

Title	Assembly, Disassembly, and Exchange of Glial Fibrillary Acidic Protein
Author(s)	中村, 祐
Citation	大阪大学, 1991, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/37189">https://hdl.handle.net/11094/37189</a>
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉</a> 大阪大学の博士論文について <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈/a〉</a> をご参照ください。

***Osaka University Knowledge Archive : OUKA***

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

【38】

氏名・(本籍)	なかむら ゆう 中村 祐
学位の種類	医学博士
学位記番号	第 9689 号
学位授与の日付	平成3年3月25日
学位授与の要件	医学研究科 内科系専攻 学位規則第5条第1項該当
学位論文題目	Assembly, Disassembly, and Exchange of Glial Fibrillary Acidic Protein (インビトロにおけるグリア線維性酸性蛋白の動態)
論文審査委員	(主査) 教授 西村 健 (副査) 教授 白石 純三 教授 祖父江憲治

### 論文内容の要旨

#### (目的)

グリア細胞は中枢神経系の発達段階、障害を受けた時や種々の中枢神経系疾患においてその形態を大きく変化させ、その際に細胞骨格の再構成を行っていると考えられている。しかし、グリア細胞の主要細胞骨格であるグリア線維酸性蛋白 (GFAP) の動態については解明されていない。従来、GFAPは静的な骨格蛋白であると考えられ、その再構成は蛋白分解によるのではないかと考えられてきた。グリア細胞内におけるGFAPの動態をあきらかにするためにインビトロの実験系を確立し、GFAPの動態及びその調節因子について検討を加えた。

#### (方法)

GFAPにはCysteine残基がひとつしかなく、fluorescein-maleimideにより1:1に蛍光標識をおこなうことができる。このGFAPに結合したfluorescein分子が49Å以内に接近するとfluorescence energy resonance transferにより蛍光強度の低下が見られる (fluorescence self-quenching)。この蛍光強度の低下からGFAPの重合度を正確にしかも経時的に重合度を測定できる。

8モル尿素中の蛍光標識GFAPを低張bufferに透析することにより可溶性GFAPをえることができる。この可溶性GFAPに1/4量の0.5Mのimidazole buffer (pH7.1)を加えることにより再構成を行い、蛋白濃度、マグネシウムイオンの重合への影響を検討した。また、再構成した蛍光標識GFAPを希釈、また非標識GFAPと混合し、その蛍光強度を測定することにより、GFAPが脱重合・サブユニットの交換をおこなっているかについて検討した。

また、蛍光標識した可溶性GFAP及び再構成GFAPをcyclic AMP dependent protein kinase

(A kinase) によりリン酸化を行い、リン酸化の重合への影響を電子顕微鏡及び蛍光測定により検討した。また、可溶性GFAPを alkaline phosphatase により脱リン酸化を行い、同様に重合に対する影響を検討した。リン酸化される部位については  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$  ATPを用いてリン酸化したGFAPを thrombin および lysylendopeptidase により消化することにより検討した。また脱リン酸化される部位についてはGFAPおよび thrombin 処理したGFAPを脱リン酸化しその際に遊離するリン酸基をアンモニウム・モリブデン法により定量し検討した。

GFAPを thrombin により処理し、そのHEAD領域 (N端6 KDa) を持たないGFAPを精製しその性質を検討した。また、GFAPより lysylendopeptidase によりそのHEAD領域断片を精製し、GFAPと混合することによりその性質について検討した。

#### (結 果)

- 1 : 蛍光標識GFAPは非標識GFAPと重合能及び超微細形態上、差異を認めなかった。Self-quenching の原理によりGFAPの重合を検討すると、GFAPの重合は蛋白濃度に依存し、マグネシウムイオンにより著しい重合の亢進が観察された。再構成したGFAPは希釈することにより徐々に脱重合を起こす。また、再構成した蛍光標識GFAPを再構成非標識GFAPと混合すると蛍光強度の上昇が見られ、GFAPのサブユニットが交換をしていることが観察された。
- 2 : 可溶性GFAPは、A kinase によりリン酸化をうけると中性 pH 領域において重合能を失い、また再構成したGFAPはリン酸化されることにより脱重合を起こす。GFAP 1分子当たり約1リン酸基入ることによりその重合能を失い、そのリン酸化を受ける部位は、プロテアーゼ処理からそのHEAD領域 (N端約6 KDa) であると考えられる。
- 3 : 可溶性GFAPは脱リン酸化を受けると重合能が低下し、マグネシウムイオンに対する感受性を失い、形態も10nmより径の広いflatな線維に重合する。また、脱リン酸化される部位はHEAD領域にあると推定された。
- 4 : GFAPは thrombin 処理することによりそのHEAD領域を失い、リン酸化GFAPと同様に中性 pH 領域においてその重合能を失う。しかし、酸性 pH 領域 (3-6) では、GFAP、リン酸化GFAP、thrombin 処理GFAPともにリボン状の構造に重合する。
- 5 : HEAD領域断片は中性 pH 領域においてGFAPの重合をその分子比に従い促進し、混合したGFAPはリボン状の構造に重合した。

#### (総 括)

GFAPは蛍光標識したGFAPが蛋白濃度依存性に重合し、希釈により脱重合を起こし、更にサブユニットの交換を示すことから動的な平衡状態にあると考えられる。この平衡状態を制御する要因としてマグネシウムイオン、リン酸化、脱リン酸化が考えられる。そして、それらの要因は中性 pH 領域においてはHEAD領域に対して作用していることが示唆され、細胞内におけるGFAPの動的な平衡状態はそのHEAD領域により制御されていると考えられる。

## 論文審査の結果の要旨

グリア細胞は中枢神経系の発達段階においてだけでなく、障害に対する修復過程や中枢神経系疾患の病理過程においても形態を変化させ、細胞骨格の再構成を行っていると考えられるが、主要細胞骨格であるグリア線維酸性蛋白（GFAP）の動態については解明されていない。本研究は、細胞内におけるGFAPの重合・脱重合の平衡動態を明らかにするためにGFAPの重合度を測定するインビトロの実験系を確立し、GFAPの動態及びその調節因子を解明しようとしたものである。

蛍光エネルギー共鳴による蛍光強度の変化を定量することにより、GFAPが蛋白濃度依存性に重合し、希釈により脱重合を起こし、更にサブユニットの交換を行っていることを示し、GFAPは動的な平衡状態にあることを明らかにした。この平衡状態はマグネシウムイオン濃度、リン酸化、脱リン酸化により制御されていることを示した。さらに、中性pH領域においてはそれらの要因はGFAPのHEAD領域に対して作用していることを示し、GFAPの動的な平衡状態はHEAD領域により制御されていることを明らかにした。

以上の成績は、グリア細胞の多様性に制御された動的な平衡状態にあるGFAPが関与していることを示唆するものであり、グリア細胞の機能・役割の解明の上で意義が大である。