

論文審査の結果の要旨

氏名 中西修

本論文は9章からなる。第1章は略号、第2章はアブストラクト、第3章は序論、第4章は実験材料と方法、第5章は結果、第6章は考察、第7章は参考文献、第8章は図表、第9章は謝辞に充てられている。

序論では、アクチン細胞骨格の基本的な性質が述べられたのち、本研究で解析が行われている二つのシグナル伝達経路、つまり Ras/MAP キナーゼカスケードと、Rho ファミリー単量体 G タンパク質による細胞骨格制御についての概説がなされている。そして、それらのシグナル伝達経路両方の下流に位置する分子として、WASP ファミリータンパク質のメンバー WAVE1~3 を示し、既知の知見について述べられている。

第5章は本研究で行われた解析の結果が示されている。論文提出者はまず 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、WAVE2 が MAP キナーゼカスケードの下流でリン酸化されていることを明らかにした。次に、*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残基を同定したところ、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須な VCA ドメインに 2 箇所であったことが述べられている。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。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。

次に、論文提出者は細胞内での WAVE2 リン酸化の意義を調べるため、野生型マウス胎児繊維芽細胞と WAVE2 がノックアウトされたマウス胎児繊維芽細胞を用いた解析を行っている。野生型マウス胎児繊維芽細胞を MEK のインヒビター存在下で刺激したときと、WAVE2 がノックアウトされたマウス胎児繊維芽細胞に WAVE2 非リン酸化変異体を発現させたときに、葉状仮足を形成する細胞の割合が増加するという現象が見いだされた。このことは、細胞を増殖刺激した時に葉状仮足の形成と MAP キナーゼカスケードの活性化が同

時に見られることから予想されたこととは逆の結果であり、MAP キナーゼカスケードの活性化が WAVE2 のリン酸化を通して葉状仮足の形成を負に制御していることが明らかにされた。WAVE2 がリン酸化されることでどのように葉状仮足の形成過程が制御されているかを明らかにするため、論文提出者は次に接着斑の構成因子である vinculin 分子と WAVE2 の局在を解析している。アラニンに置換した変異体に比べグルタミン酸に置換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ることが見いだされ、WAVE2 のリン酸化と接着斑の関わりが示唆された。

最後に、論文提出者は *in vitro* における WAVE2 のリン酸化の意義を調べるため、WAVE2 の VCA ドメインを用いてアクチン重合アッセイを行い、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とともに Arp2/3 複合体との親和性が増すことを明らかにした。

以上のことから、論文提出者は WAVE2 のリン酸化が葉状仮足の形成と接着斑の形成が協調的に起こるためになんらかの役割を果たしている可能性を示唆し締めくくっている。本研究は、Ras/MAP キナーゼカスケードと、Rho ファミリー単量体 G タンパク質 Rac の下流にある共通の因子として、WAVE2 を同定し、その二つのシグナルがどのように WAVE2 において交わっているのかを解析している点で意義のあるものである。Ras/MAP キナーゼカスケードが葉状仮足の形成に関与している報告はこれまでにない。本研究で、WAVE2 のリン酸化により葉状仮足の形成が抑制されることが明らかにされ、その現象が接着斑への WAVE2 の局在と Arp2/3 複合体活性化能の低下によって説明できる可能性が示唆された。

なお、本論文第 5 章は、末次志郎・山崎大輔・竹縄忠臣との共同研究であるが、論文提出者が主体となって分析及び検証を行ったもので、論文提出者の寄与が十分であると判断する。

したがって、博士（理学）の学位を授与できると認める。