

## シナプスの成熟にかかわる情報伝達分子の同定

### Identification of signaling molecules involved in synaptic maturation

研究代表者 大阪大学微生物病研究所 助手 名田茂之

Instructor, Research Institute for Microbial Diseases, Osaka university  
Shigeyuki Nada

Post-synaptic density (PSD) is a huge protein complex containing neurotransmitter receptor and signaltransduction proteins. In mice the NMDA receptor/PSD-95 complex appears during one to two weeks after birth, during the period that synaptic maturation proceeds. In this period tyrosine-phosphorylated p120 also appears in the NMDA receptor/PSD-95 complex. In order to reveal the function of this phosphoprotein, p120 was purified and determined its partial amino-acid sequences, so that p120 was identified as Chapsyn110, a member of PSD-95 family. Tyrosine phosphorylation of Chapsyn110 suggest a novel function of PSD-95 family proteins as signal transducing molecules.

#### 1. 研究目的

神経細胞のシナプス結合は、誕生前の神経組織が未熟な段階から生成され始め、誕生後シナプス結合間の情報伝達をへて成熟してゆく。例えば、シナプスの可塑性を説明するモデルの一つである長期増強 (Long-Term Potentiation: LTP) と呼ばれる現象は、マウス海馬では生後 2 週間頃から観察される。しかし、シナプス結合はそれ以前より見られるので、シナプスには結合して後に LTP の発現に至るまでの成熟の過程が存在することになる。実際に、Post-Synaptic Density (PSD) と呼ばれるシナプス後部の構造は、生後間もない脳では 1% Triton X-100 を含むバッファーに対して可溶性であるのに対し、生後 1~2 週のうちに不溶性へと変化してゆく。PSD はカルシウム/カルモジュリン依存性蛋白質リン酸化酵素やイオンチャネルのクラスターリング等の作用を持つ PSD-95 等の細胞/膜骨格付随蛋白質の凝集体であることから、これらの蛋白質の生化学的特性の変化は、シナプス後部神経細胞の細胞内情報伝達系の質的な変化と関連していると考えられる。発達の時期に対応したこのような情報伝達系の変化が、シナプスの成熟の一つの証で

あり、またシナプス可塑性といった現象とも結び付いているのであろう。シナプスの成熟に関与すると考えられる分子はこれまでも多数同定されているが、そのうち海馬 LTP の発現に関与することが示されているものは未だ見られない。

一方我々は、LTP の発現に必要なイオンチャンネルである NMDA (N-methyl-D-aspartate) レセプターが、海馬の成熟に伴って生後 2-3 週から、PSD の主要構成成分である PSD-95 と強固な複合体を形成することを見出した。またこの複合体には多数の未知蛋白質が含まれており、その中には分子量約 12 万と 10 万のチロシンリン酸化蛋白質が存在することを見出した。蛋白質のチロシンリン酸化は、細胞内情報伝達系ではリン酸化された蛋白質の酵素活性変化や蛋白質-蛋白質間の複合体形成の鍵となる反応であり、これが NMDA receptor/PSD-95 複合体中に存在するという事は、NMDA receptor/PSD-95 複合体のイオンチャンネル活性や複合体形成が細胞内情報伝達系に調節されていることを示している。

そこで、本研究では、これらのチロシンリン酸化蛋白質分子が海馬 LTP の発現に寄与

する情報伝達・調節分子である可能性について検討するために、これら分子の精製と同定およびクローニングを行なう。

## 2. 研究経過

### 2.1. 方法

#### マウス脳蛋白質の段階的可溶化

成熟マウス脳 PSD は Triton X-100 や Nonidet P-40 (NP40) に不溶性であるが、デオキシコール酸ナトリウムや SDS には可溶性である。そこで、マウス脳を一旦 1% NP40 を含むバッファー (NP40 バッファー) でホモゲナイズし、15,000rpm 20' 遠心して上清 (NP40 ライセート) とペレットに分けた。ペレットはさらに 2% SDS を含むバッファー (SDS バッファー) でホモゲナイズ後、5 倍容の 2% Triton X-100 を含むバッファー (Triton バッファー) で希釈し、15,000rpm 20' 遠心して上清 (SDS ライセート) を回収した。

#### NP40 不溶性チロシンリン酸化蛋白質の精製

四週令マウス 50 匹分の脳を 200ml NP40 バッファーでホモゲナイズし、15,000rpm 20' 遠心してペレットを回収した。ペレットを 40 ml の SDS バッファーでホモゲナイズして 19G の注射針を何度か通し、DNA を切断して溶液の粘度を下げた。これに 200ml の Triton バッファーを加えて 15,000rpm 20' 遠心して上清を回収した。上清に 500 マイクログラムの抗リン酸化チロシン抗体 (PY20) と 0.5ml の Protein G Sepharose を加えて冷室で一晩混合し、免疫沈降を行なった。沈降物を NP40 バッファーで三回洗い、1.5ml の SDS バッファーでチロシンリン酸化蛋白質と抗体を溶出した。

