

Huntington 病原因蛋白質 huntingtin に結合する  
HIP1(huntingtin-interacting protein 1) の  
出芽酵母ホモログ Sla2p の新規機能の解明

学位論文内容の要旨

【目的と背景】

アクチン細胞骨格の再編成は、様々な細胞機能において非常に重要な役割を果たしている。アクチン細胞骨格の再編成を制御している蛋白質として、アクチンに直接結合して機能を果たすアクチン結合蛋白質が数多く知られている。

アクチン結合蛋白質のひとつである HIP1(huntingtin-interacting protein 1)は Huntington 病の原因遺伝子によってコードされる huntingtin 蛋白質の結合蛋白質として同定された。HIP1 はアクチン細胞骨格の再編成を制御することにより、エンドサイトーシスや小胞輸送を制御していると考えられている。HIP1 は Huntington 病のみならず癌などの疾患においても重要な役割を担っていると考えられているが、その詳細な機能は未だ解明されていない。

HIP1 には出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* に保存されている相同蛋白質 Sla2p が存在する。Sla2p はエンドサイトーシスに関与するアクチン結合蛋白質であり、一次構造のみならず生理機能も保存されていると考えられる。

一方、HIP1 以外のアクチン結合蛋白質としてフォルミンファミリーが存在し、出芽酵母にも保存されている。そのひとつ Bni1p はアクチン線維を産生し、細胞分裂と細胞極性の確立に関与する。

アクチン細胞骨格の再編成の基本的なメカニズムについては出芽酵母と高等動物で共通である。したがって、遺伝学的手法という強力なツールを利用できる出芽酵母において、アクチン細胞骨格の再編成の機構を解明することは、高等動物のアクチン細胞骨格の再編成の機構の解明、更には様々な疾患の発症機序の解明に非常に有用である。今回、HIP1 の機能の一端を解明するため、相同蛋白質である出芽酵母 Sla2p の解析を行った。

【結果と考察】

*BNI1* の関連遺伝子をスクリーニングすることにより、アクチン細胞骨格の再編成に関与する遺伝子を同定することを試みた。その結果、HIP1 相同蛋白質である *SLA2* の変異 *sla2-82* が得られた。この変異では 491 番目のグルタミン酸がストップコドンに置換されており、その遺伝子産物は *SLA2* 部分欠失変異体になると考えられた。

*sla2-82* 変異株は、高温での NaCl 感受性増殖や homozygous diploid での出芽パターン異

常を示し、またアクチン関連遺伝子 *ABP1*, *SAC6*, *RVS167* 各々の欠失変異と遺伝学的相互作用を示すことから、アクチン細胞骨格の再編成に異常を引き起こしている可能性が高いことが示唆された。次に、*sla2-82* 変異とアクチン結合蛋白質であるフォルミンとの遺伝学的相互関係について検討したが、*bni1* 欠失変異 (*bni1Δ* 変異) と *sla2-82* 変異との二重変異株は温度感受性増殖を示した。しかし、出芽酵母の別のフォルミンである *bnr1* 欠失変異と *sla2-82* 変異の二重変異株は温度感受性増殖を示さなかった。また、*Bni1p* は出芽酵母の apical 成長に関わるポラリソーム複合体の構成蛋白質であるが、その他のポラリソーム構成蛋白質である *Bud6p*, *Spa2p*, *Pea2p* 各々の欠失変異と *sla2-82* 変異との二重変異株は温度感受性増殖を示さなかった。したがって、*SLA2* とフォルミンとの遺伝学的相互作用は *BNI1* に特異的であり、*Bni1p* のポラリソームの機能とは独立したものであると考えられた。

*bni1Δ sla2-82* 二重変異株の温度感受性増殖の原因が *BNI1* のどのドメインに関連するのか検討した。その結果、*Bni1p* のアクチン重合に関連する機能発現に必須のドメインである FH1 及び FH2 ドメインが必要であることが判った。*Bni1p* の局在や Rho 蛋白質による活性の制御に関係するドメインは必須ではないことから、*Bni1p* の *Sla2p* との重複した機能は、アクチン重合の機能についてのみ関係があると考えられた。

*BNI1* との遺伝学的相互作用に関与している *SLA2* 内の領域を検討するために 3 種類の *SLA2* 遺伝子部分欠失変異株を作成し、各々の単独変異株及び *bni1Δ* 変異との二重変異株の温度感受性増殖を検討した。その結果から *Sla2p* の C 末端側が複雑な制御を受けていることを示唆する所見が得られた。

