

論文審査の結果の要旨

氏名 森山 賢治

論文題目 Structural Basis for Dual Activity of Cofilin and Its Regulation by Phosphorylation and Cyclase-Associated Protein (コフィリンの2つの活性の構造基盤、及びリン酸化やCAP 1による制御機構の解析)

本論文は序章、第一章、第二章、第三章および第四章から成る。

序章では、細胞内でのアクチンの動態の調節におけるコフィリンの機能について概説されている。

第一章では、コフィリンのリン酸化部位決定、およびリン酸化によるコフィリンの機能制御について述べられている。哺乳類コフィリンの主要なリン酸化部位が Ser-3 であることが同定され、そのリン酸化によってコフィリンの PIP₂ 結合能は影響されないのに対し、アクチンへの作用が著しく阻害されることが明らかにされた。Ser-3 の Ala 置換体や野性型コフィリンを培養細胞に強制発現させると、細胞質に太いアクチン線維束が出現したが、Asp 置換体はアクチン細胞骨格に影響をおよぼさないことがわかった。また、コフィリン遺伝子 (*COF1*) を欠失した出芽酵母は、Asp 置換体コフィリンの発現では救済されず、脱リン酸化型コフィリンの機能が細胞の生存に必要不可欠であることが示された。

第二章ではコフィリンのアクチン結合ヘリックス中央の3つ組み水素結合の機能的意義について述べられている。アクチン線維切断効率と脱重合速度の双方を同時に測定する方法が考案され、コフィリンが、アクチン線維の(-)端からの脱重合を加速するのみならず、アクチン線維を有意に切断することが示された。コフィリンのアクチン結合ヘリックスでは、主鎖の連続する3箇所の水素結合がセリン等(哺乳類では、Ser-119, Ser-120, 及び Tyr-82)の側鎖のOHで破壊されている。その機能的意義を知るために、これら主鎖-側鎖間の水素結合を断ち切った変異体が作製された。解析の結果、Ser-120が関わる水素結合が、アクチン線維の切断とそのターンオーバー促進に極めて重要であることが示された。

第三章では、構造・機能相関に基づくコフィリンのアクチン線維結合・切断機構の解析について述べられている。コフィリンが側面結合すると、アクチン線維の捩れが増強される。変異体を用いた解析を行うことによって、コフィリンのアクチン線維結合様式や線維の捩れを増強する分子機構が探られた。その結果、コフィリンのアクチン脱重合加速作用は、線維の捩れの増強には依存しないこと、また、アクチン線維切断活性(若しくは線維を捩る作用)が細胞の生育に必要不可欠であることが示された。更に、線維の捩れの増強は、コフィリンのN末端部分とその反対のループ部分とが上下のアクチン分子を線維軸の回りに互いに逆向きに押し合って起こるという可能性が示唆された。一方、アクチン線維(-)端における脱重合の加速は、コフィリンのアクチン結合ヘリックスとN末端部分とがアクチン線維の(-)端に作用することによって引き起こされること

が示された。

第四章では、コフィリンのアクチン・ダイナミクス促進に果たす CAP1/ ASP56 の新機能について述べられている。ヒト培養細胞抽出液のアクチン・コフィリンを含む複合体中に、アデニル酸シクラーゼ結合タンパク質である CAP1/ ASP56 が見出された。ヒト CAP1 の全長や部分領域の組換え体を用いた解析の結果、CAP1 は、単独で F-アクチンを脱重合し、その C 末端側領域で G-アクチンのヌクレオチド交換を促進するのみならず、コフィリン存在下で、アクチン線維の(+)端でのアクチン重合を促進することが示された。CAP1 の N 末端側領域は、線維から遊離して来る ADP-アクチン・コフィリン複合体に作用し、CAP1 の C 末端側領域が ATP-アクチンを再生する過程を促進することによって、アクチン重合を加速することがわかった。CAP1 は、その分子内ドメイン間の協調作用とコフィリンとの連繋によって、F-アクチンのターンオーバーを加速し、細胞運動を促進する因子であることが証明された。

本研究では、細胞生物学的、分子生物学的、構造生物学的、遺伝学的、生化学的手法を複合的に用いることによって、アクチンの動態制御におけるコフィリンの機能を解明している。本研究によって得られた結果は、新しい知見を多く含み、細胞骨格の研究に寄与するところが多いと考えられる。第一章は飯田和子氏、矢原一郎氏と、第二章、第三章および第四章は矢原一郎氏との共著という形で学術雑誌に掲載されているが、いずれの章についても、論文提出者が主体となって分析及び検証を行ったもので、論文提出者の寄与が十分であると判断する。

従って、博士（理学）の学位を授与できると認める。