#### 精製蛋白質の断片化と部分アミノ酸配列の決定

精製し、溶出した蛋白質溶液に、50%となるようにアセトンを加え、-30 度で一晩静置した。15,000rpm 20' 遠心してペレットを取り、SDS サンプルバッファーで溶かして SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行なった。泳動後、PVDF 膜に転写し、120kDa 蛋白質のバンドを切り出して、リジルエンドペプチダーゼで一晩消化した。消化液を C18 逆相 HPLC (0.05% TFA 水/アセトンニトリルの 0-40% linear gradient) にかき、ペ

プチドフラグメントを回収し、気相マイクロシーケンサーでアミノ酸配列の決定を行なった。

### 2.2. 結果と考察

#### 脳の発達に伴う NMDA receptor/PSD-95 複合体形成とチロシンリン酸化

新生児 (0 週令) ~ 8 週令のマウス大脳より、NP40 ライセートと SDS ライセートを回収し、それぞれに含まれるチロシンリン酸化蛋白質のパターンを抗リン酸化チロシン抗体によるウエスタンブロットで観察した (Figure 1a)。生後 2~3 週で NP40 不溶性のチロシンリン酸化蛋白質 (180kDa と 120kDa、およびマイナーな 100kDa、それぞれ p180, p120, p100) が SDS ライセート中に現れることが判明した。SDS ライセートより、PSD-95 に対する抗体で免疫沈降し、その免疫沈降物中のチロシンリン酸化蛋白質を同様に観察すると (Figure 1b)、p180 と p120 のチロシンリン酸化蛋白質はいずれも PSD-95 と共沈したこと、SDS ライセート中の主要なチロシンリン酸化蛋白質はマウス脳の発達に伴って PSD-95 と複合体を形成し、NP40 不溶性となることが示された。また、PSD-95 と NMDA receptor の複合体形成、NP40 不溶性画分への移行も同じ時期に起こることが観察された (data not shown)。

#### チロシンリン酸化蛋白質 p120 の精製と同定

メジャーなチロシンリン酸化蛋白質である p180 と p120 について、分子量が近い既知のチロシンリン酸化蛋白質に対する抗体を用いて免疫沈降/ウエスタンブロット等の方法で調べた結果、p180 は NMDA receptor のサブユニットである NR2A および NR2B 分子であることが判明した。しかしながら、p120 については反応する抗体が無かったので、未知のものである可能性が考えられた。そこで、p120 を精製し、その部分アミノ酸配列を決定して分子の同定を行なうことにした。四週令のマウス大脳より SDS ライセートを調製し、チロシンリン酸化蛋白質を抗リン酸化チロシンモノクローナル抗体である PY20 で免疫沈降することにより、チロシンリン酸化蛋白質を得た。これを SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動することによって、p120 を分離した。p120 は PVDF 膜上でプロテアーゼ処理し、その後 HPLC でペプチ

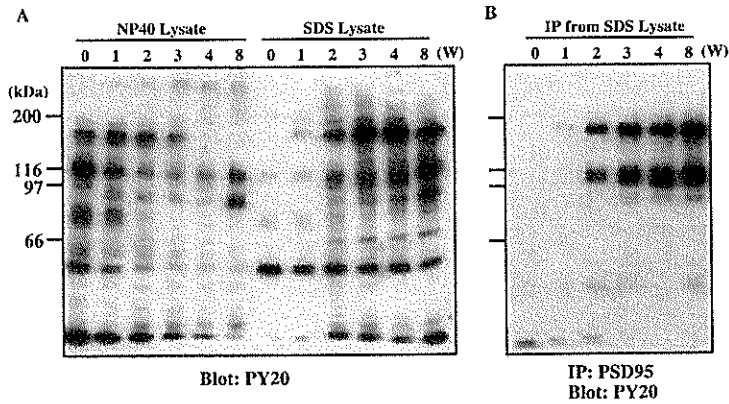


Figure 1 脳の成熟に伴うチロシンリン酸化蛋白質パターンの状態の変化  
 A. マウス0~8週令脳のNP40およびSDSライゼート中の蛋白質を抗リン酸化チロシン抗体でウエスタンブロットした。B. SDSライゼートよりPSD-95の抗体で免疫沈降したものの抗リン酸化チロシン抗体によるウエスタンブロット。

