

## 論文の内容の要旨

論文題目 Novel function of Calpain6 in cytoskeletal organization  
and its implication in cell physiology

和訳 カルパイン6の細胞骨格制御機能の同定とその生理的意義  
の解明

指導教員 栗原 裕基 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成16年4月入学

医学博士課程

分子細胞生物学専攻

砺波 一夫

胚発生における組織・器官の形成は、さまざまな分子の複雑な相互作用やカスケードによって営まれている。私は、鰓弓形成を支えるこのような分子カスケードを明らかにするため、エンドセリン-1 (ET-1) シグナル下流遺伝子の同定を試みた。正常胚と ET-1 ノックアウト胚の下顎において発現に差のある遺伝子をジーンチップによりスクリーニングし、さらに ET-1 の既知下流遺伝子 dHAND を P19 EC 細胞に導入し、発現が増加する遺伝子群を同様の方法で検索した。これらのスクリーニング結果に共通して含まれる遺伝子としてカルパインファミリーの一員である Calpain6 (Capn6) を同定した。カルパインは主に細胞質内で働くシステインプロテアーゼであり、基質に対する限定的切断により細胞の増殖や分化、アポトーシスなどの制御に関与している。しかし、Capn6 はファミリーの中で唯一、酵素活性中心を欠失した大変ユニークな分子であり、胎盤および胎生期における大まかな発現領域が知られていたことを除けば、これまで機能に関する知見は全く無かった。そこで、本研究では機能未知分子である Capn6 の機能を解明し、ET-1 シグナルによる形態形成の分子機構を明らかにすることを目的とした。

まず、マウス 9.5~11.5 日胚で *in situ* ハイブリダイゼーションを行い、Capn6 の発現が鰓弓・心臓・肢芽で認められること、ET-1 ノックアウト胚においては鰓弓で発現が減弱していることを明らかにした。この結果から Capn6 は ET-1

の下流遺伝子として鰓弓形成に関与しており、さらに胎生期器官発生において重要な役割を担っていると予想した。

そこで、Capn6 の分子機能を探るため細胞レベルの解析に取り組んだ。まず、GFP-Capn6 融合タンパク質を培養細胞において過剰発現し機能獲得時の表現型を解析した。Capn6 を過剰発現させた細胞では細胞質分裂異常に起因する細胞の多核化現象が多数観察され、殆ど全ての過剰発現細胞において細胞質分裂の遅延、特に分裂溝の切断不全が起こっていることが確認された。さらに、GFP-Capn6 融合タンパク質のシグナルと微小管の免疫染色像が細胞周期の様々な段階で一致し、分裂溝においても両者の共局在が認められた。また間期の細胞においては特に核周囲を中心とした微小管の束化が促進していることが観察された。これら過剰発現の実験結果から、GFP-Capn6 融合タンパク質は微小管と共局在し、その構築や機能に働きかけることで細胞質分裂に見られる様な細胞骨格関連現象と結びついている可能性が示唆された。

次に私は、ウサギを用いて抗 Capn6 抗体を独自に作成した。この抗体を用いて免疫染色を行い内因性 Capn6 の細胞内局在について検討したところ、内因性 Capn6 についても微小管と共局在していることが明らかとなり、特に束化した微小管で両者の共局在が強く認められた。さらに、微小管の安定化を促す試薬である Paclitaxel を用いた *in vitro* の実験では Capn6 が安定化した微小管と共沈することが証明された。これら両実験手法により Capn6 は安定化した微小管と結合する性質を有することが証明され、GFP-Capn6 融合タンパク質を用いた実験においても同様の結果を確認することが出来た。

そこで、Capn6 が微小管と結合し、その構築や制御にどのような役割を果たしているのかを過剰発現の実験手法に戻り詳細に検討した。Capn6 の安定化微小管との結合性や過剰発現細胞で見られた微小管の束化現象、細胞質分裂に対する影響から Capn6 と微小管の安定性との関連に着目し、Capn6 過剰発現細胞における微小管の安定性をアッセイした。微小管の安定性を示す分子として安定化チューブリンの翻訳後修飾体であるアセチル化チューブリンが挙げられる。そこで、Capn6 過剰発現細胞におけるアセチル化チューブリンの量をウェスタンブロッティングによりアッセイしたところ、コントロールに比べ著しく増加していることが明らかとなり、また免疫染色によりアセチル化チューブリンのシグナルは GFP-Capn6 の蛍光シグナルと良く重なることが確認された。これらの結果から、過剰発現した Capn6 は微小管と結合し、微小管を安定化する作用があることが明らかとなった。さらに、Capn6 の微小管安定化作用が細胞質分裂など細胞の細胞骨格関連現象に重要な役割を果たしていることが示唆された。

