

論文の内容の要旨

論文提出者氏名	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

Detergent-dependent separation of postsynaptic density, membrane rafts and other subsynaptic structures from the synaptic plasma membrane of rat forebrain

(シナプス後肥厚部、膜ラフト及び他のシナプス内構造の分離・精製過程の系統的解析)

(論文の内容の要旨)

<背景と目的>

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 が精製されると言われてきた。以来、この精製 PSD は生化学的に克明に解析が進められてきた。1997 年になると、脂質ラフト (後に膜ラフト) の概念が提案された。PSD と膜ラフトはともに 4°C で界面活性剤不溶性であるが、信州大学神経可塑性学研究室は、シナプスにおける Triton X-100 不溶性の PSD と膜ラフトは密度の差によりショ糖密度勾配 (SDG) 超遠心法によって分離されること、またシナプス膜 (synaptic plasma membrane) を比較的低濃度の Triton X-100 で処理した後、界面活性剤不溶性膜画分 (detergent-insoluble membrane, DRM、いわゆる膜ラフト画分) 中に PSD-膜ラフト複合体が存在する事を報告した。また、シナプス膜のオクチルグルコシド (n-octyl β -D-glucoside, OG) 処理は PSD と DRM を完全に分離することも報告した。これらの結果は、シナプス膜内のサブコンポーネントの可溶性は、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を示唆していた。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) シナプスを含む。しかし、この様にヘテロなシナプスや PSD を体系的に分離・同定する研究はまだ行われていなかった。これらのシナプスのサブ構造間の解剖学的関係および相互作用や、シナプスの分子構築は詳細には明らかにされてはいない。例えば、Type II PSD の分離法は確立されていない。PSD とシナプス後部膜ラフトの間の、より詳細な相互作用を解明するために、私たちは、3 種類のマイルドな界面活性剤 Triton X-100、OG または CHAPSO を濃度を変えて用いてラット前脳から調製したシナプス膜を可溶化し、得られたシナプス内構造を SDG にて分離して、その分離のプロセスを系統的に解析した。

<実験方法>

PSD とシナプス後部膜ラフトの精製: 6 週齢ラットの前脳から調製したシナプス膜を様々な濃度のマイルドな界面活性剤 (Triton X-100、OG、CHAPSO) で処理した後、SDG にかけて、12 画分を分離・回収した。各画分のタンパク質の分布は電気泳動/銀染色で検出した。SDG 上の 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トングにてそれぞれのマーカー分子を検出することにより調べた。また、主要な画分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。

<実験の結論と考察>

Type I と Type II タンパク質は相互に排他的な分布をしていた。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。従来の方法で精製される PSD は、これら 2 つの PSD プールの混合物であることが示唆されたが、Type II の PSD は混在していなかった。Type I PSD と膜ラフトの結合は 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 の処理時には観察された。Type II シナプスのマーカーである gephrin (scaffolding protein) と GABA 受容体は、gephrin が容易に可溶化されるため、解離していた、また、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。さらに、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。これらは今後の研究対象になると考えられた。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ると考えられた。