The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Proteolytic Regulation of E2F1 by Ubiquitin-Proteasome Pathway in Postmitotic Neurons
Author(s)	原, 瑞紀
Citation	大阪大学, 1999, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/41586
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、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

氏　　名	原（はら）　瑞紀（みずき）
博士の専攻分野の名称	博　士（理　学）
学位記番号	第　14418　号
学位授与年月日	平成11年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 理学研究科生物化学専攻
学位論文名	Proteolytic Regulation of E2F1 by Ubiquitin-Proteasome Pathway in Postmitotic Neurons. （神経細胞における転写因子 E2F1 の調節機構：ユビキチン-プロテアソーム経路による蛋白質分解）
論文審査委員	（主査） 教　授　吉川　和明 （副査） 教　授　畠中　寛　　教　授　永井　克也

論文内容の要旨

【はじめに】

本研究は，神経細胞が細胞分裂を終了する機構を解明することを目的としている。

一度最終分化を遂げた細胞は再び分裂を行うことはないにも拘わらず，神経細胞には細胞周期に関連する様々な因子（E2F1, Rb, DP1, cyclin D1-D3 等）が発現している。しかし，神経細胞におけるこれらの因子の機能及び発現機構の詳細は，未だ明らかではない。これらの因子のうち E2F1 は特に，DNA 複製に関与する酵素や因子（DNA polymerase α, DHFR 等）の遺伝子発現を調節している。したがって E2F1 は，S 期への進行調節で中心的な役割を果たす転写因子であると考えられている。そこで私は，神経細胞の分化の研究に有用な細胞系であるマウス胚性ガン細胞 P19 を用いて E2F1 の発現調節機構の解析を行った。

【結果と考察】

1．神経分化に伴う E2F1 mRNA 及び蛋白質の発現量の変動

神経細胞への分化誘導に伴う E2F1 mRNA と蛋白質の発現量の比較検討を行った。ノーザンブロット法により E2F1 mRNA は，神経細胞への分化途中に著しく上昇し分化後も高濃度存在することが明らかとなった。一方，E2F1 蛋白質量をウェスタンブロット法で解析したところ，分化に伴って一過性に上昇した後，分裂終了後には減少していた。また，ゲルシフトアッセイ法によると，細胞抽出液中の E2F 結合配列への結合能は神経分化に伴って著しく減少していた。神経細胞で E2F1 蛋白質レベルの発現量の低下が見られたことから，その分解が促進していることが示唆された。

2．神経細胞におけるユビキチン－プロテアソーム経路依存的 E2F1発現調節機構

増殖性の細胞において，E2F1 の蛋白質の分解にプロテアソーム依存性蛋白質分解経路が関与していることが既に報告されている。一般的にプロテアソームによる分解は，基質へのユビキチン蛋白質の付加反応を伴う多段階にわたる複雑な反応であり，E2F1 の分解の詳細は明らかではない。したがって異種の細胞間の分解活性を比較するのが困難であった。私は，神経細胞中の活性を検討するために細胞抽出液と大腸菌で発現させた組み換え E2F1 蛋白質を用いた In vitro での分解系，及びユビキチン化反応系を確立し，この経路の関与の有無や活性の強さを検討した。まず，In vitro の分解系においてプロテアソーム阻害剤により E2F1 の分解は抑制された。また，プロテアソーム阻害剤の

存在下で培養した神経細胞中のE2F1蛋白質の発現量は，阻害剤非存在下の場合よりも増大していた。これらのIn vitro及びIn vivoの結果より，神経細胞においてもプロテアソーム依存性蛋白質分解経路がE2F1蛋白質の分解に関与しているものと結論した。

さらに，増殖性である未分化の細胞と神経細胞のE2F1の分解活性を比較したところ神経細胞の方が活性が高かった。また，この経路の律速段階であるユビキチン化活性を解析した結果，神経細胞の活性は未分化細胞のものより高かった。興味深いことに，神経細胞の細胞質のみならず核にもその活性が認められた。E2F1は主に核に局在することから，神経細胞には効率よく代謝するための機構が携わっていることを示唆する結果であると考えられる。

3．E2F1強制発現に伴う神経細胞の形態変化

プロテアソーム阻害剤を培養液中に加えることによりE2F1蛋白質量の上昇と共に，神経変性を伴う細胞死が観察された。しかし，プロテアソームは様々な蛋白質を基質とすることから，E2F1発現量の増加が細胞死を誘発したとは言い難い。そこで，アデノウィルスベクターを用いてE2F1を神経細胞に強制発現させ，DNA合成能及び細胞や核の形質の変化を観察した。E2F1が導入された神経細胞のうち90%前後の細胞においてDNA合成が再開した。これにひき続いて，神経突起の退縮，核の断片化等の変性を伴う細胞死が観察された。このことは，ユビキチン－プロテアソーム経路によるE2F1の分解能力を越えてE2F1を発現した神経細胞はS期へ再度移行することにより変性を伴う細胞死に至ることを示している。

脳の発生過程において，多くの神経細胞やその前駆細胞がアポトーシスにより細胞死に至り脱落することが報告されている。本研究より，E2F1蛋白質の発現量の調節が神経分化時における分裂終了のメカニズムの1つとなりうることが示唆される。

論文審査の結果の要旨

本論文は，細胞周期進行に重要な役割を果たす転写因子E2F1が，細胞分裂を終了した神経細胞においてユビキチン－プロテアソーム経路によって迅速に分解を受け，その作用が抑制されていることを記述したものである。本論文は神経細胞の分裂終了機構に関する重要な現象を明らかにしたものであり，博士（理学）の学位論文として十分価値のあるものと認める。