

論文審査の結果の要旨

論文題目：「 α B-クリスタリン発現制御細胞の様態」

論文提出者氏名 田 中 幹 人

身体運動による適応の分子機構を、分子・細胞レベルから機構解析した研究はほとんどない。本論文は、身体運動が生命システムに及ぼす影響のうち、適応機構の鍵分子としてのストレスタンパク質（とくに個体レベルで骨格筋の適応の鍵を握る分子として同定された α B-クリスタリン）の細胞内機能を、細胞の形態や運動特性—つまり構造から生み出された機能—に関して、細胞の動的観察、数量的解析、細胞骨格の応答特性を通して明らかにした独創的な研究である。運動時には身体内に様々な力学的変化が起こる。それらは、身体を構成する細胞にとって直接的な機械的・物理的刺激となる。細胞の動的な構造維持と接着性の維持および張力発揮と運動性が、細胞骨格により生み出されること、細胞骨格のシステム維持に対し、分子シャペロンが有意に影響を与えていること、を可逆的データをもって明らかにした。

本論文「 α B-クリスタリン発現制御細胞の様態」は、また、ストレスタンパク質・分子シャペロンの新しい側面を提示したのものである。ストレスタンパク質が運動の力学応答を修飾するという新しい側面を提示したのは初めてである。ストレスタンパク質の機能は「分子シャペロン」である。分子シャペロンの意味は、‘貴婦人の介添え役’である。細胞機能を構成する異なる個々のタンパク質に対して、特異的に対応するというよりはむしろ、タンパク質システム自体の維持および機能発現、タンパク質のフォールディング、類似し複数のタンパク質複合体システムへのケアなどにより、実際に細胞システムの適応能を高める。実際にストレスタンパク質の一つ HSP90 の変異は、進化をも修飾する因子となっていることが明らかになっている (Lindquist, Nature1998, 2000, 2002)。

α B-クリスタリン (α B-crystallin) は、動物個体ラットを用いた実験モデルから重力下における骨格筋システムを維持する鍵タンパク質として同定したタンパク質である。遅筋の萎縮で特異的に減少し、筋線維組成依存的に発現しており、遅筋の緊張性持続的収縮を機能的に維持するシステムと考えられる。実際に細胞骨格という細胞の基本的な構造のシャペロンとして機能していることが報告されており、当研究室においてもチューブリン・微小管の動的不安定性の持続的な維持への貢献を示すデータを得ている。本論文でも示されたように α B-クリスタリンはその配列特異性から small heat shock protein (sHSP)ファミリーに分類され、 α B-クリスタリンが力学的負荷を受ける骨格系および接着部位に局在し、細胞の力学的な機能を維持する環境に貢献していると考えられ、この論文で行った細

胞全体を動的観察により、定量化してゆく研究は、大変難しい多機能タンパク質の機能解析および力学的負荷への対応システム構築原理の解析として必須であると考えられる。この論文は、遺伝子工学的に α B-クリスタリン発現量を増大(SE)/抑制(AS)した培養細胞の特性を動的に解析することで、*in vivo*での α B-クリスタリンの作用機序を明らかにした。

第一章は、実験の第一段階として、個々の細胞から細胞集団に至る過程での細胞発達課程における力学的負荷モデルとして、さらにタイムラプス画像からの解析手法確立のために *Xenopus laevis* A6 細胞を対象に過重力実験を行い、増殖時および Na^+ 運搬能を持つドーム状構造の分化形成について検討した。その結果、細胞が一個で独立して機能している間は、重力による有意な力学応答が観察されたが、分化時には、むしろ細胞どうしの接着等の影響が大きく影響することが示された。この *Xenopus laevis* A6 細胞は、水生の両生類由来であるため、接着が弱く、細胞の運動性が顕著であったため、人工的に α B-クリスタリンを発現させ、その力学的感受性に影響を及ぼすことを期待し実験を行ったが、各種の方法で試行を繰り返したものの本来 α B-クリスタリンを持たない A6 細胞には、種間障壁の問題もあって α B-クリスタリンの導入が困難であり、安定した発現量を持つ細胞をクローニングすることが出来なかった。

