

論文審査の結果の要旨

氏名 佐々木 信成

本論文は二章からなり、第一章は WAVE の Arp2/3 複合体を介さないアクチン凝集形成の解析、第二章は新規 WASP ファミリー結合タンパク質 FBP17 の同定と機能解析について述べられている。

第一章では、WASP ファミリー分子である WAVE 1 を細胞内に発現させると引き起こされる、アクチン繊維よりなるアクチン凝集の解析を行なっている。このアクチン凝集は、WAVE 1 がアクチン重合において重合核を形成できる 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。論文提出者はその仮説の真偽を実験的に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)を作製した。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かった。

この変異体を細胞内に発現させ、そのアクチン細胞骨格に与える影響を観察したところ、 ΔA 変異体は予想に反し野生型と同様のアクチン凝集を形成することが観察された。次に、N-WASP-VCA の CA 領域が WASP ファミリータンパク質の引き起こす Arp2/3 複合体の活性化に対する競合阻害分子となることを明らかにし、その N-WASP-CA と WAVE1 ΔA の共発現実験を行なった。その結果、WAVE1 ΔA は、単独で発現させた時と同様にアクチン凝集を形成することが観察された。以上の結果は、WAVE1 ΔA が引き起こすアクチン凝集は Arp2/3 複合体非依存的であるということを示しており、これにより WAVE1 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が示唆された。

第二章では、酵母 two-hybrid 法を用いて新規 WASP ファミリー結合タンパク質、human Formin binding protein 17(FBP17)を同定し機能解析を行なっている。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、免疫沈降実験を行なった結果より、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された。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 N-WASP の局在に与える影響を観察した結果、FBP17 は FCH ドメインと SH3 ドメインにより N-WASP を微小管へと局在させる因子であることが示唆された。

次に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、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解析した。その結果、精製された FBP17 タンパク質は、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を上昇させることが明らかにされた。

WASP ファミリータンパク質が、アクチン細胞骨格を制御することで必須の役割を担っている細胞膜の伸展において、FBP17 がどのような機能を果たしているのかを明らかにするために、FBP17 の野生型、 Δ SH3 変異体を用いて cell spreading assay を行ない、その影響を観察した。その結果、 Δ SH3 変異体を発現している細胞は野生型を発現している細胞に比べ、細胞の広がりや抑制されることが明らかにされた。さらに spreading している細胞において 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 と呼ばれる接着構造に局在することが観察された。また免疫沈降実験により、FBP17 は spreading 時に 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された。以上の結果は、FBP17 が新規 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を示すものである。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。

なお、本論文の第一章は、竹縄忠臣氏、三木裕明氏、第二章は竹縄忠臣氏、山崎大輔氏との共同研究であるが、論文提出者が主体となって研究を行ったものであり、論文提出者の寄与が十分であると判断する。したがって、博士(理学)の学位を授与できると認める。