

# 論文の内容の要旨

論文題目      低分子量 G タンパク質 Rap 特異的 GTP アーゼ活性化  
タンパク質 SPAL の高次脳機能における機能解析

氏名            松浦 憲

## 【はじめに】

近年ポストシナプスにおける機能分子が次々と同定され、グルタミン酸受容体と結合する巨大なシグナル伝達複合体の理解が進んできた。しかしその全貌はまだ明らかではなく、記憶と学習の基盤と考えられているシナプス可塑性における細胞内シグナル伝達の分子機構もまだ良くわかっていない。

SPA-1 like(SPAL)は PSD95/SAP90 ファミリーとの結合タンパク質として同定された、GTPase activating protein (GAP)ドメイン、ACT (Actin Regulatory) ドメイン、PDZ ドメイン、coiled-coil ドメインを持つ全長 1804 アミノ酸のタンパク質である。SPAL は相対的に脳で大量に発現しており、ラット海馬の分画実験では細胞質画分および postsynaptic density(PSD)画分に分画される。ラット脳 lysate の免疫沈降法や神経初代培養の免疫染色から、*in vivo*で SPAL は PSD-95、NMDA 受容体と複合体をつくっている事がわかっている。また SPAL は低分子量 G タンパク質 Ras ファミリーの一員である Rap1 および Rap2 特異的 GAP であることが示されている。さらに SPAL は ACT ドメインを介してアクチンと相互作用し、アクチン細胞骨格系を再構成する機能を持ち、また海馬神経初代培養での SPAL の過剰発現実験ではスパイン (ポストシナプスの構造体) の形態を変化させ、GAP 活性依存的に増大させる事が示された。

これらの知見から、SPAL が NMDA-R 活性化に伴うシナプス可塑性やシグナル伝達に関与している可能性が考えられた。本研究では SPAL の個体レベルでの機能解析を目的としてノックアウトマウスを作製、その表現型を解析し、記憶・学習実験などを行なった。また SPAL の新規ファミリー分子を2種類クローニングし、機能解析を行なった。

## 【方法と結果】

### 1. 新規 SPAL ファミリー分子、SPAL2、SPAL3 の全長クローニング

データベース上での SPAL 遺伝子のホモログ検索により、SPAL 遺伝子と非常にホモロジーの高い

二種類の部分配列を見出した。これらファミリー分子の発現分布や機能の解析は SPAL ノックアウトマウスの表現型の予測や解釈に有効であると考えられた。そこでゲノム構造からの遺伝子（エクソン）予測などの手法により開始コドン进行を推測し、RT-PCR で欠損部分を補い、全长をクローニングした。結果、予測通りの産物を得た。ホモロジーの高い方からそれぞれ SPAL2、SPAL3 と名付けた。

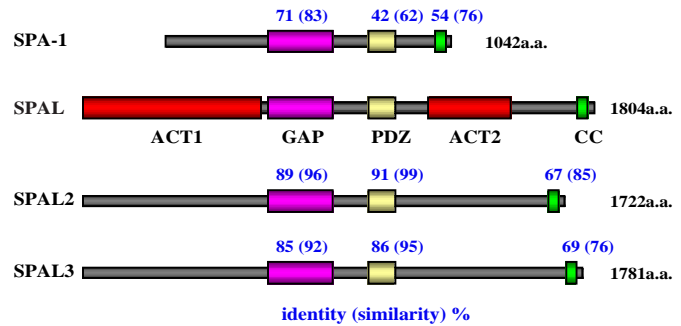


Fig.1 SPALファミリーのドメイン構造 とホモロジー SPALはSPAL2、SPAL3に対し、SPA-1に対するよりも高いホモロジーを示している。

クローニングされた SPAL2 と SPAL3 は、SPAL との相同性が非常に高く、また大きさも近い (Fig.1)。このことから SPAL、SPAL2、SPAL3 は SPA-1 ファミリーの中でも SPA-1 とは別に、独自のサブファミリーを形成していると考えられた。ノザン解析では SPAL 程豊富ではないものの、いずれも脳で発現していた。In vitro GST pull-down assay により SPAL2、SPAL3 も PSD-95 と相互作用することを示した。しかしその相互作用の機構は異なっていた。また Coiled-coil ドメインに着目し SPAL ファミリー間の相互作用も検討した。

