

## 論文の内容の要旨

応用生命工学専攻  
平成22年度博士課程進学  
氏名 稲葉弘哲  
指導教員名 依田幸司

論文題目 細胞性粘菌の細胞質分裂に関わる新規細胞骨格制御因子の解析

### 第1章 緒論

細胞分裂は生物にとって自己増殖を達成するために不可欠な現象である。細胞分裂は、遺伝情報である DNA を等分する核分裂と、それに引き続いて起こる細胞質を等分する細胞質分裂からなる。この過程は時空間的に厳密に制御される必要があるが、その詳細な分子機構は特に細胞質分裂において未解明な部分が多い。動物細胞では、核分裂時に球形化・伸長した細胞は、核分裂の終了に伴い中央で収縮環が陥入して分裂溝が形成され、娘細胞が両極へ移動し、最終的に娘細胞を繋ぐ橋状構造が切断され、完了する。この様に細胞質分裂は非常にダイナミックな細胞形態の変化を伴うので、広義の細胞運動現象であると言える。細胞運動現象にはアクチン細胞骨格を主とした細胞骨格系の制御が重要である。アクチン細胞骨格は収縮環の主成分であり、娘細胞の細胞移動においても重要である。アクチン細胞骨格には多くの制御因子が見出されているが、その詳細な制御機構は未解明な部分が多い。

細胞性粘菌 *Dictyostelium discoideum* のアメーバ細胞は細胞質分裂や貪食作用、走化性運動などにおける形態変化の様式が動物細胞のそれと酷似して

いるため、広義細胞運動現象のモデル生物として用いられている。当研究室では、REMI(restriction enzyme-mediated integration)法により基質上で多核化する細胞性粘菌変異株を取得し、細胞質分裂に関わるタンパク質の同定と解析を行ってきた。本研究では、その中の 1 つであり、細胞骨格制御に関わっていると考えられた nenkyrin (D411-2p)の機能解析を研究の開始点として、動物型細胞質分裂の分子機構を明らかにすることを目的とした。

## 第 2 章 細胞質分裂に関わる新規アクチン結合タンパク質 nenkyrin の解析

Nenkyrin は 1346 アミノ酸からなる全体が親水性のタンパク質で、遺伝子破壊株(K06 株)は、基質上で細胞質分裂に失敗し巨大多核化することや、細胞形態が扁平であることが分かっていた。また、GFP-nenkyrin はアクチンに富む細胞の裏打ち骨格(cortex)やマクロ飲作用時の王冠状突起(crown)に局在した。これらのことから、nenkyrin はアクチン細胞骨格系の制御に関与することが示唆された。そこで、貪食作用やマクロ飲作用、走化性運動の速度を調べると、何れも K06 株では親株(AX2)に比べ明らかに低下していた。また、GFP-nenkyrin はファゴシティックカップにも局在しており、nenkyrin は様々な細胞運動現象においてアクチン細胞骨格を制御することが示唆された。

GFP 融合型の部分断片を作製し、局在を観察すると、F9R7 (アミノ酸残基 264~701)と C 末端を含む NΔF14 (1052~1346)の 2 断片でそれぞれ F アクチンと共局在を示し、GST 融合型として大腸菌から精製した両断片はウサギ骨格筋の F アクチンと相互作用の強さが異なるものの、共沈した。但し、GFP-F9R7 と異なり GFP-NΔF14 は界面活性剤 Nonidet P-40 を用いて調製した F アクチンを主成分とする細胞の裏打ち骨格(cytoskeleton ghost)との共沈は見られなかった。大腸菌から精製した nenkyrin 全長も F アクチンと共沈し、nenkyrin は少なくとも 2 カ所で F アクチンと直接相互作用することが示唆された。

Nenkyrin を F アクチンと混合し、透過型電子顕微鏡で観察すると F アクチンが束化されており、これは F9R7 断片のみでも観察された。以上より、nenkyrin はアクチン束化タンパク質であり、束化活性は少なくとも F9R7 領域内にあることが分かった。

作製した GFP 融合型断片を KO6 株で過剰発現させると GFP-NΔF14 で細胞質分裂と細胞形態の異常が相補された。このことから nenkyrin の機能には束化能を持つ F9R7 領域よりむしろ、F アクチンとの相互作用が弱い NΔF14 領域が重要であることが示唆された。これまで nenkyrin には既知のドメインに相同性のある配列は見出されていなかったが、NΔF14 領域のみによる検索から、この領域に

相同性のある配列を持つアメーバ類のタンパク質がいくつか同定された。これらの領域は互いに相同性を持っており、nenkyrin ドメイン(NKD)と命名した。NKD を持つ細胞性粘菌のタンパク質は nenkyrin の他に 3 つあり、既に命名されていた GflB 以外のタンパク質を NkrB、NkrC とした。単独遺伝子破壊株の解析により、NkrB の細胞質分裂への関与は示唆されなかった。一方、GflB は細胞質分裂への関与が示唆されたので、第 3 章で詳細に解析した。

