

## 論文の内容の要旨

### 論文題目

「細胞分裂期の制御に介在する新奇低分子量 G 蛋白質 Gie/Arl8 の機能解析」

氏名 岡井 拓郎

#### 【序】

低分子量 G 蛋白質は、種々の細胞機能の発揮に至る経路において、結合しているグアニンヌクレオチド依存的にシグナル伝達をオン/オフする分子スイッチとして機能している。現在までに大別して Ras, Rab, Rho, Arf, Ran の各サブファミリーが同定されており、これらは細胞の増殖・分化や骨格系制御及び細胞内小胞輸送などの多様な生体反応において重要な制御を担っている。また、これらの G 蛋白質を介した情報伝達系の乱れが、癌を始めとする様々な疾病の原因となることも明らかになっている。

近年様々な生物種のゲノム配列が決定されたことにより、これまでの研究では明らかにならなかった遺伝子群が同定され、これらの情報に基づく生物学の新たな研究局面が開かれつつある。本論文においては、ヒトゲノム解析の結果を利用して、新奇の低分子量 G 蛋白質を複数見出し、これらの因子の機能及びその制御機構の解析から、G 蛋白質を介在する新たなシグナル伝達経路が解析されている。本研究では、ヒトに存在する機能未知 G 蛋白質の中で、多細胞生物間で高度に保存されている新奇低分子量 G 蛋白質の同定とその機能解析を行い、染色体分離における G 蛋白質の新しい役割が見出されている。

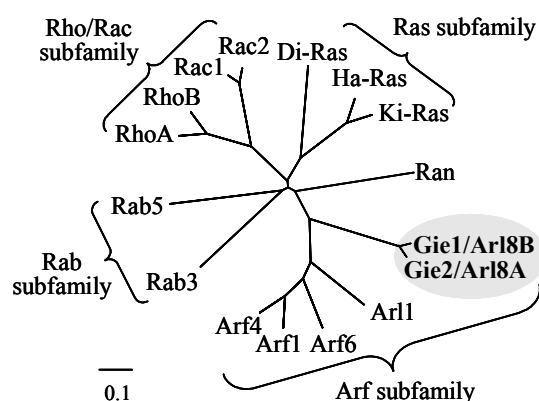


図1 ヒト Gie1, 2 及び他の低分子量 G 蛋白質ファミリー分子の進化系統樹

## 【結果】

### 1. Gie は多細胞生物において非常によく保存された新奇低分子量 G 蛋白質である

G 蛋白質ファミリーは、グアニンヌクレオチドとの結合に必須な G ドメインと呼ばれる極めて特徴的なモチーフを有する。そこで、G ドメインを手掛かりにヒトゲノムデータベースを検索し、新奇の低分子量 G 蛋白質を複数見出した。その中の一つ Gie (novel **G** protein **I**ndispensable for **E**qual segregation of chromosomes) と命名した分子はヒトから線虫まで高度に保存されており、哺乳動物では 2 種のサブタイプが存在する (図 1)。現在では Gie は Arf ファミリーに分類されているが (Arl8: **A**rf **l**ike **G**Tpase **g**), Arf ファミリー分子の機能に必須な N 末端のミストイル化部位をもたないなど、既存の Arf ファミリー分子とは異なる特徴をもつユニークな低分子量 G 蛋白質である。

まず、ヒト Gie1, 2 mRNA の発現をノザンプロットにより検討した結果、これらは共にヒトの臓器全てに発現していた。したがって、Gie1, 2 は多くの細胞において基本的な生体反応に関与するのではないかと考えられた。

### 2. Gie の機能抑制により核の断片化及び染色体分離に異常が見られる

多くの G 蛋白質は、GDP の結合した不活性型と GTP の結合した活性型の 2 つの異なるコンホメーションをとることでその活性が制御されている。そこで細胞内で主に GDP 型となり、恒常的不活性化型として機能すると期待される T34N 変異体を作製し、この変異体を哺乳細胞に過剰発現したところ、核が断片化するという表現型を見出した。さらに Gie の機能を抑制した際の表現型を詳細に検討するために、ショウジョウバエの細胞株である S2 細胞を用いて RNAi (RNA interference) 法により内在性 Gie の発現を抑制した。その結果、Gie の発現を抑制した細胞において染色体分離に異常が生じることを見出した (図 2, 矢印)。以上により、Gie が細胞分裂期における染色体分離になんらかの役割を果たしていることが示唆された。

