The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

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、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

【7】

氏　　名	藤本崇宏（ふじもと たかひろ）
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限局していた。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、ならびにドットブ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変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。