

論文審査の結果の要旨

論文提出者氏名 井上 毅

ミオシンは広範なサブファミリーを形成しているモータータンパク質である。ヒトゲノムの解析により、ヒトには 12 クラスにわたり少なくとも 40 のミオシン遺伝子が存在していることが明らかになっている。本論文における研究の目的は、これらヒトミオシン—特に特異な構造あるいは性質を持つミオシン VI とミオシン XVIIIIB—が細胞内でどのようなタンパク質と相互作用し、その結果生じる複合体がどのような機能をはたしているかを明らかにすることである。本論文では、ミオシン VI について研究結果を第 1 章に、ミオシン XVIIIIB についての研究結果を第 2 章にまとめた。

第 1 章. ミオシン VI と KPI-2 の相互作用

論文提出者は、ヒト胎児脳 cDNA ライブラリーを用いた酵母 two-hybrid スクリーニングから哺乳類細胞 two-hybrid アッセイ, GST pull-down, 免疫共沈降実験といった *in vivo*, *in vitro* における一連の結合実験により、ミオシン VI の新規相互作用因子として膜貫通型セリン/スレオニンキナーゼ KPI-2 を同定した。これまで、KPI-2 の細胞内機能の詳細は明らかになっていない。そこで、KPI-2 の細胞内機能解明を目的とし、まず免疫蛍光染色によって過剰発現体や細胞内在性の KPI-2 の細胞内局在を解析したところ、KPI-2 は細胞質全体にドット状に分布し、特に核近傍に凝集した局在を示した。様々なオルガネラマーカータンパク質やトランスフェリンを指標としたクラスリン依存的エンドサイトーシス小胞との局在比較より、この核近傍の構造は初期/リサイクリングエンドソームであることを明らかにした。さらに siRNA による細胞内在性 KPI-2 の発現抑制を行いその表現型を解析したところ、核近傍のリサイクリングエンドソームへのトランスフェリンの凝集阻害を認めた。この KPI-2 の発現抑制による表現型の変化は、外因的に KPI-2 を発現させることで解消された。一方、細胞のトランスフェリン取り込み及び放出の経時的定量的解析により、KPI-2 の発現抑制はトランスフェリン放出には顕著な影響を与えないものの、その取り込みを減少させることを明らかにした。これらの結果は、KPI-2 が細胞内小胞輸送経路、特に初期エンドソームからリサイクリングエンドソームへの輸送において重要な働きをしていることを示唆している。

第 2 章. ミオシン XVIIIIB (MYO18B) と Sug1 の相互作用

新規遺伝子 *MYO18B* は、肺がん細胞の約 50% で不活化していること、及び遺伝子を肺が

ん細胞株に過剰発現させることによりがん細胞の足場非依存性増殖を抑制することから、肺がんの発生・進展に関わる重要な新規がん抑制遺伝子であると考えられている。*MYO18B* 遺伝子産物である *MYO18B* はクラス 18 に分類されているミオシンであり、尾部のほかにもモーター領域の上流に機能未知のドメインを持つ特異なミオシンであるが、その細胞内機能に関してはほとんど知見が得られていない。論文提出者は第 1 章と同様に、*MYO18B* と相互作用する因子を酵母 two-hybrid スクリーニングによりヒト肺の cDNA ライブラリーより探索し、その結果、相互作用候補タンパク質の一つとして 26S プロテアソーム構成要素 Sug1 を同定した。

ミオシン VI と同様の *in vivo*, *in vitro* における結合実験により両者の細胞内における相互作用を確認した。また細胞内局在解析により両者は細胞内で共存していることを示した。26S プロテアソームは主としてユビキチン化された標的タンパク質を ATP 依存的に選択的に分解する、総分子量約 2.5 MDa に及ぶ巨大なプロテアーゼ複合体である。p53 をはじめとする主要ながん抑制遺伝子産物の多くがユビキチン-プロテアソームシステムの制御の下、秩序だった分解を受け、その発現レベルが厳密に制御されていることが一般的に知られている。本研究ではプロテアソーム阻害剤や siRNA による Sug1 の発現抑制によって *MYO18B* タンパク質レベルの上昇が見られたことから、両者が機能的に相互作用していることがわかった。さらに、*in vivo* ユビキチン化実験により *MYO18B* は細胞内でユビキチン化を受けることも明らかにした。これらのことから、*MYO18B* の機能がプロテアソームによる分解で調節されていることを示すことができた。

論文提出者は、本論文において、ヒトミオシンとその相互作用因子の細胞生物学的解析から、細胞内におけるヒトミオシンとそれが織り成すネットワークの機能の一端を明らかにした。したがって、本審査委員会は博士(学術)の学位を授与するにふさわしいものと認定する。