第二章は、第一章を受け、実験の第二段階として、第一章で確立した手法を踏襲し、解析対象を自然型から α B-クリスタリン発現能を持つ C6 (ラットグリオーマ細胞), L6 (ラット筋芽細胞), C2C12 (マウス筋芽細胞) を対象に、解析を行っている。この SE/AS 細胞は、それぞれ顕著な形態特性を示した。すなわち、 α B-クリスタリン量が増加している SE 細胞は葉状仮足が大きく広がった構造を持ち、一方 α B-クリスタリン量の減少している AS 細胞は糸状仮足が顕著で細長く、細胞両端の二点で基質に接着している針状構造を取り、接触阻止効果が極めて弱い傾向にあった。これらの細胞のキネマティクス解析の結果、AS 細胞の移動速度は α B-クリスタリン-WT (自然型) の 2~3 倍で (A6 細胞の移動速度と一致した)、尺取り虫様の独特の移動様式を持ち、SE は移動度こそ低いもののラッフル膜の盛んな運動が観察された。この傾向は、FBS を誘導因子に用いた細胞移動アッセイによっても確認された。チューブリンとアクチンに対する二重抗体染色の結果、SE ではラッフル膜の顕著に発達した傾向が、また AS では細胞体の多くを微小管が占め、その二極性両端の末梢部にアクチンが集合している様子を示した。

これらのユニークな α B-クリスタリン発現量多寡による細胞変化の可逆性を、SE 細胞への α B-クリスタリン抗体および AS 細胞に対しての精製 α B-クリスタリンタンパク質をマイクロインジェクションにより導し、統計的にも有意に SE 細胞の AS 化 (α B-クリスタリン減少にともなう様態化) と、AS 細胞におけるラッフル膜形成という変化を確認し、

これらの様態変化の可逆性を立証した。

この形態差異が、形質転換に伴う細胞外基質との接着性変化や接着因子の産生量変化によるものであるかを様々な基質上における形態・動態への影響として解析・検証したが、有意な影響はみられず、本論文で得た結果は能動的な接着能の変化によるものであると推察された。また運動性の差異をもたらす要因を検証するため、各種の細胞骨格系に影響を及ぼす薬剤を添加し、薬剤添加後の細胞動態を画像に基づいて解析した。この結果、C6/L6細胞では異なった反応様式を示したものの、AS細胞の極端な移動度が細胞骨格系の収縮力を阻害する薬剤種によって顕著に抑えられる点では一致した。このWT/SE/ASにおける顕著な形態と運動性の変化から、 α B-クリスタリンが低分子量Gタンパク質を介したシグナル伝達系に作用している可能性が示唆されたため、Rac1のWild-Type(WT)及びConstitutively-Active(CA), Dominant-Negative(DN)変異体のEGFP融合タンパク質を α B-クリスタリン-WT/SE/ASに導入し、これを上記画像撮影解析系を用いて経時撮影、解析した。結果、WT/CA/DNは、それぞれのシグナル伝達系変異体によって予想されるとおりの結果をもたらしたものの、その発現様式には α B-クリスタリン-WT/SE/ASの種類により明確な差があることを示したが、この点に関しては、今後のさらなる研究が必要である。

本論文の研究成果から、 α B-クリスタリンは、細胞内で細胞骨格系に関与し、細胞形態と運動特性に影響を与えている可能性が示唆された。この変化は α B-クリスタリンの本質的機能に因るものであることが想像された。またこの変化の多くは細胞骨格の動的不安定性の増大あるいは偏向という点に集約されるものと推察された。以上より、個体の運動剥脱で顕著に減少したストレスタンパク質 α B-クリスタリンの機能は、培養細胞において、持続的運動を支える細胞骨格の持続的な維持に必要なタンパク質として、その可逆性をも証明した形で示した。

最近のアメリカソーク研究所のFred Gageグループの研究では、神経幹細胞のニューロンへの新生が個体の運動(回転ケージ走行運動)により増大することが報告されている。他にまた運動時に活性化するドーパミンを分泌するニューロンの直接的な刺激は、機械的刺激であることが報告されている。身体を構成する細胞のシステムから、個体の運動を生命システムとして解析することは、運動のもつ本質的な局面-実際に脳をも含む身体システムを作りかえてゆく機構-を解明する上できわめて重要である。

以上の内容から、本審査委員会は、本論文を博士(学術)の学位を授与するにふさわしいものと認定する。