

[別紙 2]

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 若松 猪策無

生体内で細胞は刻一刻と変化する環境に適応するため、外界からの刺激に対して適切な応答を示す。増殖因子等の刺激は受容体で感知され、そのシグナルは複雑な経路を伝わり分化や増殖、細胞運動など種々の応答を引き起こす。phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K) は重要な 2 次メッセンジャーの担い手の一つで、数多くの増殖因子、成長因子の刺激により活性化され、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 phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate (PIP₃) を産生する。PIP₃ は刺激後一時的に増加し、これが膜結合型セカンドメッセンジャーとして機能することが知られている。また、Rho family は GEF により不活性型である GDP 結合型から GTP 結合型である活性型となり effector protein にシグナルを伝達し、細胞骨格制御等様々な細胞応答に対する重要な役割を果たしていることが知られている。PIP₃ 結合タンパク質として同定された SWAP-70 は PH domain、Coiled-coil (CC) domain を持ち、活性化型 Rac の effector domain と結合すること、C 末端付近で F-actin と結合すること、また増殖因子などの刺激に応じラッフリング膜でアクチンと共局在し、ラッフリング膜の形成を増強すること、ある種の変異体ではラッフリング膜形成を阻害することが知られている。

本論文はこのような背景のもと SWAP-70 について、まずその構造から予測された活性部位に対して様々な変異を導入し、それぞれの性質を生化学的、分子生物学的手法を用いて解析することにより、SWAP-70 の分子内制御機構とその活性化のメカニズムを解明することを本研究の目的とした。

第一章では背景について述べている。

第二章では SWAP-70 の PH domain の構造と活性について検討している。PH domain のループ部分を中心に変異を複数導入し PIP₃ との結合を観察し、第一ループに変異を導入した変異株群

ではその結合活性が失われることを明らかにした。PH domain と CC domain との結合を pull down assay により確認した後、上記の GST-PH の変異株を利用し CC domain との結合を解析した。その結果、第一ループ変異株が CC domain との結合にも関与しており、PIP₃ との結合部位と重なることが明らかとなった。

第三章ではまず PH domain と CC domain との結合が PIP₃ により阻害されることを明らかにした。この結果は通常 PH domain が第一ループで CC domain に結合することにより C 末端付近のアクチン結合部位をマスクし、刺激時に産生された PIP₃ が PH domain の第一ループに割り込み結合することにより、PH domain と CC domain との結合が外れ活性型となることを示唆している。続いて CC domain の変異を検索し、PH domain と結合しない変異株 m374、m502 を得た。

第四章ではまず野生株の SWAP-70 が COS-7 細胞において通常細胞質に存在し、増殖因子の刺激によりラフリング膜へと移行しアクチンと共局在することを確かめた。続いて PH domain の変異株のうち PIP₃ と結合しないものは刺激時に膜移行、アクチンとの共局在が見られないことを観察した。このことから、SWAP-70 の膜移行には PH domain と PIP₃ との相互作用が必要であると考えられた。また変異株 m374、m502 を細胞中に発現させたところ、PIP₃ 非依存的に細胞膜に移行し、アクチンと共局在することがわかった。SWAP-70 は刺激時にアクチンと共局在し、*in vitro* で SWAP-70 の C 末端部分がアクチンと結合することから SWAP-70 は活性化されるとアクチンと結合できるようになることが予想された。dominant negative 型 Rac により Rac のシグナルをとめた状態で細胞を刺激したところ m374 や m502 を単独で発現させた時の表現型と酷似していた。これはこれらの変異株が PI3K によるシグナルに対しては活性型となり、Rac に対しては活性型になっていないことを意味した。

第五章では本論の総括をしている。

以上本論文は PI3K のシグナルによる SWAP-70 の活性調節を PH domain と CC domain による分子内相互作用が担っていることを解明し、またそのアクチンと結合するという活性化のモデルを提唱したものであって学術上貢献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。