

審査の結果の要旨

氏名 大槻 真紀子

N-WASP (neural Wiskott-Aldrich syndrome protein) は、ヒト遺伝性免疫疾患である Wiskott-Aldrich 症候群の原因遺伝子である WASP のホモログであり、アクチン細胞骨格系の制御因子の 1 つである。N-WASP は Rho ファミリー低分子量 G 蛋白質 Cdc42 やイノシトールリン脂質の phosphatidylinositol (4,5) bisphosphates (PIP2) によって活性化され、Arp2/3 複合体を介してアクチン重合を促進し、糸状仮足やアクチンコメットの形成や細胞の浸潤など多くの現象に寄与している。最近、N-WASP が小胞のエンドサイトーシスに寄与している可能性を示唆する報告が相次いでなされたが、N-WASP がどのような機能を果たしているのか、その作用機序はまだ明らかではない。「EGF 刺激依存的な小胞輸送における N-WASP の役割および機能」と題する本論文では、細胞生物学的な手法により、EGF 刺激依存的な clathrin coated vesicles (CCVs) のエンドサイトーシスにおいて N-WASP が dynamin や endophilin A との相互作用を介して寄与していることを明らかにした。

N-WASP は EGF 刺激依存的に raft へ移行し、dynamin と結合する

N-WASP が実際にエンドサイトーシスのどの段階において機能しているのかを調べるため、EGF 刺激による N-WASP の細胞内局在変化を、スクロース密度勾配分画法によって調べた。EGF 刺激により活性化された EGF レセプターは、細胞膜上の raft と呼ばれるコレステロールやスフィンゴリン脂質に富んだ領域において CCVs により細胞内に取り込まれる。細胞抽出液から raft 画分、early endosome (EEA1) 画分をそれぞれ分画した結果、N-WASP は EGF 刺激後速やかに raft 画分へ移行し、その後リン酸化された EGF レセプター及び CCVs の主な構成蛋白質である clathrin や dynamin と同様に EEA1 画分に移行することが観察された。これより N-WASP は EGF 刺激依存的に raft に移行し、リン酸化された EGF 受容体を含む CCVs と共に細胞内に取り込まれることが明らかにされた。HeLa 細胞を用いた蛍光抗体による細胞染色の結果からも EGF 刺激依存的に N-WASP が raft へ移行することが明らかにされた。

抗 N-WASP 抗体を用いて免疫沈降を行なった結果、N-WASP は EGF 刺激依存的に dynamin と複合体を形成することが判明した。dynamin は CCVs のエンドサイトーシスに必要不可欠な蛋白質であり、実際に N-WASP を過剰発現させた場合には約 50 % の細胞においてテキサスレッドでラベルした EGF の取り込み阻害効果が認められた。これらの結果から、N-WASP が raft における CCVs のエンドサイトーシスに寄与していることが示唆された。

N-WASP は endophilin A と結合する

N-WASP と dynamin は直接結合しないため、この N-WASP/dynamin 複合体は第三の蛋白質によって介在されていると考えられた。endophilin A は dynamin と結合し、clathrin coated-pit を細胞膜からくびり取る過程を制御していることがすでに明らかにされている蛋白質である。実際に *in vitro* において endophilin A の SH3 ドメインと N-WASP のプロリンリッチ領域が結合することが判明した。*in vitro* におけるアクチン重合活性測定の結果、endophilin A も Cdc42 や PIP2 と同様に N-WASP のアクチン重合活性を増強することも明らかにした。さらに endophilin A を過剰発現させて免疫沈降を行なった結果、N-WASP を共に過剰発現させた場合に endophilin A と dynamin の共沈が検出されたことから、N-WASP は endophilin A と dynamin の結合の安定化に寄与していることが示唆された。つまり N-WASP は、いわゆる scaffolding protein として重要な役割を担っていると考えられた。

N-WASP の raft への移行には endophilin A によって制御されている

endophilin A の SH3 ドメインを過剰発現させた細胞では、N-WASP の EGF 依存的な raft への移行が生じないことを細胞染色の結果から明らかにした。スクロース密度勾配分画法によって、SH3 ドメインに結合できない N-WASP のプロリンリッチ領域欠損変異体は raft へ移行しないことも判明した。したがって N-WASP はプロリンリッチ領域において endophilin A の SH3 ドメインと相互作用することにより raft への移行が制御されていることが示唆された。

以上、本研究は N-WASP が EGF 刺激依存的に raft に移行し、clathrin coated-pit の細胞内への取込みに必須な dynamin と複合体を形成することにより CCVs の取り込みに関与していることを明らかにした。さらにこの N-WASP/dynamin 複合体の形成には endophilin A が介在する可能性を示唆し、実際に N-WASP と dynamin と endophilin A が複合体を形成することを明らかにした。以上の知見はエンドサイトーシスの複雑な制御機構における N-WASP の機能を解明する上で意義深いものであり、博士(薬学)の学位論文として十分な価値があるものと認められる。