

審査結果の要旨

氏名 岡井 拓郎

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に依存したコンホメーションの転換を介してシグナル伝達のオン/オフを制御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、重要な制御を担うことが明らかにされてきた。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知られている。

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されてこ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。「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」と題した本論文においては、ヒトに存在する機能未知 G 蛋白質の中から多細胞生物間で高度に保存されている新奇低分子量 G 蛋白質を同定し、その機能解析から染色体分離における G 蛋白質の新しい役割を見出している。

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1つ Gie (novel G protein Indispensable for Equal 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、現在では Arf ファミリーに分類されている (Arl8: Arf like GTPase 8)。しかしながら、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 蛋白質であることが示された。

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。その結果、核が断片化するという表現型を見出した。さらに、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 の発現を抑制したところ、染色体分離に異常が生じることを見出した。以上から、Gie が細胞分裂期における染色体分離に重要な役割を果たしていることが示された。

3. GDP 型 Gie は Nir2 蛋白質の RID と相互作用する

Gie は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、Nir2 という因子に注目した。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。

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。その結果、RhoA を発現した細胞では RID と共沈降する Gie の量が減少することを見出した。すなわち、Nir2 の RID において RhoA と Gie が競合し得ることが示された。

【総括】

本論文から、進化的に高度に保存された機能未知な低分子量 G 蛋白質 Gie/Arl8 が細胞周期に依存してその存在様式を変える制御機構として、以下のモデルが提示される。間期において Gie は主に GTP 型で存在しており、Gie と Nir2 は結合しないと考えられる。分裂期に入ると GAP の活性化あるいは GEF の抑制等によって GDP 型 Gie が増加し、Gie が Nir2 の RID に結合する。Nir2 は GDP 型 Gie を適切な場所で GEF に受け渡すことにより Gie の活性制御に関与すると考えられ、その結果活性化した Gie が下流の因子を介して染色体分離における制御を担う。さらに、Gie と RhoA が Nir2 の RID に共に結合し、競合的に働き得るという知見は、Gie が RhoA と協調的に働き、細胞質分裂の制御にも関与する可能性を示唆している。本論文は機能未知な新奇低分子量 G 蛋白質の同定と解析を通じて、染色体分離における制御機構の理解に有用な知見を提供しており、博士(薬学)の学位として十分な価値があるものと認められる。