### 3. GDP 型 Gie は Nir2 蛋白質の RID と相互作用する

Gie が細胞分裂期において機能する可能性が考えられたため、細胞分裂期における Gie の細胞内局在を観察した。その結果、Gie が細胞分裂後期から細胞質分裂時にかけて細胞分裂溝に移動した後、中央微小管上に局在することを見出した。そこで、Gie の相互作用因子を探索する目的で、この部位に局在して染色体分離の制御を担っている因子を探索した。その結果、細胞周期を通じて Gie と同様の細胞内局在

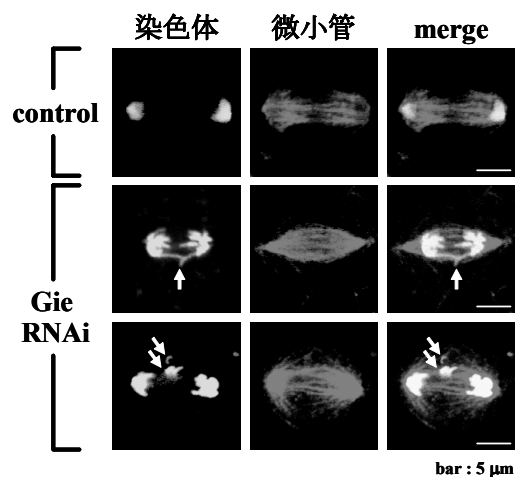


図2 Gie の発現を抑制した細胞において (Gie RNAi) 染色体分離が阻害されている

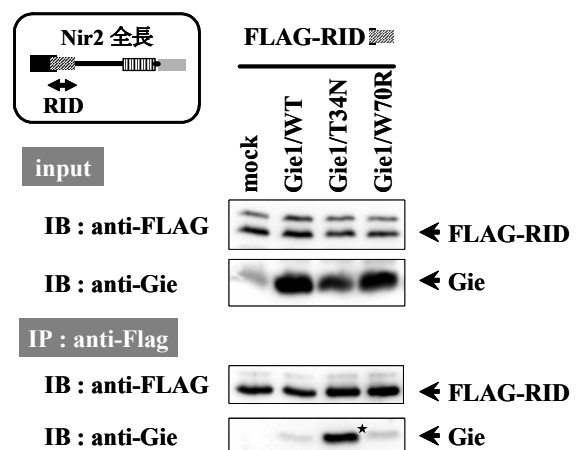


図3 GDP 結合型 Gie は Nir2 蛋白質の RID に結合する

を示し、その恒常的不活性化型変異体の過剰発現により染色体分離の異常を誘導する Nir2 という因子を見出した。

まず、Gie1 と Nir2 の相互作用について共沈降実験により検討したところ、Gie が Nir2 の RID (Rho inhibitory domain) に結合することを見出した。さらに Gie の各種変異体を用いて共沈降実験を行った結果、Gie の野生型あるいは GTP 型と考えられる W70R 変異体と比較して、GDP 型と考えられる T34N 変異体が非常に強く RID と結合することを見出した (図 3, 星印)。

#### 4. Gie は間期では主に GTP 型で存在するが分裂期に入ると GDP 型が増加する

GDP 型 Gie が特異的に RID と結合したことから、細胞内における Gie の GDP/GTP 型の量比を検討した。その結果、間期において Gie は大部分が GTP 型であるが、分裂期に入ると GDP 型が増加することを見出した。以上のことから Gie は細胞分裂期に GDP 型となりその際に Nir2 の RID と結合すると考えられた。

#### 5. Gie と RhoA は競合的に RID と結合する

Nir2 は分裂期特異的に GDP 型 RhoA と相互作用することによって細胞質分裂を制御することが報告されている。そこで、Nir2 の RID において Gie と RhoA が競合するかを共沈降実験により検討した。293T 細胞に GDP 型 Gie1 と FLAG タグを付加した RID, 及び Myc タグを付加した GDP 型 RhoA を発現させ、抗 FLAG 抗体により免疫沈降を行った。その結果、RhoA を発現した細胞で RID と共沈降する Gie1 の量が減少したことから (図 4, 星印), RID において RhoA と Gie1 が競合しうることが示された。

