

論文の内容の要旨

論文題目 Regulation of actin cytoskeleton and cell-matrix adhesion by WASP family proteins.

(WASP ファミリー蛋白質によるアクチン細胞骨格及び接着制御)

氏名 佐々木 信成

アクチン細胞骨格は細胞内外の刺激に応答して再編成され、形態形成、細胞運動等において主要な役割を担っている。WASP ファミリータンパク質は低分子量 G タンパク質の Rho ファミリーの下流で働き、Arp2/3 複合体の活性化を介して細胞膜周辺でのアクチン細胞骨格を制御し、糸状仮足や葉状仮足の形成に必須の分子である。本研究はこの WASP ファミリータンパク質におけるアクチン細胞骨格の制御機序を詳細に解析することを目的とし、以下の研究を行なった。

第一章 WAVE 1 による Arp2/3 複合体を介さないアクチン重合

WASP ファミリー分子である WAVE 1 を細胞内に発現させるとアクチン繊維よりなるアクチン凝集を引き起こす。このアクチン凝集は、WAVE 1 が Arp2/3 複合体を一過的に活性化することによって引き起こされているものと考えられていた。そこで WAVE 1 によって引き起こされるアクチン凝集が Arp2/3 複合体に依存するのかを明らかにするために、WAVE 1 の Arp2/3 複合体結合領域である A 領域の 15 アミノ酸を欠損した変異体 (ΔA) を作製し、解析を行なった。

まず、この変異体を用いて *in vitro* におけるアクチン重合活性の測定を行ったところ、野生型の WAVE 1 は Arp2/3 複合体を介した急速なアクチン重合活性を示したのに対し、 ΔA 変異体

は Arp2/3 複合体を介したアクチン重合活性をまったく示さないことが明らかになった。次にこの変異体を NIH3T3 細胞内に一過的に発現させそのアクチン細胞骨格に与える影響を観察した。この ΔA 変異体は Arp2/3 複合体を介したアクチン重合活性を持たないことから、発現させてもアクチン凝集は形成されないことが予想されたが、野生型に比べ割合は少し下がるものの、同様のアクチン凝集が観察された。これらの結果は WAVE1 が Arp2/3 複合体を介さずにアクチン凝集を引き起こしているということを示唆するものであった。そこで、この仮説を確かめるために WASP ファミリーの VCA 領域の中でも、最も Arp2/3 複合体と強く結合することが明らかにされている N-WASP-VCA の CA 領域を WASP ファミリーが引き起こす、Arp2/3 複合体の活性化に対する競合阻害分子として利用できるのではないかと考え、実験を行った。最初に、NIH3T3 細胞抽出液に GST 融合タンパク質として精製した N-WASP-CA を加え、pull down assay を行なった。この結果 N-WASP-CA は細胞に内在的に存在する Arp2/3 複合体をほぼすべて取り除く事ができた。次に、この N-WASP-CA を活性型の Rac と共に NIH3T3 細胞に共発現させその影響を観察した。活性型の Rac を単独で NIH3T3 細胞に発現させると、細胞は WAVE を介して引き起こされると考えられている膜ラップリングを形成する。しかしながら、N-WASP-CA と共に活性型の Rac を発現させると、この膜ラップリングの形成が完全に抑制された。これら二つの実験から、この N-WASP-CA を WASP ファミリーによる Arp2/3 複合体の活性化に対する競合阻害分子として用いることができると考え、WAVE1 ΔA との共発現を行った。WAVE1 ΔA を単独で NIH3T3 細胞に発現させると細胞内にアクチン繊維からなるアクチン凝集を引き起こすが、N-WASP-CA とこの WAVE1 ΔA を共発現した場合においてもこのアクチン凝集の形成はまったく影響を受けず、単独で WAVE1 ΔA を発現した時と同様に観察された。以上の結果は、WAVE1 ΔA は Arp2/3 複合体非依存的にアクチン重合を引き起こすことができるということを示しており、これは WAVE には Arp2/3 複合体を介さない、未知のアクチン細胞骨格再編成機構が存在することを示唆するものである。

