

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 岡 努

Phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) は細胞外からの増殖因子や分化因子により活性化されるリン脂質キナーゼで、細胞内情報伝達因子の一つである。この PI3K は、細胞内において phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PI 4,5-P₂) を基質とし、その D-3 位をリン酸化することにより PI 3,4,5-P₃ (PIP₃) を産生する。生成した PIP₃ は更にセカンドメッセンジャーとして働き、下流因子へと細胞外からのシグナルを伝えるものと考えられている。また、Rho ファミリーは低分子量 G タンパク質の一種であり、GEF によって活性化された GTP 型は標的タンパク質と結合し、下流にシグナルを伝え、アクチン細胞骨格系、細胞の生存と死、遺伝子発現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。PIP₃ 結合タンパク質 Def-6 が Rho ファミリーのメンバーである Rac1、Cdc42 の上流に位置し GEF 活性を持つという報告がなされていたが、本論文はこれに反論している。さらに 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ている。

まず、Rac1 および Cdc42 の GTP 型と特異的に結合すると言われる PAK1-CRIB domain の GST 融合タンパク質による pull down assay を行なったが、Def-6 が Rac1-GTP と Cdc42-GTP の量を増加させることはなかった。そこで、Def-6 がどのような状態の Rac1 と結合するのかを in vitro の系で解析したところ、Def-6 は GTP 型と特異的に結合し、GDP 型や nucleotide free 型との結合は検出されなかった。この結合は GTP 型 Rac1 特異的であり、RhoA や Cdc42 とは結合しなかった。また、Def-6 を Rac1 の活性型変異体と共発現させると COS-7 細胞の形態が大きくくびれることが観察され、この活性は Rac1 との結合能とよく相関していることを明らかにした。続いて、Rac1 の標的因子が結合するとされる部位に点変異を導入した変異 Rac1 と Def-6 との結合を解析した結果、ある変異体は Def-6 との結合能を失っていることが示された。これらの結果より、Def-6 は Rac1 の下流因子として、シグナル伝達に関与していることが強く示唆された。

次に Def-6 と 45.3% の相同性を示すタンパク質 SWAP-70 との比較を中心に、Def-6 の in vivo における役割を COS-7 細胞において解析している。SWAP-70 は EGF 刺激の前後でその局在を大きく変え、ラッフリング膜へと速やかに移行し、

ラップリング膜上のアクチンと共局在するが、Def-6 は細胞膜のやや内側のアクチンと共に存在し、EGF 刺激後も Def-6 の局在に大きな変化はないことが示された。また、Def-6 を発現した細胞には細かい突起状の膜の形態が目立ち、細胞表面に細かい隆起が観察され、Def-6 はその隆起した場所に局在するという SWAP-70 にはない特徴が観察された。続いて、EGF 刺激によってラップリングを形成する COS-7 細胞をカウントしたところ、コントロールと比較して GFP-Def6 を発現した細胞はラップリングを形成する割合が高いことを明らかにした。この Def-6 のラップリング形成促進能は GTP 型 Rac1 結合能と非常に高い相関関係にあり、活性化した Rac1 から Def-6、そしてラップリングという順序でシグナルが伝わっていくことが示唆された。

最後に Def-6 と F-アクチンとの結合を解析した。In vitro において Def-6 と F-アクチンの結合が検出され、さらに in vivo においても活性化型 Rac1 存在下では、非存在下と比べて Def-6 と F-アクチンの共局在が顕著になることが観察された。このことから、Def-6 の上流には活性化した Rac1、下流には F-アクチンが存在する可能性が高いと考えられ、Def-6 は Rac1 と F-アクチンをつなぐシグナル伝達因子であることが示唆された。

以上、本論文は細胞の運動性形態に関与すると思われる Def-6 の構造と機能を解析し、細胞運動形態の研究に一つの新しい視野を開いている。細胞運動は癌の転位などとも深い関係があることが示されているので本研究は臨床の応用にもつながると考えられる。以上のことから、本論文は学術上、応用上寄与するところが少なくない。よって、審査委員一同は本論文が博士（農学）の学位論文として価値あるものと認めた。