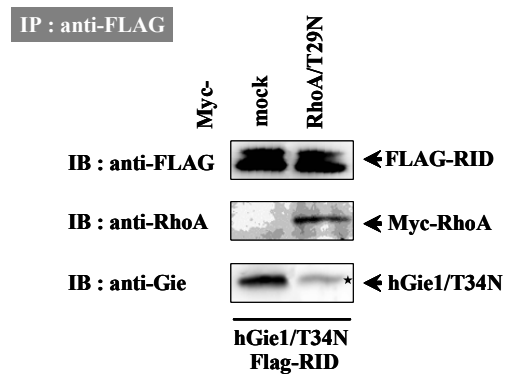


図4 Gie と RhoA は競合的に RID と結合する

#### 【総括】

本研究において、Arf ファミリーに属する新奇の低分子量 G 蛋白質 Gie1/Arl8B 及び Gie2/Arl8A を単離・同定した。まず、RNAi 法などにより Gie の機能を抑制した際に核の断片化や染色体分離の異常といった表現型が観察されたことから、Gie が細胞分裂期において何らかの制御を担うことが示唆された。さらに、Gie の相互作用因子として Nir2 蛋白質を同定し、GDP 型 Gie が特異的に Nir2 の RID と相互作用すること、間期において

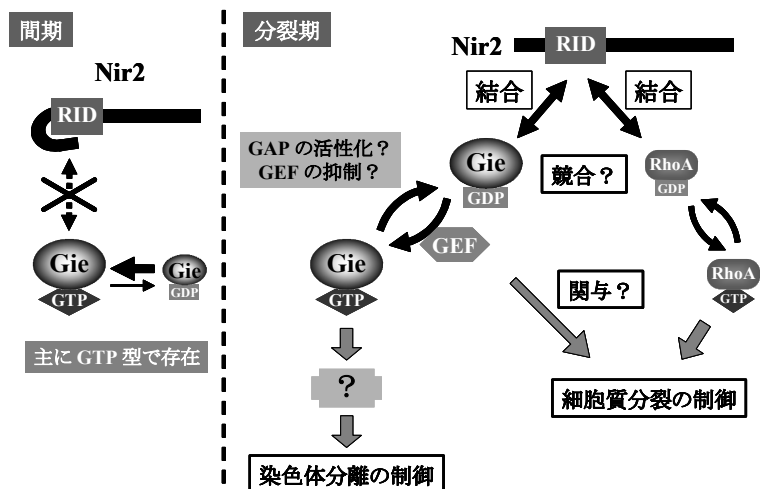


図5 細胞周期依存的な Gie の存在様式及び作用モデル

Gie は大部分が GTP 型で存在するが、分裂期に GDP 型が増加すること、及び Nir2 の RID において RhoA と競合的に相互作用することを見出した (図 5)。

細胞分裂期において Rho ファミリー分子は様々な機能を果たすことが知られているが、中でも RhoA はアクチン骨格系の制御に重要な働きをもち、細胞分裂期において時間的・空間的に厳密にその活性が制御されている。Nir2 は RID で GDP 型 RhoA と相互作用することにより、RhoA の活性制御を介して細胞分裂における役割を担うと考えられることから、Gie が RhoA と Nir2 の RID で競合することにより RhoA の活性制御に関与する可能性が考えられる。さらに RID は分裂期に Cdk1 によりリン酸化され、そのリン酸化依存的に染色体分離や細胞質分裂に関わる Plk (Polo-like kinase) が相互作用することが知られており、これらの活性制御にも Gie が関与する可能性が考えられる。

最近になって RhoA が細胞質分裂のみならず、細胞分裂面の決定にも関与することが報告されたが、その制御機構については未解明な部分が数多く残されている。本研究において同定した Gie 及び低分子量 G 蛋白質間の相互作用が、それらの機構解明に大きく寄与することが期待される。