

## 論文審査の結果の要旨

|         |       |                 |       |
|---------|-------|-----------------|-------|
| 報 告 番 号 | 甲 第 号 | 氏 名             | 趙 麗 穎 |
| 論文審査担当者 | 主 査   | 田 淵 克 彦         |       |
|         | 副 査   | 天 野 直 二・樋 口 京 一 |       |

(論文審査の内容の要旨)

シナプス後肥厚部 (postsynaptic density, PSD) の精製法は 1970 年代後半に確立され、この方法により主として Type I (興奮性) PSD が精製されると考えられてきた。この研究を行う以前の研究において、信州大神経可塑性学教室の研究によって、以下の事が明らかになっていた。つまり、シナプス膜 (synaptic plasma membrane, SPM) から Triton X-100 を用いて PSD を精製する過程で、PSD の他に、軽い Triton X-100 不溶性画分が同時に得られること。この軽い画分は、コレステロールとスフィンゴ脂質に富んでおり膜ラフトであること。シナプス膜をオクチルグルコシド (n-octyl  $\beta$ -D-glucoside, OG) 処理で可溶化すると、PSD と膜ラフトが完全に分離し、かつ PSD-free の膜ラフトが得られること。さらに、シナプス膜内のサブコンポーネントの可溶化は、界面活性剤処理の条件、例えば、界面活性剤の種類、界面活性剤の濃度または界面活性剤：タンパク質比率によってかなり異なること。また、精製された脳シナプス画分は不均一で、前脳から調製したシナプトソームやシナプス膜は Type I と Type II (抑制性) シナプスの両者を含有すると考えられていたが、それらを界面活性剤処理して得られる PSD の heterogeneity、例えば Type I PSD Type II PSD のどちらを含むのか、あるいは両方を含むのか、という点についてさえ、明らかになっていなかった。そこで、申請者はシナプスのサブ構造間の解剖学的関係およびそれらの相互作用や、シナプスの分子構築を詳細には知るために、ヘテロジナスなシナプスや PSD の分離生成過程を体系的に調べた。6 週齢ラットの脳から調製したシナプス膜 (SPM) を様々な濃度のマイルドな界面活性剤 (Triton X-100, Octyl $\beta$ -D-glucoside [OG], CHAPSO) で処理した後、ショ糖密度勾配遠心にかけて、12 画分を分離した。各画分のタンパク質の分布を電気泳動/銀染色で検出し、Type I 及び Type II シナプスタンパク質の分布、シナプス膜ラフトマーカーの分布をウエスタンブロッティングにて検出した。また、主要な画分に含まれるシナプス膜由来の構造を電子顕微鏡で観察し、各画分に含まれる構造とその構成分子の対応を調べた。

その結果、以下のような結果を得た。

1. Type I と Type II PSD タンパク質はショ糖密度勾配遠心の後、相互に排他的な分布をしていた。
2. Triton X-100 処理後に Type I PSD は主に沈渣 (第 12 画分) と不溶性画分 8 に分布していた。
3. 従来の確立された方法で精製される PSD は、これら 2 つの PSD のプールの混合物であることが示唆されたが、Type II の PSD は含有していなかった。
4. Type I PSD と膜ラフトの複合体は Triton X-100 処理時には観察されたが、OG や CHAPSO での処理時には検出されなかった。一方、Type II PSD と膜ラフトの相互作用は Triton X-100 では観察されず、OG や CHAPSO 処理時には観察された。
5. Type II シナプスのマーカーである gephyrin (scaffolding protein) と GABA 受容体は、gephyrin が容易に可溶化されるため、解離していた。
6. Type I PSD タンパク質は高濃度の OG により可溶化されることが分かった。
7. CHAPSO 処理により新規のシナプスサブ構造を含む画分が複数同定された。
8. GluA は PSD に結合したサイトの他に、PSD から解離したサイト (非 PSD プール) にも存在することが OG と CHAPSO 処理により明らかになった。

以上の結果は、分子レベルでのシナプス構造の理解を深めるために有益であり、今後のシナプス可塑性の分子レベルでの研究を正しく進めていく上で不可欠な基礎情報を提供するものであると考えられた。よって主査、副査は一致して本論文を学位論文として価値があるものと認めた。