

## 論文内容の要旨

応用生命化学専攻

平成 12 年度博士課程進学

氏名 岡 努

指導教官名 福井 泰久

## 論文題目

イノシトールリン脂質結合タンパク質 Def-6 によるアクチン細胞骨格の制御

### 1. 序論

生命活動を営む上で、生物は周りの環境変化に適応しなくてはならない。このとき、1つ1つの細胞が周囲の環境に合った適切な細胞応答をする必要があり、この役割を果たす役者として多くのシグナル伝達因子が研究されている。イノシトールリン脂質は重要な二次メッセンジャーであり、細胞膜に普遍的に存在するリン脂質で、イノシトール環のリン酸基がリン酸化、脱リン酸化を受けて標的タンパク質と結合し、シグナルを伝えている。イノシトール環は3、4、5位がリン酸化されることが知られており、そのすべての組み合わせ ( $2^3=8$ 通り) の化合物が生体内で見られている。これらの中で3つともリン酸化されたものが phosphatidylinositol trisphosphate (PIP<sub>3</sub>)である。PIP<sub>3</sub>は phosphatidylinositol-3 kinase (PI3K)によって、phosphatidylinositol 4,5-P<sub>2</sub> (PI-4,5-P<sub>2</sub>)から産生される。細胞内の PIP<sub>3</sub>の存在量はごくわずかであるが、増殖因子(EGF、NGF、Insulin など)で刺激すると、一過的にそのレベルが上昇し、多岐に渡るシグナル伝達に関与していることが示されてきた。

我々の研究室では、 $PIP_3$  結合タンパク質を網羅的に同定し、その機能の解析を進めてきた。 $PIP_3$  結合タンパク質の 1 つ Def-6 は血球系細胞の分化に伴い down-regulation を受ける遺伝子として取られ、N 末にカルシウムと結合するモチーフとされる EF-hand motif を、中央部に pleckstrin homology (PH) domain を有する全長 632 アミノ酸からなるタンパク質である。Def-6 の PH domain に変異を入れた mutant は  $PIP_3$  アナログビーズと結合できなかつたため、PH domain を介して  $PIP_3$  と結合することが示唆された。また Def-6 の発現部位は血球系で特に高いものの、多くの組織において普遍的に発現している。Def-6 の機能については未知の部分が多かったが、Def-6 とアミノ酸配列で 45.3% のホモロジーを示す SWAP-70 は当研究室でよく解析されており、 $PIP_3$  と結合すること、増殖因子刺激に伴い  $PIP_3$  依存的にラッフリング膜に移行すること、低分子量 G タンパク質 Rho family のメンバーである Rac1 の下流因子 (effector) であることなどが示されていた。Def-6 と SWAP-70 は N 末の相同性は高いものの、中央部～C 末 (315～632a.a.) の相同性は 34.2% と低く、Def-6 と SWAP-70 が違う働きをしているのではないかと考えた。

本研究は Def-6 の機能を解析し、多細胞生物の外界からの刺激に応答するメカニズムの一端を明らかにすることを目的とした。

## 2. Def-6 は低分子量 G タンパク質 Rac1 の effector protein である

G タンパク質は GTP または GDP と結合して存在し、GTP 型 (活性型) と GDP 型 (不活性型) を行き来することによって活性が調節され、その下流因子は GTP 型と結合することによって活性化されシグナルを伝えている。G タンパク質はいくつかのファミリーに分類され、よく研究されているものの 1 つに Rho family がある。この family はアクチン細胞骨格系、遺伝子発現、細胞周期、細胞の生存と死など広範囲の細胞応答を制御していることが知られている。

これまでに他の研究室から、Def-6 は低分子量 G タンパク質である Rac1 及び Cdc42 の guanine nucleotide exchange factor (GEF) であるという報告がなされた。しかし、私の実験ではそのようなことを支持する結果は得られなかった。また Rac1 の dominant active 変異体と GFP-Def-6 を共発現させたところ、COS-7 細胞の形態が大きく変化した。もし Def-6 が Rac1 の上流に位置するのならば、Rac1 dominant active 変異体の効果以上の表現型を呈するのは不自然なので、Def-6 は Rac1 の上流因子ではなく、下流因子として働いているのではないかと考えられ

