

東邦大学審査学位論文（博士）の要旨

新規 addicsin 結合タンパク質 Tomoregulin-1 の同定

分子生物学部門（指導教員：藤崎真吾）

（外研先）（独）産業技術総合研究所（指導教員：池本光志）

荒野 拓

【序論】

Addicsin は、モルヒネ耐性依存形成候補因子としてマウス脳扁桃より我々の研究グループが単離・同定した新規因子である。Addicsin は、疎水性領域を持つ 23 kDa の可溶性タンパク質であり、脳を始めとする幅広い組織・器官に発現し、細胞内では主に小胞体に局在する。また、addicsin は、addicsin、EAAC1、Arl6ip1、 μ -opioid receptor、Reticulon 2B 等の多様な因子とホモ及びヘテロ複合体を容易に形成する。さらに addicsin は、細胞外グルタミン酸輸送能調節、小胞体輸送能調節、グルタチオン合成、細胞移動等の分子生理機能に加え、モルヒネ依存、統合失調症、アルコール耐性、癲癇等の神経疾患の発症にも関与する（図 1）。従って、addicsin は多様な複合体形成を介して生理機能を発揮すると考えられることから、その詳細な分子機序の解明は上記神経疾患の発症機序の解明に結びつくものと思われる。

本研究は、①新規 addicsin 結合因子の同定、②addicsin と同定因子の複合体形成が同定因子の生理機能に及ぼす影響を解析することで、addicsin の多彩な生理機能発現の分子機序の一端を解明することを目的として実施した。

【結果】

最初に、全長 addicsin を bait として用いた Yeast Two-Hybrid 法により、マウス E17 胎児 cDNA ライブラリーより新規 addicsin 結合因子 tomoregulin-1 (TR1) を同定した。TR1 は 2 個のフォリスタチン様ドメインと 1 個の EGF 様ドメインを持つ膜一回貫通型タンパク質であり、Nodal 及び BMP シグナルを阻害することが知られている。Addicsin 及び TR1 のマウス脳内における発現分布を RT-PCR 及び免疫組織化学実験により解析した結果、addicsin 及び TR1 は共に大脳、海馬等脳の各領域で発現しており、海馬では主に神経細胞から構成される錐体細胞層に発現分布していた。Addicsin-TR1 複合体の存在を実証する目的で、両因子を共発現させた COS-7 細胞ライセートならびにマウス全脳ライセートを用いて免疫沈降法を実施したところ、*in vitro* ならびに *in vivo* 双方の系において、addicsin-TR1 複合体の存在が確認された。また、両因子の部分欠損変異体を用いた免疫沈降法によって addicsin ならびに TR1 結合領域を同定したところ、TR1 は addicsin C 末端領域 145~188 アミノ酸配列、addicsin は TR1 226~288 アミノ酸配列に結合する事が明らかとなった。

次に、addicsin-TR1 複合体形成が addicsin 及び TR1 の細胞内局在に及ぼす影響を検討する目的で、COS-7 細胞内における addicsin 及び TR1 の細胞内局在を免疫細胞化学

法により検討した。TR1 を単独で発現させた場合、TR1 は細胞全体に分布していた。Addicsin を単独で発現させた場合、addicsin は小胞体に局在していた。同様に、addicsin を TR1 と共発現させた場合においても、addicsin の局在に変化は見られず、小胞体に局在していた。一方、TR1 及び addicsin を共発現させた細胞群では、TR1 の細胞内局在が細胞全体から小胞体に変化した。さらに、スクロースグラジエント法による TR1 細胞内局在解析を行った結果、addicsin との共発現によって、TR1 が小胞体マーカーであるカルネキシンと同一のフラクションに局在が変化し、免疫細胞化学法を支持する結果を得た。また、ビオチン化アッセイにより TR1 の細胞膜発現量を評価した結果、TR1 の細胞膜発現量は addicsin との共発現によって著しく抑制されている事が明らかとなった。

更に、addicsin-TR1 複合体の生理的意義を明らかにする事を目的として、addicsin の過剰発現が細胞移動能を抑制する報告に着目し、細胞移動能を創傷治癒アッセイにより解析した。まず、我々は Flp-In T-REx 293 細胞 (Invitrogen) を用いて addicsin、TR1、TR1 結合領域欠損 addicsin 変異体、addicsin 結合領域欠損 TR1 変異体をテトラサイクリン依存的に発現する安定細胞株を各々作製した。次に、これらの細胞株を用いて創傷治癒アッセイを実施した結果、細胞移動能は、addicsin の過剰発現により顕著に低下するにも関わらず、TR1 結合領域欠損 addicsin 変異体を過剰発現した場合、細胞移動能が有意に促進された (図 2、左パネル)。また、addicsin 結合領域欠損 TR1 変異体の過剰発現時には細胞移動能が有意に抑制される事が明らかとなった (図 2、右パネル)。

【考察】

本研究において得られた知見は、以下の 4 つである。

- [1] 新規 addicsin 結合因子として TR1 を同定した。
- [2] Addicsin は TR1 226~288 アミノ酸配列、TR1 は addicsin C 末端領域 145~188 アミノ酸配列に結合する。
- [3] Addicsin は小胞体から細胞膜への TR1 細胞内輸送を抑制する。
- [4] Addicsin 中の TR1 結合領域及び TR1 中の addicsin 結合領域は細胞移動能の制御に関与する。

