

論文の内容の要旨

論文題目 Studies on functions of IQGAP-related proteins in cytokinesis of *Dictyostelium*

(細胞性粘菌の細胞質分裂におけるIQGAP様タンパク質の機能に関する研究)

氏名 櫻井 大雄

細胞分裂では、核分裂の後に進行する細胞質分裂によって細胞質が等分され、母細胞は2つの等価な娘細胞に分裂する。したがって、細胞分裂により核を含む細胞成分が均等に分配されるためには、細胞質分裂が時間的・空間的に厳密に制御されている必要がある。このような細胞質分裂の制御では、細胞形態を決定する細胞骨格系と、それを再構築させるシグナル伝達系が重要な役割を果たしていると考えられているが、その詳細な分子メカニズムは、まだ十分には明らかになっていない。この細胞質分裂の分子メカニズムの一端を解明することが、本研究の目的である。研究材料としては、細胞性粘菌 *Dictyostelium discoideum* を用いた。細胞性粘菌は、ゲノムが半数体で変異株を利用でき、遺伝学的・分子生物学的手法が確立しているうえ、酵母のように細胞壁を持たず、細胞分裂における形態変化が動物培養細胞に似ているため、細胞質分裂研究のモデル生物として用いられている。

本研究では、細胞性粘菌で細胞質分裂に関わることが知られているIQGAP様タンパク質、特にGAPAの機能を中心に解析を行った。細胞性粘菌では、2つのIQGAP様タンパク質、GAPAとDGAP1/DdRasGAP1が報告されている。GAPA欠損株は、懸濁培養および基質上の培養いずれの場合でも細胞質分裂の欠陥により巨大多核細胞を生じる。DGAP1欠損株は、細胞質分裂の欠陥を示さないが、GAPAとDGAP1の二重欠損株はGAPA単独欠損株よりも重篤な細胞質分裂の欠

陥を示すことから、GAPA と DGAP1 は細胞質分裂において何らかの重複した機能を持つと考えられている。

まず、IQGAP 様タンパク質の機能を知る手がかりとして、GAPA と DGAP1 の細胞内局在を調べた。それぞれの N-末端に green fluorescent protein (GFP) を融合させた GFP-GAPA と GFP-DGAP1 を作成し、それぞれの欠損株にシャトルベクターを使って発現させた。いずれの GFP 融合タンパク質も、それぞれの欠損株の欠陥を相補したことから、GAPA もしくは DGAP1 としての機能を保持していることが示された。蛍光顕微鏡による観察から、GFP-GAPA と GFP-DGAP1 は、いずれも主として細胞表層に一様に局在していることがわかった。GFP のみではこのような表層への局在は見られなかった。さらに、細胞質分裂中の局在を観察したところ、いずれも細胞表層に局在するだけでなく分裂溝部分の表層に濃縮してくることがわかった。この集積は、分裂溝陥入の初期から分裂直後まで続いていた。GAPA と DGAP1 は、なんらかの機構で分裂溝部分に集積し、分裂溝局所で細胞質分裂に関わっていると考えられる。また、GFP-GAPA については、界面活性剤存在下で主として高速沈殿画分に回収されることから、表層の細胞骨格と相互作用をしていることが裏付けられた。

さらに、GFP-GAPA と GFP-DGAP1 がきわめて類似した局在パターンを示したことから、両者は共通の機構によって分裂溝に濃縮することが予想された。このことを傍証するために、GAPA 欠損株における GFP-DGAP1 の局在と、逆に DGAP1 欠損株における GFP-GAPA の局在を観察した。その結果、いずれの場合も、予想通り細胞周期を通じて表層に局在し、分裂溝に濃縮する正常な局在パターンを示し、GAPA と DGAP1 は相互に独立に局在することがわかった。

ミオシン II は、細胞質分裂において分裂溝に集積し、アクチン収縮環を収縮させることで分裂溝陥入に働くと考えられている。実際に、細胞性粘菌のミオシン II 欠損株は、懸濁培養下で全く細胞質分裂を行うことができず、巨大多核化する。しかし、この細胞性粘菌ミオシン II 欠損株は、基質上ではほぼ正常に近い細胞質分裂を行って増殖できることから、ミオシン II に依存しない細胞質分裂メカニズムが存在すると考えられている。GAPA と DGAP1 の局在とミオシン II の関わりを調べるために、ミオシン II 欠損株における GFP-GAPA および GFP-DGAP1 の局在を観察した。その結果、いずれの場合も正常な局在パターンを示したことから、GAPA と DGAP1 の局在にミオシン II は必要ではないことがわかった。既に知られるように、GAPA 欠損株でミオシン II が分裂溝に集積するこ

とと、GAPA 欠損株が基質上でも細胞質分裂の欠陥を示して多核化することを考えあわせると、GAPA と DGAP1 がミオシン II 非依存性の基質上の細胞質分裂に関わることが示唆された。

