

論文の内容の要旨

論文題目 卵細胞のアクチン細胞骨格形成における
低分子量 G タンパク質 Rho ファミリーの役割

氏名 西村有香子

アクチン細胞骨格のダイナミクスは細胞が営む様々な生命現象においてなくてはならないものである。細胞の増殖、移動、形態形成時には、アクチン細胞骨格は消滅したり、新たな構造を形成したりして、これらの現象で主要な働きをする。このダイナミックな構造変化がどのように制御されているのか調べるために、本研究ではウニ卵細胞を用いた。この細胞は、生化学的解析、細胞生物学的解析が容易であり、古くから細胞骨格を調べるためのモデル細胞として用いられてきた。

近年、細胞内のアクチン細胞骨格の制御に低分子量 G タンパク質の Rho ファミリータンパク質が関与していることが分かってきた。このタンパク質は、GDP と結合すると不活性型に、GTP と結合すると活性型となって下流にシグナルを伝えるスイッチ分子である。ウニ卵においても細胞質分裂時の収縮環中の F-アクチンの再配列の制御に、Rho タンパク質が関わっていることが示唆された (Mabuchi et al., 1993)。そこで、私はウニ卵の初期発生時に Rho ファミリータンパク質がどのようにアクチン細胞骨格を制御しているかについて解析を行った。第一部では Rho の機能を調べるため、抗体を作成し局在を観察したことについて、また、第二部で

は Cdc42 がウニ卵抽出液中でアクチン重合を引き起こすことを見出し、その解析を行った結果について述べる。

第一部 ウニ卵における Rho タンパク質の局在

近年、Rho ファミリータンパク質が細胞質分裂において、重要な役割を持っていることが明らかになってきた。Rho ファミリーのうちの Rho を特異的に阻害する効果のある C3 酵素をウニ卵 (Mabuchi et al., 1993) やカエル卵 (Kishi et al., 1993) に顕微注入すると収縮環構造の形成が阻害されることが分かった。このことから Rho が細胞質分裂において何らかの役割を担っていることが示唆された。そこで Rho の局在を知るためにヒト RhoA をプローブとして単離されたウニ Rho 遺伝子 *urho1* を用い、リコンビナントタンパク質を作成し、これを抗原として抗 URho1 抗体を作製した。まず URho1 の局在をイムノプロットングによって調べた。URho1 は未受精卵、受精卵共に、細胞質画分よりも表層画分に多く存在していることが分かった。次に細胞表層からの溶出実験を行った。多くの URho1 が界面活性剤で可溶化されることが分かった。そこで URho1 は細胞膜に直接結合して機能していることが示唆された。

次に、バフウニ卵とアカウニ卵を用いて、第一分裂時の各ステージの卵を固定し、抗 URho1 抗体、ローダミンファロイジン、DAPI を用いて染色を行った。URho1 は細胞分裂後期の終わりまで、細胞全体に広がって存在し、特に局在している様子は観察されなかった。細胞質分裂期に収縮環が形成され卵がくびれ始めると、URho1 は分裂溝部分に徐々に集積し始め、収縮がさらに進むと URho1 はリング構造を形成した。このリング構造は分裂終了時にも残っており、次の細胞周期になっても消えなかった。また、このリング構造は二つの割球間から伸びている intercellular bridge と呼ばれる微小管構造の中央 (midbody) に位置していることが明らかになった。

URho1 がどのような状態でこの部分に集積しているのかは抗体を用いた実験だけでは示すことができないが、最近、Rho の標的タンパク質が同様に分裂溝に集積することが報告されていることから、活性型の状態で分裂溝部分に存在して下流にシグナルを伝え、収縮環の制御に働いていると考えられる。また、URho1 がいつまでも midbody に残っている機構やその生物

