

Title	Proteomic Analysis of Importin α -interacting Proteins in Adult Mouse Brain
Author(s)	福本, 昌宏
Citation	大阪大学, 2011, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/59029
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	福本昌宏
博士の専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	第24898号
学位授与年月日	平成23年9月20日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学位論文名	Proteomic Analysis of Importin α -interacting Proteins in Adult Mouse Brain (神経細胞における核内移行情報伝達分子の検索とその分子機能解析)
論文審査委員	(主査) 教授 米田 悦啓 (副査) 教授 菊池 章 教授 島田 昌一

論文内容の要旨

【目的】

核-細胞質間のタンパク質輸送の分子メカニズムは近年精力的に研究され、その輸送に関与する因子が次々に明らかにされてきた。核局在化シグナル受容体であるimportin α 5は他のimportin α 分子種に比べて神経細胞で強く発現していること、ならびにSTAT1のようなシグナル伝達分子を特異的に輸送していることから神経細胞特異的な情報伝達において重要な役割を担っているものと考えられるが、神経細胞における輸送基質や輸送以外の機能は不明である。そこで本研究では、マウス大脳抽出液からimportin α 5特異的に結合する因子のスクリーニングを行い、核-細胞質間輸送の観点から、神経細胞におけるimportin α 5を介した輸送の生理的重要性について明らかにすることを目的とした。

【方法】

成体マウス大脳抽出液からimportin α 5特異的に結合するタンパク質を抽出し、SDS-PAGEにより分離した。ゲル内消化後、matrix-assisted laser desorption ionization time of flight (MALDI-TOF)質量分析器でペプチド断片を測定し、データベースからpeptide mass fingerprint (PMF)によりタンパク質の同定を行った。これらの遺伝子をクローニングし、HeLa細胞と初代培養ラット神経細胞にGFP融合タンパク質を発現させ、その局在を観察した。次にタンパク質を大腸菌を用いて発現精製し、importin α 5との*in vitro*結合実験、ならびに*in vitro* cell-free transport assayを行った。また、HeLa細胞にGFP融合タンパク質を発現させて核外輸送因子CRM1の阻害薬であるleptomycin B処理を行い、それらタンパク質の核外輸送についても検討した。

【成績】

importin α 5結合タンパク質としてSDS-PAGEから約100の単一なバンドが確認され、48のタンパク質を同定した。データベースから同定タンパク質の細胞内局在と機能区分を行うと、それらの機能は多岐にわたっており、核内に局在するだけでなく細胞質や細胞骨格に関わる因子も多く存在した。同定した中から7つの遺伝子: acidic (leucine-rich) nuclear phosphoprotein 32 family member A (Anp32a)、far upstream element binding protein 1 (FUBP1)、thyroid hormone receptor β 1 (TR β 1)、transaldolase 1、CDC42 effector protein 4 (CDC42-ep4)、Coronin 1B、brain-specific creatine kinase (CK-B)をそれぞれクローニングし、GFP融合タンパク質の局在を解析したところ、転写に関わる分子Anp32a、FUBP1、TR β 1は核に局在した。一方で、代謝に関わる分子transaldolase 1やCK-B、細胞骨格に関わる分子CDC42-ep4やCoronin 1Bは核と細胞質両方に局在した。CK-B以外の因子はすべて*in vitro* transport assayでimportin α 5/ β によって核へ輸送されることが確認された。さらにleptomycin B処理した細胞ではCK-B-GFPの核への局在が増加したことからCK-BはCRM1依存的に核外へ移行していると推察された。また、同定された分子にはシナプス後部肥厚 (postsynaptic density; PSD) の組成分子が多く含まれていた。これはimportin α 5が神経細胞において核-細胞質間輸送のみならず、軸索形成やシグナル伝達にも深く関わっている事を示唆している。

【総括】

神経細胞においてimportin α 5依存的に核へ輸送されるタンパク質の広範囲な同定を行った結果、神経細胞での軸索形成に関わる因子やシグナル伝達因子などが多数同定されてきたことから、importin α 5が核内輸送だけでなく神経細胞の活動に深く関わっていると考えられる。

論文審査の結果の要旨

核局在化シグナル受容体であるimportin α 5は神経細胞で強く発現しており、神経細胞特異的な情報伝達において重要な役割を担っているものと考えられる。本研究では、マウス大脳抽出液からimportin α 5特異的に結合する因子を分離し、質量分析器を用いて48のタンパク質を同定した。同定した因子の中から7遺伝子をクローニングし、細胞内局在解析や組み換えタンパク質を用いた*in vitro* transport assayの結果からimportin α 5との結合や核移行活性が確かめられた。特に細胞質で機能すると考えられていた糖代謝分子transaldolase 1は核への局在を示し、細胞骨格に関わる分子CDC42-ep4やCoronin 1Bは核と細胞質間をシャトルしている事が明らかとなった。また、本研究ではimportin α 5結合因子として神経細胞特異的分子も多数同定されていることから、神経細胞におけるシグナル伝達機構、特にimportin α 5を介した輸送のメカニズムを解明する足がかりの研究として重要である。よって本研究は、学位論文に値すると考えられる。