

氏名 安 田 昌 弘

学位（専攻分野） 博士（学術）

学 位 記 番 号 総研大甲第223号

学位授与の日付 平成8年3月21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 Identification of a novel Fyn-associated protein
that is concentrated in the postsynaptic density

論文審査委員 主 査 教 授 井 本 敬 二

教 授 池 中 一 裕

教 授 小 幡 邦 彦

教 授 岡 田 泰 伸

教 授 三 品 昌 美（東京大学）

論文内容の要旨

チロシンリン酸化酵素は細胞膜の裏打ちに局在し、細胞相互識別での情報伝達機構で重要な役割を持つことが明らかとなっている。非レセプター型チロシンキナーゼであるFynをジーンターゲット法により欠損させたマウスは、哺乳行動の異常、Morris taskでの学習障害、情動行動の異常、聴覚性痙攣発作異常、海馬構造体でのLTPの減少、及び海馬体、ミエリン鞘形成異常が起こることが知られている。このことより、脳においてFynを介する情報伝達系は、脳の機能発現に重要な役割を果たしていると考えられる。彼らはこの情報伝達系を解析する目的で、脳でFynと結合する蛋白質の同定を試みた。

GSTとカルボキシル末端のキナーゼドメインを欠くFynとの融合蛋白質を大腸菌に発現させ、精製し、アフィニティーカラムを作製した。このカラムを使いマウスの脳膜画分よりFyn結合蛋白質を調整し、これを抗原としてモノクローナル抗体を作成した。

本研究では得られたモノクローナル抗体の中でも行動制御に関わる可能性の高い分子を認識しているものを選別するためFyn欠損マウスと同様にMorris taskでの学習障害、情動行動の異常、聴覚性痙攣発作異常が報告されているDBA/2系統マウスを用いた。得られたモノクローナル抗体の一つ1B6を用いたウェスタンブロット法で検出されるバンドは、C57BL/6マウスの脳で約130kDa、80kDa、75kDaの3つであるのに対し、DBA/2マウスでは、80kDa、75kDaのバンドに変化が見られないものの約130kDaのバンドの大きさが変化していることがわかった。実際にこの分子がFynと相互作用していることを確かめるためにFynに対するモノクローナル抗体を新たに作製し、抗Fyn抗体による免疫沈降を行った。その結果p130はFynに対するモノクローナル抗体、ポリクローナル抗体いずれにおいても共沈してることがわかった。

この結果によりDBA/2とC57BL/6系統間で分子量の異なるp130はFynと結合していることが明らかとなった。

またマウス各組織でのp130の発現様式をウェスタンブロット法で調べたところ、p130は脳に特異的な蛋白質であり、脳すべての領域で発現が観察された。この発現様式はFyn^{-/-}マウスにおいてもDBA/2マウスにおいても変化は認められなかった。

脳の発達過程における発現量をウェスタンブロット法で調べた結果、p130は、生後より発現量が増大し、生後15日以降ほぼ一定量に保たれることがわかった。この発現量の変化は、脳における神経細胞のシナプス結合の増大と相関関係が認められた。シナプスにおけるp130の局在を調べる目的で、脳の細胞分画に対するウェスタンブロット法により検討した結果、p130は、シナプス後膜の構造であるシナプス肥厚分画にシナプトソーム分画の約10倍量と非常に強く濃縮して来ることが明らかになった。このシナプス肥厚分画への濃縮は、DBA/2、Fyn^{-/-}マウスにおいても観察され、p130分子の変異、Fyn欠損により変化しないことが明らかとなった。

p130遺伝子座のマッピングをDBA/2とC57BL/6マウスの交雑系統を用いて行ったところ、マウス第7番染色体上の*hbb*遺伝子座の近傍に同定された。この近傍には、行動異常マウスである*shaker-1*の遺伝子座が同定されており、p130が原因遺伝子である可能性が示唆されたため*shaker-1*におけるp130について検討を行った。その結果、p130は*shaker-1*ホモマウスでは、バンドが1本しか検出されないのに対しヘテロマウスでは、2本検出された。

