

極性制御キナーゼ PAR1b/MARK2による アクチン骨格系調節に関する研究

学位論文内容の要旨

細胞骨格は細胞運動、細胞形態、細胞分裂、極性形成など様々な細胞過程において重要な役割を担っている。細胞骨格の主要な構成因子として、アクチンフィラメントと微小管が挙げられている。アクチンフィラメント(F-actin)は、アクチン結合分子を介して、束状構造や網目状構造のアクチン骨格を形成する。代表的なアクチン骨格の一つであるストレスファイバーは、束状構造を持ち、Rho ファミリーsmall GTPaseであるRhoAの活性化により形成される。活性化されたRhoAは、接着斑及び接着斑へのアクチンの連結を誘導することによって、束状のF-actinが細胞の周縁に沿って配置しているcortical actinを安定化し、さらに細胞の基底部を横切るように配置されたストレスファイバーの形成を誘導する。

一方、微小管は、チューブリンが繊維状に重合することによって形成される。微小管の機能を制御する因子の一つとして、Partitioning-defective 1 (PAR1)が挙げられている。PAR1はセリン・スレオニンキナーゼであり、微小管結合タンパクをリン酸化することにより微小管ダイナミクスを制御する。近年、PAR1キナーゼファミリーの構成因子であるPAR1bは微小管のみならずアクチン骨格も制御することが報告されている。PAR1bの過剰発現によりcortical actinの形成が抑制されるが、その機構は不明である。cortical actinの安定化にRhoAが関与することから、PAR1bがRhoAを介してアクチン骨格を制御する可能性が考えられる。そこで、本研究では、PAR1bがアクチン骨格を制御する分子機構を解明することを目的とした。

第1章では、PAR1bによるアクチン骨格制御の分子機序を示す。PAR1bが、RhoA活性を抑制することによりストレスファイバー形成を抑制することを明らかにした。さらに、PAR1bがRhoA活性分子であるGEF-H1と複合体を形成することに着目し、PAR1bによるストレスファイバー形成の抑制機構を検討した。PAR1bがGEF-H1を介してストレスファイバー形成を制御することも明らかにした。また、PAR1bがGEF-H1を介してストレスファイバー形成を抑制する際、PAR1bのキナーゼ活性が必要であることも示した。

第2章では、PAR1bによるGEF-H1の機能制御を示す。PAR1bが、細胞内でGEF-H1のSer 885のリン酸化レベルを亢進することを明らかにした。また、PAR1bが、Ser885を直接リン酸化することを*in vitro* キナーゼアッセイより明らかにした。

第3章では、PAR1bがGEF-H1のRhoA-GEF活性を抑制する分子機構を示す。GEF-H1のSer 885とSer 959の両方のリン酸化がRhoA-GEF活性を抑制することを明らかにした。更に、PAR1bが両Serのリン酸化を介してRhoA-GEF活性の抑制することも明らかにした。

第4章では、GEF-H1/RhoA経路におけるPAR1bの重要性を示す。内在性PAR1bが、GEF-H1のリン酸化を介して、RhoA活性を抑制した結果、ストレスファイバーの形成を抑制することを見出した。

本研究により、PAR1bは微小管のダイナミックスを制御すると同時に、アクチン骨格を制御することを見出した。PAR1b/GEF-H1/RhoA経路が、時空間制御を受けることによって、PAR1bが微小管の安定性とアクチン骨格を協調的に制御することが推察される。また、PAR1bの二重機能が、細胞骨格、細胞形態、細胞運動の制御に重要な役割を果たすことも推察される。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 坂 口 和 靖
副 査 教 授 村 上 洋 太
副 査 教 授 谷 野 圭 持
副 査 教 授 畠 山 昌 則
(東京大学大学院医学系研究科)

