

## 審査の結果の要旨

論文提出者氏名 櫻井 大雄

本論文では、細胞分裂における時間的、空間的制御の分子メカニズム解明のため、細胞性粘菌 *Dictyostelium discoideum* を用いた分子生物学的、生化学的研究、特に、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 様タンパク質の機能解析を行った。

まず第 1 章では、IQGAP 様タンパク質 (GAPA と DGAP1) 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樣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。

次に、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。

第 2 章では、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。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* での結合をイムノブ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 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 のバンドを見出すことができた。

次に、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。さまざまな GAPA 変異体 (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。また、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 も作成し、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 $\Delta$ N は GAPA 欠損株を相補したのに対し、174 残基を欠失した GAPA $\Delta$ P は相補しなかった。また、C 末端 16 残基のみを欠く GAPA $\Delta$ 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。

以上の結果は、真核細胞の細胞質分裂に IQGAP 様タンパク質がどのように関わっているかを示唆しており、細胞質分裂機構の理解に貢献するものである。したがって、本審査委員会は博士 (学術) の学位を授与するのにふさわしいものと認定する。