この結果はp130が*shaker-1*の原因遺伝子である可能性を示唆したが、近年*shaker-1*の原因遺伝子座が同定され、ミオシンⅦであることが明らかにされた。ノーザンブロットによる発現解析で、*sh-1*は、肺、腎臓、精巣において発現が高いことが明らかにされている。p130は、脳においてのみ発現が検出されることより、*sh-1*とp130は別の分子である可能性が示唆された。以上の結果より、p130は*shaker-1*と非常に近傍に連鎖している遺伝子であると考えられた。

本研究ではFynとマウス脳において相互作用する分子として、シナプス肥厚分画に濃縮する新たなミオシン類似タンパク質p130を同定した。またこのp130は、空間学習障害などの行動異常が観察されるDBA/2マウスにおいて変異が存在していることより、脳の機能発現との関連が示唆された。本研究で得られたp130はFynと相互作用してシナプスの可塑性に関わる分子の1つではないかと推測している。

審査結果の要旨

申請者、安田昌弘氏は、脳神経系におけるFynを介する情報伝達系の解明に興味を持ち、Fyn結合タンパクの解析を行った。FynはSrcファミリーに属する非レセプター型チロシンキナーゼであり、脳神経系・免疫系に多く存在する事が知られている。免疫系でのFyn情報伝達系に関しては、その分子的解析が進んでいるが、脳におけるFyn情報伝達系については、ジーンターゲットングによりFyn遺伝子を破壊したマウスで行動異常が認められるという事実以外にほとんど知見がなかった。安田氏は、脳におけるFyn情報伝達系の分子的解明を目指して、リコンビナントFynタンパクをアフィニティリガンドとして用い、Fyn結合タンパクの分離精製を行った。さらに安田氏は、Fyn結合タンパクの一つであるp130と名付けられたタンパクに対するモノクローナル抗体を作製し、ウェスタンブロットを用いて、p130の組織および細胞内分布・発生に伴う変化・マウス系統間でのp130の違い・p130の遺伝子座などに関する詳細な解析を行った。研究の主な結果は次の通りである。

p130は、Fyn結合タンパクに対して作製されたモノクローナル抗体1B6が認識する130kDaのタンパクとして同定された。p130は脳抽出物のFyn結合分画に存在すること、かつ抗Fyn抗体により免疫沈降してくることより、p130はマウスの脳でFynと結合するタンパクであると結論された。各組織より調整したタンパクを、モノクローナル抗体1B6を用いたウェスタンブロットで検討した結果、p130は脳にのみ発現している事が示された。またp130はシナプス後膜の構造であるシナプス肥厚分画に濃縮していた。p130の発現は生後明瞭となり、生後15日より20日の間に特に著しい発現の増加が見られた。DBA/2および他の数種の系統では、p130は大きい分子量を有している。この分子量の差異を利用して、BXDリコンビナントインブレットマウスにおけるp130のタイプを調べた結果、p130の遺伝子座はマウス第7番染色体上のhbb遺伝子座・Sh-1遺伝子座の近傍にあることがしめされた。p130の脳における機能は未解明であるが、シナプス肥厚分画に濃縮しておりかつシナプス形成時期に一致して発現量が増加することから考え、シナプス形成あるいはシナプス機能に寄与する事が予想される。

この研究は、タンパクの解析という生化学的な手法を取りながらも、分子生物学的手法やマウス遺伝学的手法を駆使して、シナプス機能に関与すると考えられる新しいタンパクを同定・検討し、シナプスに関する新しい知見を提供したものであり、優れたものと評価できる。よって本論文は学位論文にふさわしく、安田昌弘氏は博士（学術）の学位を受けるに十分な資格を有するものと審査員全員一致で判定した。

また、審査委員会は、安田昌弘氏の提出論文の内容及び生物学医学一般の知識について、多くの質問と試問を行った。その結果、安田氏は、研究の位置付けをよく理解しており、本人の行った研究に関する知識および生物学医学全般における知識を十分に有していると判断された。また、博士論文の英語も適正であり、語学力も十分と判断された。

以上により、審査委員会は安田昌弘氏の論文内容、学識、語学力ともに博士（学術）を授与に値すると判断した。