

[ 別紙 2 ]

## 論文審査の結果の要旨

申請者氏名 堀口 かおり

PIP<sub>3</sub>は、細胞が細胞外からの刺激を受け取ったときに一時的に産生され、細胞増殖、分化、運動、細胞骨格再構成、小胞輸送など様々な細胞応答を引き起こす。近年、PIP<sub>3</sub>が細胞内で特定の領域に蓄積することが細胞極性形成に重要であることが、細胞移動や上皮細胞、神経細胞で報告された。神経細胞ではPIP<sub>3</sub>の神経突起先端への蓄積が突起伸長を促し、もっともPIP<sub>3</sub>が蓄積した突起がやがて軸索へと変化する。このようなPIP<sub>3</sub>の蓄積が神経細胞の極性、すなわち軸索-樹状突起の決定に重要である。PIP<sub>3</sub>結合タンパク質であるPIP<sub>3</sub>BPは、細胞刺激により一時的に細胞膜表面でのPIP<sub>3</sub>レベルが上昇するのに伴い、細胞膜に移行する。PIP<sub>3</sub>BPの結合タンパク質を検索する目的でPIP<sub>3</sub>BPをベイトとする yeast two hybrid screening が行われ、kinesin-3 family protein である GAKIN/KIF13B が見出された。本論文は、PIP<sub>3</sub>結合タンパク質と、細胞内輸送を担う kinesin である GAKIN が相互作用するということから、PIP<sub>3</sub>の特定の場所への蓄積は、微小管に沿った kinesin 依存的な輸送によってもたらされているのではないかという仮説について検討を行ったもので、研究の背景を述べる第一章と、それに続く4章、および研究結果を討論する第六章からなる。

第二章では、PIP<sub>3</sub>BP と GAKIN の相互作用について検討している。まず、pull down assay により、GAKIN の PIP<sub>3</sub>BP 結合領域は motor domain の隣に位置する FHA domain であることを明らかにした。次に PIP<sub>3</sub>BP と GAKIN との結合が特異的であり直接的であることを示した。

第三章では、GAKIN による PIP<sub>3</sub>BP を介した PIP<sub>3</sub>輸送を in vitro で観察している。まず GAKIN が微小管上で+端へと物質を輸送する活性を持つ kinesin であることを微小管 gliding assay で確かめた。次に、GAKIN が PIP<sub>3</sub>BP との結合を介し、PIP<sub>3</sub>小胞を輸送しているかどうかを確かめるため、合成 PIP<sub>3</sub>小胞上で形成された PIP<sub>3</sub>BP-GAKIN 複合体をシヨ糖濃度勾配遠心の上層から検出した。そして、実際に GAKIN が PIP<sub>3</sub>BP との結合を介し PIP<sub>3</sub>小胞を輸送することを in vitro で蛍光ラベルした微小管上で PIP<sub>3</sub>小胞の動きを観察することにより確かめた。

第四章では、GAKIN による PIP<sub>3</sub>輸送が実際の細胞内で存在すること、またその意義について検証している。GAKIN、PIP<sub>3</sub>BP は脳に多く発現し、ラットの脳から共沈殿してく

るという知見から、脳、特に神経細胞で重要な役割を担っているのではないかと考え、まず神経細胞のモデルである PC12 細胞を用いた実験を行った。PC12 細胞で GFP-Akt-PH で可視化した PIP<sub>3</sub> は、内在性の GAKIN とともに突起の先端で共局在した。GAKIN の motor domain 欠損変異体 DN-GAKIN の過剰発現により、PIP<sub>3</sub> の突起先端への蓄積は部分的に阻害されたことから、PC12 細胞で GAKIN による PIP<sub>3</sub> 輸送が存在し、突起の先端への蓄積に寄与していることが示唆された。

第五章では、マウス胎児海馬由来の神経細胞初代培養を用い、実際の神経細胞で GAKIN による PIP<sub>3</sub> 輸送の意義について検討している。PIP<sub>3</sub> と内在性の PIP<sub>3</sub>BP は軸索の先で共局在した。全長 GAKIN の過剰発現により、PIP<sub>3</sub> の突起先端への蓄積は亢進されたが、軸索の先だけではなく、複数の突起の先への蓄積亢進が見られた。DN-GAKIN の過剰発現により、PIP<sub>3</sub> が特に蓄積した突起、あるいは特に長い軸索様の突起は見られなくなった。全長 GAKIN の過剰発現によって、複数の突起の先への PIP<sub>3</sub> 蓄積が亢進することにより、軸索の決定が阻害もしくは遅延した。DN-GAKIN の過剰発現によって、軸索となるべき突起の先への PIP<sub>3</sub> の輸送が阻害されることで軸索決定が阻害された。またこの GAKIN 過剰発現による神経極性決定阻害は、FHA domain を介した PIP<sub>3</sub>BP-PIP<sub>3</sub> の輸送阻害によるということ、様々な欠損変異体の過剰発現で確かめた。全長 GAKIN または DN-GAKIN の過剰発現により、軸索のマーカである Tau-1 で染まる突起は見られなくなったことから、軸索決定が阻害されていることを明らかにした。

以上、本論文は、GAKIN-PIP<sub>3</sub>BP による PIP<sub>3</sub> 輸送を *in vitro* で示し、神経細胞ではその輸送が、神経突起先端への PIP<sub>3</sub> の蓄積に一部寄与し、ひいては軸索決定すなわち神経細胞の極性形成に重要な役割を果たしていることを明らかにしたもので、学術上、応用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。