学 位 論 文 題 名

極性制御キナーゼ PAR1b/MARK2による アクチン骨格系調節に関する研究

博士学位論文審査等の結果について（報告）

細胞骨格は細胞運動、細胞形態、細胞分裂、極性形成など様々な細胞過程において重要な役割を担っている。細胞骨格の主要な構成因子として、アクチンフィラメントと微小管が挙げられる。アクチンフィラメント (F-actin) はアクチン結合分子を介して、束状構造や網目状構造のアクチン骨格を形成する。代表的なアクチン骨格の一つであるストレスファイバーは束状構造を持ち、Rho ファミリーsmall GTPase である RhoA の活性化により形成される。活性化された RhoA は接着斑および接着斑への F-actin の連結を誘導することによって、束状の F-actin が細胞の周縁に沿って配置されている表層アクチン(cortical actin)を安定化するとともに細胞の基底部を横切るように分布しているストレスファイバー形成を誘導する。一方、微小管はチューブリンが繊維状に重合することによって形成される。微小管の形成を制御する因子の一つとして、Partitioning-defective 1 (PAR1) が挙げられる。PAR1 はセリン・スレオニンキナーゼであり、微小管結合タンパク質をリン酸化することにより微小管ダイナミクスを制御する。

近年、PAR1 キナーゼファミリーの構成因子である PAR1b が cortical actin の形成を抑制することが報告されている。この事実は PAR1b が微小管のみならず、アクチン骨格も制御することを示唆しているが、その機構は不明である。そこで、本研究では PAR1b がアクチン骨格を制御する分子機構を解明することを目的とした。筆者は本研究の目的を達するために以下の知見を得て、その研究成果を本学位論文としてまとめている。

第 1 章では、PAR1b によるアクチン骨格制御の分子機序を検証した。まず、cortical actin の安定化に RhoA が関与することから、PAR1b が RhoA を介してアクチン骨格の形成に与える影響

を検討した。その結果、PAR1b は RhoA 活性の抑制を介してストレスファイバー形成を抑制することを明らかにした。次に、PAR1b が RhoA 活性分子である GEF-H1 と複合体を形成することに着目し、PAR1b によるストレスファイバー形成の抑制機構を詳しく検討した。その結果、PAR1b が GEF-H1 を介してストレスファイバー形成を抑制することを明らかにした。また、この抑制機構に PAR1b のキナーゼ活性が必要であることも示した。

第 2 章では、第 1 章の結果を基に、GEF-H1 が PAR1b の下流で制御される機構を検証した。PAR1b が細胞内で GEF-H1 の Ser 885 のリン酸化レベルを亢進することを 14-3-3 アッセイにより明らかにした。また、PAR1b が、Ser885 を直接リン酸化することも *in vitro* キナーゼアッセイにより明らかにした。

第 3 章では、PAR1b が GEF-H1 のリン酸化を介して RhoA 活性を抑制する可能性を検証した。GEF-H1 の Ser 885 と Ser 959 の両方のリン酸化が RhoA-GEF 活性を抑制することを RhoA G17A アッセイおよび RBD-Rhotekin アッセイにより明らかにした。さらに、同様の方法で PAR1b が両 Ser のリン酸化を介して RhoA-GEF 活性を抑制することを明らかにした。また、PAR1b が GEF-H1 の両 Ser 残基のリン酸化を介して RhoA 依存的ストレスファイバー形成を抑制することも示した。

第 1 章から第 3 章まで、PAR1b 発現実験系を用いて PAR1b が GEF-H1 のリン酸化を介して RhoA 依存的ストレスファイバー形成を抑制することを示した。したがって、第 4 章では、GEF-H1/RhoA 経路における内在性 PAR1b の役割を、ヒト胃上皮由来の AGS 細胞内の PAR1b 発現を siRNA 法で抑制することにより検証した。その結果、内在性 PAR1b が GEF-H1 のリン酸化を介して RhoA 活性を抑制し、ストレスファイバーの形成を抑制することを見出した。

これを要するに、本論文は PAR1b が GEF-H1 の Ser 885 と Ser 959 をリン酸化した結果、ストレスファイバー形成を抑制することを示したものであり、PAR1b がこれまでに知られている微小管の形成のみならずアクチン骨格も制御することを世界に先駆けて明らかにしたものである。アクチン骨格は細胞極性、細胞形態、細胞運動に重要な役割を果たすことから、本研究で得られた成果は、PAR1b による細胞極性、細胞形態、細胞運動の制御の理解に重要な知見をもたらしたことに對して貢献するところ大なるものがある。

よって著者は、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。