

論文の内容の要旨

論文題目 Analysis of the actin polymerization-inducing activity of WASP family proteins.

和訳 WASP ファミリータンパク質のアクチン重合誘導活性の解析

指導教官 竹縄忠臣 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成10年4月入学

医学博士過程

病因・病理学専攻

氏名 山口英樹

アクチン細胞骨格は多くの細胞機能において重要な役割を果たしており、アクチンの重合と脱重合は厳密にコントロールされている。特に細胞運動においては細胞の先端部での急速なアクチン重合が必要である。運動している細胞の先端部にはマイクロスパイクや膜ラッフリングと呼ばれる構造が観察される。これらの構造は急速なアクチン重合により細胞膜が隆起、突出して形成され、細胞はこれらを足場にして移動していく。これまでに低分子量 G タンパク質 Rho ファミリーの Cdc42 と Rac がそれぞれマイクロスパイクや膜ラッフリングの形成を制御することが示されていた。これらの分子の下流でアクチン重合を直接制御するメカニズムは長らく不明であったが、最近 WASP ファミリータンパク質と Arp2/3 複合体が鍵を握る分子であることが明らかになった。

WASP ファミリーは WASP、N-WASP、WAVE1、WAVE2、WAVE3 の 5 つのタンパク質から構成され、アクチン細胞骨格の再構築を制御する。N-

WASP は Cdc42 の下流でマイクロスパイク形成に、WAVE は Rac の下流で膜ラフリング形成において機能している。全ての WASP ファミリータンパク質は C 末端部にバープロリン相同ドメイン (V) とコフィリン相同・酸性ドメイン (CA) から成る活性領域 (VCA ドメイン) を持つ。V ドメインは単量体アクチンと結合し、CA ドメインは Arp2/3 複合体と結合する。Arp2/3 複合体は、2つのアクチン類似分子、Arp2 と Arp3 を含む7つのサブユニットから成る複合体である。アクチンの重合にはモノマーが重合核を形成する律速段階が存在し、この過程を経るとアクチンは急速に重合していく。Arp2/3 複合体はこのアクチン重合核の形成を促進する。VCA ドメインは Arp2/3 複合体のアクチン重合核形成能を活性化し、速いアクチン重合を誘導する活性を持つことが示されている。本研究では WASP ファミリーのアクチン重合誘導活性を解析し、その生体内での機能における重要性を調べた。

まず、全ての WASP ファミリー VCA ドメインを GST 融合タンパク質として精製し、ピレンアクチンアッセイを用いて Arp2/3 複合体を介したアクチン重合誘導活性を比較した。その結果、全ての WASP ファミリー VCA は Arp2/3 複合体を活性化し、急速なアクチン重合を誘導した。その中でも、N-WASP VCA ドメインは他の VCA と比較して、10倍から20倍の強い活性を示した。この強い活性が V ドメイン、CA ドメインのどちらによるものか検証するため、N-WASP と WAVE1 のキメラ VCA を用いた解析を行い、アクチンと結合する V ドメインがこの活性に重要であることを明らかにした。WASP ファミリーの中で N-WASP のみが、VCA ドメインに2つの V ドメインを持っている。そこで V ドメイン中のアクチンへの結合に重要と考えられるアミノ酸に点変異を導入し、V ドメインを不活性化した N-WASP の VCA 変異体を作成しその活性を解析した。その結果、2つの V ドメインのどちらを不活性化してもアクチン重合誘導活性は明らかに低下した。従って N-WASP

は2つの V ドメインを有することにより強いアクチン重合誘導活性を持つことが示された。

次に VCA ドメインのアクチン重合誘導活性と WASP ファミリータンパク質の機能との関係を培養細胞を用いて解析した。野生型 N-WASP を COS7 細胞に大量発現させると、EGF 刺激によりマイクロスパイクが形成されることが示されている。しかし、N-WASP の VCA ドメインをアクチン重合誘導活性の弱かった WAVE1 VCA に組み換えたキメラタンパク質を発現させると、このマイクロスパイク形成は著しく抑制された。従って、N-WASP VCA の強いアクチン重合誘導活性はマイクロスパイク形成に必要であることが示された。

さらに、2つの V ドメインの重要性を確認するため、V ドメインを2つ持つ WAVE1 VCA 変異体 (WAVE1 V2CA) を作成した。WAVE1 V2CA は N-WASP VCA と同程度の強いアクチン重合誘導活性を示した。さらに、N-WASP の VCA を WAVE1 V2CA と組み換えたキメラタンパク質は COS7 細胞においてマイクロスパイク形成を誘導した。従って、活性の弱い WAVE1 の VCA でも2つの V ドメインを持つことにより、マイクロスパイク形成に必要な強いアクチン重合誘導活性を持つことが可能になると考えられた。

以上より、N-WASP は2つの V ドメインを持つことにより、Arp2/3 複合体を介して急速なアクチン重合を誘導することが可能であり、この強い活性がマイクロスパイク形成に必要であることが示された。先に述べたように、マイクロスパイクの形成は方向性を持った細胞の運動に必要なプロセスであることから、本研究は細胞運動が関わる様々な生物現象 (血球系細胞のケモタキシス、発生過程における形態形成、癌細胞の浸潤や転移等) の理解に貢献するものと思われる。