細胞質分裂における GAPA と DGAP1 の役割を知る手がかりを得るために、それぞれの結合タンパク質の同定を試みた。GAPA と DGAP1 は、ヒト IQGAP1 の C 末端側約半分の領域に相同性を持ち、IQGAP1 と同様に、その中央部には GAP-related domain (GRD)と呼ばれる、RasGAP (GTPase activating protein)の触媒領域として同定された機能ドメインがある。ヒト IQGAP1 は RasGAP 活性は持たないが、GRD 領域を介して Rho ファミリーの低分子量 G タンパク質である Rac や Cdc42 にエフェクターとして結合し、アクチン系細胞骨格の制御に関わると考えられている。GAPA と DGAP1 も、IQGAP1 と同様に GRD を介して Rho ファミリー低分子量 G タンパク質に結合するか、もしくは、Ras ファミリー低分子量 G タンパク質に結合して GAP として働くことにより、細胞質分裂に関わることが予想される。そこで、細胞性粘菌のさまざまな低分子量 G タンパク質の GST (glutathione S-transferase) 融合タンパク質結合ビーズと、GFP-GAPA または GFP-DGAP1 を発現した細胞性粘菌細胞の粗抽出液を用いて、*in vitro* での結合をイムノプロットングで検討した。8種類の細胞性粘菌低分子量 G タンパク質について調べたところ、既に報告されている GTP 型の Rac1A (ほ乳類 Rac1 ホモログの一つ) と GFP-DGAP1 の結合のみが検出された。さらに、GFP 抗体による免疫沈降法で GFP-GAPA および GFP-DGAP1 の結合タンパク質の探索を行ったところ、GFP-DGAP1 について特異的に結合していると思われる 40kDa と 83kDa のバンドを見い出すことができた。

GAPA に対する結合タンパク質は今のところ同定されていないが、GRD を持つことから、なんらかの低分子量 G タンパク質と結合し、これを介して細胞質分裂に関わっていることが予想される。この可能性について検討するため、結合に重要と考えられる GAPA の GRD 内のアミノ酸残基を予測し、これらを部位指定変異導入により置換した変異型 GAPA を作製して、GAPA 欠損株の遺伝的相補性解析を行った。GAPA の GRD がヒトの RasGAP である p120GAP の GRD と同様の立体構造をとると仮定し、すでに解明されている Ras-p120GAP 複合体の立体構造を参考にして変異を導入する残基を決定した。Ras と p120GAP の結合において、p120GAP の R903 と K935 の正電荷残基が重要であると考えられている。この2残基は、ヒト IQGAP1 や GAPA、DGAP1 でも保存されており、GAPA

では R442 と K474 に相当する。これらの残基をそれぞれ負電荷のグルタミン酸に置換した GAPA (GAPA-R442E, GAPA-K474E) を作製し、GAPA 欠損株中で発現させた。これらの変異型 GAPA はいずれの場合も GAPA 欠損株の細胞質分裂欠陥を相補することができなかったことから、GAPA の GRD が何らかの低分子量 G タンパク質と結合し、その結合が細胞質分裂に関わっている可能性が示唆された。さらに、GAPA-R442E と GAPA-K474E の GFP 融合タンパク質を作製し、その細胞内局在を観察したところ、野生型の GFP-GAPA と同じ正常な局在パターンを示したことから、想定される相互作用は、GAPA の細胞表層や分裂溝への局在には不要であり、それ以外の重要な役割を細胞質分裂において果たしていると考えられた。

IQGAP 様タンパク質においては、GRD のみならず一構造上その前後にも高い相同性を示す領域が長く続いており、この領域は p120GAP などの RasGAP には存在しない。GAPA においてこれら GRD 以外の保存領域の役割を調べるために、N または C 末端から様々な長さの領域を欠失させた変異型 GAPA を作成し、遺伝的相補性を調べた。その結果、IQGAP と相同性を持たない N 末端の 87 残基を欠失した GAPA Δ N は GAPA 欠損株を相補したのに対し、174 残基を欠失した GAPA Δ P は相補しなかった。また、C 末端 16 残基のみを欠く GAPA Δ X を含む他の変異型 GAPA は相補しなかった。このことから、GRD のみではなく、保存領域全体が GAPA の細胞質分裂における機能に重要であることがわかった。また、相補しない変異型 GAPA に加え、全長を 3 つの領域に分割した変異型 GAPA の GFP 融合タンパク質を作製し、細胞内局在に必要な領域の特定も試みた。その結果、GRD よりも C 末端側の領域を含む GAPA は細胞表層に局在し、その領域を含まないものは細胞表層に局在せず、細胞質全体に拡散して存在した。また、いずれにおいても細胞質分裂時の分裂溝への集積はみられなかった。このことから、GAPA が GRD よりも C 末端側の保存領域を介して細胞表層に局在すること、分裂溝への濃縮には保存領域全体が必要であることが示唆された。

以上の結果より、細胞性粘菌の細胞質分裂において、実際に IQGAP 様タンパク質 GAPA と DGAP1 が細胞質分裂時に分裂溝部分に集積し、他のタンパク質と相互作用して何らかの機能を果たしている可能性が示唆された。今後、結合タンパク質の同定も含め、さらに細胞質分裂における GAPA および DGAP1 の局在や機能に関する分子機構を明らかにすることが重要な課題である。