

論文内容の要旨

論文題目 WAVE2 のリン酸化による制御機構の解析 (Functional analysis of WAVE2 phosphorylation)

氏名 中西修

<序論>

アクチン細胞骨格は細胞内外の刺激に応答して再編成され、形態形成、細胞運動等において主要な役割を担っている。WASP ファミリータンパク質は WASP、N-WASP、WAVE1~3 からなり、低分子量 G タンパク質の Rho ファミリーの下流で働いている。これらの分子は、Arp2/3 複合体の活性化を介して細胞膜周辺でのアクチン細胞骨格を制御し、糸状仮足や葉状仮足の形成に必須の分子である。

WAVE2 は WASP ファミリータンパク質の一員であり、IRSp53 や Abi1、Sra1、Nap1 といったタンパク質とコンプレックスを形成して単量体 G タンパク質 Rac の下流で葉状仮足の形成に関わっていることがこれまでに報告されているが、WAVE2 それ自体が Arp2/3 複合体を活性化する機構については明らかにされていない。また WAVE は増殖刺激に応じて古典的 MAP キナーゼカスケードの下流でリン酸化されることも明らかにされている。私は WAVE2 の制御機構について、そのリン酸化に焦点を当て解析した。

<結果>

3 種類のアイソフォーム WAVE1~3 のうち、どのアイソフォームがリン酸化されているかを調べるため、それぞれのアイソフォームに特異的な抗体を用いてウエスタンブロット法で解析したところ、WAVE2 がバンドシフトを起こしていることが分かった (Fig. 1A)。そして WAVE2 のバンドシフトは、MEK のインヒビターである U0126 によって抑えられていた。WAVE2 のリ

ン酸化状態を直接調べるため、放射性ラベルされた正リン酸を用いて細胞内の WAVE2 を放射性ラベルすることを試みた。レトロウイルスを用いて FLAG タグ付きの WAVE2 を発現させた WAVE2 ノックアウト MEF に、放射性ラベルされた正リン酸を取り込ませ、PDGF 刺激を行うことで WAVE2 に放射性ラベルされたリン酸基を取り込ませた。PDGF 刺激依存的に WAVE2 へのリン酸の取り込みが見られ、またその取り込みは U0126 で完全に抑えられた。このことから、WAVE2 のバンドシフトと同時に WAVE2 のリン酸化も MAP キナーゼカスケードの下流で起こっていることが明らかになった (Fig. 1B)。

in vitro でのキナーゼアッセイを用いて WAVE2 が ERK2 によって直接リン酸化される可能性を検討したところ、5 個のセリン・スレオニン残基が ERK2 によって直接リン酸化されることが明らかになった。リン酸化される残基はプロリンリッチな領域に 3 箇所と、Arp2/3 複合体を活性化するために必要な VCA ドメインに 2 箇所であった (Fig. 2)。放射性ラベルされた正リン酸を使った実験から、これらの残基は細胞内でもリン酸化されていることが確認された (Fig. 3A)。また、プロリンリッチ領域においてリン酸化される残基をアラニンやグルタミン酸に置換した変異体を発現させた実験から、プロリンリッチ領域のリン酸化が WAVE2 のバンドシフトに対応していることが明らかになった (Fig. 3B)。

VCA ドメインを用いてアクチン重合アッセイを行ったところ、この領域がリン酸化されると Arp2/3 複合体を活性化する能力を失うことが判明した (Fig. 4)。また、リン酸化される残基をアラニンまたはグルタミン酸に置換した変異体を、WAVE2 がノックアウトされたマウス胎児繊維芽細胞に発現させたところ、アラニンに置換した変異体に比べグルタミン酸に置換

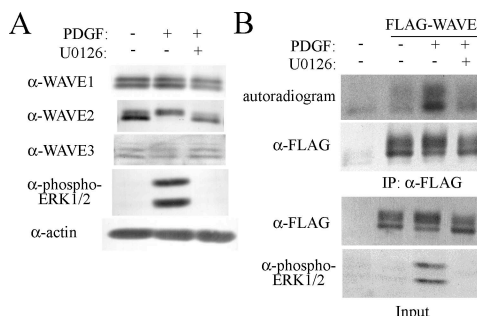


Figure 1 (A) WAVE2のみPDGF刺激に応答してバンドシフトしている。(B) MEKのインヒビターによりWAVE2のバンドシフトとリン酸化が抑制される。

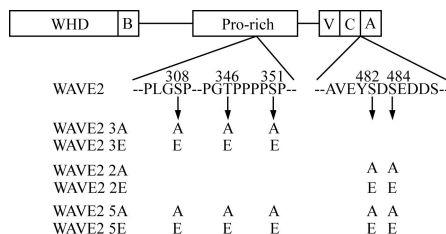


Figure 2 WAVE2のドメイン構造と本研究で明らかになったリン酸化残基 (WHD, WAVE homology domain; B, basic; Pro-rich, proline-rich region; VCA, verprolin, central, and acidic region)。

