

## 論文の内容の要旨

論文提出者氏名	郭 維 恒
論文審査担当者	主 査 田 淵 克 彦 副 査 樋 口 京 一 ・ 竹 下 敏 一
論文題目	<b>Protein components of the backbone structure of postsynaptic density of type I excitatory synapses</b> (タイプ I 興奮性シナプスにおけるシナプス後肥厚部の基本骨格タンパク質成分の解析)
(論文の内容の要旨)	<p>〔背景と目的〕 シナプス後肥厚部 (postsynaptic density, PSD) とはシナプス膜直下にある, 神経細胞に高度に分化した特殊な細胞骨格系で, 極めて精巧なタンパク質複合体である。PSD はシナプス伝達とシナプス可塑性の発現と維持に必須な役割を果たす細胞内情報伝達処理の場として知られている。その分子構築については, 2000 年中頃より scaffold-adaptor protein モデルが提唱されている一方, 1970 年代から, 強い界面活性剤処理により可視化される PSD lattice と呼ばれる網目構造が PSD の基本構造であるとも言われてきた。現時点において, scaffold-adaptor protein モデルと PSD lattice 構造との関係は明らかにはされていない。また, PSD lattice の主要構成タンパク質についても明らかにされていない。本研究では, 上記の 2 点について明らかにするための最初の模索的実験を行った。</p> <p>〔方法〕 まず始めに, PSD の基本的内部構造, 特に PSD lattice 様網目構造が可視化できる PSD 標本を得るための種々の条件を検討した。界面活性剤は従来から PSD 調製に用いられている代表的な Triton X-100 (TX または TX-100) と n-Octyl-<math>\beta</math>-D-glucoside を用いた。脳の採取方法に関しては, 未成熟脳において PSD の基本骨格を主体とする PSD 構造が主体であると考えられたので, 生後 7 日前脳から未成熟 PSD 標品 (7d-PSD) を調製した。さらに, liquid nitrogen (LN) を用いて採取後の前脳を 30 秒以内に凍結して (snap freezing 法) “thin PSD (痩せた PSD)” を持つ LN-PSD を調製した。コントロールとして通常法により成獣前脳 (6 週齢脳) から 6w-PSD を調製した。これらの PSD 標品に対して, 電子顕微鏡観察 (通常の薄切及び negative 染色), 質量分析によるタンパク質成分の同定, Western blotting による主要 scaffold-adaptor タンパク質と細胞骨格タンパク質成分の定量解析を行った。</p> <p>〔結果と考察〕 通常の 6w-PSD の電子顕微鏡観察では, PSD は非常に電子密度が高くてほぼ均一に黒く見えるのみで PSD 内部の微細な構造は見えないが, 7d-および LN-PSD においては PSD 構造内部に明瞭な網目状構造が観察された。TX-100 を通常の 1% から 5% に引き上げて調製した PSD においても網目状の PSD 構造が観察された。この構造は deoxycholate 処理によって得られる正規の PSD lattice 構造と形態上, 区別はつかなかった。次に, 網目構造含有 PSD 標品 (7d-PSD, LN-PSD) においては基本骨格成分が濃縮して存在していると考えられるので, これらの PSD 標品のタンパク質成分を分析した。単純なタンパク質成分の比較では, 網目構造含有 PSD 標品において actin の濃縮が顕著であった。質量分析によれば PSD 網目構造の主要成分を絞り込む事は困難であった。この結果を受けて, Western blotting を用いて主要 scaffold-adaptor タンパク質と細胞骨格タンパク質成分を定量することにより, PSD 網目構造に濃縮されるタンパク質の探索を行った。その結果まず第一に, 7d-および LN-PSD とともに PSD 網目構造を有していたがその成分には違いが見られたので, 全くの同一物ではないと判断された。7d-PSD においては SAP102 以外の主要 scaffold-adaptor タンパク質の濃度は非常に低く, この PSD 基本構造には SAP02 以外の scaffold-adaptor タンパク質の寄与は小さいと考えられた。変わって general cytoskeleton, 特に actin と <math>\alpha</math>-internexin の寄与が大きい事が示唆された。LN-PSD において, 通常の PSD (6w-PSD) と比べ主要 scaffold-adaptor タンパク質と細胞骨格タンパク質成分の濃度は変わらなかった。また, 一部の scaffold-adaptor タンパク質濃度は増加していた。LN-PSD においては大型構造体である CaMKII cluster が PSD に付着されなくなることで, PSD 内部構造が可視化された過程が考えられた。CaMKII は PSD 基本網目構造への寄与は大きくないことが示唆された。</p>