

低分子量 GTP 結合蛋白質 Rho の標的分子による 中間径フィラメントの構造制御に関する研究

学位論文内容の要旨

中間径フィラメントはアクチンフィラメントおよび微小管とともに細胞骨格を構成する主要成分の1つである。*in vitro*での解析から、そのフィラメント構築はフィラメントの構成蛋白質の部位特異的なリン酸化・脱リン酸化により変化することが明らかとなった。また、これらリン酸化部位のセリン／スレオニン残基のリン酸化状態を特異的に認識する抗体（抗リン酸化抗体）を用いて細胞内での中間径フィラメント蛋白質のリン酸化を可視化した結果、細胞内においてもリン酸化・脱リン酸化がフィラメントの構築を制御している可能性が高まっている。我々はすでに抗リン酸化抗体を用いた細胞染色の結果から、細胞分裂後期にグリア線維酸性蛋白質（GFAP）の7番目のスレオニン残基および13、34番目のセリン残基が分裂溝領域で特異的にリン酸化されることを見いだした。このことは細胞質分裂に重要な役割を担うプロテインキナーゼの存在を示唆しており、このキナーゼを仮にCF（Cleavage Furrow）キナーゼと名付けた。

近年、低分子量GTP結合蛋白質Rhoが細胞質分裂において必須の役割を担っていることが報告された。Rhoは、活性型であるGTP結合型がその標的分子と相互作用することにより、細胞形態・接着や細胞運動、細胞質分裂などのさまざまな生理機能を制御していると考えられている。さらにごく最近、Rhoの標的分子の候補として、プロテインキナーゼN（PKN）やRho-キナーゼといったプロテインキナーゼや、ミオシンホスファターゼミオシン結合サブユニット（MBS）などが同定された。これまでRhoは、アクトミオシン系の制御を介して上に述べたような多彩な生理機能を遂行していると考えられてきたが、Rhoと中間径フィラメントの関係については全く不明であった。そこで本研究では、細胞質分裂で重要な役割を果たすRhoがCFキナーゼをも制御している可能性を想定し、PKN、Rho-キナーゼ、およびMBSの3つのRhoの標的分子と、中間径フィラメントとの関係について解析した。本論文の要旨は以下の3点である。

1. III型の中間径フィラメント蛋白質であるビメンチンとGFAPが、*in vitro*においてともにPKNによってリン酸化されることを明らかにした。また、そのリン酸化はこれ

らの蛋白質におけるフィラメント構築の制御ドメインといわれているヘッドドメイン特異的に生じており、PKNでリン酸化したビメンチンとGFAPはフィラメントの形成能を喪失することが確認された。抗リン酸化抗体を用いたウエスタンブロットによるリン酸化部位の解析から、この酵素はGFAPの7番目のスレオニン残基および8、34番目のセリン残基をリン酸化することが明らかとなった。これらはCFキナーゼの*in vivo*でのリン酸化部位とは異なったため、PKNはCFキナーゼではないと考えられたが、この酵素が*in vivo*においても中間径フィラメント蛋白質をリン酸化してそのフィラメント構築の制御に関与している可能性が示唆された。

2. Rho-キナーゼが*in vitro*で活性型のGTP・Rho依存的にGFAPのヘッドドメインをリン酸化することを明らかにした。またそのリン酸化によってGFAPのフィラメント形成能が失われることを示した。抗リン酸化抗体を用いたウエスタンブロットによるリン酸化部位の解析から、Rho-キナーゼはGFAPの7番目のスレオニン残基および13、34番目のセリン残基をリン酸化することが判明し、これらはCFキナーゼの*in vivo*でのリン酸化部位と一致した。以上の結果から、Rho-キナーゼがCFキナーゼの候補の1つであることが示された。

3. MBSが、線維芽細胞および細胞間接着を形成していない上皮細胞では主にミオシンファイバーと共存しており、細胞間接着を形成している上皮細胞ではミオシンファイバー上ではなくむしろ細胞間接着部位に存在していることを免疫染色により示した。また、MBSが細胞間接着の形成に伴って細胞質から細胞間接着部位へとトランスロケーションを起こすことを明らかにした。これらの結果から、MBSが細胞内で中間径フィラメントと相互作用する可能性は否定されたが、MBSがミオシンのみならず細胞間接着部位の機能をも調節している可能性が考えられた。