## 2. SPAL ノックアウトマウスの作製

SPAL ノックアウトマウスの作製には TT2 ES 細胞株を用い、SPAL 遺伝子の開始コドンから核移行シグナル付きの LacZ 遺伝子を挿入する形のターゲティングベクターと相同組換えを起こさせ、凝集法によりキメラマウスを作製した。F1 SPAL<sup>+/-</sup>の交配により得られた F2 世代はメンデルの法則に従って正常に出生、発育し (~300 匹、+/+25%、+/-50%、-/-25%)、本研究の実験は全て F2 世代で行なわれた。SPAL タンパク質の完全な欠損はウエスタンブロッティングにより確認された。SPAL<sup>-/-</sup>は見た目上明瞭な表現型はなく、脳の切片を用いた Nissl 染色、シナプスマーカーの synaptophysin、樹状突起マーカーの MAP2 による免疫染色から脳の基本構成、構造には異常がないことが示された。さらにシナプス領域の電子顕微鏡撮影でもシナプスの基本構造に異常は見られなかった。また全身の組織学的な検査によっても特に異常は見られなかった。

## 3. SPAL、Rap1、Rap2 の脳内発現部位の同定

SPAL の脳における発現部位の同定は X-Gal 染色、および免疫染色により行なった。その結果、X-Gal 染色では海馬の錐体細胞層や顆粒細胞層等の神経細胞が主に染まっていた。免疫染色では海馬全体、中でも特に上昇層や放射状層等の樹状突起が伸びている領域 (Fig.2)、嗅球、および扁桃体の中心核領域が非常に強く染まった。次に強く染まるのは大脳皮質領域、線条体、扁桃体の中心核以外の領域で、その他間脳、中脳、小脳、橋、延髄などは弱く染まった。X-Gal 染色と免疫染色の結果は良く対応していた。これらの結果は、SPAL が海馬や扁桃体、大脳皮質等の高次の記憶と学習を司る領域の神経細胞で盛んに発現し、働いていることを示唆している。一方より基本的な生命活動の維持に関わる脳幹部での発現は低い

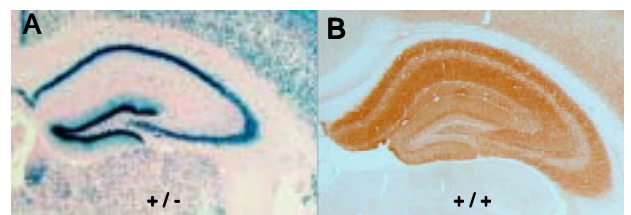


Fig.2 海馬における SPAL の発現領域 (A)X-Gal染色: *spal gene* プロモーター依存的に発現するnls-ガラクトシダーゼの染色。アンモン角の錐体細胞層、歯状回の顆粒細胞層が良く染まる。(B)免疫染色:樹状突起層、特にCA1領域の上昇層と放射状層が強く染まる。

傾向が見てとれた。SPAL<sup>-/-</sup>では免疫染色は一切染まらず、免疫染色が SPAL タンパク質特異的であることを示した。更に SPAL のターゲットである Rap1 および Rap2 の発現を免疫染色で調べた。その結果 Rap1、Rap2 とともに脳全般で発現しているが、中でも海馬は比較的強く染色された。Rap1 は細胞体のみが染まるのに対し、Rap 2 は逆に細胞体は染まらず樹状突起や軸索の層のみ染まった。よって PSD における SPAL の主要なターゲットは Rap 2 であると推測できる。しかし SPAL は細胞体でも発現しているため細胞体における Rap1 の制御にも働いていると考えられる。