### 第 3 章 nenkyrin ドメインを持つ GflB の機能解析

GflB は NKD を持ち、同時に低分子量 G タンパク質の制御ドメインである RhoGAP ドメインと RasGEF ドメインを持つ 1601 アミノ酸からなるタンパク質である。GflB の機能を調べるため、最初に *gflB* 破壊株を作製した。*gflB* 破壊株は基質上では単核であったが、生育速度が遅く、仮足 (pseudopod) の数が多く、細胞が扁平且つ細長くなっていた。さらに、*gflB* 破壊株では貪食作用とマクロ飲作用の速度の低下も見られた。一方、GFP-GflB を過剰発現すると、細胞の球形化が見られ、基質上でも多核細胞が見られた。破壊株と過剰発現株を懸濁培養すると、何れも多核化し、特に破壊株は分裂せず、細胞数の増加がほとんど見られなかった。また、*gflB* 破壊株では cytoskelton ghost に含まれる F アクチン量が増加しており、アクチン細胞骨格に異常が見られることが分かった。

GFP-GflB の局在を観察すると、crown や cortex などの F アクチンに富む部位への局在が見られた。GFP-GflB は細胞質分裂時に分裂溝への局在は見られなかったが、不思議なことに F5R6 領域(129~700)を含む部分断片で分裂溝や、娘細胞を繋ぐ橋状構造への局在が見られた。また、F アクチンに富む部位への局在には CAR10 領域(1~47)が必要であり、大腸菌から精製した GST-CAR10 は F アクチンと共沈することから、GflB もまた F アクチン結合タンパク質であることが示唆された。

GFP 融合型の部分断片を *gflB* 破壊株で過剰発現させると、NKD の一部を欠損させた  $\Delta$ NKD3 (1~1423) や GEF ドメインの一部を削った  $\Delta$  GEF( $\Delta$ 1106~1205) では形態の異常は相補されず、GEF ドメインと NKD を持つ GEF+NKD(783~1601)で相補された。このことから GflB においても細胞骨格制御における機能に NKD が必要であり、加えて RasGEF ドメインも必要であることが示唆された。

### 第 4 章 GflB を含む情報伝達系の解析

GflB を含む情報伝達系の解析のために、まず GflB の標的的低分子量 G タンパク

質の探索を行った。酵母ツーハイブリッド法によって全ての Rho ファミリー GTPase と Ras ファミリー GTPase について解析したが、有意な強さの相互作用は認められなかった。第 3 章で述べた様に RasGEF ドメインの重要性が示唆されたので、以降は Ras ファミリー GTPase に絞って解析を進めた。まず、GST-Ras を用いた pull-down assay や *in vitro* の GEF 活性測定を一部に対して行ったが、何れも陰性だった。次に、GFP-Gf1B の過剰発現で多核化が見られたことから、Ras ファミリー GTPase の恒常活性型の過剰発現で多核化が見られるか調べた。その結果、既に知られていた RasB の他に RasW, X, Y, Z で多核化することが分かった。RasW, X, Y, Z は相同性が高く、重複した機能を持つと予想される。現在の時点でこれらと Gf1B の関連性は明らかではないが、少なくとも RasW-Z が細胞質分裂に関与することは示唆された。

次に、免疫沈降と PMF により GFP-Gf1B の相互作用因子の探索を行ったところ、恒常発現型の熱ショックタンパク質 Hsc70-2 が同定された。細胞性粘菌には Hsc70 のアイソフォーム Hsc70-1~4 の 4 つが存在する。共免疫沈降実験で mRFPmars-Hsc70-1~4 は全て GFP-Gf1B と共沈した。これらのことから、Hsc70-1~4 は何れも Gf1B と相互作用することが示唆された。Hsc70-2 については、単独遺伝子破壊株を作製した。Hsc70-2 の遺伝子破壊株に目立った表現型は見られなかったが、GFP-Gf1B を過剰発現させると AX2 で過剰発現させた場合に比べ、有意に多核細胞が多く、この相互作用は Gf1B の機能に意味があるものと考えられた。Hsc70 は分子シャペロンであるので、Gf1B の機能的構造の形成のみ関与する可能性もあるが、それ以外の機能も含めて、今後の解析が必要である。

## 総括

本研究では Nenkyrin が F アクチン束化タンパク質であり、細胞質分裂に加えて細胞移動やエンドサイトーシスも制御することを明らかにした。また、これらの細胞運動制御に、保存されたドメイン(NKD)が重要であることを見出した。この NKD を持つ Gf1B もアクチン結合タンパク質であり、細胞質分裂や細胞形態、エンドサイトーシスの制御に NKD と RasGEF ドメインを通して関与していることが示唆された。さらに、Gf1B との関連は証明できなかったが、RasW, X, Y, Z を新規細胞質分裂関連因子として同定した。この様に本研究により、NKD が細胞運動現象における細胞骨格制御に重要な役割を果たすことが分かったが、NKD の詳細な分子機構は未だ不明であり、今後解明されることを期待したい。