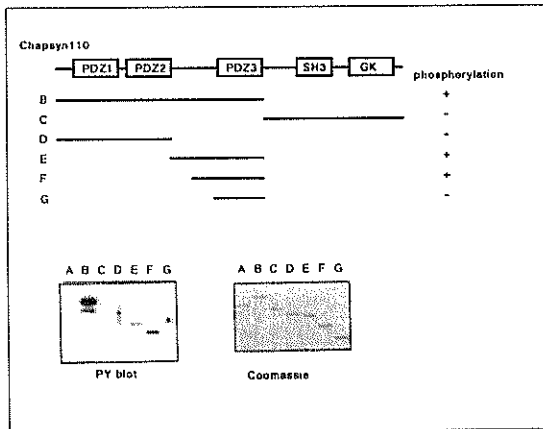


Figure 2. Chapsyn110のFynによるリン酸化部位

GST-Chapsyn110の一部融合蛋白質を基質として、Fynによるin vitroでのリン酸化を抗リン酸化チロシン抗体によるウエスタンブロットで検出した。同じ反応液の半分は、SDS-PAGE後クマシー染色を行ない、各反応液中の基質の量をモニターした。レーンAはPSD-95由来の融合蛋白質で、Chapsyn110のGST融合蛋白質Bに相当する部分の領域

を基質として反応させたもの。Chapsyn110のリン酸化に対して、PSD-95はFynによって全くリン酸化されていない。

ドを分取して配列を決定した。得られた8箇所のペプチド配列は全てラット Chapsyn110 のアミノ酸配列と一致し、精製蛋白質がマウス Chapsyn110 であることが判明した。Chapsyn110 は PSD-95 ファミリーに属する蛋白質であり、PSD-95 と同様に NMDA receptor のクラスターリング能を持つことが示されている PSD 蛋白質である。しかしながら、PSD-95 ファミリーはこれまでイオンチャネルアンカーとしての膜裏打ち、あるいは細胞骨格関連蛋白質としてみなされており、チロシンリン酸化を受けて何らかの活性あるいは構造変化が引き起こされる情報伝達関連分子であると認識されていなかった。実際に PSD-95 および Chapsyn110 の抗体を複製してそれぞれのチロシンリン酸化状態を検討してみたところ、PSD-95 にはチロシンリン酸化を検出できなかったが、Chapsyn110 は強くチロシンリン酸化を受けていることが確認された (data not shown)。また、エタノールやベンチレンテトラゾール等、脳神経細胞を刺激する物質を腹腔内へ投与した場合に、Chapsyn110 のリン酸化状態が変動することも観察された (data not shown)。

#### Chapsyn110 のチロシンリン酸化部位

神経細胞には非常に多様なチロシンリン酸化酵素が存在することがこれまでに判明しているが、NMDA receptor のリン酸化や LTP 等の現象には、非受容体型チロシンキナーゼである Src ファミリーが関与していることが示されている。そこで、脳に発現の多い Src ファミリーキナーゼである Fyn を酵素として、SDS ライセートより免疫沈降した SPD-95/NMDA receptor 複合体を *in vitro* でリン酸化してみたところ、NR2A, NR2B, Chapsyn110 のいずれもが効率的にチロシンリン酸化されることが判明した (data not shown)。また、Fyn ノックアウトマウスでは p180, p120 のリン酸化レベルが減少しているというデータもあり (Seth Grant, personal communication)、*in vivo* でも Fyn が Chapsyn110 や NMDA receptor のリン酸化に関与することが考えられた。そこで、脳より免疫沈降した Fyn を酵素とし、大腸

菌で産生させた Chapsyn110 の一部とグルタチオン S-トランスフェラーゼの融合蛋白質を基質として *in vitro* kinase assay を行なったところ、Chapsyn110 の PDZ ドメイン 2 と 3 の間の領域がリン酸化されることが判明した (Figure 2)。PSD-95 や Chapsyn110 の PDZ1, 2 には NMDA receptor や K<sup>+</sup> ion channel 等が結合し、PDZ3 には SynGAP 等の情報伝達分子が結合することが最近同定されている。PDZ2 と 3 の間の領域がリン酸化されてこの部分の立体構造に変化が起こると、PDZ 結合因子の膜に対する配向性が変化し、例えば PDZ3 に結合している情報伝達分子の活性変化につながる可能性が考えられる。この可能性は PSD-95 ファミリーの中でも特に Chapsyn110 において、この分子がより積極的に細胞内情報伝達に関与していることを示唆するものであり、また従来単なる細胞骨格関連蛋白質と考えられていたものが、細胞膜裏打ちのスイッチング素子として機能している可能性を示す、非常に興味深い発見であるといえよう。

### 3. 研究成果

神経シナプスの成熟に伴って現れる PSD-95/NMDA receptor 複合体中のチロシンリン酸化蛋白質 p120 が Chapsyn110 であることを同定し、PSD-95 ファミリーが情報伝達に関与する因子である可能性を示した。

### 4. 今後の課題と発展

Chapsyn110 の情報伝達系への関与について、細胞レベル、あるいは生体レベルで証明する必要がある。また、Chapsyn110 のリン酸化による構造変化や、PDZ, SH3, GUK ドメイン等に結合する因子の同定を更に進め、構造変化によるそれら因子の活性変化についても追及していく必要がある。

### 5. 発表論文リスト

1. Identification of Chapsyn110 as a tyrosine-phosphorylated synaptic protein. Nada S., Yanai H., Okada M., Akiyama T. (投稿準備中)