

| | | |
|----------|------------------------------------|--------------------|
| 氏名 | 平林 愛 (ヒラバヤシ アイ) | |
| 学位の種類 | 博士 (理学) | |
| 学位記番号 | 論博第 1 5 号 | |
| 学位授与報告番号 | 乙第 4 5 号 | |
| 学位記授与年月日 | 平成 2 6 年 9 月 3 0 日 | |
| 学位授与の要件 | 学位規則第 4 条第 2 項該当 (論文博士) | |
| 論文題目 | 遺伝的標識法を用いた細胞内 PSD-95 クラスターの電子顕微鏡解析 | |
| 論文審査委員 | (主査) 教授 | 宮澤 淳夫 |
| | (副査) 教授 | 小倉 尚志 |
| | (副査) 教授 | 八田 公平 |
| | (副査) 教授 | 安永 卓生 |
| | | (九州工業大学大学院情報工学研究院) |
| | (副査) 准教授 | 園部 誠司 |

1. 論文内容の要旨

中枢神経シナプスのポストシナプスには、神経伝達物質受容体が集積し神経情報の伝達を行っている。神経ポストシナプスに形成されるシナプス後肥厚部 (Post-Synaptic Density : PSD) には、足場タンパク質の 1 つである PSD-95 がクラスターを形成し、ポストシナプス膜にある神経伝達物質受容体の局在や集積に重要な役割を担っている。しかし、ポストシナプス内部に形成された PSD-95 クラスターの三次元構造や形成様式などの詳細が明らかにされていないため、神経伝達物質受容体の集積機構も未だ解明には至っていない。PSD-95 を始めとするタンパク質などの電子顕微鏡法による細胞内局在観察は、これまで主に目的タンパク質に対する特異的抗体を用いて標識を行う免疫電子顕微鏡法によって検討されてきた。しかし、免疫電子顕微鏡法ではクラスターを形成するタンパク質のクラスター全体の三次元構造や立体的な配置を捉えることは難しい。また、分子標識に抗原抗体反応を利用するため試料を化学固定する必要があるが、従来の化学固定法ではアルデヒド固定や脱水によって、細胞内タンパク質の構造変化や細胞内からの流出が起きてしまうことが報告されている。そこで本研究では、細胞内での PSD-95 クラスターの三次元構造やその形成様式を明らかにするために、金属結合タンパク質であるメタロチオンニン (MT) 3 分子を用いた遺伝的標識法 (3MT 標識法) で PSD-95 を標識し (PSD-95-3MT)、細胞内局在観察、電子線トモグラフィーおよび凍結試料のクライオ電子顕微鏡観察 (Cryo-Electron Microscopy of Vitreous Sections : CEMOVIS) による電子顕微鏡解析を行った。

中枢神経シナプスの *in vitro* モデルとなる海馬初代培養細胞にアデノウイルスを用いて PSD-95-3MT を遺伝子導入し、標識用の重金属としてカドミウムを培養液に添加した状態で、PSD-95-3MT を発現させた。この海馬初代培養細胞のシナプス部位を電子顕微鏡で観察すると、細胞内で発現した PSD-95-3MT の 3MT タグに結合したカドミウムにより、PSD-95 クラスターが細胞内で電子密度の高い領域として観察されることが分かった。次に、電子線トモグラフィーによりこの試料切片の三次元再構成を行ったところ、PSD-95 が膜状や楕円体状にクラスター化している三次元構造を捉えることができた。この楕円体状の PSD-95 クラスター構造を詳しく検討すると、クラスターは微小なサブクラスター（直径 20nm 程度）から形成されており、クラスターの周囲やその内部にも多くのサブクラスターが存在することが分かった。さらに、アルデヒド固定や脱水などの操作がなく、生きている時に近い状態で細胞内タンパク質を観察できる手法として注目されている CEMOVIS による細胞内 PSD-95 の観察を試みた。本研究において、海馬初代培養細胞のような単層の培養細胞に適用できる高圧凍結法ならびに凍結切片作製法を確立し、これに 3MT 標識法を適用した。その結果、凍結試料切片でも、電子線トモグラフィーで観察されたものと同様な PSD-95 のサブクラスターを、ポストシナプス膜直下に検出することができた。

これら 3 種の異なる電子顕微鏡法による研究結果から、ポストシナプスに存在する PSD-95 は、微小なサブクラスターを形成して細胞内に存在しており、それらが集合して PSD におけるクラスターを形成していることを初めて示すことができた。

2. 論文審査結果

本論文は、ポストシナプスに存在する足場タンパク質 PSD-95 クラスターの分子メカニズムを明らかにするために、細胞内に存在する PSD-95 クラスターの三次元構造とその形成様式について、電子顕微鏡で観察可能な遺伝的標識法である 3MT 標識法を用いて解析を行った初めての成果である。PSD-95 はこれまで光学顕微鏡法や免疫電子顕微鏡法によって細胞内での局在が解明されてきたが、クラスターとしての三次元構造やクラスター形成様式については明らかにされていなかった。そこで、本論文では、3MT 標識法を用いて細胞内局在観察、電子線トモグラフィーおよび CEMOVIS による解析を行うことにより、細胞内 PSD-95 クラスターの三次元構造と立体的な配置を明らかにすると共に、PSD-95 は細胞内で微小なサブクラスターを形成していることを初めて示した。これらは、ポストシナプスにおける PSD-95 のクラスター形成様式を、電子顕微鏡法により分子レベルで解明した重要な成果である。この成果は、電子顕微鏡法における細胞内タンパク質の観察手法において技術的な進歩をもたらし、中枢神経ポストシナプスにおいて重要な役割を担っている PSD-95 クラスターの分子メカニズム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 26 年 7 月 29 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。

