OUKA
Osaka University Knowledge Archive

Title	Identification and Characterization of nCLP2, a Novel C1q Family Protein Expressed in Central Nervous System
Author(s)	下野, 知性
Citation	大阪大学, 2010, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/57989
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。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

【60】

氏名	下野知性（しもの ちせい）
博士の専攻分野の名称	博士（理学）
学位記番号	第 23590 号
学位授与年月日	平成22年3月23日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 理学研究科生物科学専攻
学位論文名	Identification and Characterization of nCLP2, a Novel C1q Family Protein Expressed in Central Nervous System （中枢神経特異的な新規C1qファミリー蛋白質nCLP2の同定と機能解析）
論文審査委員	（主査） 教授 関口 清俊 （副査） 教授 吉川 和明　教授 小倉 明彦

論文内容の要旨

本研究では、中枢神経特異的な新規細胞外マトリックス(ECM)因子を探索することを目的として、理化学研究所のマウス完全長 cDNA ライブラリーを用いて網羅的スクリーニングを行った。その結果、海馬で高発現する C1q ファミリー蛋白質を同定した。C1q ファミリーは補体 C1q の C 末端側球状ドメインに代表される C1q ドメインを有する蛋白質群であり、哺乳類ではゲノム解析から約３０種類が報告されている。これらの間でのアミノ酸配列の系統樹解析は、同定した蛋白質が 3 つの C1q ファミリー蛋白質とともにサブファミリーを形成していることを明らかにし、RT-PCR においてこれらが神経組織特異的に発現パターンを示したことから、この分子群を neural C1q-like protein (nCLP)ファミリーと命名した。本研究で同定された蛋白質はその Gene symbol の C1ql2 に合わせて nCLP2 と命名した。

nCLP2 の発現は RT-PCR で中枢神経組織に限局されていることが確認され、マウス成体脳の *in situ* ハイブリダイゼーションは発現量の高い海馬においては顆粒細胞で発現されていることを示した。免疫組織化学染色では、海馬の歯状回から CA3 領域 Stratum lucidum に局在していることが分かった。また、他の脳領域では視床前核と嗅内野皮質、赤核、下オリーブ核に局在が認められた。マウス成体脳の海馬における免疫電子顕微鏡観察では、顆粒細胞の神経軸索である苔状線維やそのシナプス終末端に局在が認められたほか、後シナプスとの間の細胞外にも局在が認められ、歯状回の顆粒細胞で発現された nCLP2 が苔状線維中を輸送されてシナプス終末端で細胞外に分泌されることが示唆された。

nCLP2 は collagen triple helix repeats と C1q ドメインを有することから三量体を形成することが予測され、組換え蛋白質のウェスタンブロッティングやゲルろ過の結果、nCLP2 は三量体が会合した高分子多量体を形成していることが分かった。その N 末端領域の Cys 残基を置換した変異体のゲルろ過では三量体と六量体が検出され、C1q ドメイン内でも SS 結合を形成していることが分かった。これらの結果から、nCLP2 は三量体を形成した後、それらが N 末端領域でジスルフィド架橋されて高分子多量体となることが明らかになった。

C1q ファミリー蛋白質は液性因子型と ECM 型の２つに大別されるが、その多量体構造から nCLP2 は液性因子型 C1q ファミリー蛋白質であると考えられる。その高分子構造は、他の液性因子型 C1q ファミリー蛋白質で報告されているように受容体の結合能や特異性に関与しているものと考えられる。nCLP2 は成体マウス脳で恒常的に発現し、シナプス終末端で分泌されることから、シナプスの形成とその機能に関与していると考えられる。

論文審査の結果の要旨

神経組織のネットワーク形成過程では神経細胞の分化や移動、神経突起の伸展、標的細胞の認識、シナプスの形成などが起こる。これらの過程は細胞の接着や遊走、局在の安定化といった細胞外マトリックスが深く関わる事象であるが、中枢神経組織で働く細胞外マトリックスに関する知見はまだ少ない。学位申請者は中枢神経特異的な新規細胞外マトリックス因子の探索を行い、その結果中枢神経特異的な新規 C1q ファミリー蛋白質 Neural C1q-like protein (nCLP) 2 を同定した。また、相同性解析の結果から nCLP2 が他の３つの蛋白質とともに nCLP ファミリー(nCLP1, nCLP2, nCLP3, nCLP4)を形成していることを示し、nCLP1, nCLP2, nCLP3 が中枢神経組織特異的に発現していることを明らかにした。学位申請者は nCLP2 の発現や局在に関する詳細な解析を行い、発現の高い海馬においては顆粒細胞で発現されていること、海馬の歯状回から CA3 領域透明層に局在していることを明らかにした。また、他の脳領域では視床前核と嗅内野皮質、赤核、下オリーブ核に局在することを示した。マウス成体脳の海馬における免疫電子顕微鏡観察では、nCLP2 は顆粒細胞の神経軸索である苔状線維やそのシナプス終末端に局在しており、後シナプスとの間の細胞外にも局在していた。以上の結果は、歯状回の顆粒細胞で発現された nCLP2 が苔状線維中を輸送されてシナプス終末端で細胞外に分泌されることを示しており、nCLP2 がシナプスの形成あるいは維持に関わる可能性を示唆している。また、学位申請者は nCLP2 の分子構造に関する解析を行い、nCLP2 が三量体を形成し、これがさらに会合した多量体を形成すること、三量体同士はN末端領域およびC末端領域に存在する複数のシステイン残基を介して架橋され、多量体構造が安定化されていることを明らかにした。これらの結果は、nCLP2 が液性因子型 C1q ファミリー蛋白

質であり、他の液性因子型 C1q ファミリー蛋白質と比較してその多量体構造が安定であることを示している。

本論文は中枢神経組織に発現する分子群 nCLP ファミリーの存在を示し、nCLP2 の解析結果はシナプスの形成や機能に関するメカニズムについて新たな知見をもたらすと考えられる。よって、本論文は博士（理学）の学位論文として十分価値あるものと認める。