以上、Rho-キナーゼがCFキナーゼの候補の1つであること、またPKNが種々の中間径フィラメントの構築を調節しうることを見だし、細胞内における中間径フィラメント構築の制御がRhoとその標的分子のプロテインキナーゼによって担われている可能性を示した。

学位論文審査の要旨

主査	教授	東	市郎
副査	教授	谷口	和彌
副査	教授	矢澤	道生
副査	教授	菊池	九二三
副査	講師	劉	永春

学位論文題名

低分子量 GTP 結合蛋白質 Rho の標的分子による 中間径フィラメントの構造制御に関する研究

中間径フィラメントはアクチンフィラメントおよび微小管と並んで細胞骨格の主要成分の1つであるが、その強い安定性と不溶性のため、細胞中の単なる機械的支持体であり、静的で消極的な役割しか果たしていないと考えられてきた。しかしながら、*in vitro*において、細胞内シグナル伝達や細胞周期に関与するさまざまなプロテインキナーゼが中間径フィラメント蛋白質のヘッドドメインを部位特異的にリン酸化してそのフィラメントを脱重合させることが明らかとなり、中間径フィラメントの動的な側面が浮かび上がってきた。このような*in vitro*での中間径フィラメント構築の制御が*in vivo*でも起こっているかどうかという問題は、細胞内におけるアクチンフィラメントや微小管の機能解析が精力的に進められているのに対し未だ不明の点が多く、細胞の運動、接着、分化、癌化や細胞周期などの分子機構を解析していくうえで重要な課題として残されてきた。

申請者らはすでに種々のプロテインキナーゼによる中間径フィラメント蛋白質のリン酸化部位を同定し、そのリン酸化状態を特異的に認識する抗体群を作製した。そしてこれらの抗体を用いて、細胞内で生じる中間径フィラメントの部位特異的なリン酸化を時間的・空間的に解析してきた。その結果、細胞分裂後期に分裂溝近傍でグリア線維酸性蛋白質（GFAP）の7番目のスレオニン残基および13番目、34番目のセリン残基が特異的にリン酸化されることを発見し、このリン酸化を遂行する未知のキナーゼ（CFキナーゼ）の存在を示した。このことは、*in vivo*においても、リン酸化によって中間径フィラメントの構築が制御されているという説を強く支持するものであった。

近年、低分子量GTP結合蛋白質Rhoが、その標的分子を介して細胞骨格を制御していることを裏付ける報告が数多くなされている。Rhoは、アクトミオシン系の制御を介し

て多彩な生理機能を遂行していると考えられてきたが、Rhoと中間径フィラメントの関係については全く不明であった。また、Rhoが細胞質分裂において必須の役割を担っているといわれていることから、本研究において、低分子量 GTP 結合蛋白質 Rho の標的分子の中に CF キナーゼが存在するかどうかを検討した。

*in vitro*におけるリン酸化反応の解析結果から、プロテインキナーゼ N (PKN) については GFAP に対するリン酸化部位が異なったため、CF キナーゼそのものではないということが明らかとなった。しかしながら、この酵素が種々の中間径フィラメント蛋白質をリン酸化してそのフィラメント形成能を失わせることが判明し、PKN が *in vivo*においても中間径フィラメント構築の制御に関与している可能性が示唆された。

一方、Rho-キナーゼについては、GFAP に対するリン酸化部位が一致しており、かつリン酸化された GFAP がフィラメントの形性能を喪失することから、この酵素が CF キナーゼの有力な候補であることが判明した。この結果とこれまでに得られている知見を総合し、「細胞質分裂期に分裂溝に集積した Rho によって Rho-キナーゼ/CF キナーゼが局所的に活性化され、ミオシン軽鎖のリン酸化などを通じてアクトミオシン系より成る収縮環を形成・維持するとともに、分裂溝近傍の中間径フィラメント (GFAP) をリン酸化する」というモデルを組み立てることが可能となった。

このように申請者は、細胞骨格の主要成分の 1 つである中間径フィラメントの構造が、細胞内において低分子量 GTP 結合蛋白質 Rho とその標的分子のプロテインキナーゼによって制御されている可能性を示した。これは細胞運動や細胞接着、細胞周期、細胞分化や癌化などに伴う細胞の形態変化の分子機構を解明するうえで貢献するところ大なるものがある。

よって、申請者は、北海道大学博士 (理学) の学位を授与される資格あるものと認める。