

博士(医学) 伊藤 武司

## 論文題目

The identification of novel protein, brain-derived integrating factor-1 (BDIF1), which interacts with astrocytic gap junctional protein

(アストロサイトのギャップ結合タンパク質と相互作用する新規タンパク質、脳由来統合因子-1 (BDIF1) の同定)

## 論文の内容の要旨

[はじめに]

アストロサイトは、中枢神経系のグリア細胞の一種であり、ニューロンを栄養的、機械的に支持するのみならず、その細胞膜上に神経伝達物質の受容体やトランスポーター等を発現し、ニューロン間の情報伝達を修飾する機能を持つことが、近年明らかになってきた。さらに、アストロサイトは、ギャップ結合を介して隣接する細胞との間で  $\text{Ca}^{2+}$  等の低分子のやり取りを行い、脳内情報伝達に自身が関与することも報告されている。しかし、アストロサイト細胞膜上に発現する、それらタンパク質の細胞内輸送や膜移行の分子的基础は、これまで詳細に解析されていなかった。膜輸送を制御する低分子量 G タンパク質 Rab GTPアーゼは、酵母からヒトまでよく保存されており、GTP が結合した活性型の Rab は加水分解を経て、GDP を結合した不活性化型になることで膜輸送が調節されている。このサイクリングにおいて、TBC (Tre-2, Bub2 and Cdc16) ドメインを含むタンパク質が、GTP 加水分解速度を加速する GTP アーゼ活性化タンパク質 (GAP) として働く。本論文では、TBC ドメインを発現する新規分子についての探索を目的として研究を行った。

[方法]

### 1. TBC ドメインを有するタンパク質 cDNA のクローニング

ウィスター・ラット 18 日齢胎仔大脳皮質からアストロサイトを初代培養し、それより調製した mRNA の逆転写産物 cDNA を基質として、TBC ドメインをコードする塩基配列を持つ PCR プライマーによる degenerative PCR を行った。ついで、その PCR 産物 DNA 断片で、オリゴキャッピング法と 3' RACE 法を行い、タンパク質をコードする全長 cDNA を得た。また、ラット組織毎での mRNA 発現をノーザン・ブロットィング法により検討した。

### 2. BDIF1 とギャップ結合タンパク質の相互作用解析

HEK293 細胞に Myc タグ標識 BDIF1 とギャップ結合タンパク質(コネキシン 43(Cx43)、36(Cx36)、32(Cx32))を強制発現し、そのライセートについて、抗 Myc タグ抗体または抗ギャップ結合タンパク質抗体による免疫共沈を行った後、ウェスタン・ブロットィング法で分子間結合を解析した。さらに、ラット初代培養アストロサイトのライセートで、抗 BDIF1 抗体または抗 Cx43 抗体による免疫共沈を行い、同様に分子間結合を解析した。

### 3. 免疫組織化学的染色による BDIF1 の細胞内分布解析

ラット初代培養アストロサイトに Myc タグ標識 BDIF1 を強制発現し、抗 Myc タグ抗体と抗 Cx43 抗体により免疫組織化学的染色を行った。二次抗体には、Alexa Fluor 488 抗ウサギ IgG 抗体と Alexa Fluor 594 抗マウス IgG 抗体を用い、蛍光顕微鏡で BDIF1 と Cx43 の細胞内

分布を検討した。

[結果]

### 1. 脳由来統合因子-1 (BDIF1) の同定

上述の方法により、タンパク質コード領域が 2250 bp、全長 mRNA が 2.8 kbp の cDNA 遺伝子をクローニングし、脳由来統合因子-1 (BDIF1) と命名した。その分子量は 85 kDa と推定された。BDIF1 は、TBC、SH3、RUN の各ドメインを持ち、ノーザン・ブロットィング法の結果、成体ラット組織では、脳、精巣、及び心臓で高い発現を確認した。

### 2. BDIF1 の Cx43 との相互作用

HEK293 細胞で BDIF1 と Cx43 を共発現し、免疫共沈により、両者の結合を確認した。一方、同様の免疫共沈により、Cx36 と Cx32 は BDIF1 に結合しないことを確認した。さらに、ラット初代培養アストロサイトでの免疫共沈の結果、内因性の BDIF1 と Cx43 が結合することが示された。

