomatous polyposis coli (APC)と複合体を形成することが知られている。一方、hDLG/PSD-95 の GUK ドメインには hDLG-associated protein (DAP)/synapse-associated protein 90-associated protein (SAPAP)/guanylate kinase-associated protein (GKAP)が結合することが知られている。DAP は 14 アミノ酸繰り返し配列、プロリンリッチドメインから成り、hDLG/ PSD-95 は DAP の 14 アミノ酸繰り返し配列を介して結合していることが明らかになっている。

これまでに PSD-95 ファミリーは細胞膜裏打ち蛋白質としてレセプターやイオンチャンネルのクラスタリングを引き起こす活性を持ち、シナプスにおける蛋白質複合体の構築に重要な役割を果たすことが知られている。またシグナル伝達分子と結合してシグナルを伝えるための足場にもなることが明らかになってきており、これらの機能を通してシナプスの可塑性、増殖制御などに関与していると考えられ、注目を集めている。そこで本研究では hDLG/PSD-95 の機能をさらに明らかにするために、hDLG/PSD-95 結合蛋白質 DAP-1 の機能解析を行った。

方法と結果

Two-hybrid screening による DAP-1 結合蛋白質の単離

hDLG/PSD-95 結合蛋白質 DAP-1 に着目し、yeast を用いた two-hybrid system により DAP-1 結合蛋白質をコードする遺伝子のクローニングを行った。ヒト胎児脳 cDNA ライブラリーを用いてスクリーニングした結果、hDLC (human dynein light chain)と非常に高い相同性 (93 % identity and 98 % similarity) を持つ 89 アミノ酸から成る蛋白質をコードする新規遺伝子が単離された。そこですでにクローニングされていた DLC を hDLC-1 とし、本研究によって得られた新規遺伝子を hDLC-2 と命名した。

hDLC-2 は DAP-1 と結合する

hDLC-2 と DAP-1 が直接結合するかどうかを pull-down assay を用いて検討を行った結果、hDLC-2 は DAP-1 に直接結合することが確認できた。また DAP-1 の hDLG や PSD-95 との結合に必要とされる 14 アミノ酸繰り返し領域を含む断

片、およびプロリンリッチ領域は hDLC-2 との結合には関与しないが、中央の 12 アミノ酸(673-684)が hDLC-2 との結合に関与していることが明らかになった。

NMDA-R-2 と PSD-95、DAP-1、nNOS、および DLC の複合体形成

シナプス後膜部 (PSD)では PSD-95 を介して nNOS と NMDA レセプターが効率良くカップリングしていると考えられている。また DAP-1 は PSD-95 と結合することが明らかになっているので、ラット脳抽出液を用いて様々な抗体により免疫沈降およびウェスタンブロットティングを行ったところ、*in vivo* において DLC は NMDA-R-2-PSD-95-DAP-1-nNOS 複合体に含まれていることが明らかとなった。

DAP-1 は nNOS と結合する

DAP-1 と nNOS の結合を pull-down assay によって検討を行った結果、DAP-1 は nNOS に直接結合することが確認できた。ここで DLC は nNOS と直接結合することが報告されている一方、DAP-1 とも直接結合することが明らかとなったので DAP-1 と nNOS の共沈実験において hDLC-2 を添加し、添加量を増加させていったが hDLC-2 は DAP-1 と nNOS の結合には影響を与えないことが明らかになった。

DAP-1、DLC の nNOS 制御効果

ラット DLC (PIN、protein inhibitor of nNOS)は nNOS と結合し、nNOS の二量体形成を阻害して nNOS の酵素活性を負に制御することが報告されている。そこで human embryonic kidney (HEK) 293 細胞に hDLC-2、nNOS を発現させ、カルシウムイオノフォア A23187 を用いて nNOS を活性化し、hDLC-2 の nNOS 酵素活性に対する影響を nNOS による cGMP 生成レベルを指標に検討した。その結果、hDLC-2 の nNOS 酵素活性に対する影響は観察されず、同様に DAP-1、または DAP-1 と hDLC-2 を HEK 293 細胞に発現させても nNOS の酵素活性に対する影響は観察されなかった。

DAP-1 は nNOS を Triton X-100 不溶性画分へ誘導する

nNOS は HEK 293 細胞に発現させ、抗 nNOS 抗体を用いてウェスタンブロットティングを行うと、主に Triton X-100 可溶性画分にて検出される。ここで DAP-

1 と nNOS を HEK 293 細胞に共発現させ、DAP-1 の発現量を増加させていったところ、Triton X-100 可溶性画分に検出される nNOS が減少する一方、Triton X-100 不溶性画分に検出される nNOS が増加することが観察された。この現象は DLC の発現量には関係していなかった。これらの結果から、DAP-1 は nNOS を Triton X-100 不溶性画分に誘導する作用を持つことが明らかとなった。

考察

本研究において DAP-1 結合因子として新規遺伝子 hDLC-2 を単離した。また DLC は NMDA-R-2-PSD-95-DAP-1-nNOS 複合体に含まれ、さらに DAP-1 は nNOS と直接的に結合することを示した。 *In vitro* において hDLC-2 はこれらの結合を阻害しなかったことから、DLC と nNOS は DAP-1 の異なる部位に結合し、NMDA-R-2-PSD-95-DAP-1-nNOS 複合体を維持していると予想される。ここで DLC はモーター蛋白質 dynein や myosin-V を構成するサブユニットである。ラット脳抽出液を用いた実験により DLC は DAP、myosin-V と複合体を形成し、DLC は PSD-95 および F-actin と有棘樹状細胞に局在してシナプス後膜部 (PSD)画分に多量に含まれることが報告されている。さらに DAP-1 を HEK 293 細胞に発現させると、nNOS が Triton X-100 不溶性画分に移行することが本研究において明らかになった。従って DLC は NMDA-R-2-PSD-95-DAP-1-nNOS 複合体を myosin-V などのモーター蛋白質にリンクさせ、これら複合体は DAP-1 の作用により Triton X-100 不溶性画分である PSD へ移行する可能性があると考えられる。

さらに PSD-95 のアンチセンスオリゴを用いた実験から PSD-95 は NMDA レセプターと nNOS をカップリングさせることが明らかになっている。その結果 NMDA レセプターを流入する Ca^{2+} によって活性化した nNOS から NO が生じ、これが中枢神経系において様々な生理作用を示すものと考えられている。従って PSD において DAP-1 の作用により PSD-95、NMDA レセプターおよび nNOS が効率よくカップリングさせられ Ca^{2+} シグナルが伝搬する結果、これら複合体が海馬における長期増強(long-term potentiation:LTP)や小脳における長期抑圧(long-term depression:LTD)等、神経の可塑性に影響を与えている可能性があると考えられる。推測するのは興味深い。