審査の結果の要旨

氏名　松浦　憲

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SPA-1-Like（SPAL）はSAP90/PSD95ファミリーとの結合タンパク質として同定された1804アミノ酸残基からなるタンパク質であり、GTPase activating protein（GAP）ドメイン、PDZドメイン、及びcoiled-coilドメインを有する。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シナプトソーム画分に分画され、そのうち大部分は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-Rと複合体をつくっている事がわかっている。またSPALはRasスーパー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。これらの知見から、SPALがNMDAレセプター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。そこで、松浦　憲は、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し、その表現型を解析し、記憶・学習実験などを行なった。

<u>1.　ノックアウトマウスの作製</u>

SPAL KO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遺伝子で置き換える形で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+/-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-/-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。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。

<u>2.　SPAL、Rap1、Rap2の脳内発現部位の同定</u>

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、海馬全体、中でも特に上昇層や放射状層等の神経線維が走っている領域、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線状体、大脳皮質領域で、その他間脳、中脳、小脳、橋、延髄などは弱く染まる。小脳では小脳核、顆粒細胞層の小脳糸球体、分子層の神経線維領域が染まった。SPAL-/-では免疫染色は一切染まらなかった。また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、2とも脳全般で発現しているが、中でも海馬が比較的強く染色される。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神経線維層のみ染まる。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。SPALは細胞体でも発現しているので細胞体におけるRap1の制御にも働いていると考えられる。

<u>3.　記憶・学習に関する行動実験</u>

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-/-にはシナプスの可塑性、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。そこでまず海馬依存的な空間学習課題であるMorris Water Maze実験を行なった。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、海馬の機能の障害が示唆された。

さらに扁桃体依存的なCued Fear Conditioning、及び海馬依存的なContextual Fear Conditioningを行なった。まず一日目にある環境（Context）で2分間慣らした後、30秒間条件刺激（CS）としてtone（Cue） を、CSの最後2秒で無条件刺激（US）として電気ショックを与え、30秒後に回収した。24時間後に同じContextに5分間.置き、恐怖の指標であるFreezingの割合を測定した。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。その結果、-/-全9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4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群も多くはwild-typeと比べFreezingの割合は著しく減少した。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、-/-の多く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、Backcross を進めてないことによるgenetic backgroundの多少の違いによって生じるものか、今後の検討を要する。

4.　SPAL KO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-/-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る。そこでRap1、2のGTP型特異的に結合するRalGDSのRap-binding domain（RBD）とGSTの融合タンパク質を用いて、KOマウスの海馬lysateからGST pull-downを行なった。その結果、SPAL-/-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-/-で差は見られなかった。また脳切片の免疫染色においてはSPAL+/+、-/-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えにくいものと考えられる。

本研究において、松浦　憲は、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 KOマウスを作製し-/-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-/-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-/-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-/-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明らかにした。

以上のように、本研究はSPALタンパク質の機能の一端を初めて解明し、グルタミン酸シナプスの可塑性の研究に重要な知見を加えたものであり、よって、博士（薬学）の学位に値するものであると判定した。