[別紙２]

審査の結果の要旨

氏名 水 谷 清 人

アクチン線維の重合は、細胞の移動、細胞の極性化、細胞の分裂、そして細胞の形態変化といった細胞内における様々な機能において重要な役割を果たしている。近年、アクチン線維の重合を制御する分子としてWASPファミリー分子が同定され、これまでにWASP、N-WASP、WAVE1、-2、-3の5種類のタンパク質が報告されている。これらのタンパク質はC末部に存在するVerprolin相同領域（V）、Cofilin相同領域（C）、酸性領域（A）から構成されるVCA領域でArp2/3複合体と相互作用し、Arp2/3複合体を活性化することで非常に速いアクチン重合を引き起こす。近年、WASPファミリータンパク質のアクチン重合活性化を制御する分子として、SH3ドメインを持つアダプタータンパク質が報告されている。本論文の研究では、酵母two-hybrid法によりWASPファミリー結合タンパク質としてFBP11を同定し、FBP11が核内でN-WASPのアダプターとして機能し、細胞質中のN-WASP量を制御する分子であることを明らかにしている。

まず、WASPファミリー結合タンパク質を探索する目的で、ヒトWAVE3のプロリンに富んだ領域に結合する分子を'bait'として酵母two-hybrid法を行っている。得られたクローンに含まれる遺伝子配列を解読したところ、FBP11タンパク質のWWドメインがコードされていた。WASPファミリータンパク質には、WWドメインと結合しうるプロリンに富んだ配列が存在しており、FBP11のWWドメインとN-WASP、WAVEとの結合を確認している。各WASPファミリータンパク質を一過的に発現させた細胞溶解液を用いた結合実験では、特異性・結合強度に差異は認められなかった。しかし、豚脳抽出液を用いてFBP11のWWドメインに特異的に結合するタンパク質を同定したところ、主要な結合タンパク質はN-WASPであった。したがって、細胞内ではN-WASPがFBP11のWWドメインに対する主要な結合タンパク質であると結論づけている。

次に、FBP11を特異的に認識する抗体を作製し、内在性のFBP11の細胞内局在について調べている。抗FBP11抗体を用いた蛍光抗体免疫染色では、内在性のFBP11が核内に存在し、核スペックルに局在することを明らかにしている。核スペックルは多数のスプライシング因子やスプラインシングに関与するsnRNAsを含み、遺伝子の転写活性に応じて形態変化を示す核内構造体である。これらの結果はFBP11がスプライシングに関与しているという知見と一致しており、FBP11の酵母ホモローグPrp40がスプラインシングに必須の因子であるという報告とも一致している。

また、FBP11に関する様々な変異体を作製し、それら変異体の細胞内局在がどのように変化するかという実験を行っている。FBP11には2つのWWドメインがある。このWWドメイン内に変異を導入した変異体（WWmt）やWWドメインを欠失させた変異体（ΔWW）を細胞に発現させた場合、これらの変異タンパク質は核内に局在する。しかし、野生型を発現させた場合に観察される核スペックルへの局在は認められず、核内に拡散して存

在していた。また、C 末の塩基性領域を欠損させた変異体は核内への局在が認められない。以上のことから、FBP11 の核内局在には C 末部の塩基性領域が必須であり、核内で核スペックルに局在するためには WW ドメインが必須であることを示している。

最後に、FBP11 と WASP ファミリータンパク質の細胞内における関連を論じている。野生型の FBP11 と GFP、GFP-N-WASP、GFP-WAVE1 を共発現させた場合、FBP11 は核スペックルに局在しており WASP ファミリータンパク質の影響を受けない。しかし、FBP11 の発現によって N-WASP は核内へと移行し、FBP11 と核スペックルで共局在することを明らかにしている。WAVE ではそのような核内移行は認められず、共局在も認められない。このことから、核内で FBP11 が N-WASP と複合体を形成し何らかの作用を引き起こしていると推測している。N-WASP を一過的に発現させた COS7 細胞では EGF 刺激に応じて N-WASP 依存的なマイクロスパイク形成が引き起こされることが知られており、核内で FBP11 が N-WASP と結合し安定化しているならば、細胞質中で引き起こされる N-WASP 依存的なアクチン細胞骨格再構成は抑制されるはずであると仮定し、その効果を検証している。N-WASP を単独で発現させた場合は EGF 刺激により発現細胞の 80%がマイクロスパイク形成を生じているのに対し、FBP11 を発現させるとその割合は 24%にまで低下し、N-WASP が核内に存在する比率も大きくなっている。また、N-WASP と結合できない変異体ではマイクロスパイク形成率が 79%となっており、N-WASP の核内、細胞質の存在比率に変化は無かった。したがって、FBP11 は N-WASP の局在を制御し、核内で安定な複合体を形成することで細胞質中の N-WASP 量を減少させ、N-WASP によるアクチン細胞骨格の再構成を抑制していることを明らかにしている。

本論文の研究で、FBP11 が N-WASP 結合タンパク質であり、核内において共局在することを明らかにしている。また、FBP11 を発現させることで N-WASP 依存的なマイクロスパイク形成が有意に抑制されることを示している。これらの結果は FBP11 が核内において N-WASP のアダプターとして機能し、細胞質中の N-WASP 量を制御することを示唆している。これまで N-WASP が核内に局在することは知られていたが、核内における N-WASP 結合分子を同定したのは本研究が初めてである。よって、本論文の成果は、N-WASP の既知の制御機構とは異なった機構で N-WASP の活性を制御していることを示したという点で独創的であり、核内における N-WASP の機能解明への手がかりが得られたと考えられることから、博士（薬学）の学位授与に価すると判定した。