

平成 22 年 6 月 16 日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2008 ～ 2009

課題番号：20790292

研究課題名（和文） 脳神経機能に關与する TPR モチーフタンパク複合体の機能解明

研究課題名（英文） Functional analysis of the proteins with TPR motifs which are associated with the cerebral nerve function

研究代表者

泉山 朋大（IZUMIYAMA TOMOHIRO）

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：80424183

研究成果の概要（和文）：

本研究では、脳神経機能に關与する可能性のある TPR モチーフタンパクとして TPRBK タンパクについて、主に以下の研究を実施した。

- (1) TPRBK タンパクと相互作用するタンパク質の同定
- (2) 相互作用タンパクの機能ドメイン探索
- (3) 蛍光抗体染色法を用いた細胞内局在解析

その結果、

- (A) TPRBK は細胞分裂に關連するタンパク質 X,Y と相互作用する
- (B) TPRBK は細胞分裂期に中心体極から中央体へ局在を変える
- (C) TPRBK は細胞質分裂機構に關与する

の 3 つの研究成果が得られた。

研究成果の概要（英文）：

We studied about TPRBK protein which were highly expressed in human and mouse brain tissue and embryonic tissue of medaka. We carried out coimmunoprecipitation analysis to identify proteins which interact with TPRBK protein and immunofluorescence assay by using anti-TPRBK antibody. These studies revealed that: First, TPRBK interacts with X and Y which are associated with the function of cell division. Second, the localization of TPRBK is changed from centrosomes to the midbody during mitosis and cytokinesis. Third, TPRBK associates with the system of cytokinesis.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2009 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・人体病理学

キーワード：脳・神経

## 1. 研究開始当初の背景

TPR モチーフは、34 アミノ酸残基からなり、多くの場合タンパク質中に複数の TPR モチーフが存在する。この TPR モチーフは特徴的な立体構造をとり、タンパク質複合体形成に関与している。TPR モチーフは、細胞周期調節、転写制御、細胞内タンパク質輸送、糖鎖修飾、神経発生及びタンパク質の折りたたみなど様々な細胞機能に関わる多くのタンパク質に確認されており、さらに Bardet-Biedl 症候群やファンコニ貧血症等の疾患、家族性パーキンソン病や失読症等の脳神経疾患の発症にも関与が示唆されている。

申請者は、所属教室が 1999 年に英・米との共同研究で完了したヒト 22 番染色体長腕全長 33.4Mb のシーケンシングの後、引き続き 22 番染色体全遺伝子の構造解析、機能の解明を目指して行った解析の中で、22q12.1 領域内に *TPRBK* (TPR-containing Big gene cloned at Keio) を同定した。TPRBK 遺伝子は、ヒト及びマウス胎児期の広範な組織、特に脳と心臓で mRNA の発現量が多いこと、ヒト神経芽細胞腫由来細胞 SH-SY5Y でタンパク質 (~270kDa: 2481aa) の発現が確認されたこと、さらに統合失調症、双極性障害、家族性てんかんの候補領域中に存在することから、脳神経機能に関わっている可能性が考えられた。これらの理由により、TPRBK を本研究の対象タンパクの一つとして機能解析することとした。また、機能未知の TPR モチーフタンパクが未だ多く存在する (FLJ12788, FLJ13946, TTC6, TTC7, TTC21 等) ことから、これらの中にも脳神経機能に関与するタンパク質がいくつか存在する可能性が考えられる。今後、これらタンパク質においても機能解析を行い、脳神経疾患との関連について明らかにし、発症機序解明をめざす。

## 2. 研究の目的

Tetratricopeptide repeat (TPR) モチーフは、34 アミノ酸残基をコンセンサス配列とし、タンパク質が複合体を形成する際のタンパク質間相互作用に関与している。近年、TPR モチーフが細胞の恒常性維持機能に関わる例や、さらにいくつかの関連疾患において遺伝子変異から生じる TPR モチーフの欠損によりタンパク質複合体が形成されず、発症に

至るという例も報告されている。このように、TPR モチーフは複合体形成に重要な役割を果たしており、TPR モチーフとの関連の考察からこれらタンパク質複合体の構成機構が明らかになれば、疾患の解明にも大きな手掛かりとなる。本研究では、TPR モチーフを介したタンパク質-タンパク質間相互作用機構の解明の一環として、脳神経機能に関与する TPR モチーフタンパクを対象とし、それらと相互作用するタンパク質の同定、これらタンパク質複合体の機能解析を行うことにより、脳神経疾患に関連する TPR モチーフタンパクを新たに発見し、その疾患の発症機序解明を目的とする。