*bni1Δ sla2-82* 二重変異株の温度感受性増殖は、多コピーの *END3* 及び単コピーの *ACT1* により抑圧された。*END3* はエンドサイトーシスと関連する遺伝子であるが、*SLA2* 遺伝子部分欠失変異株の温度感受性増殖の抑圧を検討した結果、*END3* は *sla2* 変異側の異常を抑圧している可能性が高いことが示唆された。*ACT1* はアクチン細胞骨格の素材そのものであるアクチンをコードしており、*bni1Δ sla2-82* 二重変異株の温度感受性増殖が単コピーの *ACT1* により抑圧されることから、*bni1Δ sla2-82* 二重変異株は出芽酵母が出芽し増殖するために必要な細胞内の利用可能なアクチン量が不足している可能性が高いと考えられた。

F-アクチン構造体の観察では、*bni1Δ sla2-82* 二重変異株と *sla2-82* 単独変異株との間では大きな違いを認めなかった。次にアクチンのターンオーバーが変化している可能性を検討した。その結果、*bni1Δ sla2-82* 二重変異株は、*bni1Δ* 変異株及び *sla2-82* 単独変異株と比較してアクチンのターンオーバーが遅延していることが示唆された。

エンドサイトーシスの異常については、検討した各 *sla2* 変異は *bni1Δ* 変異と二重変異株になっても、エンドサイトーシス異常の更なる悪化は認められなかった。また *ACT1* や *END3* により温度感受性増殖は抑圧されたが、エンドサイトーシス異常は抑圧されず、*bni1Δ sla2-82* 二重変異株の温度感受性増殖の原因はエンドサイトーシスに関係が無いと考えられた。

*bni1Δ sla2-82* 二重変異株の細胞溶解を起こしている細胞の割合は、許容温度及び高温での培養で共に野生株や *bni1Δ* 変異株、*sla2-82* 単独変異株に比べて有意に高く、*sla2Δ* 変異株と同程度であった。*bni1Δ sla2-82* 二重変異株の温度感受性増殖は、速やかな細胞溶解が原因の一つである可能性が考えられた。細胞溶解の原因を検討したが、細胞壁合成異常の可能性は低く、細胞膜の異常が原因である可能性が高いと考えられた。

### 【結語】

本論文では、HIP1 の出芽酵母ホモログ *SLA2* が、*BNII* 及び *END3* と新たな遺伝学的相互作用を持つことを示した。フォルミンである *BNII* との新規遺伝学的相互作用は、これまで知られていない Sla2p と Bni1p の重複した機能の存在を示唆し、そのひとつは F-アクチン構造体のターンオーバーの制御である可能性が考えられる。また、*END3* との機能的関連性の解析は、*SLA2* ファミリーを初めとしたエンドサイトーシスに関連する分子メカニズムをより明らかにすることが可能になると考えられる。更に、これらの関連性や相互作用を解析することは Huntington 病や癌の原因解明の一助になる可能性があると考えられた。

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 浅 香 正 博  
副 査 教 授 田 中 一 馬  
副 査 教 授 藤 田 博 美

学 位 論 文 題 名

## Huntington 病原因蛋白質 huntingtin に結合する HIP1(huntingtin-interacting protein 1) の 出芽酵母ホモログ Sla2p の新規機能の解明

アクチン細胞骨格の再編成は、様々な細胞機能において非常に重要な役割を果たしており、その解明は様々な疾患の発症機序の解明に非常に有用であると考えられる。本研究では、モデル生物である出芽酵母を用いた遺伝学的手法により、Huntington 病原因蛋白質 huntingtin に結合する HIP1 蛋白質の出芽酵母ホモログである *SLA2* が示す遺伝学的相互作用を新規に解明した。