た。そこで GFP-Def-6 の生化学的性質を解析したところ、Def-6 は Rac1 の GTP 型と特異的に結合し、GDP 型や nucleotide free 型とは結合せず、同じ Rho family のメンバーである Cdc42、RhoA とともに結合しなかった。また、Def-6 が Rac1 の下流因子であることを確かめるために、Rac1 の標的因子が結合する effector region (amino acids 26~45) に点変異を導入したものと Def-6 との結合能力を解析した。いくつかの Rac1 変異体は Def-6 と結合できず、これと同時に細胞を変形させる活性も失っていた。さらに Def-6 の様々な deletion と Rac1 との結合能の関係を調べたところ、1~40a.a. と 400a.a. 付近の両方が必要であることが分かり、Rac1 と結合できない Def-6 も細胞を変形させる活性を失っていた。これらの結果から、Def-6 は Rac1 の下流因子であることが強く示唆された。

### 3. Def-6 の in vivo における役割の解析

Rac1 の関与するシグナルは、膜ラッフリング（ラメリポディア）を形成することと、c-jun N-terminal kinase (JNK) を活性化してアポトーシスを誘導するという 2 つの特徴がよく研究されている。Def-6 の誘導する細胞の形態変化は、極端な膜ラッフリングの結果であること、またはアポトーシスで細胞が死んでいく過程であることの 2 つの可能性が考えられた。これを検証するために Time lapse による観察を行ったところ、Rac1 dominant active 変異体と GFP-Def-6 を共発現させたときの COS-7 細胞の形態変化は可逆的で、速やかに移行することがわかり、Def-6 はアクチン細胞骨格を制御することが示唆された。また SWAP-70 も Rac1 の下流因子であるが、Def-6 のように細胞を変形させる活性は認められないので、Def-6 は Rac1 の下流で SWAP-70 とは違ったシグナル伝達に関与している可能性が高いと考え、実際に in vivo でどのような表現型を示すのか検討した。COS-7 細胞を EGF で刺激したところ、GFP を過剰発現した control は 50% 程度の細胞がラッフリングをしていたのに対して、GFP-Def-6 を過剰発現させた細胞の 90% 以上にラッフリング形成が観察され、細かい突起状の膜の形態が目立ち、ラメリポディアというよりむしろフィロポディアに近いという特徴があった。一方、SWAP-70 が誘導するラッフリングは細胞膜が大きくめくれ上がるという典型的なラメリポディア様形態を示し、SWAP-70 はラッフリング膜のアクチンと共局在するという違いがあった。

Rac1 や Cdc42 の下流因子でアクチンと結合するものとして、WASP family がよく知られている。この family 内でよく保存されたアクチン結合領域と Def-

6 の配列を比較したところ、相同性の高い部位が Def-6 にも存在することが分かった。in vivo において Def-6 とアクチンの共局在が観察されたので、in vitro でも Def-6 とアクチンの結合が検出できるか検討した。His-Def-6 (314~407a.a.) を精製し、F-アクチンとの共沈実験を行ったところ、Def-6 は直接アクチンと結合できることが示された。SWAP-70 も Def-6 と対応する部位でアクチンと結合し、さらに C 末にも明確なアクチン結合配列を持っている。Def-6 は、これに対応する C 末のアクチン結合配列を持たず、この差が Def-6 と SWAP-70 の機能の違いを生み出している可能性が高い。

#### 4. まとめ

本研究において、Def-6 は活性型 Rac1 とアクチンの両者に結合可能であることが示され、増殖因子からの刺激を橋渡しするシグナル伝達因子であると考えられる。SWAP-70 も同様に Rac1 とアクチン両方に結合できる。しかし、Rac1 の dominant active 変異体と共発現させたときの細胞の形の変化、EGF で刺激したときの局在やラッフリングの様子など、Def-6 と SWAP-70 が異なる表現型を示すことも観察された。つまり、Rac1 のシグナルを受け取るという入力シグナルは同じであるが、出力は似て異なるものであり、Def-6 と SWAP-70 がアクチン細胞骨格を協調して制御している可能性が高いと思われる。

本研究が生体内における細胞の方向性を持った移動機構を解明する一端を担うことが期待される。