

Title	Neurabin-II/Spinophilin AN ACTIN FILAMENT-BINDING PROTEIN WITH ONE PDZ DOMAIN LOCALIZED AT CADHERIN-BASED CELL-CELL ADHESION SITES
Author(s)	守屋, 綾子
Citation	大阪大学, 2001, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/42763
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"〉 大阪大学の博士論文について 〈/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	守屋綾子
博士の専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	第 15895 号
学位授与年月日	平成13年2月28日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学位論文名	Neurabin-II/Spinophilin AN ACTIN FILAMENT-BINDING PROTEIN WITH ONE PDZ DOMAIN LOCALIZED AT CADHERIN-BASED CELL-CELL ADHESION SITES (ニューラビン-II/スピノフィリン：カドヘリンをベースとする細胞間接着部位に局在し、PDZ ドメインをもつアクチンフィラメント結合蛋白質)
論文審査委員	(主査) 教授 高井 義美 (副査) 教授 岡野 栄之 教授 中村 敏一

論文内容の要旨

[目的]

細胞の接着や運動、形態の変化等種々の細胞機能を効率よく発現するために、細胞は特殊な細胞膜ドメインを形成して一定の空間的秩序を維持している。これらの細胞膜ドメインには、細胞接着分子、レセプター、イオンチャンネル等の細胞膜貫通蛋白質が集積し、多くの場合、アクチン細胞骨格がこれらの分子を裏打ちすることによって細胞膜ドメインが形成されている。例えば、細胞間接着部位は特殊に発達した細胞膜ドメインであり、カドヘリンが重要な細胞接着分子として機能している。カドヘリンの細胞内領域は β -カテニン、 α -カテニンと結合し、さらに α -カテニンは直接的ならびに他のアクチンフィラメント(F-アクチン)結合蛋白質であるビンキュリンや α -アクチニンを介して間接的にF-アクチンに連結している。しかし、細胞間接着部位での細胞膜とアクチン細胞骨格の連結機構やその制御機構は十分に理解されていない。また、細胞膜とアクチン細胞骨格との連結による細胞膜ドメインの形成は、神経軸索の伸長やシナプスの形成や維持等の神経細胞固有の機能においても重要な役割を担っているが、神経細胞での細胞膜とアクチン細胞骨格の連結機構も不明である。

そこで本研究では、神経細胞をはじめとする細胞膜とアクチン細胞骨格の連結機構とその制御機構を明らかにする目的で、新しいF-アクチン結合蛋白質の単離を試みるとともに、その蛋白質の制御機構についても検討した。

[方法ならびに成績]

1) 新規F-アクチン結合の単離とその遺伝子のクローニング

¹²⁵Iで標識したF-アクチンをプローブとしたプロットオーバーレイ法によって、ラット脳にSDS電気泳動上での分子量が約130kDのF-アクチン結合蛋白質を検出した。この蛋白質を種々のカラムクロマトグラフィーによって精製し、その部分アミノ酸配列を決定した。その結果、この蛋白質は新規であることが判明し、その部分アミノ酸配列の情報に基づいて、この蛋白質の遺伝子をクローニングした。この蛋白質は、817のアミノ酸から成り、計算上の分子量は89,642であり、中央部にPDZドメイン、C末端側にコイルドコイルドメインを有していた。また、F-アクチン結合ドメインはN末端側に位置していた。この蛋白質は全長にわたって、私共がすでに見出していた神経組織特異的なF-アクチン結合蛋白質ニューラビン-Iと高い相同性を示し、この蛋白質をニューラビン-IIと命名した。

2) ニューラビン-IIの生化学的解析

まず、ニューラビン-IIとF-アクチンとの共役沈降実験を行い、ニューラビン-IIがF-アクチン結合蛋白質であることを確認した。その結合のストイキオメトリーは、約10:1(アクチン:ニューラビン-II)であり、その解離定

