

氏名	モハマド Mohammad Rubayet Hasan
学位の種類	博士(情報工学)
学位記番号	情工博甲第175号
学位授与の日付	平成18年3月23日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位論文題目	Studies on the microtubule binding, and associated properties of ferritin and a neural variant of microtubule-associated protein 4 (フェリチンと神経特異型微小管結合タンパク質4の微小管結合特性に関する研究)
論文審査委員	主査 教授 宮本 茂 昭 教授 仁川 純 一 教授 藤居 仁 助教授 安永 卓 生 教授 小谷 享 (神奈川大学)

## 学位論文内容の要旨

真核細胞はその細胞骨格の形成・再編を通して高次機能を発現している。微小管は細胞骨格の主要なメンバーの一つで、細胞内の物質輸送、細胞分裂および形態変化の際に重要な役割を果たしている。微小管は $\alpha$ 、 $\beta$ の2種のチューブリン(tubulin)分子の重合により形成され、その機能は微小管結合タンパク質(MAP)に依存している。これまで、モータータンパク質や既知の数種のMAPなど微小管と相互作用するタンパク質については多くの研究が行われてきた。しかし、まだ未知のMAPの存在が予想されている。

この研究では、2種のタンパク質に焦点をあてて、その機能解明を行った。第1章では鉄イオンを貯蔵する性質を持つフェリチン(ferritin)について、第2章は神経細胞に特異的に発現するMAP4の変異体(MAP4SP)についての報告である。

- (1) この研究で単離した第1の新MAPはアミノ酸配列の解析結果より、従来のフェリチンと同一であることがわかった。また、電気泳動速度、免疫学的性質および形態を比較しても、全く区別がつかないことがわかった。さらにこの新MAPはフェリチンと同様に鉄イオンを蓄えたり、遊離させたりする性質を持つこともわかった。これらのことより、第1の新MAPはフェリチンと同一のタンパク質であると決定した。フェリチンは分子量がおおよそ250KDaのタンパク質で、哺乳類の細胞にはあまねく存在している。また、細胞内でも試験管内でも微小管には結合するが、チューブリンを重合させる性質はない。
- (2) 次に電子顕微鏡とin-vitro実験による解析から、フェリチンは微小管とオリゴマー(重合体)を形成して結合していること、微小管に結合したフェリチンは結合していないものと比べて鉄を貯

蔵する能力が2倍以上に増加することを明らかにした。

(3) 間接蛍光抗体法による顕微鏡観察により、多くの培養細胞では、フェリチンの大部分は微小管と共局在すること。このオリゴマーの数は、鉄イオンを含む培地で処理すると減少すること。さらに通常の培地に戻すと、元通りに回復すること。人の肝腫瘍細胞(hepatoma cell)では、ローダミンで標識したフェリチンは容易にオリゴマーを形成すること。この細胞を鉄イオンに曝すと、オリゴマーは分解してフェリチンが細胞質に分布すること。などを明らかにした。

以上の結果は、フェリチン分子は細胞内で微小管と結合することによりダイナミックなオリゴマーを形成すること。したがって、微小管は細胞内で、フェリチンと相互作用することで鉄の代謝過程で重要な役割をしていることを示している。

この研究の第2章では最近報告された神経細胞に特異的に発現するMAP4の変異体MAP4SPの機能の解析を行った。

(1) 通常のMAP4LPの1次構造と比較すると、変異体はproline rich領域の連続した72個のアミノ酸が欠損している。この研究でfull lengthのMAP4LPと比較すると、変異体のMAP4SPは微小管を束ねるといふ点では差がないことがわかった。

(2) 神経成長円錐においてはMAP4SPはMAP4LPに比べ注目すべき性質を示した。GFP-MAP4SP (Green fluorescence protein 融合 MAP4SP)は、FRAP (fluorescence recovery after photo-bleaching) 解析によると微小管上では、GFP-MAP4LPに比べ、速い速度で回復を示した。このことは微小管表面と細胞質の間をMAP4SPは速いrateで交換をしていることを示している。この成長円錐でのMAP4SPの挙動は微小管と弱い結合によるか、またはseptinのような他のタンパク質の関与によると考えられる。Septinは最近発見されたタンパク質で、MAP4のpro-rich領域と相互作用することが知られている。

以上のことを総合すると、神経特異的MAP4SPは神経細胞の成長円錐での微小管のダイナミックな作用を維持していること。さらにこのことは神経細胞の可塑性や速い形態変化を可能にする重要な役割を果たしていることがわかった。

## 学位論文審査の結果の要旨

本研究は細胞内の代表的な細胞骨格である微小管に結合する新奇のタンパク質の同定と、微小管との結合様式および機能の解明を行ったものである。

第1章では、分子量250KDaの微小管結合タンパク質(MAP)は鉄を貯蔵するタンパク質として知られているフェリチンであることを確定している。第1に遺伝子解析の結果より、第2に電気泳動および抗原抗体反応によりフェリチンであることを同定している。このフェリチンの細胞内での存在様式は電子顕微鏡による観察と間接蛍光抗体法によりいくつかの点が明らかにされた。(1) 微小管との結合は、単分子ずつが結合するのではなくオリゴマー(集合体)を形成して結合していること。(2) フェリチン1分子あたりの鉄の貯蔵能力は、微小管に結合している場合の方が、結合していない場合に比べ、2倍以上に増加することを明らかにした。さらに生体内で鉄を貯蔵する働きをしている臓器である肝臓に着目して、その腫瘍細胞から樹立された細胞株(hepatoma cell)についてフェリチンと

微小管の関係を明らかにした。鉄の豊富な培地で培養すると、フェリチンが微小管からはずれて細胞質に分布すること。鉄を含まない培地で培養するとさらに大きなオリゴマーを形成して微小管に結合して存在することを明らかにした。これらの事実はフェリチンと微小管の相互作用が生体内の鉄の代謝に関与することを示した最初であり、医学的にも重要な意味をもつ。

第2章では、神経細胞に特異的に発現する MAP4 の変異体 MAP4SP の構造・機能について以下の点を明らかにした。(1) Wild type の MAP4(MAP4LP)に比べ、MAP4SP は proline rich 領域のアミノ酸が 72 個欠落していること。しかしながら微小管を束ねる機能においては両者に差がないこと(2) 神経突起先端の成長円錐にそれぞれの GFP との融合体を発現させることにより、FRAP による解析を行っている。その結果 MAP4SP は MAP4LP に比べ速い rate で回復することを明らかにした。このことは成長円錐の伸長時には微小管細胞骨格の再編が速いスピードで行われねばならぬことの分子基盤をあたえることを明らかにしたという点で重要である。

以上のようにこの研究においては新たな発見および考え方の提唱が行われている。したがってこれらの内容は学位(情報工学)に値すると判定した。

また、公聴会においても、出席者からフェリチンオリゴマーの鉄の蓄え方、データベース検索からの遺伝子解析と分子構造との関係等について質問が出された。いずれに対しても著者からの的確で明快な説明がなされ理解がえられた。

以上により、論文調査および最終試験の結果にもとづき、審査委員会において慎重に審査した結果、本論文が、博士(情報工学)の学位に十分値するものであると判断した。