

平成 22 年 5 月 31 日現在

研究種目：若手研究(B)  
研究期間：2007～2009  
課題番号：19700304  
研究課題名（和文）データベースサーチによる神経可塑性の制御に関与する候補分子の特定と実験的検証  
研究課題名（英文）Identification of candidate proteins involved in synaptic plasticity by database search and experimental evaluations of their cellular functions  
研究代表者  
千村 崇彦 (Chimura Takahiko)  
独立行政法人理化学研究所・記憶学習機構研究チーム・研究員

## 研究成果の概要（和文）：

当該研究プロジェクトを推進することにより以下の成果が得られた。

1. PDZ ドメインに結合するアミノ酸モチーフ（PDZ 結合モチーフ）がタンパク質の C 末端に選択的に出現するような特殊な配列であることを発見。
2. 前述の情報を利用し、当該モチーフを有するタンパク質から PDZ 結合モチーフと PDZ ドメインに仲介される新規の蛋白質間結合を発見。
3. 結合タンパク質のスクリーニングにより神経細胞に発現する新規膜タンパク質に結合するタンパク質を同定。

## 研究成果の概要（英文）：

The followings were achieved by this project.

1. PDZ binding motifs are special sequence overrepresented at the C-terminal ends of proteins.
2. Using this information, novel interactions mediated PDZ binding motifs and PDZ domains were identified.
3. Novel membrane proteins expressed in neurons were identified. Interacting proteins with the intracellular portion of these proteins were identified.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,200,000	0	1,200,000
2008 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2009 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
総計	3,200,000	600,000	3,800,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：神経科学・神経科学一般

キーワード：PDZ 結合モチーフ、神経可塑性、バイオインフォマティクス、シグナル伝達

## 1. 研究開始当初の背景

個体を構成する細胞が機能的であるためには、細胞が外部からの情報を細胞内に適切に伝達する必要がある。そのためには受容体を細胞の適切な部位に局在させる必要があり、またその周辺にシグナル伝達に関わる分子群を適切に集合させる必要がある。ある種の受容体及びシグナル伝達分子はPDZドメインと呼ばれる約80アミノ酸からなるドメインに結合することで、つまり、PDZドメインを有するタンパク質がこれらのタンパク質を集合させる足場蛋白質として機能することで、細胞の特定の部位にシグナルの受容と伝達に関わる複合体が形成される。このような現象は神経細胞のシナプスで主に知られており、本研究を提案、開始した2007年当初、種々の神経伝達物質に対する受容体や、細胞接着タンパク質、イオンチャネルといった膜タンパク質やプロテインキナーゼCなどの細胞内シグナル伝達に関わる分子といった、神経伝達に中心的な役割を果たすタンパク質群がPDZドメインと結合することが知られていた。多くの場合PDZドメインとの結合には、結合タンパク質のC末端の数アミノ酸が必要で、その領域にはある種の配列相同性（PDZ結合モチーフ）が認められることが分かっていた。また、報告例は神経シナプスでの解析に比べ少ないながらも、免疫系細胞におけるシグナル受容・伝達系、発生・分化過程で起こる細胞不均等分裂（細胞の極性形成）におけるシグナル受容・伝達系においても同様のメカニズムが存在することが報告され始めていた。従ってPDZドメインとPDZ結合モチーフを介した結合は、シグナル受容・伝達系において普遍的な役割を果たすものと考えられた。

しかし、そのようなモチーフを有するタンパク質はゲノムの中にどの程度の種類存在し、また、どのような機能を有するタンパク

質に多くみられるのか、は不明であった。もしこれを明らかにすることができれば、どのようなタンパク質が神経可塑性をはじめとするシグナル受容・伝達の制御に関与しているか、どのような分子基盤が存在するかを効率的に解明することが可能と考えられる。また、機能未知のタンパク質についても機能解明の糸口になることが期待された。

## 2. 研究の目的

ゲノムプロジェクトが進み、DNAの配列情報に加え、タンパク質情報とゲノム情報の対応情報の整備が進んでいる。また、PDZドメインと結合するタンパク質群に関して、それらの間で共通に見出される短いアミノ酸モチーフ（PDZ結合モチーフ）が提唱されていることから、このようなモチーフを有するタンパク質をゲノムデータベース、タンパク質データベースから網羅的に抽出することが可能である。これらを踏まえ、本プロジェクトでは以下の項目、即ち

- (1) PDZ結合モチーフを有するタンパク質をデータベースから抽出する。また抽出方法の最適化についても検討する。
- (2) 抽出されたタンパク質（PDZドメインと結合する可能性が高い）が実際にPDZドメインと結合するかを検証する。
- (3) それらのタンパク質が神経系で果たす役割を明らかにする。

