



Title	MALS is a binding partner of IRSp53 at cell-cell contacts
Author(s)	堀, 啓
Citation	大阪大学, 2004, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/45290">https://hdl.handle.net/11094/45290</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。

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

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

The University of Osaka

氏名	堀 啓
博士の専攻分野の名称	博士 (医学)
学位記番号	第 18515 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 医学系研究科生体総合医学専攻
学位論文名	MALS is a binding partner of IRSp53 at cell-cell contacts (MALS は細胞接着面における IRSp53 の結合因子である)
論文審査委員	(主査) 教授 祖父江憲治 (副査) 教授 津本 忠治 教授 遠山 正彌

### 論文内容の要旨

#### 【目的】

Insulin receptor substrate p53 (IRSp53) はインスリン刺激によってチロシンリン酸化される基質として同定され、中枢神経系ではシナプス後肥後部 (PSD) の構成分子であることが報告されている。IRSp53 は複数の機能ドメインを有するアダプタータンパク質であり、これまでに 4 つのアイソフォーム (S、T、IRS-58、L) が報告されている。これら IRSp53 アイソフォームは N 末端から 511 アミノ酸残基までの共通配列と、個々に特有な数残基の配列より構成されるが、アイソフォーム間の機能的差違は不明であった。IRSp53N 末端の CRIB/プロリン-リッチドメインに Rho family 低分子量 G タンパク質 (Rac または Cdc42) が結合し、WAVE や Mena などアクチン重合調節因子は IRSp53C 末端の SH3 ドメインに結合して、線維芽細胞のラッフル膜形成や培養神経細胞の神経突起伸長を促進させることが明らかとなっている。本研究では、yeast two-hybrid system を用いて、IRSp53 アイソフォームである IRSp53-S の結合因子として MALS を見出し、上皮系細胞 MDCK における IRSp53 および MALS との相互作用について解析を行った。

#### 【方法ならびに成績】

ラット IRSp53 の 19-522 アミノ酸残基を bait として、ラット脳 cDNA ライブラリーを用いて yeast two-hybrid system によるスクリーニングを行い、17 個の陽性クローンを得た。これら結合因子候補のうち、16 クローンは PDZ ドメインを有するタンパク質であり、また IRSp53-S の C 末端にある S-T-V 配列が PDZ 結合モチーフとして機能することを見出した。IRSp53C 末端配列はこれまでに報告されている複数の種族で保存されている。これら陽性クローンのうち、クローン数の最も多い MALS (mammalian Lin-7s) を IRSp53-S 結合因子候補としてさらに解析を行った。In vitro の結合実験により、IRSp53-S はその PDZ 結合モチーフを介し、MALS の PDZ ドメインと直接結合することが明らかとなった。MALS アイソフォームの 1 つ MALS3 は MDCK などの上皮系細胞に発現しており、細胞接着面に局在することが報告されている。MDCK 細胞で発現している IRSp53 アイソフォームを確認するために、MDCK 細胞 cDNA ライブラリーを作成しクローニングを行い、ラット IRSp53-S に相当するイヌホモログを同定し、MDCK 細胞における IRSp53-S の発現を確認した。MDCK 細胞抽出液に対し免疫沈降を行い、IRSp53-S と MALS

が *in vivo* においても結合していることを確認した。また、IRSp53 および MALS に対して作成したポリクローナル抗体を用いた MDCK 細胞の免疫染色の結果、IRSp53 および MALS は共に細胞接着面に局在することが判明した。これらの染色像は非イオン性界面活性剤 TritonX-100 に対して抵抗性を示すことから、両タンパク質は細胞接着面で細胞骨格系タンパク質と結合して局在することが示唆された。アクチン重合阻害剤サイトカラシン D で処理すると、IRSp53 および MALS の細胞接着面への局在が阻害されることから、これらのタンパク質はアクチン細胞骨格を足場として細胞接着面に局在していることが明らかとなった。

#### 【総括】

IRSp53-S 結合タンパク質として MALS を同定し、IRSp53-S C 末端のアミノ酸配列 (PDZ 結合モチーフ) が MALS の PDZ ドメインと結合することを明らかにした。IRSp53 は MDCK 細胞において MALS と相互作用しており、両者は共にアクチン細胞骨格依存性に細胞接着面に局在することが明らかとなった。IRSp53 上流因子である Rac や Cdc42 が細胞接着形成に関与していること、接着形成にアクチンフィラメントの形成が重要な役割を果たしていることなどが報告されていることから、IRSp53 は接着構造の形成・維持さらにダイナミクスに関与するアダプタータンパク質であると考えられる。

#### 論文審査の結果の要旨

中枢神経シナプスの高次機能を解明するため、後シナプスに形成されるシナプス後肥厚部に対する特異的なモノクローナル抗体を作成し、Insulin receptor substrate p53 (IRSp53) を同定した。IRSp53 はこれまでに、細胞の形態形成に重要な細胞骨格蛋白質の調節因子であることが報告されている。本研究では、IRSp53 の分子機能を解明するため、Yeast Two-hybrid システムを用いて IRSp53 結合因子として MALS を同定した。IRSp53 はその C 末端を介して MALS の PDZ ドメインと直接結合する。この結合様式は既存の IRSp53 結合因子とは異なり、IRSp53 の C 末端アミノ酸配列が PDZ ドメイン結合モチーフとして機能することを初めて明らかにした。また、上皮系細胞 (MDCK 細胞) 間細胞接着部位に IRSp53 および MALS が局在すること、同上細胞内において両蛋白質が総合していることを、免疫染色法および免疫沈降法によって解明した。さらに、アクチン重合阻害剤を用いた実験により、IRSp53 の細胞接着部位への局在はアクチン細胞骨格に依存することを明らかにした。本研究は、IRSp53 の新たな機能として、細胞接着の形成や維持への関与を示唆するものであり、学位の授与に値すると考えられる。