学的意味についてはよく分からないが、この部分に Rho の標的タンパク質も濃縮されていることから midbody において何らかの機能を担っている可能性がある。

第二部 ウニ卵抽出液中で Cdc42 が誘導するアクチン重合の解析

多くの生物で Rho ファミリーの Cdc42 は細胞の極性や filopodia の形成などのアクチン細胞骨格系の制御に働いていることが分かってきている。ウニ卵のアクチン細胞骨格の制御機構にも Cdc42 が重要な役割を果たしているのではないかと考え、この分子のウニ卵における働きを調べた。ウニ *cdc42* cDNA のクローニングを行い、その遺伝子 *ucdc42* を単離した。イムノプロットングによる解析から、UCdc42 は URho1 と同じように、表層画分により多く存在し、表層に直接結合していることが示唆された。さらに、UCdc42 の標的タンパク質を同定する目的で UCdc42 アフィニティービーズをウニ卵抽出液中でインキュベートしたところ、活性型特異的にビーズ周囲にアクチンのアグリゲーションが観察された。この現象を解析するため、アクチン重合アッセイシステムを開発した。さらに UCdc42 の下流でアクチン重合を誘導するタンパク質を同定するため、活性型特異的に結合するタンパク質を検索した。その結果、分子量 180kDa、100kDa、80kDa、65kDa、60kDa のタンパク質が得られた。これらのタンパク質の部分アミノ酸配列の解析を試みたところ、180kDa タンパク質 (以下 p180) はヒト IQGAP1 と、また 65kDa、60kDa タンパク質はマウスの p21-activated kinase1 (PAK1) とそれぞれホモロジーがあった。IQGAP、PAK は共に Cdc42 の活性型に結合してアクチン細胞骨格に働く標的タンパク質として様々な動物種で同定されている分子である。

このうち p180 の解析を行うため、抗体を作製した。得られた抗体で、細胞分画実験を行った。p180 は卵表層画分にも細胞質画分にもほぼ等量含まれており、細胞周期を通じてその量に変化はなかった。また p180 と F-アクチンとの関係を調べるため、溶出実験と F-アクチンとの共沈実験を行った。表層画分中の p180 は F-アクチンが脱重合すると一緒に溶出されてきた。また、抽出液を F-アクチンとインキュベートすると、p180 の多くが沈殿画分に落ちていくことが分かった。これらの結果より、p180 は F-アクチンに直接的あるいは間接的に結合していることが示唆された。次に、ウニ卵抽出液から p180 を免疫吸収除去し、アクチン重合ア

ッセイを行った。その結果、p180 を除去したものではアクチン重合が起こらないことが分かった。p180 は UCdc42 の誘導するアクチン重合に関して何らかの役割を行っていることが明らかになった。この役割について、いくつかの可能性が考えられる。第一には p180 それ自身がアクチン重合の引き金を引いている可能性である。第二は、p180 がアクチン重合因子が結合し、それらが活性化するための足場となって働く可能性である。第三は、p180 は UCdc42 ビーズ上で抽出液中のアクチンフィラメントを結合し、そこからさらにアクチンが重合する可能性である。

さらに、抗 p180 抗体を用いて第一分裂時のウニ卵における p180 の局在を観察した。全卵の染色像では、細胞質分裂が始まる前まで p180 は卵全体に拡散しているように見えた。細胞質分裂時になると、p180 は F-アクチンとほぼ同時期に細胞の赤道面表層直下に集積しはじめた。そして F-アクチンも p180 も同様に同じ位置にリング構造を形成した。また、表層を単離して未受精卵、受精卵、細胞質分裂時の p180 の局在を観察した。P180 の局在は F-アクチンの局在と非常によく似ており、p180の方がわずかに細胞質側にパッチ状に存在していることが多かった。また、分裂期には収縮環全体を取り囲むようにパッチ状の局在が観察された。*in vitro*の実験結果と考えあわせると、p180 は受精時の卵表層や分裂溝部分で上流因子 (UCdc42) によって活性化され、アクチン重合を誘導している可能性がある。*in vitro* で UCdc42 が誘導するアクチン重合は非常に早く、5-10 分程で UCdc42 ビーズの周囲に目に見える位の重合が起こるので、ウニ卵の細胞質分裂中に同様の重合反応が起こることは充分あり得ると思われる。