

審査の結果の要旨

氏名 吉村 祐太

本研究は線虫からヒトまで進化的に保存されている細胞極性制御キナーゼ Par1 の基質を同定し、その極性制御における役割を明らかにするため、イヌ上皮細胞 MDCK の細胞溶解液から Par1 結合タンパク質の探索を試みたものであり、下記の結果を得ている。

1. FLAG-Par1b もしくは GFP を安定発現させた MDCK 細胞溶解液から抗 FLAG 抗体ビーズで免疫沈降を行った。共沈したタンパク質を SDS-PAGE で分離し、銀染色によって可視化した。GFP にはなく、FLAG-Par1b 特異的に共沈してくる 250-kDa のタンパク質を質量分析で調べたところ、これが GAKIN であった。
2. 抗 Par1b 抗体および抗 GAKIN 抗体を用いて MDCK 細胞溶解液から免疫沈降を行った。この結果、内在性の Par1b と GAKIN が細胞内で複合体を形成することが示された。4 つの GAKIN 欠失型変異体 (Motor, Stalk1, Stalk2, CAP-Gly) を作製し、それぞれについて Par1b との結合を調べた。その結果、Stalk1 および Stalk2 が Par1b と結合したことから、Stalk 領域には少なくとも 2 つの独立した Par1b 結合部位が存在していることを示した。
3. COS-7 細胞に発現させた FLAG-GAKIN を抗 FLAG 抗体ビーズで精製し、そこに His-Par1b を混合してリン酸化アッセイを行ったところ、GAKIN のリン酸化シグナルが増加した。リン酸化されているアミノ酸残基の場所を調べるため、GAKIN の 4 種類の欠失型変異体ももちいてリン酸化アッセイを行うと、Stalk2 だけがリン酸化された。Stalk2 のアミノ酸配列をヒト、マウス、ゼブラフィッシュ、ショウジョウバエで比較してみると、1381 番目と 1410 番目のセリン残基が高度に保存されていることがわかった。さらに 1381 番目のセリン残基は 14-3-3 結合モチーフである RSXpSXP または RXXXpSXP に合致している。これら 2 つのセリン残基をアラニン残基に置換した変異体 (S1381A, S1410A, AA (S1381A/S1410A)) を作製し、Par1b のリン酸化アッセイを行った。S1381A, S1410A 変異体ではシグナルが減少しており、両方に変異を入れた AA 変異体ではリン酸化シグナルがほとんど検出されなかった。このことから、試験管内における Par1b によるリン酸化部位が 1381 番目と 1410 番目のセリン残基であることがわかった。
4. COS-7 細胞に FLAG-Stalk2 と Myc-Par1b を共発現させて、抗 FLAG 抗体ビーズで免疫沈降後、内在性 14-3-3 $\beta$ を検出すると、Myc-Par1b 依存的に FLAG-Stalk2 の 14-3-3 $\beta$  結合量が上昇した。抗リン酸化 14-3-3 結合モチーフ抗体 (リン酸化された 14-3-3 モチーフを特

異的に認識する) を用いて GAKIN のリン酸化状態を直接調べると、Myc-Par1b と FLAG-Stalk2 を共発現させた時に FLAG-Stalk2 のリン酸化が確認できた。

