

論文審査の結果の要旨

論文提出者氏名 西村有香子

本論文は2章からなり。第1章はウニ卵におけるRhoの局在について、第2章はウニ卵抽出液中でCdc42が誘導するアクチン重合について述べられている。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—細胞の増殖、移動、形態形成等においてなくてはならないものである。ウニ卵は、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いる。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。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。しかしこれらのシグナル伝達の詳しい分子メカニズムについては分かっていない。そこで、提出者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。

1. ウニ卵におけるRhoタンパク質の局在

Rhoの局在を知るためにウニのRhoタンパク質URho1の抗体を作製し、まずURho1の局在をイムノブロットングによって調べた。URho1は細胞質画分よりも表層画分に多く存在し、表層画分からの溶出実験では多くのURho1が界面活性剤で可溶化されてくることから、URho1は細胞膜に直接結合して機能することが示唆された。

次に、蛍光抗体法による局在の観察を行った。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、intercellular bridgeと呼ばれる微小管構造の中央(midbody)にリング構造を形成した。このリング構造は次の細胞周期になっても消えなかった。

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。

2. ウニ卵抽出液中でCdc42が誘導するアクチン重合の解析

Rhoファミリーのうちの一つ、UCdc42 (sea urchin Cdc42) の活性型がウニ卵抽出液中でアクチンを重合させるという現象を見い出した。このシグナル伝達経路

で働くタンパク質の同定を試みた。アフィニティーカラムを用い、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、幾つかのタンパク質が見い出された。このうち、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。しかしアクチン重合に関与しているかどうかは不明である。

次に、p180の解析を行うため、抗体を作製した。p180とF-アクチンとの関係を調べるため、表層画分からの溶出実験と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条件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くることが分かった。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、*in vitro*でアクチン重合が起こるかどうかを調べた。p180を除去したものではアクチン重合が起こらなかった。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。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おり、細胞質分裂時になるとF-アクチンとほぼ同様に細胞の赤道面表層直下に集積しはじめ、リング構造を形成した。未受精卵、受精卵、細胞質分裂時の表層上のp180の局在を詳細に観察したところ、P180の局在はF-アクチンの局在と非常によく似ていた。また、分裂期には収縮環のF-アクチンの周りにパッチ状に観察された。*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。

なお本論文第1章は中野賢太郎、馬淵一誠との共同研究であるが、論文提出者が主体となって研究を行ったもので、論文提出者の寄与が充分であると判断する。従って、博士(学術)の学位を授与できると認める。