

氏 名	たけむらまさあき 竹村理明
学位(専攻分野)	博 士 (理 学)
学位記番号	理 博 第 2553 号
学位授与の日付	平成 14 年 5 月 23 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
研究科・専攻	理学研究科化学専攻
学位論文題目	グリア繊維性酸性タンパク質 (GFAP) リン酸化の意義に関する研究

論文調査委員 (主査) 教授 伊藤維昭 教授 三木邦夫 助教授 白石英秋

### 論 文 内 容 の 要 旨

グリア繊維性酸性タンパク質 (glial fibrillary acidic protein:GFAP) はアストログリアの中間径フィラメント (intermediate filament:IF) の主たる構成タンパク質である。細胞骨格タンパク質の内、IF タンパク質は大きなタンパク質ファミリーを形成する特徴を持つ。ファミリーメンバーの各々は高い細胞種選択性を示し、細胞系譜のマーカー分子として利用されると同時に、特定の細胞種で固有の役割を担うと考えられる。近年、IF タンパク質が高度にリン酸化される事、リン酸化とフィラメントの脱重合との関係等が報告され、IF タンパク質のリン酸化の意義に関心が注がれてきた。しかしながら、多くの研究は培養細胞系や無細胞系で為されており、動物個体での IF タンパク質リン酸化の意義については未知の部分が多い。申請者は、動物個体での GFAP リン酸化の動態を明かとし、さらに遺伝学的手法で GFAP リン酸化の意義を検証する事を目的として本研究を行った。

動物個体での GFAP のリン酸化の動態を追跡する手段として、リン酸化 GFAP 特異的抗体の利用が有用である。リン酸化 GFAP に対する複数の抗体が既に開発されているが、それらはヒト GFAP と反応するもののマウス GFAP と殆ど反応性を示さない。この問題を解決するために、発生工学的手法でマウスの *Gfap* 遺伝子の内、リン酸化部位が集積するヘッドドメインをヒト型化した *Gfaphwt* ノックインマウスを作製した。このノックインマウスと抗リン酸化ヒト GFAP 特異的モノクローナル抗体を利用した免疫組織化学的方法で、リン酸化 GFAP のマウス個体内での局在を初めて可視化することに成功し、体系的に解析した。リン酸化 GFAP は脳の限られた領域および細胞集団でのみ検出された。GFAP のリン酸化状態は、アストロサイトの多様性を示した。リン酸化 GFAP が検出される細胞は、成熟アストロサイトであり、その分布は細胞突起に局在した。培養細胞系での実験結果と異なり、動物個体内では、細胞分裂との関連が見い出されなかった。

GFAP のリン酸化の意義を直接的に評価する手段として、ヘッドドメインに存在する 5 個のリン酸化部位 (セリン/スレオニン) をアラニンに置換したマウスをノックイン法で作製した。ヘッドドメインに存在する 5 箇所のリン酸化部位全てを置換した Hm3-GFAP を発現する *Gfaphm3/hm3* マウスでは、GFAP のタンパク量およびフィラメント構造共に著しい減少を認めた。一部のアストロサイトでは、このような観察がされなかったが、ビメンチン欠損マウスと交配して得た 2 重変異マウスでは、これらのアストロサイトでも表現型が顕在化した。ビメンチンとは、IF タンパク質の一つであり、一部のアストロサイトで発現する事が知られている。各々 3 箇所ずつのリン酸化部位を異なった組み合わせで置換した他の 2 系統の変異マウスでは、異なった表現型を示した。初代培養アストロサイトを用いたパルスチェイス実験の結果、ビメンチン非存在下において、Hm3-GFAP は野生型 GFAP に比して分解速度が早い事が明かとなった。これらの結果は、GFAP のリン酸化がその代謝分解を調節する事を示し、さらに、その調節にはビメンチンとの相互作用が関与する事を示している。得られた成績に既報の成績を加味して GFAP のリン酸化の意義を考察し、成熟アストロサイトの構造的可塑性の制御に関わる事を示唆した。

## 論文審査の結果の要旨

本研究は、中間径フィラメント (intermediate filament: IF) タンパク質の生体内でのリン酸化が果たす役割について、初めて直接的な検証を加えようとしたものであり、顕著な成果を含んでいる。グリア繊維性酸性タンパク質 (glial fibrillary acidic protein: GFAP) はアストログリアの IF の主たる構成タンパク質であるが、他の IF タンパク質ファミリーと同様に、そのアミノ末端ヘッドドメインに複数のリン酸化部位を持つことが明らかにされている。その意義については、試験管内での実験もしくは培養細胞での過剰発現実験により、フィラメントの重合と脱重合の調節、これに基づいた細胞質分裂の制御への関与が議論されてきた。申請者は、まずリン酸化部位が集積するヘッドドメインをヒト型化した *Gfaphwt* ノックインマウスを作製することにより、抗リン酸化ヒト GFAP 特異的モノクローナル抗体を利用した免疫組織化学的方法でリン酸化 GFAP のマウス個体内での局在の解析を可能にした。その解析の結果は、GFAP のリン酸化は生体内では細胞分裂の制御ではなく、成熟アストロサイトにおいて意義を持つ可能性を示唆した。さらに、リン酸化部位 (セリン/スレオニン) を組み合わせを変えてアラニンに置換した変異マウスを 3 系統樹立した。この内、全てのリン酸化部位をアラニンに置換したマウスは、さらにビメンチン欠損変異マウスと交配し、2 重変異マウスを得た。これらの脳における GFAP タンパク量および GFAP フィラメント形成能を解析し、さらに初代培養アストロサイトでのパルスチェイス実験を行った結果、GFAP のリン酸化がその代謝分解を調節する機構に関与する事を示した。また、GFAP の代謝およびフィラメント、構造の構築における GFAP とビメンチンの相互作用の存在を明白に示した。また、3 種の置換変異体の比較解析に基づいて、個々のリン酸化部位が GFAP の動態において異なった役割を果たす事を示唆した。申請者は GFAP のリン酸化の意義について考察し、GFAP-のリン酸化が成熟アストロサイトの構造的可塑性の制御機構を担い、これを介してアストロサイトの機能の一端を制御するとの考えを提唱した。また、この研究は、*in vitro* の実験によって築かれた仮説を *in vivo* で検証する事の重要性も指摘している。

以上、本研究は、GFAP はもとより、細胞骨格の主要因子である IF タンパク質の代謝経路と機能の理解に重要な貢献をもたらした。よって、博士 (理学) の学位論文として価値あるものと認める。なお、主論文に報告されている研究業績を中心として、これに関連した研究分野について諮問した結果、合格と判定した。