



Nagoya City University Academic Repository

学位の種類	博士 (医学)
学位記番号	第 1026 号
氏名	太田 晴子
授与年月日	平成 26 年 3 月 25 日
学位論文の題名	Proteomic analysis of Girdin-interacting proteins in migrating new neurons in the postnatal mouse brain (生後マウス脳の新生ニューロンにおける Girdin 相互作用分子のプロテオミクス解析) Biochem Biophys Res Commun Vol.442 (1-2): PP16-21, 2013
論文審査担当者	主査： 澤本 和延 副査： 飛田 秀樹, 祖父江 和哉

論 文 内 容 の 要 旨

【はじめに】脳には生後も神経幹細胞が存在する。生後脳で新生したニューロンは脳内を移動し、既存の神経回路に組み込まれる。これら新生ニューロンは、脳機能の維持や傷害部位の再生に関与すると考えられており、ニューロンの移動制御機構の解明は医学的にも意義が大きい。げっ歯類の脳室下帯で新生したニューロンは嗅球まで移動して介在ニューロンへと分化する。しかしニューロンの移動を制御する分子機構は完全には解明されていない。我々は **Girdin** 遺伝子欠損マウスで脳室下帯から嗅球への新生ニューロンの移動が障害されることを報告した。**Girdin** はセリンスレオニンキナーゼ **Akt1** の基質として同定されたアクチン細胞骨格結合タンパク質で、長いコイルドコイル領域を N および C 末端領域 (NT, CT) が挟む構造を有する。これまでの研究より、C 末端にはアクチン結合領域が含まれることが分かっている。また、**Girdin** は微小管の制御に関与するという報告もある。しかしながら、**Girdin** がどのようにして細胞の移動を制御しているかは不明である。本研究では、プロテオミクスの手法を用いた **Girdin** 相互作用分子の網羅的な探索により、生後マウス脳の脳室下帯から嗅球へのニューロン移動を制御する新規細胞内タンパク質の同定を試みた。

【方法と結果】グルタチオン-S 転移酵素 (GST) 融合タンパク質をベイトとした相互作用タンパク質のアフィニティー精製と液体クロマトグラフィー質量分析法 (LC-MS/MS) により、マウス脳室下帯組織抽出液中の **Girdin** 相互作用分子の網羅的な探索を施行した。まず、大腸菌を宿主としてベイトとなる GST 融合タンパク質 (GST, GST-Girdin NT, GST-Girdin CT2) を合成・精製した。次に、これらを固相化したセファロースビーズを脳室下帯抽出液と混合し、相互作用タンパク質を濃縮した。このビーズ画分に 1M 塩化ナトリウム溶液を加えて溶出させたタンパク質を LC-MS/MS により分析し、GST-Girdin CT2 に特異的な 198 タンパク質を同定した。これらを Gene Ontology terms によって分類し、「移動」あるいは「細胞骨格」に分類された 33 分子を選出した。さらに、「移動」及び「細胞骨格」の両方に分類された 4 分子のうち、微小管結合タンパク質 **CLASP2** に着目し解析した。免疫染色の結果、**CLASP2** と **Girdin** は脳室下帯のほぼすべての新生ニューロンに発現し、細胞内で共局在することが分かった。また、**Girdin** および **CLASP2** のフラグメントタンパク質を用いたプルダウンアッセイにて **CLASP2-M** 領域が **Girdin-CT** と共沈降したことから、**CLASP2** は同部位を介して **Girdin** と複合体を形成すると考えられた。

【考察】我々は、生後マウス脳における脳室下帯の新生ニューロンの移動に重要なタンパク質 **Girdin** と相互作用するタンパク質のスクリーニングにより、ニューロンの移動を制御する新規メカニズムの解明を目指した。**Girdin** は培養細胞の遊走においてアクチン細胞骨格再編成に関与するが、今回の結果でも **Girdin** 相互作用候補分子としてアクチンおよび複数のアクチン細胞骨格結合分子が同定された。その中には **Drebrin** のように既に細胞遊走への関与や脳室下帯新生ニューロンでの発現が報告されている分子もあり、**Girdin** が **Drebrin**

との相互作用によりニューロン移動におけるアクチン再編成を制御する可能性も示唆された。

ニューロンの移動においては微小管が重要な役割を果たすことが知られている。我々が着目した CLASP2 は微小管プラス末端に集積して微小管とアクチンの連結を制御するとの報告がある。今回、CLASP2 と Girdin は複合体を形成し、新生ニューロン内で共局在することが確認されたことより、Girdin-CLASP2 相互作用がニューロン移動に関与する可能性がある。一方、Girdin は Hook protein ファミリーの微小管結合領域の配列と相同性を有することから HkRP1 (Hook-related protein1)とも呼ばれる。Girdin が直接的に微小管と結合するという報告は少ないが、阻害剤を使って機能的な関連を示唆する報告がある。これらの報告と我々の結果と併せると、新生ニューロンの移動において Girdin は CLASP2 を含む微小管結合タンパク質との結合を介して微小管の動態を制御する可能性が考えられる。

本研究では、Girdin を手掛かりとして新生ニューロンの移動に関与する可能性のある新規分子を探索し、アクチンや微小管動態の制御に関与する分子を複数同定した。これらの候補分子の詳細な解析により、脳室下帯から嗅球へのニューロン移動制御機構の解明が期待される。

