

Title	Molecular neurobiological study on the necdin binding protein NEFA
Author(s)	谷口, 直子
Citation	大阪大学, 2000, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/42536">https://hdl.handle.net/11094/42536</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	谷口直子
博士の専攻分野の名称	博士(理学)
学位記番号	第15722号
学位授与年月日	平成12年9月29日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 理学研究科生物科学専攻
学位論文名	Molecular neurobiological study on the necdin binding protein NEFA. (Necdin 結合蛋白質 NEFA に関する分子神経生物学的研究)
論文審査委員	(主査) 教授 吉川 和明  (副査) 教授 畠中 寛 教授 小倉 明彦

#### 論文内容の要旨

Necdin は、マウスの胚性癌由来の細胞株 P19 をレチノイン酸によりニューロン分化させた状態から未分化状態の subtraction cDNA library より同定された分子量 43kDa の蛋白質である。また、Necdin は増殖性の培養細胞に強制発現すると細胞増殖を強く抑制すること、癌抑制遺伝子産物である Retinoblastoma gene product (Rb) と同様に、SV40 LargeT 抗原、アデノウィルス E1A や転写因子 E2F1 に結合することなどが明らかにされている。特に E2F1 との結合により、その転写活性が抑制される。従って分化したニューロンにおいて Necdin は細胞周期促進因子である E2F1 への結合を介してその活性を抑制し分裂終了機構に寄与していると考えられる。

本研究では Necdin の機能を探るため、Yeast two-hybrid 法により、Necdin 結合蛋白質のスクリーニングを行った。分化誘導した P19 細胞の cDNA library から NEFA を、成熟ラット脳の cDNA library より Nucleobindin (Nuc) を得た。NEFA と Nuc はアミノ酸レベルで相同性が高く (86%)、Basic/Helix-loop-helix (HLH) /acidic/HLH/Leu-zipper というドメイン構造を保持しており、その各 HLH ドメイン内には Ca 結合モチーフである EF hand が存在する。欠失変異体解析より NEFA の Ca 結合部位が Necdin との結合に必要なことを in vitro, in vivo における両者の結合実験により確認した。また、NEFA の特異的抗体を作製し、新生仔マウス脳切片の免疫組織化学による光学顕微鏡観察の結果、Necdin と同様に視床下部や海馬に強く発現し、ニューロンの細胞体が fine dot 状に染色された。更に詳細に検討するために電子顕微鏡による観察を行った結果、NEFA はニューロンの小胞体膜、及び核膜に存在することが認められた。NEFA の細胞内局在について検討する目的で、神経芽細胞において NEFA-GFP (Green Fluorescence Protein) を強制発現した結果、Necdin と NEFA の共発現により、NEFA の細胞外分泌が抑制されていた。この時の細胞内の Ca 貯蔵量を Fura-2 の蛍光測定により検討したところ、NEFA 単独発現の場合に比較して増加する傾向が見られた。つまり、NEFA は Necdin との共存下において、ニューロン細胞内の Ca 動態を制御することを示している。以上の結果は、Necdin が核内で細胞分裂抑制因子として働く以外にもニューロンの細胞体で Ca を制御する多機能分子であることを示唆している。

## 論文審査の結果の要旨

本論文は、ニューロンに発現する細胞増殖抑制因子 Necdin に結合する蛋白質を探索した結果、細胞質に存在するカルシウム結合蛋白質 NEFA が特異的に結合することを記述したものである。Necdin と NEFA 複合体のニューロン細胞質内のカルシウム動態に及ぼす影響について解析した本論文は、Necdin の生理機能の解明に貢献するものであり、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。