

氏 名 甲 斐 信 行

学位（専攻分野） 博士(学術)

学 位 記 番 号 総研大甲第237号

学位授与の日付 平成8年9月30日

学位授与の要件 生命科学研究科 生理科学専攻

学位規則第4条第1項該当

学 位 論 文 題 目 **Molecular Cloning of Fyn-associated Molecules**

**in the Mouse Central Nervous System**

論 文 審 査 委 員 主 査 教 授 小幡 邦彦

教 授 井本 敬二

教 授 池中 一裕

助 教 授 丸山 敬

教 授 三品 昌美（東京大学）

## 論文内容の要旨

非レセプター型チロシンリン酸化酵素の一つであるFynは脊椎動物以上の中枢神経系及び免疫系で主に発現している。哺乳類の免疫系ではT細胞受容体複合体と共役して情報伝達に関わることが知られている。中枢神経系では発生時期より神経細胞に発現が認められ、出生直後に最も発現量が増えた後に、成体では嗅球、海馬や感覚神経核で発現する。またミエリンから成る繊維束領域でも発現が認められ、ミエリン上の糖蛋白であるL-MAGとの結合が報告されている。標的遺伝子組み換え法により、Fyn遺伝子を欠損したマウスが八木及びGrantらにより独立に作成され、どちらのマウスも中枢神経系の異常を示した。哺乳類や情動行動、学習機能の低下、海馬層構造の異常及び聴覚性痙攣発作の亢進が八木らにより、また海馬における長期増強現象の低下がKandelらにより報告された。以上の行動学・生理学的な解析の結果から、Fynが中枢神経系の形成や機能に深く関わることを示された。そこで彼は中枢神経系におけるFynの情報伝達系に着目して、Fyn結合分子が神経系の細胞や組織で担う機能を明らかにすることにより、個体の情動や学習行動にFynを介して関与する分子機構を解明したいと考えた。神経系でのFyn結合分子は詳しく知られておらず多様な分子機能が推測されることから、蛋白結合の検出系である Two Hybrid System により、Fynと結合する新たな分子のマウス脳からの単離と各分子の発現様式の解析を行った。

相互作用の標的配列としてヒトFynのN末端からSH2領域までに相当するcDNA配列を用い、酵母の転写因子であるGAL4のDNA結合領域との融合蛋白を酵母株で発現させた。一方、新生児マウス脳より、約 $1.7 \times 10^6$ 個のクローンから成るGAL4の転写活性化領域とcDNAの融合ライブラリーを作成した。リポーター遺伝子としてHIS3と*lacZ*の両方を持つ酵母株にFyn及びライブラリーの各融合蛋白を発現させた。ヒスチジン欠失培地で生育したコロニーをX-gal染色し、リポーター遺伝子の転写活性が認められたコロニーからライブラリーcDNAを回収した。これらのcDNAクローンをさらにGAL4認識部位以外のプロモーター配列の異なるリポーター遺伝子を持つ酵母株に導入して、Fynとライブラリーの翻訳領域同士の結合によるGAL4依存性の転写活性が認められた5種類のcDNAクローンを単離した。各クローンの塩基配列より推測される蛋白の一次構造を決定し、アミノ酸配列のデータベース検索を行った。

その結果、3種類は既に報告されている分子かそのホモログで、そのなかには既に免疫沈降法により非神経系細胞でFynとの結合が報告されているRNA結合蛋白質が含まれていた。これら3種類の既知の分子はいずれも脳及び他の組織に広く発現していることがノザンハイブリダイゼーション法により認められた。残る二種類のクローン（34番及び82番）は既知の配列と相同性が無く、発現様式に特徴を持つことが明らかになった。34番はノーザン解析で脳にのみ弱い発現が認められ、またRT-PCR法により出生後に発現量の増加が観察された。82番は脳で強発現する他は心臓と筋肉で弱く発現し、脳の発現量は胎生後期と出生直後で最も多かった。両者の全長cDNAを単離した結果、どちらも新規な蛋白をコードしていた。34番の予想分子量は156KDで、SH3領域の結合配列とPEST配列を持ち、親水性のアミノ酸に富む領域を有していた。82番の予想分子量は42KDで、RNA結合配列(RBD)とSH3及びSH2領域の結合配列を有していた。