#### 4. SPAL ノックアウトマウスにおける Rap1、Rap2 の活性化状態の解析

低分子量 G タンパク質は活性型の GTP 型と不活性型の GDP 型の間を移り変わる事によりシグナル伝達の制御を行なっている。その変化を制御・促進しているのが GTPase Activating Protein(GAP)と GDP-GTP Exchanging Factor(GEF)である。SPAL は Rap に対する GAP なので SPAL ノックアウトマウス (-/-) では Rap の過剰な、あるいは恒常的な活性化が起きている可能性があった。そこで Rap1、2 の GTP 型特異的に結合

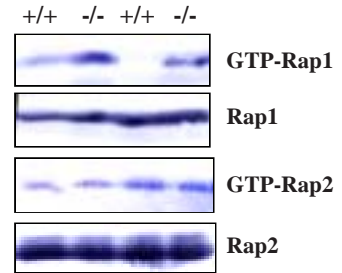


Fig.3 SPAL KOマウスの海馬におけるRap1、Rap2の活性化状態

する RasGDS の Rap-binding domain(RBD)と GST の融合タンパク質を用いて、マウスの海馬 lysate から GST pulldown を行なったその結果、SPAL<sup>-/-</sup>では Rap1 の GTP 型が著しく増加している事が明らかになった。一方、Rap2 は +/+ と -/- で明確な差は見られなかった (Fig.3)。また脳切片の免疫染色においては SPAL<sup>+/+</sup>、<sup>-/-</sup>との間に Rap1、2 の発現分布や染色強度に変化はなかった。以上の結果は少なくとも SPAL が海馬における Rap1 の制御に重要な役割を果たしている事を示している。一方、海馬における SPAL と Rap2 の発現分布から、シナプスにおいて SPAL が Rap2 の制御に関与していないということはやや考えにくく、むしろ Rap2 は局所的に刺激依存的なシグナル伝達に働いている可能性が高いため、全体としてみた時には差が見にくい可能性が考えられる。

#### 5. SPAL ノックアウトマウスの記憶・学習に関する行動実験

SPAL の脳における発現パターンや in vitro の機能解析の知見から、SPAL<sup>-/-</sup>にはシナプス可塑性、特に海馬や扁桃体の機能に障害が出る可能性が考えられた。そこでまず Morris Water Maze 実験を行った。初めに海馬非依存的なコントロール課題である visible platform 課題を行なったが、+/+ と -/- に差は見られず、視覚、運動能力、モチベーションなどに異常はないことが示された。次に海馬依存的な空間学習課題である hidden platform 課題を行ない、9 日目の最後に platform を除いて probe test を行なった。そ

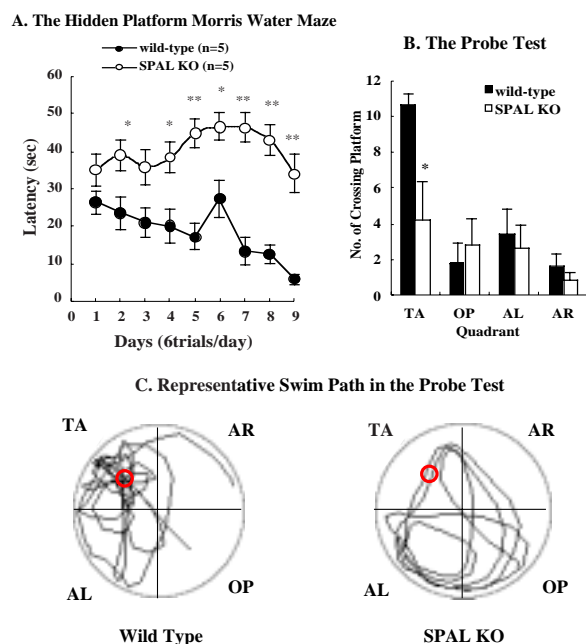


Fig.4 Morris Water Maze課題におけるSPAL KOマウスの成績, \*p<0.03, \*\*p<5x10<sup>-5</sup>

の結果-/-は wild type に比べ全く空間学習をしないかあるいは学習が遅く、海馬の機能に障害があることが示唆された(Fig.4)。さらに Cued and Contextual Fear Conditioning を行なった。