5. Myc-GAKIN を MDCK 細胞に過剰発現させると細胞突起を形成し、その先端に Myc-GAKIN が集積した。ところが、同時に FLAG-Par1b を共発現させると Myc-GAKIN は細胞質中に分散し、細胞突起の形成は阻害された。Myc-GAKIN AA を単独で発現させると Myc-GAKIN と同様の局在を示すが、FLAG-Par1b を共発現させても反応しなかった。これらの結果は Par1b がリン酸化によって GAKIN の細胞内局在(集積)を制御していることを示している。
6. Myc-GAKIN を発現させた MDCK 細胞に微小管を脱重合させるノコダゾールを処理すると、Myc-GAKIN は集積することなく細胞突起も形成されなかった。微小管共沈降アッセイを行うと、FLAG-GAKIN はタキソールで安定化させた微小管に結合して共沈降するが、Myc-Par1b を共発現させておくと微小管と共沈降してくる FLAG-GAKIN の量は顕著に減少した。GAKIN は Motor ドメインと Stalk 領域で分子内結合を形成していることが報告されている。Myc-Par1b を共発現させると、FLAG-Motor に結合する Myc-Stalk の量は Myc-Stalk AA と比べて増加した。これらの結果は、Par1b のリン酸化によって GAKIN の分子内結合が強まり、微小管との結合が阻害されることで、細胞質中に分散すると考えられる。
7. ラットの海馬神経細胞の発達段階において、stage 2 のほとんどの神経細胞で内在性 GAKIN は複数の短い突起の先端に濃縮している。これとは対照的に、stage 3 の神経細胞で内在性 GAKIN は 1 本の長い突起の先端にだけ濃縮しており、他の短い神経突起からは消失していた。この 1 本の突起は軸索であり、GAKIN は成長円錐先端の微小管末端に局在することを示した。
8. 海馬神経細胞を単離した直後に Nucleofector kit を用いた siRNAs の導入により GAKIN をノックダウンした。コントロール siRNA を導入した神経細胞が stage 3 に成長し、Tau-1 陽性の軸索が形成される時期において、GAKIN siRNAs を導入した細胞では Tau-1 陽性の軸索が形成されにくくなっていた。さらに、神経細胞に GAKIN siRNA #2 と同時にコントロールベクターを導入しても軸索形成は阻害されたが、Myc-GAKIN を同時に導入させることで軸索形成阻害の表現型は緩和された。これらの結果から GAKIN が軸索形成に必要なであることを示した。
9. 海馬神経細胞に Myc-GAKIN を過剰発現させると、軸索が過形成された細胞の数がコントロールと比較して顕著に増加した。この Myc-GAKIN による軸索の過形成は FLAG-Par1b を共発現させることで抑制される。一方、Myc-GAKIN AA の過剰発現でも同様に軸索の過形成が起こるが、FLAG-Par1b によって抑制されなかった。これらの結果は、Par1b によるリン酸化が GAKIN の機能を負に制御していることを示した。
10. FLAG-Par1b を過剰発現させると、海馬神経細胞の stage 2 での内在性 GAKIN の神経突

起先端への集積を阻害したが、FLAG-Par1b KN では効果がなかった。Par1 と GAKIN の上流で機能すると考えられる PI3K の阻害剤 (LY294002) および PKC $\zeta$  の阻害剤で極性形成前の stage 2 における GAKIN の局在を調べた。コントロール (DMSO、KT5720) の処理では GAKIN が神経突起の先端に集積していたが、対照的に LY294002 と PKC $\zeta$  阻害剤では GAKIN の集積が著しく阻害されていた。また、この効果が Par1 のリン酸化依存的事であることを示した。つまり、神経極性形成において PI3K 情報伝達系は Par1b/GAKIN の上流で機能していることを明らかにした。

11. 通常、stage 2 の細胞で平均 2 本の神経突起の先端にリン酸化 Akt (Ser473) のシグナルが観察されたが、Myc-GAKIN AA を発現させた細胞ではその数が約 1.5 倍増加した。次に GAKIN をノックダウンした神経細胞を調べると、リン酸化 Akt (Ser473) のシグナルを持つ神経突起の数は減少した。これらの結果から、GAKIN が神経突起の先端に PIP3 を集積させ、軸索の決定に貢献している可能性が示された。

以上、本論文は極性制御因子 Par1b の基質が GAKIN であることを見つけ、その制御機構の解析から Par1b によるリン酸化が GAKIN の集積を制御することが神経極性の形成に重要であることを解明した。本研究はこれまで未知に等しかった、極性形成シグナル伝達における Par1b の下流のシグナル伝達解明に重要な貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。