

博士論文審査報告書

論文題目：金属結合タンパク質を利用した遺伝的標識法の研究

申請者：西野有里

1. 論文内容の要旨

シナプスでの情報伝達において重要な役割を担っている神経伝達物質受容体は、シナプス後膜で集積し、クラスターを形成している。正常な情報伝達を行う上で受容体のクラスター形成は必要不可欠である。受容体クラスターの細胞膜直下には足場タンパク質の存在が知られており、受容体の集積やその維持、さらにシナプス可塑性に関わるスパインの形態変化に足場タンパク質が重要な役割を担っていると考えられている。しかしながら、足場タンパク質の分子動態が明らかにされていないため、足場タンパク質による受容体の集積機構の解明に至っていない。そこで、中枢神経のシナプスに存在する NMDA 型グルタミン酸受容体の足場タンパク質である postsynaptic density-95 (PSD-95) に着目し、PSD-95 の機能的な集積状態やシナプスでの局在の解析を、電子顕微鏡を用いて行うことにした。

PSD-95 の分子集積状態を観察するためには、電子顕微鏡法で一般的に用いられている免疫標識法よりも高い標識効率で PSD-95 を標識する必要がある。そこで、免疫標識法に代わる電子顕微鏡観察のための新たな分子標識法を開発した。電子顕微鏡では重金属を比較的容易に検出できることから、重金属結合タンパク質であるメタロチオネインを、観察したいタンパク質と遺伝的に融合して発現させる標識用のタグとして利用できるのか、その可能性を検証した。その結果、メタロチオネイン 3 分子を連結したコンストラクト (3MT タグ) を、観察したいタンパク質との融合タンパク質にして、カドミウムイオン存在下、細胞内で発現させる方法により、大腸菌のシャペロニンタンパク質である GroEL や PSD-95 が電子顕微鏡で検出可能となることが明らかとなった。これらの結果から 3MT タグは電子顕微鏡法において有効な標識となることが示された。

次に、3MT タグを融合した PSD-95 を海馬初代培養神経細胞で発現させて PSD-95 のシナプスでの局在や集積状態を電子顕微鏡で観察した。その結果、3MT タグ融合 PSD-95 が高密度に集積していることに由来する高い電子密度が細胞内で検出された。3MT タグを利用して PSD-95 を標識することにより、本来集積していると考えられていたシナプス後膜直下だけでなく、その近傍でも PSD-95 が集積した状態で局在している領域があるということが明らかになった。

2. 論文審査結果

本論文は、タンパク質の標識のため、免疫反応を利用した染色操作をいっさい必要としない金属結合タンパク質を利用した遺伝的標識法を開発し、その手法を用いて細胞内

にあるタンパク質を電子顕微鏡で検出できることを示した世界で初めての例である。この標識法を用いて、電子顕微鏡法で一般的に用いられている免疫標識法では解析することが困難であった NMDA 型グルタミン酸受容体の足場タンパク質、PSD-95 のシナプスでの機能的な集積状態や分布を解析し、PSD-95 がシナプス後膜だけでなくその近傍でも集積していることを明らかにした。本論文は、電子顕微鏡法における細胞内分子標識法に技術的な進展をもたらし、PSD-95 が関与しているシナプスでの受容体集積機構に関して、新しい知見を見いだしたものとして評価できる。

よって、本論文は博士（理学）の学位論文として価値のあるものと認める。

また、平成24年1月26日、論文内容およびこれに関連する事項について試問を行った結果、合格と判定した。

主査：宮澤 淳夫 印

副査：小倉 尚志 印

：八田 公平 印

：安永 卓生 印
(九州工業大学大学院
情報工学研究院、教授)