論文審査の結果の要旨

脳には生後も神経幹細胞が存在する。生後脳で新生したニューロンは脳内を移動し、既存の神経回路に組み込まれる。これら新生ニューロンは、脳機能の維持や傷害部位の再生に関与すると考えられており、ニューロンの移動制御機構の解明は医学的にも意義が大きい。げっ歯類の脳室下帯で新生したニューロンは嗅球まで移動して介在ニューロンへと分化する。しかし、ニューロンの移動を制御する分子機構は完全には解明されていない。申請者らは、以前に Girdin 遺伝子欠損マウスで脳室下帯から嗅球への新生ニューロンの移動が障害されることを報告した。Girdin はセリンスレオニンキナーゼ Akt1 の基質として同定されたアクチン細胞骨格結合蛋白質で、長いコイルドコイル領域を N および C 末端領域 (NT, CT) が挟む構造を有する。これまでの研究より、C 末端にはアクチン結合領域が含まれることが分かっている。また、Girdin は微小管の制御に関与するという報告もある。しかしながら、Girdin がどのようにして細胞の移動を制御しているかは不明である。本研究では、プロテオミクス的手法を用いた Girdin 相互作用分子の網羅的な探索により、生後マウス脳の脳室下帯から嗅球へのニューロン移動を制御する新規細胞内蛋白質の同定を試みた。

グルタチオン-S 転移酵素 (GST) 融合蛋白質をベイトとした相互作用蛋白質のアフィニティー精製と液体クロマトグラフィー質量分析法 (LC-MS/MS) により、マウス脳室下帯組織抽出液中の Girdin 相互作用分子の網羅的な探索を施行した。まず、大腸菌を宿主としてベイトとなる GST 融合蛋白質 (GST、GST-Girdin NT、GST-Girdin CT2) を合成・精製した。次に、これらを固相化したセファロースビーズを脳室下帯抽出液と混合し、相互作用蛋白質を濃縮した。このビーズ画分に 1M 塩化ナトリウム溶液を加えて溶出させた蛋白質を LC-MS/MS により分析し、GST-Girdin CT2 に特異的な 198 蛋白質を同定した。これらを Gene Ontology terms によって分類し、「移動」あるいは「細胞骨格」に分類された 33 分子を選出した。さらに、「移動」及び「細胞骨格」の両方に分類された 4 分子のうち、微小管結合蛋白質 CLASP2 に着目し解析した。免疫染色の結果、CLASP2 と Girdin は脳室下帯のほぼすべての新生ニューロンに発現し、細胞内で共局在することが分かった。また、Girdin および CLASP2 のフラグメント蛋白質を用いたプルダウンアッセイにて CLASP2-CR2 領域が Girdin-CT と共沈降したことから、CLASP2 は同部位を介して Girdin と複合体を形成すると考えられた。

本研究では、生後マウス脳における脳室下帯の新生ニューロンの移動に重要な蛋白質 Girdin と相互作用する蛋白質のスクリーニングにより、ニューロンの移動を制御する新規メカニズムの解明を目指した。Girdin は培養細胞の遊走においてアクチン細胞骨格再編成に関与するが、今回の結果でも Girdin 相互作用候補分子としてアクチンおよび複数のアクチン細胞骨格結合分子が同定された。その中には Drebrin のように既に細胞遊走への関与や脳室下帯新生ニューロンでの発現が報告されている分子もあり、Girdin が Drebrin との相互作用によりニューロン移動におけるアクチン再編成を制御する可能性も示唆された。

ニューロンの移動においては微小管が重要な役割を果たすことが知られている。本研究で着目した CLASP2 は微小管プラス末端に集積して微小管とアクチンの連結を制御するとの報告がある。今回、CLASP2 と Girdin は複合体を形成し、新生ニューロン内で共局在することが確認されたことより、Girdin-CLASP2 相互作用がニューロン移動に関与する可能性がある。一方、Girdin は Hook protein ファミリーの微小管結合領域の配列と相同性を有することから HkRP1 (Hook-related

protein1)とも呼ばれる。Girdin が直接的に微小管と結合するという報告は少ないが、阻害薬を使って機能的な関連を示唆する報告がある。これらの報告と我々の結果と併せると、新生ニューロンの移動において Girdin は CLASP2 を含む微小管結合蛋白質との結合を介して微小管の動態を制御する可能性が示唆された。

本研究では、Girdin を手掛かりとして新生ニューロンの移動に関与する可能性のある新規分子を探索し、アクチンや微小管動態の制御に関与する分子を複数同定した。これらの候補分子の詳細な解析により、脳室下帯から嗅球へのニューロンの移動制御メカニズムの解明が期待される。また、このような生後新生ニューロンの移動メカニズム解明は、脳傷害部位へのニューロンの移動メカニズム解明、さらには、不可逆的脳損傷に対する新たな治療法開発につながると考えられる。

審査委員会による試験においては、最初に審査委員会の中で本論文の研究に関与していない委員（第1副査・飛田秀樹教授）が、「SDS-PAGE の原理について、特に蛋白質を分子量で分けられるメカニズムを説明せよ」など、論文に関して 10 項目の質問を行った。次に、主査（澤本和延教授）が、「ニューロン移動を制御する細胞外メカニズムについて説明せよ」など、論文に関してさらに 7 項目の質問を行った。最後に、第2副査（祖父江和哉教授）が、「麻酔薬の高次脳機能への影響について基礎的および臨床的な見地から説明せよ」など、主科目の知識に関する点を中心に 3 項目の質問を行った。いずれの質問に対しても、的確な回答が得られたことから、学位申請者は、本論文の背景・目的・方法・結果・成果の社会貢献等について十分に理解しており、また、専攻分野（麻酔・危機管理医学）に関する知識を十分に習得しているものと判断した。

よって、本論文の著者は博士（医学）の学位を授与するに相応しいと判定した。