Cued Fear Conditioning は扁桃体依存的、Contextual Fear Conditioning は扁桃体および海馬依存的学習課題である。まず一日目にある環境で 2 分間慣ら

した後、30 秒間条件刺激(CS)として tone を、CS の最後 2 秒に無条件刺激(US)として電気ショックを与え、30 秒後回収。24 時間後と同じ環境に 5 分間置き、恐怖の指標である Freezing の割合を測定(Contextual)。さらに 2 時間後環境を変化させ 2 分間慣らした後 3 分間 CS を与え続け Freezing の割合を解析した(Cued)。その結果、SPAL-/-全 8 匹中 5 匹は Cued Fear Conditioning においてほとんど Freezing せず(A 群とする)、他の 3 匹は wild type と同等以上の Freezing を示した(B 群とする)。A 群は Contextual Fear Conditioning でもほとんど Freezing せず、B 群も wild type と比べ Freezing の割合が著しく減少した(Fig.5)。これらの結果は A 群が扁桃体の機能に障害があることを、B 群は扁桃体の機能には大きな異常はないかも知れないが、海馬の機能に障害があることを示唆している。Morris Water Maze の結果と合わせて考えると、SPAL ノックアウトマウスは海馬の機能に障害があり、一部はさらに扁桃体の機能にも障害があることが推測される。Fear Conditioning の結果のばらつきは、発生あるいは発育上ある確率で起きるばらつきか、バッククロスを進めてないことによる遺伝的背景の多少の違いによって生じるものかも知れない。

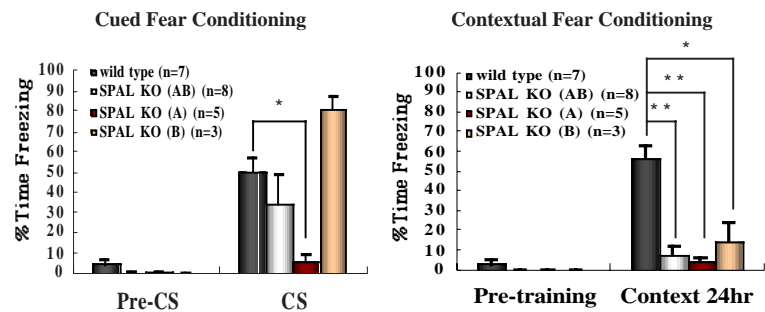


Fig.5 Cued and Contextual Fear Conditioning課題における SPAL KOマウスの成績, (\* $p < 0.005$ , \*\* $p < 5 \times 10^{-4}$ )

### 【まとめ】

本研究において私は SPAL と独自のサブファミリーを形成すると考えられる、新規遺伝子 SPAL2 と SPAL3 の全長クローニングに成功した。また SPAL、Rap1 および Rap2 の脳内における詳細な発現分布を初めて明らかにした。更に SPAL ノックアウトマウスを作製し、SPAL ノックアウトマウスが正常に出生、発育し、組織学的には異常がない事を示した。しかしながら SPAL ノックアウトマウスは Morris Water Maze や Contextual Fear Conditioning などの海馬依存的な課題の学習に著しい障害があり、SPAL が海馬依存的な学習において重要な役割を担っている事を初めて個体レベルで明らかにした。更に SPAL ノックアウトマウスの一部は扁桃体依存的な課題の Cued Fear Conditioning においても障害があり、SPAL が扁桃体依存的な学習においても重要な役割を担っている事を示唆した。また SPAL ノックアウトマウスは海馬で Rap1 の GTP 型が増加しており、SPAL が *in vivo* で Rap1 の制御に重要な役割を果している事を示した。

今後は更に SPAL ノックアウトマウスを用いた電気生理学的実験や刺激依存的な Rap シグナル伝達経路とシナプス可塑性との相関関係を明らかにしていく事により、シナプス可塑性、ひいては記憶と学習の分子機構の一端が明らかにされる事が期待される。