

Title	中枢神経特異的最初期遺伝子Arc蛋白質と相互作用する新規蛋白質Aip-1 (Arc Interacting Protein 1) の単離と機能解析
Author(s)	入江, 康至
Citation	大阪大学, 1998, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/40711">https://hdl.handle.net/11094/40711</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

氏名	入江 康 至
博士の専攻分野の名称	博士 (医学)
学位記番号	第 13689 号
学位授与年月日	平成10年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 医学研究科生理系専攻
学位論文名	中枢神経特異的最初期遺伝子 Arc 蛋白質と相互作用する新規蛋白質 Aip-1 (Arc Interacting Protein 1) の単離と機能解析
論文審査委員	(主査) 教授 三木 直正  (副査) 教授 岡田伸太郎 教授 米田 悦啓

### 論文内容の要旨

#### 【目的】

最初期遺伝子 (Immediate early genes; IEGs) は、痙攣、キンドリングや LTP のような神経活動、あるいは成長因子、虚血といった刺激によって急速かつ一過性に発現誘導される遺伝子群で、刺激による神経可塑性や、細胞死にも関与していると考えられている。このような最初期遺伝子群の一つである Arc (activity-regulated cytoskeleton-associated protein) は、発現が中枢神経系にほぼ局限していること、転写因子ではなく“effector”として働くと考えられること、構造から機能が推定できるほど既知の蛋白と高い相同性を持たないことなどが特徴である。また、刺激に伴って起こる神経可塑性に細胞骨格を介して関与することが示唆されている。本研究は、yeast two hybrid screening system を用いて Arc 蛋白質と結合する蛋白質を見出し、その構造と機能を解析することによって、Arc 蛋白質の関与する細胞内機構の生理的および病的過程における役割を明らかにすることである。

#### 【方法ならびに成績】

Yeast two hybrid screening system を用いて Arc と相互作用する蛋白質の検索を行った。約200,000個の遺伝子をスクリーニングして、15個の陽性クローンを得た。このうち1個のクローン (Aip-1; Arc Interacting Protein) は既知の遺伝子と相同性のない挿入配列を持っていた。これをプローブとしてラット海馬の cDNA ライブラリーをスクリーニングし、Aip-1 の全長を得た。Aip-1 は250個のアミノ酸からなり、アミノ酸配列でも既知の蛋白質やモチーフと高い相同性を持たないことがわかった。アミノ酸配列の二カ所に、塩基性アミノ酸に富むクラスターがあり、核局在シグナルの可能性が示唆された。

Aip-1 mRNA の発現を Northern blot と in situ hybridization 法によって解析した。Northern blot では Aip-1 mRNA は約1.2kb と1.0kb の二本バンドとして認められ、ほぼ脳に特異的であることがわかった。一方、ISH 法では、最大電撃痙攣発作 (MECS) 処理後に歯状回で Aip-1 の発現誘導が見られた。ここは、MECS 後に Arc mRNA の最も強い誘導が見られるところである。この Arc と Aip-1 の共存は、両者の協調した機能を示唆している。

Aip-1 が Arc と会合していることを確かめるために、in vitro の再構成実験をおこなった。標識した Aip-1 蛋白質を生体外で合成し、Arc 蛋白質を豊富に発現している PC12 細胞の抽出液とインキュベートした後、特異的な抗 Arc 抗血清を用いて免疫沈降を行なったところ、Aip-1 蛋白質は Arc 蛋白質とともに特異的に免疫共沈された。

さらに, *in vivo* での Aip-1 蛋白質と Arc 蛋白質の会合も確認した。COS-7 細胞を, 同量の pEGFP-C1-Arc と pCS2+myc-tag-Aip-1 で一過性に形質導入し, 抗 myc 抗体とインキュベートして免疫沈降を行なった。その後, 抗 Arc 抗血清を用いた Immunoblot 法によって解析した。80kDa の EGFP-Arc 融合蛋白質は myc-tag をもった Aip-1 蛋白質と特異的に沈降された。

細胞における Aip-1 蛋白質の機能を調べるため, 緑色蛍光蛋白質 EGFP と Aip-1 の融合蛋白質を, 一過性に COS-7 細胞に形質導入した。強い蛍光信号は核に局限して認められた。一方, EGFP だけを発現するベクターの場合は細胞全体に蛍光信号が分布した。さらに形質導入後 2~3 日すると EGFP-Aip-1 融合蛋白質を発現している COS-7 細胞のほとんどが, apoptosis の特徴である小さい, そして丸い形態を示し, 細胞死を起こした。核酸を特異的に染色する蛍光色素 DAPI で細胞を染色することにより, この現象が apoptosis であることを確かめた。蛍光顕微鏡による形態観察では, EGFP-Aip-1 融合蛋白質を発現している細胞だけが核の濃縮および断片化の像を示した。このことから Aip-1 蛋白質は細胞死の機構において, 細胞死を促進する方向に機能していると考えられる。

#### 【総括】

中枢神経特異的な新しい最初期遺伝子 Arc の機能をさらに調べるため, yeast two hybrid screening system を用いて Arc 蛋白質と相互作用する新規蛋白質 Aip-1 を単離した。Aip-1 は既知の蛋白質と相同性を持たず, *in vitro* および *in vivo* において Arc 蛋白質と結合することが免疫沈降法を用いて確認された。Northern blot 解析および *in situ* hybridization の結果, Aip-1 は中枢神経系にほぼ局限していることがわかった。培養細胞系において, Aip-1 蛋白質の過剰発現が apoptosis を引き起こすことが明らかとなった。これらの結果は, 種々の刺激に対して発現誘導される Arc 蛋白質が, Aip-1 蛋白質を介して細胞死の機構に影響を与え, 細胞の運命を変える可能性を示唆している。

#### 論文審査の結果の要旨

本研究は, 中枢神経系特異的な新しい最初期遺伝子 Arc 蛋白質と結合する蛋白質を見出し, その構造と機能を解析することによって, Arc 蛋白質の生理的および病的過程における役割を明らかにすることを目的として行われた。yeast two hybrid screening system を用いて Arc 蛋白質と相互作用する新規蛋白質 Aip-1 を単離した。Aip-1 は既知の蛋白質と相同性を持たず, *in vitro* および *in vivo* において Arc 蛋白質と結合することが免疫沈降法を用いて確認した。Northern blot 解析および *in situ* hybridization の結果, Aip-1 は中枢神経系にほぼ局限していることがわかった。培養細胞系では Aip-1 蛋白質の過剰発現が apoptosis を引き起こすことが明らかとなった。これらの結果は, 種々のシナプス活動によって発現誘導される Arc 蛋白質が, Aip-1 蛋白質を介して細胞死の機構に影響を与え, 細胞の運命を変える可能性を示唆している。本研究は, てんかんの難治化, 虚血といった疾患の病態解明や, 神経可塑性と細胞死の細胞内機構の関係の解明に道を拓くものであり, 学位に値すると思う。