

[課程一 2]

審査の結果の要旨

氏名 砺波 一夫

本研究ではエンドセリン-1 (ET-1)シグナルによる鰓弓形成の分子機構を明らかにするため、ジーンチップを用いたスクリーニングから ET-1 の下流遺伝子として Calpain6 (Capn6) を同定した。Capn6 はカルパインファミリーの中でも唯一、酵素活性中心を欠失した大変ユニークな分子であり、これまでその機能については全く知られていなかった。

そこで、本研究では培養細胞を用いて Capn6 の機能解析を試みるとともに、遺伝子改変マウスの作製を通じて器官発生における Capn6 の生理的役割の解明を目指している。これらの目的のもと、本研究では下記の結果を得ている。

1. 胎生期器官発生(9.5~11.5日胚)における Capn6 の mRNA 発現パターンを in situ ハイブリダイゼーションを用いて解析したところ、Capn6 は ET-1 遺伝子改変マウスの鰓弓間葉領域で特異的に発現低下が認められた。また、鰓弓に加え Capn6 は肢芽、心臓、体節の領域に発現が認められ、胎生期の器官形成に重要な役割を果たしている可能性が示唆された。
2. GFP-Capn6 融合タンパク質を培養細胞に過剰発現したところ、細胞質分裂の異常に起因する細胞の多核化現象が観察され、また殆ん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確認された。さらに、GFP-Capn6 融合タンパク質は細胞骨格成分である微小管と共局在し、その束化を亢進することから Capn6 は微小管に働きかけることで細胞機能に重要な役割を果たしていることが示唆された。
3. そこで、内因性の Capn6 に対する抗体を作製し、免疫染色および生化学的手法により Capn6 と微小管の結合を検討したところ、Capn6 は特に安定化した微小管に結合性を示すことが明らかとなった。さらに、微小管への結合は Capn6 の構造中でも特に他のカルパイン分子と相同性が低いドメインⅢ領域を介しており、Capn6 のファミリーに置けるユニークな機能を示唆する知見である。
4. 以上の結果から Capn6 と微小管の関係に着目し、Capn6 の過剰発現が微小管にどのような働きかけるかを解析したところ、Capn6 過剰発現細胞では安定化微小管の翻訳後修飾体であるアセチル化チューブリンの量が著しく増加し、Capn6 の微小管に対する作用がその安定化にあることを突き止めた。
5. 続いて RNAi による Capn6 のノックダウン (KD) を行ったところ、内因性 Capn6 の抑制により微小管構築が崩壊し、アセチル化チューブリンの量的減少が認められた。このことから、内因性の Capn6 が細胞機能の維持において微小管を安定化する役割を

6. 次に、本研究では **Capn6** の細胞骨格および運動能の制御に関与する分子機構を明らかにする目的で、葉状仮足形成や細胞の遊走性に重要な役割を持つ低分子量 G タンパク質 **Rac1** との関連を調べた。その結果、インヒビターや **RNAi** による **Rac1** の抑制により **Capn6 KD** 細胞における葉状仮足形成や運動能の亢進が有意に抑制され、また、**Capn6** 過剰発現細胞のアクチン骨格編成が **Rac1** のドミナントネガティブ過剰発現細胞のそれと類似していることから、**Capn6** が **Rac1** の制御を介し、細胞骨格構築や運動能の制御に関与している可能性を示した。
7. これに加え、**Nocodazol** を培養細胞に高濃度で処理し、安定化微小管の構築を完全に破壊すると、**Capn6** は安定化微小管と解離してアクチンと親和性を示すようになる。また、ドメインⅢ単独では微小管を安定化しない条件下でアクチンと共局在を示すことから、**Capn6** は微小管およびアクチンと双方向的な親和性を有し、その **Rac** 活性化抑制作用により細胞質分裂、細胞形態、細胞運動といった細胞骨格関連現象に広く重要な役割を担っている可能性を示唆している。
8. また、細胞レベルの機能解析と平行して本研究では **Capn6** 遺伝子改変マウスを作製しおり、**Capn6** 遺伝子改変領域に挿入した **LacZ** の発現解析によりその発現領域を詳細に解析、同定した。その結果 **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。個体レベルでの発現解析は **Capn6** が筋・骨・軟骨の形態形成に重要な役割を果たしている可能性を示唆しており、**Capn6** の器官発生における生理的役割を示唆するものである。

以上、本論文では鰓弓形成におけるエンドセリン-1 下流遺伝子としての **Capn6** の同定に始まり、その微小管安定化作用、アクチンを含む細胞骨格再編成における役割や細胞運動能の制御における役割を明らかにしている。本研究はこれまで機能が全く未知であった **Capn6** の分子機能を始めて解明したものであり、またカルパインファミリーの中でも唯一、酵素活性部位を欠失したカルパインの機能を同定した点で独創性、新規性に富む研究成果である。さらに、遺伝子改変マウスの作製を通じて、その器官形成における生理的役割に迫るものであり、その表現型の解析は今後のさらなる進展が期待される場所である。本研究の成果はマクロな器官形成を分子のレベルから理解する大きな足がかりを作ると共に、細胞骨格の制御機構や生体におけるカルパインシステムに新しい概念を導入する重要な貢献をなすものと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。