酵母を用いた蛋白間相互作用検出系によりマウス中枢神経系でFynと結合する分子の単離を試み、5種類の結合分子を得た。既にFynとの結合が異なる手法により報告された分子も単離したことから、本研究で用いた手法が有効に機能しており、またFynが多様な分子と結合することが示された。本研究で単離された二つの新規な分子はそれぞれ脳で特徴的な発現様式を示した。脳でのFynの発現量は胎児期から出生直後にかけて増大した後生後10日にかけて減少し、成体で主として感覚神経伝導路で発現することが免疫組織化学的手法により知られている。このことからFynは個体の発生時期と脳の発達後では異なる役割を持つ可能性が考えられるが、新規な二種類の分子はそれぞれ異なる転写量の変化を脳の発達過程で示すことから、両分子はそれぞれ脳発達の異なる時期にFynを介した性質の異なる情報伝達を担う可能性が考えられる。

## 審査結果の要旨

FynはSrcファミリーに属する非レセプター型チロシンリン酸化酵素であり、主に中枢神経系及び免疫系に発現している。Fyn遺伝子を欠損したマウスが本出願者を指導している八木らとGrantらにより独立に作成・解析され、情動、学習等の異常、海馬組織異常などがみられることから、Fynは中枢神経系の形成と機能に関与していることがあきらかであり、その分子機構の解明が期待される。Fynによりリン酸化される基質についてはグルタミン酸レセプターサブタイプがそのひとつである等、研究が進められているが、Fynに結合してFynの作用や分布を制御するFyn結合分子はまだあきらかでない。そこで本出願者はtwo hybrid systemを用いてマウス脳からFyn結合分子の単離を行い、その構造と発現様式を解析した。

相互作用の標的配列として、ヒトFynのN末端からSH2領域までと酵母の転写因子であるGAL4のDNA結合領域との融合蛋白を酵母株で発現させた。一方、新生児マウス脳cDNA（約 $1.7 \times 10^6$ 個のクローン）とGAL4の転写活性化領域との融合ライブラリーを作成した。ついでリポーター遺伝子としてHPS3と*lacZ*の両方を持つ酵母株に各融合蛋白を発現させ、ヒスチジン欠失培地で生育し、かつX-gal染色されるコロニーからライブラリーcDNAを回収した。これらのcDNAクローンをさらにGAL4認識部位以外のプロモーター配列の異なるリポーター遺伝子を持つ酵母株に導入して、Fynとライブラリーの翻訳領域同士の結合によるGAL4依存性の転写活性が認められた5種類のcDNAクローンを単離した。各クローンの塩基配列より推測される蛋白の一次構造を決定し、アミノ酸配列のデータベース検索を行った。その結果、3種類は既に報告されている分子かそのホモログであったが、いずれも脳及び他の組織に広く発現していることが判明した。残る2種類のクローン（34番及び82番）は既知の配列と相同性が無く、特徴的な発現様式を示した。34番はノーザン解析で脳にのみ弱く発現が認められ、またRT-PCR法により出生後に発現量の増加が観察された。82番は脳で強く発現する他は心臓と筋肉で弱く発現し、脳の発現量は胎生後期と出生直後で最も多かった。両者の全長cDNAを単離した結果、どちらも新規な蛋白をコードしていた。34番の予想分子量は156KDでSH3領域の結合配列とPEST配列を持ち、親水性のアミノ酸に富む領域を有していた。82番の予想分子量は42KDで、RNA結合配列(RBD)とSH3及びSH2領域の結合配列を有していた。

本研究は、神経系での役割が注目されているFynのシグナル伝達系の解明をめざして、Fynの活性を制御すると考えられるFyn結合分子を検索し2種の新規蛋白質を発見したもので、博士（学術）に値するものと判定した。

試験結果については、博士論文の内容・引き続き行っている研究の内容・関連領域の研究動向等について試問を行い、満足すべき回答を得た。本論文内容は、国際誌 *Journal of Neuroscience Research* に投稿し、現在、レビューアーの意見に基づき改訂中である。さらに別の論文としてまとめるため、本論文で発見したFyn結合分子について細胞内でのFyn結合性、mRNA及び蛋白の脳内分布等につき、データをそろえている。また新規2分子の役割を遺伝子ノックアウトしたマウスで解析するため、その作成にとりかかっている。本研究で使用した Two hybrid system を始めとする各種実験技術については十分理解し習熟している。学位論文の英語は適正であり、外国語の学力も十分とみなされた。これら

のことを総合的に採点して合格とした。