

[別紙 2]

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 稲葉 弘 哲

細胞分裂は生物にとって自己増殖を達成するための根源的な現象であり、時・空間的に厳密に制御される必要がある。細胞質分裂は、DNA を等分する核分裂に引き続いて起こる、細胞質を等分するプロセスである。動物型の細胞質分裂は、アクチン収縮環の形成に始まり、分裂溝の陥入、細い橋状構造の形成、切断という流れで進行する。この一連の流れにおける細胞形態のダイナミクスは、ほとんどがアクチン細胞骨格によって制御されていると考えられるが、その詳細な分子機構は多くが未解明のままである。本論文は、細胞質分裂研究の、特に細胞形態変化において重要なモデル生物として位置付けられている細胞性粘菌のアメーバ細胞を用い、細胞質分裂に関わる新規タンパク質の同定、機能解析を行った研究成果をまとめたもので、4章より構成される。

第1章の緒論に続き、第2章では、細胞性粘菌の細胞質分裂に関わる新規アクチン結合タンパク質 *nenkyrin* の機能について述べている。

まず、*nenkyrin* のアクチン細胞骨格の制御する細胞運動現象への関与を調べ、貪食作用、マクロ飲作用、走化性運動、細胞基質間接着への関与が示唆された。

次に F アクチンとの相互作用について調べた。GFP 融合型の *nenkyrin* 部分断片の細胞内局在解析により、2 領域で F アクチンと共局在することが明らかになった。組換えタンパク質を用い、ウサギ骨格筋の F アクチンとの共沈を調べ、この 2 領域で F アクチンと直接相互作用することが示唆された。さらに、組換えタンパク質を F アクチンと混合し、透過型電子顕微鏡で観察すると、F アクチンの束、特に部分断片ではパラクリスタルと呼ばれる非常に密な束が見られ、*nenkyrin* は密に F アクチンを束化することが示唆された。

次に *nenkyrin* 部分断片の遺伝的相補性を調べ、C 末端を含む束化能を持たない F アクチン結合領域のみで遺伝的相補性を持つことを明らかにした。さらにこの領域のアミノ酸配列が細胞性粘菌やアメーバ類のタンパク質に保存されていることを見出し、この領域を *nenkyrin domain* (NKD) と命名した。NKD には高く保存された短い指紋配列が 3 つ存在することを見出した。

第3章では NKD を持つタンパク質 *Gf1B* の遺伝子破壊株の表現型と細胞内局在について述べている。

Gf1B は NKD の他に推定 RhoGAP、RasGEF ドメインを持つタンパク質である。*gf1B* 破壊株は基質上で細胞が細長くなっており、懸濁培養すると多核化した。このことからアクチン細胞骨格の異常を推測し、調べたところ、細胞表層の F アクチン量の増加が見られると共に、仮足が長く出続けることが明らかになった。細胞分裂のタイムラプスビデオによる観察においても娘細胞の移動性に異常が生じていることが示され、仮足形成の制御異常

が細胞極性や細胞質分裂の異常として表れることが示唆された。

次に細胞内局在を調べた。GFP-Gf1B は間期には F アクチンに富むクラウンや細胞表層に局在し、分裂期にも F アクチンに富む polar region に局在した。このことから Gf1B は娘細胞の細胞移動に関与すると予想された。さらに部分断片も用いた解析により Gf1B は F アクチンと直接相互作用すること、アクチン細胞骨格依存的に細胞表層に局在することが示唆された。また、遺伝的相補性についても調べ、Gf1B においては RasGEF ドメインと NKD が機能的に重要であることが示唆された。この様に NKD を持つ Gf1B もアクチン細胞骨格制御を通じて細胞質分裂に関与することが明らかになった。

第 4 章では、Gf1B を含む情報伝達系を解析した結果が示されている。Gf1B と Rho、Ras ファミリー GTPase との相互作用について多角的に調べたが、相互作用は見出されなかった。しかしながら、Gf1B との表現型の類似性を調べる過程で、RasW, X, Y, Z の恒常活性型をそれぞれ過剰発現すると、細胞が基質上で多核化することが明らかになり、これらが新規細胞質分裂関連因子として同定された。

次に、免疫沈降と PMF 法によって Gf1B と相互作用するタンパク質を探索し、Hsc70-1, 2 を同定した。Hsc70 は分子シャペロンとして機能することが想像されるが、Hsc70-2 遺伝子破壊株で GFP-Gf1B を過剰発現した場合に、より多核化することが示され、この相互作用に何らかの生理学的意義があることが示唆された。

以上、本論文は細胞性粘菌の細胞質分裂に関わる複数のタンパク質を新たに同定し、その機能を明らかにすると共に、細胞運動現象において重要な機能を持つ新規ドメイン、NKD を同定したものであり、これらの研究成果は、学術上応用上寄与するところが少なくない。よって、審査委員一同は本論文が博士（農学）の学位論文として価値あるものと認めた。