続いて内因性 Capn6 の微小管に対する機能について検証するため RNAi による Capn6 のノックダウン (KD) を行った。内因性 Capn6 の KD を確認した2つの RNAi クローンにおいて、いずれも微小管構造の崩壊が認められ、アセチル化チューブリンの量的減少も認められた。さらに、GFP-チューブリン融合タンパク質安定発現細胞株において Capn6 を KD したところ、Capn6 の抑制によ

り微小管の束化が失われている傾向が GFP シグナルを介して明らかとなった。以上の結果から、内因性 Capn6 も微小管の束化を維持あるいは促進する機能があることが明らかとなった。

さらに、本研究では欠失変異体を作製し免疫染色および Pull down アッセイにより Capn6 と微小管の結合領域を同定した。その結果、Capn6 はそのドメインⅢ領域を介して微小管と結合していることが明らかとなった。ドメインⅢ領域は古典的なカルパイン分子では C2 様ドメイン構造をとっているが、Capn6 のドメインⅢはそれらとの相同性が低く Capn6 の独自の分子機能を裏付ける結果となった。これに加え、GST-Capn6 融合タンパク質と重合精製チューブリンの結合試験により両者が *in vitro* で直接的に結合することも確認している。

以上の結果により Capn6 が微小管と結合し、その安定化を介して細胞機能に寄与していることが強く示唆されたため、Capn6 KD 細胞を用いて細胞骨格が関与する細胞現象を重点的に観察した。まず、細胞質分裂に着眼したところ、Capn6 を KD した細胞では M 期から細胞質分裂終了時までの過程でおきる糸状仮足の形成が早まることが分かった。この知見は細胞骨格がダイナミックに編成を変える細胞質分裂において Capn6 が微小管の安定化を介し、その代謝回転や再構築など動的現象に重要な役割を果たしていることを示している。また、KD 細胞ではアクチンフィラメントによる葉状仮足の形成が著しく亢進し、ラフリング現象も活発化することが明らかとなった。さらに、Boyden chamber 法や scratch wound アッセイの実験から Capn6 の抑制によって細胞の遊走能が亢進することが示され、Capn6 の細胞骨格における作用が細胞形態や運動能の制御に関与していることが明らかとなった。

ここまでの結果から Capn6 を KD した細胞では安定化微小管構造の崩壊と共にアクチンフィラメントによる葉状仮足の形成亢進、ラフリング現象の活発化、細胞遊走能の亢進が観察された。そこで、次に Capn6 の細胞骨格制御に関わる分子機構に着眼した。このような細胞現象に共通して、中心的な役割を果たしている分子として低分子量 G タンパク質 Rho ファミリータンパク質が知られている。本研究では特に Capn6 による Rac1 の活性制御に注目し、RNAi による Rac1 の抑制あるいは Rac1 の活性阻害剤が Capn6 KD 細胞の表現型に与える影響を検討した。その結果、Rac1 の抑制および Rac1 活性阻害剤のいずれによっても Capn6 の KD 細胞に見られる葉状仮足の形成が有意に抑制され、さらに細胞運動能にも影響が見られた。また、Capn6 の過剰発現細胞に見られる細胞形態は Rac1 のドミナントネガティブ変異体過剰発現細胞と良く類似しており、Capn6 が Rac1 の活性を抑制する働きを有していることが示唆された。

これに加えて Capn6 はアクチンと結合する性質も有しており、DomainⅢ領域単独ではアクチンと強い共局在を示す。さらに、Capn6 過剰発現細胞において Nocodazol を高濃度で処理し微小管と Capn6 の結合を解離すると、細胞は糸状仮足を形成し Capn6 はその糸状仮足上に局在を示すようになる。

以上の結果から Capn6 は比較的安定化された微小管上で Rac の活性を抑制し、微小管の安定化を促進すると共に、安定化微小管から解離した Capn6 はアクチ

削除: 一部

削除: 乖離

削除: 乖離

ンに親和性を示し、Capn6はこの微小管およびアクチンの双方向的な親和性とRacの活性化抑制作用をもって細胞質分裂、細胞形態、細胞運動といった細胞骨格が関連する細胞現象に重要な役割を果たしているという仮説を提示した。

また、細胞レベルの機能解析と並行して本研究ではCapn6の遺伝子改変マウスを作製した。遺伝子改変領域に挿入したLacZの発現によりCapn6は胎生期で鰓弓組織が由来となる舌筋を含め、幼若な筋・骨・軟骨組織を中心に発現していることが明らかとなった。現在、LacZ発現組織である筋・骨・軟骨の形態観察を中心にCapn6遺伝子改変マウスの表現型に関する解析をさらに進めている。

以上の結果を総合して、今後は培養細胞で認められたCapn6のRac活性抑制機能と個体レベルでの筋・骨分化との関連を追及し、ET-1シグナルの下流遺伝子として下顎の形成にどの様に寄与しているのかを明らかにすると共にCapn6そのものの組織構築における生理的役割を解明していく予定である。