## 3. 研究の方法

本研究では、タンパク質-タンパク質間相互作用解明の一環として、脳神経機能に関与する TPR モチーフタンパクを対象とする。解析法の一例として、これまでのヒト・マウス各種組織由来の cDNA を用いた遺伝子発現解析及びメダカ胚のステージ別 cDNA を用いた発現解析により脳神経機能との関連性が示唆された TPRBK を対象とし、相互作用タンパクの同定、同定されたタンパク質に対するコンピュータ上での機能ドメイン探索、欠失変異体を用いた相互作用部位の特定、細胞内局在解析等、*in silico* 解析と *in vitro*, *in vivo* 実験の両面から機能解析を行う。解明された TPRBK 複合体の機能から、関与する脳神経系機能について考察し、発症する可能性のある脳神経疾患の特定、発症機序の解明をめざす。具体的な内容について、以下に述べる。

### (1)TPRBK と相互作用するタンパク質の同定

TPRBK の発現量が多い組織や培養細胞について、RT-PCR 法及びウェスタンブロット法を用いて調べる。高発現が確認された組織・細胞から抽出したタンパク質をプレートとして、抗 TPRBK 抗体またはタグ抗体により免疫沈降を行う。さらに、共沈降するタンパク質について質量分析機でアミノ酸配列解析を行い、BLAST を用いた同源性検索により、相互作用タンパクを同定する。

## (2)相互作用タンパクの機能ドメイン探索

同定された相互作用タンパクについてモチーフ検索プログラムを用いて既知の機能ドメインを探索する。また、機能ドメインが全く検索されなかった場合でも、まずそのタンパク質のオルソログ解析を行い、それらオルソログのアミノ酸配列間での保存領域に対して TBLASTX を用いて相同性探索を行う。検索された他のタンパク質で機能の共通性が見られた場合、対象とした TPRBK タンパク複合体の機能推察に役立つ。

## (3)TPR 欠失変異体を用いた相互作用部位の特定

実際に相互作用に關与する TPR モチーフ部位を明らかにするため、様々な位置の TPR モチーフ欠失変異体を作製し、相互作用タンパク質が共沈降する変異体を免疫沈降法により調べる。

## (4)培養細胞を用いた蛍光抗体染色による局在解析

TPRBK タンパク及び相互作用タンパクが発現している培養細胞を用いて、それらタンパク質の細胞内局在を調べるため、蛍光抗体染色法による細胞の顕微鏡観察を行う。また、siRNA を用いて TPRBK や相互作用タンパクの発現を抑制し、その時に生じる局在変化や細胞の表現型変化について解析する。

## 4. 研究成果

今回の研究では、今後この研究課題に対する解析法の一例として、TPRBKについて研究を行った。この遺伝子は、これまでに筆者が行ったヒト・マウス各種組織由来のcDNAを用いた遺伝子発現解析において、特に胎児脳組織で高発現が確認され、またゲノム上でいくつかの脳神経疾患の候補領域に存在していること等から、脳神経機能に關与する可能性が考えられた。今回の研究で得られた具体的な成果について、以下に記述する。

### (1)TPRBKは細胞分裂機構関連タンパクX, Yと相互作用する

まず、TPRBKタンパクの発現が確認されたHeLa細胞やCOS7細胞(アフリカミドリザル由来)から抽出したタンパク質に対し、抗TPRBK抗体を用いて免疫沈降を行ったところ、タンパク質X及びYが共沈降することがわかった(論文投稿準備中)。Xは細胞分裂機構のいくつかの場面において非常に重要な役割を担っていることが既に明らかになっており、

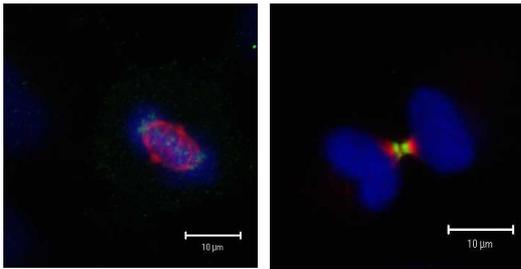
関連タンパク質も多く存在する。従って、それらのタンパク質とも相互作用する可能性があるため、そのうちのいくつかに対しても免疫沈降法で調べたが、共沈降は確認されなかった。一方、抗X抗体を用いた免疫沈降でも、TPRBKの共沈降を検出できたことから、これら二つのタンパク質が相互作用することはほぼ確実であると思われる。以上の結果から、TPRBKがさらにこれまでに報告されている他の関連タンパク質と複合体を形成して、それらタンパク質の機能に關わる可能性もあるが、TPRBK-Xという新たな複合体が存在し、その複合体が細胞分裂機構の中で重要な機能を担っている可能性も十分考えられ、この二つのタンパク質間の相互作用が明らかになったことは、細胞分裂機構を解明する上で非常に意義深いと思われる。

また、TPRBKとの相互作用が確認されたもう一つのタンパク質Yは、機能未知のタンパク質であった。モチーフ検索の結果、このタンパク質には3種類の機能既知ドメインが含まれており、そのうちの一つのドメインが細胞増殖やアポトーシス等の機能に關連するタンパク質に多く存在することがわかった。このドメインの關連機能から推察すると、Yも細胞増殖や細胞分裂機構に關わる可能性が考えられた。