アクチン結合蛋白質であるフォルミンファミリーは、アクチン線維形成の制御により細胞極性形成や細胞質分裂に関与している。出芽酵母にはフォルミンファミリーのひとつとして *BNII* が存在する。本研究では、アクチン細胞骨格再編成に関与する新規遺伝子の同定を目的として、*BNII* の機能に関連した遺伝子変異の遺伝学的スクリーニングを行った。その結果、491 番目のグルタミン酸がストップコドンに置換された *SLA2* の変異 *sla2-82* を同定した。*sla2-82* 変異は、出芽パターンの異常や高温での NaCl 感受性増殖、及びアクチン関連遺伝子 *ABP1*, *SAC6*, *RVS167* 各々の欠失変異と遺伝学的相互作用を示すことから、アクチン細胞骨格の再編成に異常を持つ可能性が高いことが示唆された。

解析を進める過程で、*sla2-82* 変異と *bni1* 欠失変異(*bni1Δ*変異)との二重変異株は温度感受性増殖を示すことが明らかになった。すなわち、*SLA2* と *BNII* に遺伝学的相互作用があることを世界で初めて見出した。出芽酵母のもうひとつのフォルミンである *bnr1* 欠失変異と *sla2-82* 変異の二重変異株は温度感受性増殖を示さないこと、及び *Bni1p* の属するポラリソーム構成蛋白質群のうち他の構成蛋白質の欠失変異と *sla2-82* 変異は遺伝学的相互作用を示さないことから、この遺伝学的相互作用は、*BNII* に特異的であり、*Bni1p* のポラリソームの機能とは独立したものであると考えられた。

遺伝学的相互作用の存在から *SLA2* と *BNII* に重複した機能が存在することが示唆されたので、その詳細な解明を試みた。まず、*BNII* の欠失変異体を用いた検討から、*Bni1p* の

アクチン重合活性が *SLA2* との遺伝学的相互作用において重要であることが示唆された。また、*bni1Δ sla2-82* 二重変異株の温度感受性増殖を抑圧する遺伝子の探索を行った結果、多コピーの *END3* 及び単コピーの *ACT1* が温度感受性増殖を抑圧することが判った。*END3* は F-アクチン構造体に存在する蛋白質なので、*SLA2* と *BNII* の重複した機能はアクチン細胞骨格系に関連していると考えられた。また、*ACT1* の発現量を増加させることにより *bni1Δ sla2-82* 二重変異株の温度感受性増殖が抑圧されることから、二重変異株において細胞内の利用可能な単量体アクチンが不足している可能性が高いと考えられた。そこで、*bni1Δ sla2-82* 二重変異が細胞内のアクチンにどのような影響を及ぼしているか検討した結果、二重変異株はそれぞれの単独変異株と比較してアクチンのターンオーバーが遅延していることが示された。これらの結果より、*SLA2* と *BNII* の重複した機能はアクチンのターンオーバーの制御であると考えられた。

また、*bni1Δ sla2-82* 二重変異株は細胞溶解を起こすことが判明した。許容温度と高温での培養両方で、*bni1Δ sla2-82* 二重変異株の細胞溶解の割合は各々の単独変異株と比較して有意に高く、*SLA2* と *BNII* に重複した機能が細胞溶解の原因の一つである可能性が考えられた。

以上より、本研究において *HIP1* の出芽酵母ホモログ *SLA2* が *BNII* と遺伝学的相互作用を持つことを新規に見いだした。この結果はこれまで知られていない *Sla2p* と *Bni1p* の重複した機能の存在を示唆し、そのひとつは F-アクチン構造体のターンオーバーの制御である可能性が考えられた。このメカニズムの解析を進めれば、外界の刺激に応じたアクチン細胞骨格系の調節機構を解明することが可能になると考えられる。更に、得られた知見が Huntington 病などの疾患の原因解明につながる可能性が高いと考えられる。

口頭発表において、副査藤田教授より具体的な蛋白質の機能、及び Huntington 病へのアクチン細胞骨格系の関与について質問があった。続いて副査田中教授より重複した機能と細胞溶解の関連性、及びアクチンのターンオーバーの制御の具体的な機序について質問があった。また主査浅香教授より発癌とアクチン細胞骨格系の関係において現在判明していること、及び本研究の結果と転移浸潤の関連性について質問があった。これらに対して申請者は、自己の研究結果と文献的知識を基に誠実に、概ね妥当な回答を行った。

本研究は、ヒト *HIP1* の出芽酵母ホモログ *SLA2* の遺伝学的相互作用を新たに見いだしたことにより、Huntington 病を初めとした様々な疾患の原因解明につながる可能性を示唆したものとして高く評価され、今後高等生物における研究への発展が期待される。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ申請者が博士(医学)の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。