第二章 WASP ファミリー結合タンパク質 FBP17 の機能解析

WASP ファミリー分子は他のシグナル分子が結合する非常に多くのドメインを有しているが、その中でも特に proline-rich 領域は IRSp53 や、WISH などの SH3 ドメインを持ったタンパク質が結合し、WASP ファミリータンパク質の機能制御に非常に重要な役割を果たしている。そこで新たにこの領域に結合するタンパク質を酵母 two-hybrid 法により探索し、human Formin binding protein 17(FBP17)を同定した。FBP17 は N 末に微小管の結合ドメインである FCH ドメイン、そして C 末には SH3 ドメインを持ち、pull down assay ではこの SH3 ドメインによって WASP ファミリータンパク質全てに結合した。より生理的な条件での結合を調べるために免疫沈降実験を行なった結果、WASP ファミリーの中でも N-WASP との結合が強いことが明らかになった。次に HeLa 細胞内に FBP17 の野生型、FCH ドメイン、SH3 ドメインを欠損した変異体 (ΔFCH 、 $\Delta SH3$) を発現させ局在を観察したところ、FBP17 は繊維状の局在を示し、微小管と部分的に共局在した。 $\Delta SH3$ も同様の局在を示したが、 ΔFCH においてはこのような局在は観察されず、細胞質全体に局在した。さらに、これらのタンパク質が N-WASP の局

在に及ぼす影響を観察したところ、FBP17はFCHドメインとSH3ドメインによりN-WASPと微小管を繋ぐ因子であることが示唆された。*In vitro* そして *in vivo* においてN-WASPとの結合が明らかになったことから、次にN-WASPのArp2/3複合体を介したアクチン重合活性にFBP17がどのような影響を与えるのか、精製タンパク質を用いた *in vitro* のアクチン重合再構成系を用いて解析した。N-WASPはその分子内結合による活性抑制を受けているため、単独ではあまり大きな活性を示さない。そこにCdc42やWISHといった活性化因子が加わるとN-WASPは活性化タイプに構造が変化しArp2/3複合体を介したアクチン重合能が上昇することが現在までに明らかにされている。この系において精製されたFBP17タンパク質をN-WASPに加えたところ、その濃度依存的にN-WASPのArp2/3複合体を介したアクチン重合活性は上昇し、最終的にはほぼ最大の活性を示すまでになった。

WASPファミリータンパク質は細胞膜の伸展においてArp2/3複合体と共に必須の因子であることが現在までに明らかになっている。FBP17は細胞内でN-WASPの局在を変化させた *in vitro* の系においてN-WASPを活性化することから、細胞膜の伸展時にも何らかの機能を果たしていることが推測された。そこでFBP17の野生型、 Δ SH3変異体をHeLa細胞内に発現させ cell spreading assay を行なってその影響を観察した。FBP17は通常細胞内で、上で述べたように繊維状の局在を示すが、spreadingしている細胞内では細胞の縁にアクチンと共に局在することが観察された。また、spreadingをしている細胞を固定、観察し、細胞の面積を測定したところ Δ SH3変異体を発現している細胞は細胞の広がりや抑制されることが明らかになった。さらに詳細にspreadingしている細胞を観察したところ、FBP17はしばしば細胞の縁でdot状の局在を示した。最近、WASPファミリータンパク質と共にアクチン細胞骨格の再編成において重要な役割を果たしているArp2/3複合体が、葉状仮足形成時に細胞の縁に出来るfocal complexesと呼ばれる接着構造に局在し、vinculinと結合することが明らかにされている。FBP17の局在はこのfocal complexesの局在に似ていたことから、FBP17もまたN-WASPと共にfocal complexesに局在しているのではないかと推測し、まずvinculinとの結合を確認した。FBP17を発現させたHeLa細胞をまき直し、spreadingしている細胞を回収してその細胞抽出液を用いて免疫沈降実験を行なったところ、FBP17はspreadingしている細胞内でvinculinとtransientに結合し、さらにそこにはN-WASPが含まれることも明らかになった。次に、より詳細にFBP17の局在を観察するために、HeLa細胞よりも発達した葉状仮足を形成し、focal complexesを観察しやすいmouse embryonic fibroblasts (MEFs)を用いてFBP17の局在を観察した。その結果、spreadingしているMEFsにおいてFBP17はvinculin、Arp2/3複合体、そしてN-WASPと共に葉状仮足に形成されるfocal complexesに共局在することが明らかになった(図1)。以上の結果より、FBP17は新たなWASPファミリー結合タンパク質であり、N-WASPのArp2/3複合体を介したアクチン重合活性を濃度依存的に活性化する因子であることが明らかになった。また、その活性は細胞のspreading、特に葉状仮足におけるfocal complexesの形成に必要であることが強く示唆された。

