

Title	Hzf protein regulates dendritic localization and BDNF-induced translation of type 1 inositol 1,4,5-trisphosphate receptor mRNA
Author(s)	飯島, 崇利
Citation	大阪大学, 2006, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/46253
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 飯 島 崇 利

博士の専攻分野の名称 博士 (医学)

学位記番号 第 19909 号

学位授与年月日 平成 18 年 2 月 20 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 Hzf protein regulates dendritic localization and BDNF-induced translation of type1 inositol 1,4,5-trisphosphate receptor mRNA
(Hzf タンパク質はイノシトール 3 リン酸受容体 1 型 mRNA の樹状突起への局在化及び BDNF 依存的翻訳を制御する。)

論文審査委員 (主査)

教授 内山 安男

(副査)

教授 狩野 方伸 教授 米田 悦啓

論文内容の要旨

[目的]

神経細胞のような極性を持つ細胞においては、タンパク合成が主に行われる細胞体と情報伝達など機能的に作用するシナプス部位との間に大きな空間的隔たりがある場合が多い。記憶・学習は活動の盛んな一部のシナプスが機能的・形態的に特異的な変化が起きることにより成立すると考えられる一方で、どのようにして一つの細胞内でこのような局所での変化が制御されているかは多くがまだ謎である。しかし近年海馬や小脳などの神経細胞においてその樹状突起上にある特定の分子の mRNA が存在していることが知られてきた。これらは入力を受けたシナプス近傍で翻訳され、必要とされる部位に必要なタンパクを供給することでより精密に神経回路網の形成をコントロールしていることが示唆されているが、このような細胞体内のものとは独立した神経突起上でのタンパク合成系の生理学的意義且つ重要性は未だよくわかっていない。

このような機構の解明は記憶の形成・障害の基礎過程のみでなく、成長過程において神経回路網が完成する過程の理解を大きく進めることが期待される。そこで私はまず、神経細胞において mRNA に結合しその局在化や局所的翻訳を制御する分子、具体的には局在化 mRNA の一つである IP₃R1 の mRNA 結合性タンパク質を同定し、そのノックアウト動物を用いた解析などにより詳細な分子機構の解明をめざした。

[方法および成績]

a) IP₃R1 mRNA 3'UTR に結合する RNA 結合タンパク質 Hzf の同定、及び神経系における発現解析

局在化 mRNA には多くの場合、3 末端側の非翻訳領域にその局在を制御する重要な配列が存在していることが知られている。まず初めに私は IP₃R1 の 3'UTR が mRNA の樹状突起への局在における重要性を海馬初代培養細胞によって確かめ、次にその 3'UTR に結合する因子を expression cDNA library screening によって同定した。この *hematopoietic zinc finger (hzf)* は 3 個の C2H2 型 zinc-finger motif を有する蛋白質をコードし、中枢神経系においては IP₃R1 とほぼ同様に小脳 Purkinje 細胞、海馬や大脳皮質ニューロンなどで発現が認められ、ポリクローナル抗体を作成し、マウス成体脳において組織免疫染色を行ったところ、小脳プルキンエ細胞や一部の海馬細胞において樹状突起に局在していることが分かった。

b) Hzf タンパク質の IP₃R1 mRNA 3'UTR に対する *in vitro*, *in vivo* における RNA 結合能

次に大腸菌のタンパク質発現系によってリコンビナント Hzf タンパク質を作成し、RNA 結合能を UV cross link 法及び gel retardation 法により解析したところ、Hzf は IP₃R1 3'UTR に high affinity で結合することが確かめられた。さらに Hzf 抗体を用いた免疫沈降においては、小脳抽出物から IP₃R1 mRNA が共沈した。このことから Hzf は選択的に IP₃R1 mRNA を認識する RNA 結合タンパク質であることが確かめられた。

c) Hzf 欠損マウス小脳における IP₃R1 mRNA の局在化、BDNF 依存性翻訳の低下

Hzf 欠損マウス小脳において IP₃R1 mRNA の挙動を *in situ* hybridization によって調べたところ、このマウスではプルキンエ細胞の樹状突起への局在の減少が見られた。さらに私は IP₃R1 が BDNF 依存的に翻訳される機構を見だし、Hzf 欠損マウスでこの BDNF 依存的な IP₃R1 のタンパク合成が低下していることも明らかとなった。

[総括]

本研究において、私は IP₃R1 の 3'UTR に結合する RNA 結合タンパク質として Hzf を同定した。Hzf は成熟脳において IP₃R1 と類似した発現パターンを示し、特に小脳ではプルキンエ細胞に豊富に発現が認められ、タンパク質レベルではそのプルキンエ細胞や一部の海馬細胞の樹状突起に局在していた。さらに Hzf 欠損マウスではプルキンエ細胞樹状突起における IP₃R1 mRNA の減少、また IP₃R1 の BDNF 依存的タンパク合成の低下が認められた。以上の結果から、Hzf は IP₃R1 mRNA と 3'UTR 領域での結合を介してその細胞内局在及びその刺激依存的な翻訳調節を制御することが示唆された。

論文審査の結果の要旨

神経細胞における mRNA の樹状突起への局在化機構及びその局所的翻訳は、シナプス可塑性など高次の神経ネットワーク構築の一端を担っていると言われている。これらの研究の多くは海馬領域を中心に行われているが、小脳領域での解析はほとんど行われておらず、その生理学的重要性も不明な点が多い。

本論文では小脳プルキンエ細胞の樹状突起に局在する IP₃ 受容体 1 型 (IP₃R1) の mRNA に注目し、小脳領域においてこの局在化の生理的意味を解析している。初めに IP₃R1 mRNA の 3'UTR 側に RNA の局在化に関わる重要なエレメントが存在することを、海馬初代培養系を用いたレポーター解析により明らかにした。次に IP₃R1 の 3'UTR を指標として小脳 cDNA ライブラリーを用いた発現ライブラリースクリーニングにより Hematopoietic zinc finger (Hzf) と呼ばれる結合因子を同定し、UV cross link や RNA gel shift assay などの RNA 結合実験により、これが IP₃R1 mRNA に結合するタンパク質であることを確かめた。また、Hzf が IP₃R1 を高発現するプルキンエ細胞で豊富に発現し、タンパク質レベルではプルキンエ細胞と一部の海馬細胞の樹状突起に存在していることを示した。さらに免疫沈降法を用いて、小脳抽出液中に内在性の IP₃R1 mRNA が共沈することから、*in vivo* においても複合体を形成していることを示した。これらの解析に加え、Hzf ノックアウトマウスを用い、Hzf は小脳プルキンエ細胞で IP₃R1 mRNA が樹状突起へ局在化するのに関与していることを証明した。本研究では IP₃R1 が BDNF 刺激によって翻訳制御を受けることを見だし、この BDNF 依存性の翻訳は Hzf ノックアウトマウスで低下していることを示した。この事実は、小脳における IP₃R1 の局所的翻訳機構の存在を示唆している。

これらの結果は、脊椎動物における小脳シナプス可塑性など高次神経機能に関わる転写後制御のメカニズムの解明の手がかりとなるものであり、本研究が学位に値するものと認める。