### 3. アストロサイトでの BDIF1 と Cx43 の共局在

ラット初代培養アストロサイトでの免疫組織化学的染色の結果、BDIF1 と Cx43 が共局在することが確認された。

[考察]

本研究では、ラット胎仔大脳皮質の初代培養アストロサイトより、TBC、SH3、RUN の各ドメインを持つ新規タンパク質 BDIF1 をクローニングした。TBC ドメインは、Rab と相互作用する GAP の特徴をもつことから、BDIF1 はアストロサイトで発現する Rab の GAP としての機能を持ち、細胞内物質輸送や細胞内膜移行等に関与すると推定される。また、本研究では BDIF1 と Cx43 の相互作用が確認されたが、Cx43 の多プロリン領域 (PxxP) は SH3 ドメインへの高い親和性を持つので、Cx43 は、その多プロリン領域を介して BDIF1 に結合すると推定される。RUN ドメインは、核内移行シグナルとして働くとの報告が最近なされているが、BDIF1 の RUN ドメインが担う機能は不明である。アストロサイトは、Cx43 によるギャップ結合で連絡されシンシチウムを形成するが、これまで Cx43 の細胞膜移行についての分子的基礎は不明であった。しかし、TBC ドメインの機能をもつ BDIF1 が、Cx43 と複合体を形成したことから、シンシチウムを形成する移行についても関与することが示唆される。

[結論]

アストロサイトで Cx43 と相互作用する BDIF1 を同定した。BDIF1 はアストロサイト間での情報伝達を調節することに働くと推定された。

## 論文審査の結果の要旨

中枢神経系では神経細胞の活動を円滑に進めるために、支持細胞としての神経膠細胞が重要な働きをしている。その神経膠細胞の一つであるアストロサイトは多様な機能を担っているものと考えられている。その機能の一つとして、アストロサイト細胞膜上の gap junction を介したイオンなどの低分子量物質の細胞間輸送が挙げられる。しかし、アストロサイト細胞膜へのタンパク質輸送のメカニズムには解明されていないことが多い。そこで、申請

者は細胞膜へのタンパク質輸送に重要な役割を持つ低分子量 G タンパク質 Rab の活性を制御する GTPase-activating protein に TBC(Tre-2, Bub2, Cdc16)ドメインが保存されていることに注目し、初代培養ラットアストロサイトから作製した cDNA を基質にして、TBC ドメインに対する degenerative PCR を行った。その後、オリゴキャッピング法と 3'RACE 法を行って、全長が 2250bp の新規遺伝子 *BDIF1*(brain-derived integrating factor1)の cDNA クローニングに成功した。ノーザンブロットングにて、*BDIF1* はラット脳、精巣および肝臓などに強く発現していることが示された。次に gap junction の 1 つで、アストロサイトで重要な働きを持つ connexin 43(Cx43)と *BDIF1* を HEK293 細胞に強制発現させ、免疫共沈を行い、両者が結合することを証明した。一方、同様の免疫共沈の実験により、Cx36 および Cx32 は *BDIF1* と結合しないことも証明している。さらに、ラット初代培養アストロサイトにおいて、免疫共沈により内因性の *BDIF1* と Cx43 が結合することを証明するとともに、免疫組織化学的染色の結果、*BDIF1* と Cx43 が初代培養アストロサイト細胞質内で共局在することを明らかにした。

本研究において、申請者は新規の GTPase-activating protein である *BDIF1* を発見し、アストロサイト細胞質内で Cx43 と結合していることを証明した。*BDIF1* がアストロイト細胞膜へのタンパク質輸送に重要な役割を果たしている可能性を示唆する重要な研究であることを審査委員会は高く評価した。

審査委員会では研究方法論を中心に詳細な質疑がなされ、申請者は妥当な回答をした。以上により、本論文は博士(医学)の学位の授与にふさわしいと審査員全員一致で評価した。

論文審査担当者 主査 岩下 寿秀  
副査 中原 大一郎 副査 間賀田 泰寛