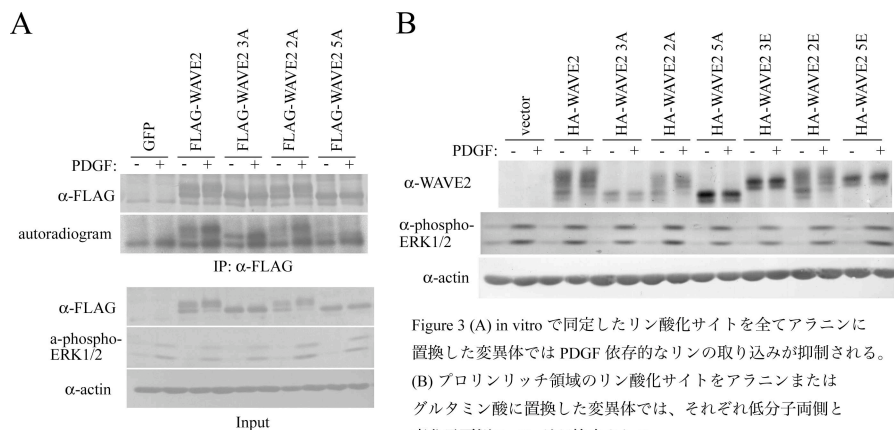


Figure 3 (A) *in vitro* で同定したリン酸化サイトを全てアラニンに置換した変異体では PDGF 依存的なリンの取り込みが抑制される。(B) プロリンリッチ領域のリン酸化サイトをアラニンまたはグルタミン酸に置換した変異体では、それぞれ低分子両側と高分子両側のバンドが検出される。

した変異体で葉状仮足における vinculin 分子との共局在が増強していた (Fig. 5)。以上のことから WAVE2 のリン酸化が、アクチン重合活性調節と葉状仮足における接着機構の形成に関与していることが明らかになった。

<考察>

葉状仮足の伸展と新たな接着斑の形成は協調的に進む現象であると考えられる。本研究で、WAVE2 の VCA ドメインがリン酸化されると Arp2/3 複合体を活性化する能力が低下すること (Fig. 4A)、そして同時に vinculin との共局在が増強されることが明らかになった (Fig. 5)。これらのことから、WAVE2 のリン酸化は、葉状仮足の伸展と接着斑の形成が協調的に起こるために何らかの役割を果たしている可能性が示唆された。

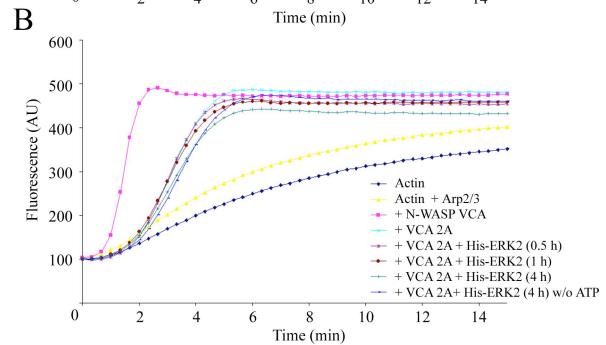
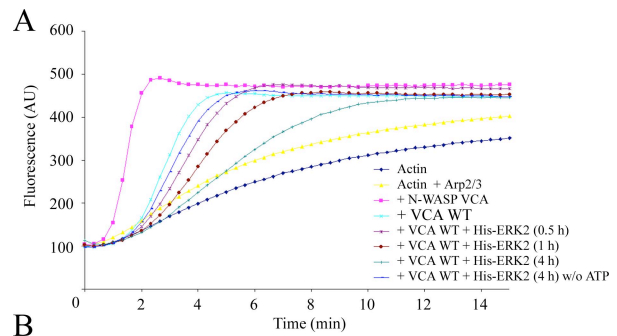


Figure 4 (A)VCA WT タンパク質は in vitro でリン酸化されると Arp2/3 複合体を活性化する能力を失うが、リン酸化サイトをアラニンに置換した変異体 (B) は影響がみられない。

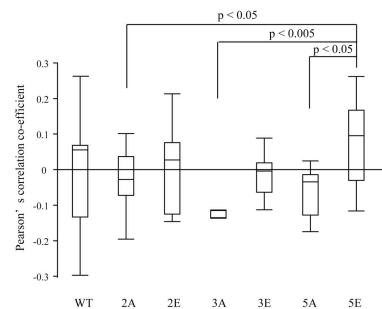


Figure 5 WAVE2 とその変異体を WAVE2 ノックアウト MEF に発現させ、vinculin との共局在を調べたところ、リン酸化サイトをアラニンに置換した変異体よりグルタミン酸に置換した変異体でより強い共局在が観察された。