### (2)TPRBKは細胞分裂期を通して中心体から中央体へ局在を変える

免疫沈降法による相互作用タンパクの同定実験から、TPRBKは細胞分裂期に機能を果たしていることが予測されたので、HeLa細胞及びCOS7細胞をDouble-thymidine block法により細胞周期M期に同調させ、抗TPRBK抗体を用いて細胞内局在解析を行った。その結果、このタンパク質はG1~S~G2期では中心体に局在しているが、M期前中期では中心体極及び紡錘体、後期ではspindle midzoneと局在を変え、核分裂後に起こる細胞質分裂期では中央体に局在することがわかった(図1参照)。中央体は細胞質分裂において細胞の切断に關わる構造体として知られることから、TPRBKが細胞分裂の終局における重要な局面で機能している可能性が示唆された。さらに、TPRBKとX及びYについて二重染色を行い、主にM期後半においてTPRBKとXが共局在すること、また機能未知タンパクYが細胞質分裂期に中央体の中心部に形成されるFlemming bodyに局在していることが明らかとなった。

以上の結果を考えると、TPRBKとその複合体は細胞分裂機構の後半、細胞の切断機構に關与している可能性が高いと考えられ、切断のメカニズムを解明する手掛かりになることが期待される。



細胞分裂期中期 細胞質分裂期  
 図1 細胞分裂期におけるTPRBKとXの細胞内局在  
 (赤：TPRBK、緑：X、青：染色体)

### (3)TPRBKは細胞質分裂機構に関与している

細胞内局在解析において、TPRBK複合体が細胞質分裂機構に関与している可能性が高いと考えられたので、その機能を実証するため、次にsiRNAを用いたTPRBK発現抑制実験を行い、その後生じる細胞形態変化について観察した。その結果、TPRBK siRNA処理細胞において、核分裂は完了したがその後の細胞質分裂が完遂せず、一つの細胞内に二つの核が存在する状態の細胞が多く観察された。さらに、詳細に観察すると、分裂溝が形成され細胞質分裂期に入っているにもかかわらず、中央体構造が形成されていない細胞も見られた(図2参照)。また、これらの細胞ではTPRBKと相互作用するXやYの局在も見られなかった。以上の結果から、TPRBKは主に細胞質分裂機構に関与していることが明らかになった。

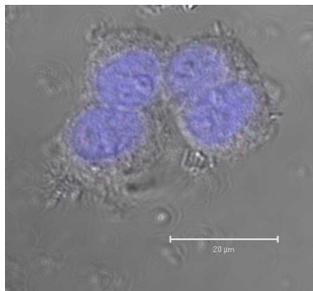


図2 TPRBK発現抑制時に見られた表現型の異常

今回ターゲットとしたTPRBKについて明確な機能解明には至らなかったものの、細胞分裂に関連のある新規タンパク質を二つ同定し、それらが細胞質分裂機構に関与していることを明らかにできた。それにより、未だ詳細が不明な細胞分裂の終局に位置する細胞の切断という、生物にとって重要な現象の一つを解明する手掛かりを得られると思われる。現在、TPRBKとタンパク質X,Yとの具体的な相互作用部位を調べるため、TPR欠失変異体を作製し、これらを用いて免疫沈降法による相互作用部位の特定を進めている。今後、細胞質分裂機構におけるさらに具体的な機能を

明らかにし、TPRBKの機能欠損により発症する可能性のある疾患を推察するため、マウス・メダカ胚を用いてTPRBKノックダウン時の表現型について*in vivo*解析を行いたいと考えている。また、特に胎児脳での発現量が多いTPRBKの上記機能と脳神経機能との関連について考察するため、マウス胎児脳組織でのこれらタンパク質の発現時期や発現場所についても解析したい。

今回の研究成果は、この研究課題に対する解析法として、参考となる点が多くあり、十分な意義を持つものと思われる。機能未知のTPRモチーフタンパクは未だ多数存在しており、今後これらに対しても同様の解析法を用いてその機能を明らかにし、その中から脳神経機能に重要な関わりを持つタンパク質を探し出したいと考えている。

### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計0件)

〔学会発表〕(計2件)

泉山 朋大、ヒト 22 番染色体由来の新規タンパク TPRBK は中心体の機能に関与している、BMB2008 (第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会 合同大会)、2008 年 12 月 9 日~12 日、神戸ポートアイランド

泉山 朋大、ヒト 22 番染色体由来の新規タンパク TPRBK の性状解析：細胞分裂への関与、第 32 回日本分子生物学会年会、2009 年 12 月 9 日~12 日、横浜みなとみらい

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕  
 出願状況 (計0件)

名称：  
 発明者：  
 権利者：  
 種類：  
 番号：  
 出願年月日：  
 国内外の別：

取得状況 (計0件)

名称：  
 発明者：  
 権利者：

種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等  
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

泉山 朋大 (IZUMIYAMA TOMOHIRO)  
慶應義塾大学・医学部・助教  
研究者番号：80424183

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし