



Title	Arc interacts with microtubule/MAP2 (microtubule-associated protein 2) and attenuates MAP2 immunoreactivity in the dendrites
Author(s)	藤本, 崇宏
Citation	大阪大学, 2004, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/45273
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、 https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed 大阪大学の博士論文について 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	藤本 崇 宏
博士の専攻分野の名称	博士 (医学)
学位記番号	第 18435 号
学位授与年月日	平成 16 年 3 月 25 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当 医学系研究科情報伝達医学専攻
学位論文名	Arc interacts with microtubule/MAP2 (microtubule-associated protein 2) and attenuates MAP2 immunoreactivity in the dendrites (Arc は微小管/微小管結合蛋白質 2 と相互作用し、樹状突起における微小管結合蛋白質 2 の免疫原性を減弱させる)
論文審査委員	(主査) 教授 三木 直正 (副査) 教授 津本 忠治 教授 遠山 正彌

論文内容の要旨

【目的】

Arc は最初期遺伝子の一つであり、その発現は神経細胞において電気刺激やメタンフェタミンなどの刺激により誘導される。Arc mRNA は活性化された樹状突起に運ばれることから、細胞体だけでなく樹状突起内の局所で蛋白質に翻訳される可能性が示唆されている。また、ラット海馬へのアンチセンスオリゴヌクレオチドの導入による発現阻害により、Arc タンパク質がシナプス可塑性や記憶の保持に重要であることが示されている。しかし、そのタンパク質機能は不明であることから、本研究は神経細胞における Arc の局在と機能を明らかにすることを目的とした。

【方法ならびに成績】

Arc タンパク質の発現部位を調べるために抗体を作成した。ラット海馬において Arc の発現は電撃痙攣処理により有意に誘導され、その発現は歯状回顆粒細胞層および、その樹状突起部位である歯状回分子層に局限していた。細胞分画により Arc の細胞内局在を検討した結果、電撃痙攣処理および対照のラット海馬において粗シナプトソームの不溶性画分に最も多く存在することが分かった。さらに電撃痙攣処理により誘導された場合、他の画分にも僅かに存在した。

さらにラット海馬初代神経細胞において細胞内局在を検討した結果、Arc は細胞体および樹状突起に存在し、後シナプスおよびシャフトの両方に存在することが分かった。

次に Arc の機能を調べるために、GFP-Arc 融合タンパク質の発現プラスミドをラット海馬初代神経細胞に導入した。GFP-Arc 融合タンパク質を発現させた細胞では、MAP2 (microtubule-associated protein 2) の免疫原性が減弱することが観察された。GFP による対照実験ではこのような現象は観察されず、また、主な細胞骨格の構成タンパク質であるチューブリンや F-アクチンの免疫原性には影響を及ぼさないことを確認した。MAP2 の減弱が Arc タンパク質によるものかどうかを検討するために、TAT ペプチドタグによるタンパク質導入実験を行った。その結果、Arc タンパク質の導入により MAP2 の減弱が引き起こされることが確認でき、またウェスタンブロットティングにより、これは MAP2 の量的な変化を反映したものではないことが示唆された。

続いて、MAP2 の減弱の分子機構を調べるために Arc と MAP2 のタンパク質間相互作用の有無を検討した。in vitro 微小管重合実験により、Arc が微小管と MAP2 の複合体と相互作用すること、ならびにドットプロットによる非変性条件での検討により、その相互作用が MAP2 の免疫原性を減弱させる原因であることが示唆された。

脳内における Arc の発現が MAP2 の免疫原性の減弱を引き起こすかどうかを検討するために、電撃痙攣処理後のラット海馬部分を免疫組織染色で調べた。その結果、Arc が発現誘導された歯状回分子層において MAP2 の減弱が観察された。

【総括】

Arc は樹状突起の後シナプスおよびシャフトに存在することが明らかになった。また培養細胞系での機能付加実験ならびに in vivo での痙攣において Arc は MAP2 の免疫原性の減弱を引き起こすことが分かった。この分子機構として Arc と微小管/MAP2 複合体の相互作用が重要であることが示唆された。

一連の結果から、神経活動により誘導された Arc は細胞骨格タンパク質と相互作用することにより神経細胞樹状突起の形態的および機能的な調節を行うことが示唆された。

論文審査の結果の要旨

Arc は最初期遺伝子の一つであり、その発現は神経細胞において電気刺激やメタンフェタミンなどの刺激により誘導される。Arc mRNA は活性化された樹状突起に運ばれることから、細胞体だけでなく樹状突起内の局所で蛋白質に翻訳される可能性が示唆されている。また、ラット海馬へのアンチセンスオリゴヌクレオチドの導入による発現阻害により、Arc タンパク質がシナプス可塑性や記憶の保持に重要であることが示されている。しかし、そのタンパク質機能は不明であることから、本研究は神経細胞における Arc の局在と機能を明らかにすることを目的とした。

申請者は、Arc に対する抗体を作成し、海馬組織および海馬培養神経細胞における Arc 蛋白質の局在を調べた結果、Arc は樹状突起のスパインとシャフトに局在することが明らかになった。また、生化学的検討により、シナプス付近のシナプス後肥厚部あるいは細胞骨格系との会合が示唆された。

海馬培養神経細胞への強制発現による機能付加実験により Arc の機能解析を行った結果、Arc の発現が微小管結合蛋白質 2 の免疫原性の減弱を引き起こすことが明らかになった。微小管関連蛋白質の in vitro 重合を行った再構成実験により、Arc 蛋白質と微小管/微小管結合蛋白質 2 の結合が示され、これが微小管結合蛋白質 2 の免疫原性の減弱の分子機構であると考えられた。電撃痙攣による in vivo での検討により、Arc が発現誘導される歯状回分子層において海馬培養神経細胞の実験で観察された現象と一致する結果が得られ、Arc が微小管細胞骨格系と相互作用することが神経の可塑的变化に影響を及ぼすことが示唆された。

本研究は、神経活動依存的に発現誘導される遺伝子産物 Arc の機能解析を行い、Arc が微小管細胞骨格系と会合することを示し、神経可塑性の分子機構に重要な働きをすることを示唆した。よって、本論文は学位論文に値すると考える。