



Title	Characterization of novel Pur α -binding proteins (PurBPs) in mouse brain and concomitant translocation of Pur α with the PurBPs from nuclei to cytoplasm during neuronal development
Author(s)	曾, 玲暉
Citation	大阪大学, 2005, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/45383
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	曾 玲 暉
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	第 1 9 2 4 2 号
学 位 授 与 年 月 日	平成 17 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	Characterization of novel Pur α -binding proteins (PurBPs) in mouse brain and concomitant translocation of Pur α with the PurBPs from nuclei to cytoplasm during neuronal development (マウス脳から見い出した新規 Pur α 結合蛋白の性質、及び Pur α を伴う核から細胞質への移行)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 三 木 直 正 (副査) 教 授 吉 川 和 明 教 授 遠 山 正 彌

論 文 内 容 の 要 旨

〔目 的〕

遺伝子発現の研究から、一本鎖 CRE (cyclic AMP response element) に結合する蛋白が Pur α であること、本蛋白が他の組織と比べ脳に多く発現していることがわかった。Pur α は、一本鎖 DNA/RNA の(GGN) n 配列 (*PUR* エレメント) や種々の蛋白質と結合することにより、複製、転写、翻訳や細胞周期に関与することから、多機能蛋白質と考えられている。神経系における Pur α の生理機能を明らかにするために、マウス全脳から Pur α 結合蛋白 (PurBP) の存在を検索した。

〔方 法〕

4 週令のマウス全脳を細胞下分画し、PurBP を overlay assay 法で検索した。分画したフラクション中の蛋白質を SDS-PAGE で分離し、Nitrocellulose filter にプロットした。大腸菌より精製した GST-Pur α (50 ng/ml) との反応後、anti-GST-Pur α を用いて PurBP を検出した。PDF filter にプロットした蛋白は、常法に従い Western blot を行った。脳発育過程における PurBP の発現の検討には、生後 4、7、10、14、21 日目のマウスを用いた。また、E18 胎児ラットより調整した海馬神経細胞を初代培養した。Anti-Pur α との免疫組織化学と DAPI 染色を行い、Pur α の核から細胞質への移行を検討した。

〔成 績〕

4 週令マウス全脳より得た細胞下分画を用い overlay assay を行ったところ、3 種類の GST-PurBPs を核分画で見出した。P2, S3 及び microsome 分画中には、PurBPs が検出されなかった。GST-Pur α と PurBPs との結合は以下の性質を示した。① GST あるいは熱変性させた GST-Pur α は、PurBPs と結合しなかった。② 反応液中に *PUR* エレメントを保有する一本鎖 CRE を共存させると、GST-Pur α は PurBPs と結合しなかった。他方、*PUR* エレメントを欠損させた Δ GGN ssCRE との共存は、結合に影響がなかった。③ 核分画の DNase/RNase 処理は PurBPs の検出

には影響がなかったが、熱処理や trypsin 処理により PurBPs は、検出されなくなった。以上のことから、Pur α の結合パートナーが蛋白であること、Pur α と PurBPs の会合が一本鎖 DNA や RNA に調節されることが示唆された。

PurBPs が糖蛋白やリン酸化蛋白でないこと、PurBPs との結合に必要な Pur α の domain がアミノ酸残基 50-215 であること、なども明らかになった。PurBPs の分子サイズや pI 値などから、新規の Pur α 結合蛋白と考えられた。

脳発育過程における Pur α 結合蛋白の発現を検討したところ、生後 4-10 日目のマウス全脳から得た核分画中に新たな 2 種類の PurBPs を見出した。これらの蛋白は、生後 10 日目頃までは核に局在するが、それ以後、細胞質へとその局在が変化することがわかった。この PurBPs の局在変化と Pur α の分布変化との関係を検討した。Pur α の核から細胞質への移行時期は PurBPs の細胞質への移行時期と一致することが overlay assay と western blot で明らかになった。海馬の初代神経培養細胞を用いた Anti-Pur α との免疫組織化学と DAPI 染色からも Pur α の核局在が細胞質への局在と経目的に変化することが明らかになった。以上のことから、Pur α の核から細胞質への局在変化は、トランスポーターとしての 30, 32 kDa PurBPs と核内で結合し、引き続き細胞質への輸送に基づくと考えられる。

[総括]

本研究は、新規 PurBPs の核から細胞質への局在変化が、脳発育過程における Pur α の核から細胞質への移動と密接に関係している可能性を示した。神経系で多量に発現している Pur α の生理的役割を解明する上で重要な糸口になると考えられる。

論文審査の結果の要旨

遺伝子発現の研究から、一本鎖 CRE に結合する蛋白が Pur α であること、本蛋白が脳に多く発現していることなどが明らかになった。Pur α は、複製、転写、翻訳に、また、細胞周期にも関与することから、多機能蛋白と考えられている。

本蛋白の脳における役割を明らかにするために、マウス脳から Pur α 結合蛋白を overlay assay 法で検索した。細胞下分画を行ったところ、Pur α 結合蛋白が核分画に存在することを見出した。これら蛋白と Pur α との結合は、ssCRE が存在下では認められないこと、結合蛋白が糖蛋白やリン酸化蛋白でないこと、結合蛋白と結合する Pur α の domain は、アミノ酸残基 50-215 であること、などが分かった。これらの結果、及び分子サイズと pI 値などから、見出した蛋白は新規 Pur α 結合蛋白と考えられる。

脳発育過程における Pur α 結合蛋白の発現パターンを検討したところ、新たに Pur α 結合蛋白を 2 種類見出した。この Pur α 結合蛋白は、生後 10 日目頃までは核に局在し、それ以後は細胞質へとその局在が変化すること、Pur α 結合蛋白の細胞質への局在変化と Pur α の核から細胞質への移行期が一致すること、海馬の初代神経培養細胞も Pur α の局在変化を示すこと、などが明らかとなった。

本研究は、脳における Pur α の生理的役割が Pur α 結合蛋白と緊密に関係することを示唆しており、神経系における Pur α の機能解明の重要な糸口になると考えられ、博士論文に充分値する。