OUKA
The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Study of the proteome of actin stress fibers in cellular senescence
Author(s)	劉, 世友
Citation	大阪大学, 2021, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/85424
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。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。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

Abstract of Thesis

Name （Liu Shiyou）	
Title	Study of the proteome of actin stress fibers in cellular senescence (細胞老化におけるアクチンストレスファイバーのプロテオームに関する研究)

Abstract of Thesis

Stress fibers (SFs) are an intracellular structure mainly composed of non-muscle myosin and actin. While SFs are known to be involved in many cell functions including the maintenance of the homeostasis of the cells, currently the protein components that constitute SFs are only partially identified. Thus, our understanding of the mechanisms underlying their responses is highly limited. In this study, we isolate SFs from human fibroblasts HFF-1 to determine, with proteomic analysis, the whole protein components and how they change with replicative senescence (RS), a state where cells decline in ability to replicate after repeated divisions. We found that at least 263 proteins are associated with SFs, and 101 of them are upregulated with RS, by which SFs become larger in size. Among them, we focused on a specific protein known as eEF2 (eukaryotic translation elongation factor 2) as it exhibited upon RS the most significant increase in abundance of their proteome. Compared to young cells, eEF2 has a higher abundance enrichment in the SFs isolated from senescent cells, suggesting that eEF2 may have a potentially unknown connection with SFs. We then found that, upon the progress of cellular senescence, endogenous eEF2 in the HFF1 cells exhibits a more obvious co-localization along the length of SFs, suggesting that there may be a senescence-dependent regulatory effect of eEF2 onto SFs. In addition, the increased abundance of eEF2 was positively correlated with the increased size of the SFs in senescent cells. We further found through silencing and over-expression of eEF2 that eEF2 indeed regulates the expression of major SF-associated proteins such as alpha-actinin and non-muscle myosin. Specifically, the silencing of endogenous eEF2 in senescent cells allowed the SF-associated proteins to be significantly down-regulated. Meanwhile, the over-expression of eEF2 in young cells allowed the SF-associated proteins to be significantly up-regulated. We also analyzed the extent of molecular exchange in SFs using fluorescence recovery after photobleaching experiments to find that the molecular stability of SF was lowered by silencing of eEF2. In summary, we provided the first descriptions of the comprehensive proteome of SFs, and among the detected proteins eEF2 was fond to be critical to the reorganization and stabilization of SFs induced in senescent fibroblasts. Thus, our findings provide a novel molecular basis for SFs to be reinforced to resist cellular senescence.

様式７

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏　名　（Liu Shiyou）		
	（職）	氏　名
論文審査担当者	主査　教授	出口真次
	副査　教授	野村泰伸
	副査　教授	境慎司
	副査　教授	大橋一正　（東北大学）

論文審査の結果の要旨

本論文では、非筋型のミオシン・アクチンタンパク質から構成される細胞内骨格構造の一つストレスファイバー（stress fibers、以下SFsと略記）に着目した研究を行った。SFsは多くの細胞内で発現しており、恒常性など多様な機能に関わっていることが知られている。しかしながら、その複合体を構成するタンパク質の構成成分には不明な点が多く、SFsの関わる研究の多くは現象の観察に留まり、分子レベルでの解明が進んでいない。本研究では、SFsをヒト線維芽細胞から単離する技術を開発するとともに、取り出したSFsの質量分析およびプロテオミクス解析を行った。その際に、継代培養を繰り返すことにより誘導することのできる細胞老化（replicative senescence）がSFsの構成成分に及ぼす影響についても調べた。その結果、SFsが少なくても263種類の異なるタンパク質から構成される複合体であり、かつそのうち細胞老化によって101種類のタンパク質の発現量が変わることを明らかにした。その中で、とりわけ老化に伴う変化量の大きい特定のタンパク質eEF2（eukaryotic translation elongation factor 2）に着目し、そのSFsに及ぼす影響を調べた。eEF2の過剰細胞内発現および発現抑制を人為的に行うことにより、SFsを構成するタンパク質である非筋型ミオシンやαアクチニンの発現量が変化し、ひいてはSFsの大きさと数量を含め細胞形態が変化することを明らかにした。さらに、その結果として細胞の増殖が調節され、そこではeEF2のリン酸化が関与していることを示した。すなわち、SFsのタンパク質構成を初めて同定したことに加え、細胞老化における細胞増殖の調節メカニズムの一端を明らかにした。本論文内では特にeEF2に注目した解析を行ったが、細胞老化に関わらず多くの細胞機能に関係するタンパク質の関与や発現量の変化も新たに見出した。従って、SFsが関与する種々の細胞機能の分子レベルでの理解に向けて、本研究は重要な基礎的知見を得たと言える。以上より、本論文は博士（理学）の学位論文として価値のあるものと認める。