数は約 $5 \times 10^{-7} M$ であった。また、ニューラビン-IIのF-アクチンへの結合は過剰量のミオシンによって完全に抑制され、ニューラビン-IIはF-アクチンの側方に結合することが示唆された。さらに、透過型電子顕微鏡によってニューラビン-IIがF-アクチンの架橋作用を有していることが明らかとなった。ニューラビン-IIはオリゴマーを形成して架橋作用を示していると考えられ、ゲルろ過カラムクロマトグラフィーおよびショ糖密度勾配遠心法を用いてニューラビン-IIの分子量を解析した。その結果、両法にてその分子量は約400kDと見積もられ、ニューラビン-IIは3量体もしくは4量体を形成していることが示唆された。

3) ニューラビン-IIの組織および細胞内分布

ノザンおよびウェスタンブロットリングの解析によって、ニューラビン-IIは検討した全ての臓器（心臓、脳、脾臓、肺、肝臓、骨格筋、腎臓、精巣）に発現が認められた。また、脳と肝臓の細胞分画を行い、細胞内分布を解析した結果、ニューラビン-IIはそれぞれ後シナプス肥厚と細胞間結合に富む分画に濃縮していた。さらに、ラット海馬初代培養細胞と腎上皮細胞株のMDCK細胞の免疫染色によって、ニューラビン-IIはそれぞれシナプスとE-カドヘリンをベースとする細胞間接着部位に局在することが明らかとなった。

4) Racによるニューラビン-IIの制御

私共の研究室では、野生型のMDCK細胞と比較して、Racの活性型変異体を発現しているMDCK細胞ではE-カドヘリンとF-アクチンが細胞間接着部位に高度に濃縮され、逆に、Racの不活性型変異体を発現しているMDCK細胞ではそれらの濃縮度が減少することを見出している。ニューラビン-IIは、これらのMDCK細胞株においてE-カドヘリンと同じ挙動を示し、Racの下流で機能していることが示唆された。

[総括]

私は、本研究において、新規F-アクチン結合蛋白質ニューラビン-IIの単離、同定に成功し、その性状の解析を行った。ニューラビン-IIは、神経組織特異的に発現しているニューラビン-Iと同様の一次構造、生化学的性状、神経細胞での局在を示し、両蛋白質はアイソフォームの関係にあると考えられる。一方、ニューラビン-IIは非神経細胞にも発現しており、カドヘリンをベースとした細胞間接着部位に局在していた。最近、カドヘリンはシナプスにおいても細胞接着分子として機能していることが明らかになりつつある。したがって、ニューラビン-Iとニューラビン-IIは、細胞膜貫通蛋白質に結合することが知られているPDZドメインを有することより、シナプスを含むカドヘリンをベースとする細胞間接着部位の細胞膜とアクチン細胞骨格の連結分子として機能していると考えられる。この論文作成中に、プロテインホスファターゼ1(PP1)に結合し、PP1の酵素活性を制御する蛋白質スピノフィリンが報告され、ニューラビン-IIがスピノフィリンと同一であることが判明した。カドヘリンをベースとする細胞間接着部位におけるリン酸化/脱リン酸化は、カドヘリン-カテニン系を制御し、シナプスを含む細胞間接着の形成と維持に重要な役割を担っていることが報告されている。したがって、ニューラビン-II/スピノフィリンはRacの下流で、PP1を介してカドヘリン-カテニン系を制御している可能性が考えられる。今後、ニューラビン-IIのPDZドメインに結合する細胞膜貫通蛋白質を同定するとともに、Racによるニューラビン-IIの制御機構、カドヘリン-カテニン系との分子関連を明らかにしていく必要がある。

論文審査の結果の要旨

本申請者は、本研究において、新しいF-アクチン結合蛋白質であるニューラビン-IIを見出し、その性状を解析した。ニューラビン-IIは神経細胞ではシナプス結合部に、上皮細胞ではカドヘリンをベースとした細胞間接着部位に局在していた。さらに、ニューラビン-IIは、野生型のMDCK細胞と比較して活性型Racを発現している細胞株では、E-カドヘリンと共に細胞間接着部位に高度に濃縮し、反対に不活性型Racを発現している細胞株ではE-カドヘリンと共に減少することを示した。したがって、ニューラビン-IIは細胞接着において重要な役割を果たしていると考えられる。

本研究は、実験結果自体の意義もさることながら、今後のこの分野の研究に極めて重要な意義を持つものと考えられる。したがって、今後の発展性や生命科学への貢献度から鑑み、学位授与に十分値するものと認める。