これらの結果は、addicsin が addicsin-TR1 複合体形成する事で、小胞体から細胞膜への TR1 の細胞内輸送能と TR1 の細胞膜発現量を制御し、細胞移動能の変化を引き起こす事を示唆する。



図 1 Addicsin の生理機能

TR1 結合領域欠損 addicsin 変異体 Addicsin 結合領域欠損 TR1 変異体

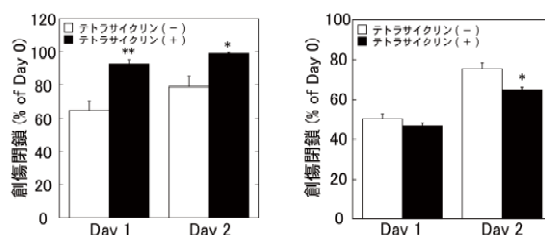


図 2 創傷治癒アッセイ

論文審査の要旨及び審査結果の要旨

2011年入学	研究分野 生物分子科学	氏名 荒野 拓
審査委員	(主査) 理学研究科准教授 (副査) 理学研究科教授 (副査) 理学研究科准教授 (副査) 産業技術総合研究所	藤崎 真吾 小林 芳郎 曾根 雅紀 池本 光志
(論文題目) Identification of tomoregulin-1 as a novel addicisin-associated factor (新規 addicisin 結合タンパク質 Tomoregulin-1 の同定)		
(論文審査の要旨及び審査結果の要旨) Addicisinは、モルヒネ耐性依存形成因子としてマウス脳扁桃体からサブトラクションクローニング法により同定された新規因子である。Addicisinは、神経細胞局在型グルタミン酸輸送体 Excitatory Amino-Acid Carrier 1 (EAAC1) と細胞死阻害因子 ADP ribosylation like actor 6 interacting protein-1 (Arl6ip1) と拮抗的にヘテロ二量体を形成し、EAAC1 細胞外グルタミン酸輸送能をダイナミックに制御する。また、addicisinは、EAAC1 の細胞膜輸送や細胞外システイン輸送能を制御することにより、細胞内酸化還元系の主要調節因子であるグルタチオン量を調節する。興味深いことに、EAAC1 の分子生理機能異常は、アルツハイマー病やパーキンソン病等の神経変性疾患の発症に関与することことが示唆されていることから、addicisin の生理機能異常は神経変性疾患発症の引き金となる可能性が高い。更に、addicisin 遺伝子欠損モデル生物を用いた行動薬理的解析により、addicisinは、モルヒネ依存、アルコール耐性、癲癇形成等の神経疾患発症に寄与することが明らかにされている。これまでの研究により、addicisinは、多様な因子と分子複合体を形成しての多彩な分子生理機能を発揮すると推察されているが、各分子複合体形成が上記神経疾患発症にどのように関与するかは全く不明である。加えて、多様な addicisin 分子複合体の全容と各分子複合体の生理的意義は殆ど解明されていない。従って、addicisin		

分子複合体の全容の解明と addicsin 分子複合体が担う分子生理機能の解明は、アルツハイマー病等の神経疾患の新規予防治療法や創薬開発において重要な知見を与えるものと推察され、重要な研究課題に位置付けられる。

本論文提出者は、addicsin 分子複合体と各分子複合体の生理的意義の解明を目的とし、(1) 新規 addicsin 結合因子の同定、(2) 新規 addicsin 複合体の生理機能解析を実施して以下に示す成果を得た。

(1) 新規 addicsin 結合因子の同定

- 全長 addicsin を bait として用いた Yeast Two-Hybrid 法により、マウス E17 胎児 cDNA ライブラリーから Nodal 及び BMP シグナル阻害因子である Tomoregulin-1 (TR1) を新規 addicsin 結合因子として同定した。
- 免疫沈降法や免疫組織化学法により *in vitro* および *in vivo* 系において、addicsin-TR1 複合体の存在を立証するとともに、免疫沈降法によって TR1 結合領域と addicsin 結合領域を明らかにした。

(2) 新規 addicsin 複合体の生理機能解析

- 免疫細胞化学法とビオチン化アッセイ法により、addicsin が TR1 細胞内局在を小胞体に限局させて TR1 の細胞膜輸送を阻害することを示した。
- 創傷治癒アッセイによる細胞移動能解析により、細胞移動能が、addicsin の過剰発現により顕著に低下し、TR1 結合領域欠損 addicsin 変異体の過剰発現により有意に促進すること、また addicsin 結合領域欠損 TR1 変異体の過剰発現時により有意に抑制されることを明らかにした。

これらの結果は、addicsin が addicsin-TR1 複合体形成して小胞体から細胞膜への TR1 の細胞内輸送能と TR1 細胞膜発現量を制御し、細胞移動能の変化を引き起こす事を示唆する。

従って、本論文提出者によるこれらの成果は、addicsin-TR1 分子複合体形成の生理的意義について新しくかつ有用な知見を与えるものである。よって荒野拓は、博士(理学)の学位を授与するに十分な資格があると認める。