を研究目的としてプロジェクトを遂行した。

## 3. 研究の方法

### データベースサーチ

PDZ結合モチーフはタンパク質のC末端にあるときにPDZドメインに認識されることに着目し、PDZ結合モチーフをC末端に有するタンパク質をタンパク質データベースから抽出するための独自のコンピュータープログラムを、生物情報学分野で一般的に使用されているプログラミング言語Perl及びUNIXスクリプトを用いて作成した。プログラ

ムは必要に応じて改良を加えた。

### PDZドメインタンパク質との結合活性と特異性検定

プログラムで抽出されたタンパク質のうち、種々の遺伝子のマウス脳における発現パターンのデータベースである

#### **Allen Brain Atlas**

<http://www.brain-map.org/>

で脳に発現が認められる遺伝子、種間保存性を考慮し、解析を進める因子数を絞り込んだ。それらに関して、同じく神経系で発現が認められるPDZドメインを有するタンパク質(PDZタンパク質)全長との細胞内結合を生化学的(Cos-7細胞での強制発現と共沈実験)に検定した。

### 神経機能における役割の解析

神経細胞での発現と局在については解析蛋白質に対するウサギポリクローナル抗体を作成し、免疫細胞染色法により確認した。シナプス後肥厚(PSD)への局在に関しては、当該抗体を利用した免疫細胞染色法に加え、超遠心機を用いて生化学的に分画したPSDフラクションに対するウェスタンブロット解析により検定した。神経系でのタンパク質の発現が認められたタンパク質に関しては、RNAiを用いたノックダウン及び強制発現による神経やシナプスの形状に与える影響を細胞形態学的に検討する一方で、脳抽出液から結合タンパク質をスクリーニングし、質量分析により同定した。

## 4. 研究成果

プロジェクト開始当初作成していたプログラムはタンパク質C末端にある特定のモチーフを自動探索するよう作成していたが、その後の改良でC末端から任意のアミノ酸数離れた位置にあるモチーフについても自動探索し、比較できるようにした。その結果、既知のPDZ結合モチーフはタンパク質の最C末端に選択的に出現するという特性を発見した。この発見によりゲノム情報からPDZ結合モチ

ーフとして機能する可能性の高低を判別することが可能となった。これにより、シグナル伝達に関わる蛋白質群を予め絞り込むことで、機能検証実験を効率的に行うことが可能となった。

さらに神経細胞で発現している遺伝子を発現データベースであるAllen Brain Atlasで確認し、選択した全18種の候補蛋白質に関して、神経系で発現するPDZ蛋白質7種と総当たりで全長同士の結合を検討したところ、全てにおいていずれかのPDZ蛋白質との相互作用を検出した。作成した抗体の特異性が高かったものから順次機能解析を行った。新規膜タンパク質がPDZ蛋白質であるPSD-95と結合し、PSDに存在することを明らかにした。この新規膜タンパク質のPDZ結合モチーフを欠損させるとPSD-95との結合が失われ、シナプスへの局在効率が低下することから、PDZ結合モチーフは当該膜タンパク質を効率的にシナプスに配置させるために必須であることが示唆された。この結果は、新規膜タンパク質におけるPDZ結合モチーフの役割を明らかにしただけでなく、本プロジェクトのユニークなアプローチであるバイオインフォマティクスによる研究手法で実際に機能的なPDZ結合モチーフを発見することができることを示すことになった。本プロジェクトを通して、機能未知因子の機能を明らかにする端緒となりうる新たな蛋白質間結合を発見した。

本プロジェクトでは、神経疾患の分子生物学的側面の理解についても検討を加えた。前述した膜タンパク質とは別の新規膜タンパク質は遺伝学的には自閉症との関連が示唆されていたが機能未知であった。この膜タンパク質はシナプス領域には局在が認められなかったものの、脳特異的かつ神経細胞自体に強い発現を示した。この膜タンパク質のPDZ結合モチーフを含む細胞質ドメインと強く結合する蛋白質の存在が脳抽出液を用いた結合アッセイにより確認されたため質量分析を行ったところ、NF- $\kappa$ Bシグナル活性経路の制御因子として知られている蛋白質であることを見いだした。この結合蛋白質は当該新規膜タンパク質の糖鎖修

飾状態を成熟型に促進するという新規な活性を有することも発見した。NF- $\kappa$ B 経路は炎症に伴う免疫反応を仲介する細胞内シグナル伝達系の要であるため、脳神経系と免疫系との関係が神経細胞に及ぼす影響を明らかにするうえで重要な蛋白質間結合の発見となった。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表] (計 1 件)

第 32 回日本分子生物学会 2009 年 12 月  
Right motif in the right place: carboxyl terminal ends of proteins conserve PDZ ligands  
千村崇彦、伊藤正男

[図書] (計 1 件)

生体の科学 2007 年刊 58 巻 p478-479  
「シナプスでの情報伝達と可塑性に関するタンパク質間相互作用」  
千村崇彦

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

千村 崇彦 (Chimura Takahiko)  
独立行政法人理化学研究所・記憶学習機構研究チーム・研究員  
研究者番号：90392034