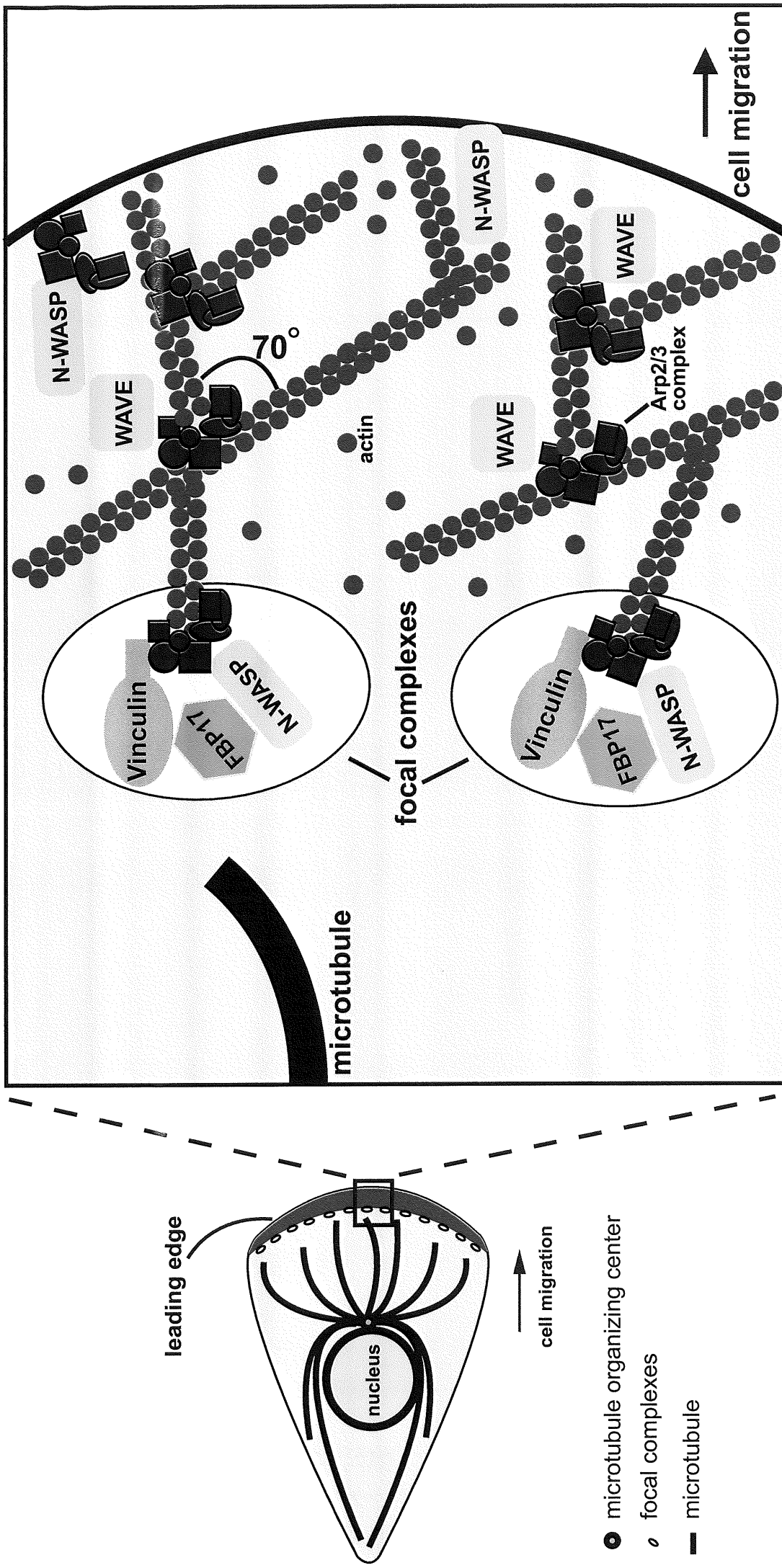


図1 細胞運動時における葉状仮足及びfocal complex形成。細胞運動時には膜の伸展と細胞-基質間の接着 (focal complex) が時間的、空間的に高度に制御されている。左の図は極性を持っている細胞。進行方向側の前面にWASPファミリー蛋白質によるアクチン細胞骨格の再編成が活発に起きている葉状仮足 (leading edge) がありその直後にfocal complexesが並んでいる。右はleading edgeの拡大図。N-WASPはleading edgeにおけるアクチン細胞骨格の再編成のみではなくFBP17と共に接着構造においても機能している。