

京都大学	博士 (生命科学)	氏名	桑田 昌宏
論文題目	Dynamic Regulation of Nuclear Architectures – Identification and Experimental Verification of Subcellular Scaffolding Proteins (核内構造の動的制御 - 細胞内骨格タンパク質の同定と実験的検証)		
(論文内容の要旨)			
<p>様々な細胞内構造体の果たす機能は、刻々と変化する細胞内外の環境に適応するため、臨機応変な動的制御がなされている。DNA複製やRNA転写・リボソーム生合成などの核の機能や、細胞接着・小胞輸送などの細胞骨格の機能は、先に述べた動的に制御されるべき機能の代表的なものとして挙げられる。これらの動的制御は、最終的にはその細胞内構造体の構成因子の動態によって説明され得るものと考えられるが、そこには未だ明らかではないメカニズムも多く存在すると思われる。</p> <p>本研究においては、細胞機能の動的制御を考えるにあたり、様々な細胞内構造体の構造的基盤と考えられる一連の難溶性タンパク質群に着目し、このタンパク質群に対して二つのアプローチを用いて網羅的に解析した。一つは一連のモノクローナル抗体の作製であり、難溶性構造タンパク質を認識する220種類の抗体を得た。その中には、核内の細胞骨格タンパク質アクチニン4やケラチン18を特異的に認識する抗体も含まれていた。もう一つはプロテオミクス解析であり、細胞内難溶性構造の構成因子として、416種類のタンパク質を同定した。この中には約20種類の機能未知タンパク質も含まれており、それらのcDNAをクローニングして細胞内の局在解析を進めた。またアクチニン4やケラチン18は、このプロテオミクス解析においても同定されており、細胞内の難溶性構造においても重要な機能を果たしていることが予想された。</p> <p>以上の網羅的解析により得られた知見の中から、特に興味深い結果の一つであるアクチニン4に着目し、核内分子を特異的に認識する抗体#92Bを用いて、その核移行メカニズムや核内での機能について解析を進めた。細胞をCRM1阻害剤であるレプトマイシンBで処理すると、アクチニン4分子の核内への蓄積がみられることから、アクチニン4は核内外をシャトルしており、CRM1依存的に核外輸送されることが分かった。また、半透過化細胞を用いた核輸送アッセイにより、アクチニン4のコイル領域は、Importinなどの輸送担体に依存しない自発的な核内輸送能力を持つことが分かった。#92B抗体の染色により、核内のアクチニン4の量は細胞周期依存的に変化する様子が観察されたことから、核内のアクチニン4は細胞周期に応じた細胞骨格の動態を反映して増減を繰り返すものと考えられる。また、#92Bによって認識されるアクチニン4は、分裂期になるとUBF依存的に末端動原体染色体上のリボソームDNA領域に局在したことから、分裂期においてリボソームRNA生合成の抑制などに関与する可能性が考えられる。更に、核内アクチニン4の機能を明らかにするため、アクチンファミリータンパク質をサブユニットに持つINO80クロマチンリモデリング複合体との関連に着目した。生化学的実験により、アクチニン4はアクチン結合部位を通してINO80複合体と結合したことから、この複合体の構成因子であることが分かった。また定量PCRを用いた遺伝子発現解析により、アクチニン4はINO80複合体が制御する遺伝子のうち、サイクリンBなど一部の遺伝子発現に関与することが明らかとなった。</p> <p>以上の結果から、アクチニン4は細胞骨格の動態を反映して核内に蓄積し、更には特定の遺伝子発現を制御するという、細胞骨格と核機能の「橋渡し」として機能していると考えられる。このことは、「細胞骨格主導の核機能の制御」という新たなメカニズムを考える上でも非常に意義深い知見になると考えている。</p>			

(論文審査の結果の要旨)

DNAの合成や遺伝子発現・細胞周期制御などに代表される細胞核の機能は、内外の環境の変化に応じて動的に調節されている。細胞骨格もまた、動的な構造体である。細胞骨格を構成するタンパク質は、細胞質内で常に活発な分解と再生を繰り返していることが知られているが、それに加え、ある種の細胞骨格タンパク質は細胞質と核内とを行き来し、上記のような核機能の制御にも関与していることが明らかとなってきた。核機能の動的な制御については、未だ分子レベルでは明らかになっていないことも多いが、そこに“核内外を行き来する細胞骨格分子”の存在を考慮しなければならないことは、徐々に認められてきている。

本研究において糸田氏は、細胞骨格も含めた様々な構造体の構成・維持に関わっていると考えられる一連の“難溶性構造タンパク質”に着目した。これらのタンパク質群は、細胞核内において繊維状のネットワーク構造をとっていることが観察されているが、生化学的な取り扱いが難しいことから、これまであまり研究が進んでこなかったものである。細胞から抽出したこの構造タンパク質群を免疫源として一連のモノクローナル抗体を作製したところ、細胞内の様々な構造体を認識する220種類の抗体を得ることができた。また、その中には核内に局在する細胞骨格タンパク質を特異的に認識するものもあった。その一つが、核内のアクチニン4を特異的に認識する抗体、#92Bである。

アクチニン4が核内に存在することは、これまでも報告はされていたが、その核移行のメカニズムや核内での機能は明らかではなかった。抗体#92Bを用いて様々な生化学的・分子生物学的解析を行ったところ、(1)アクチニン4分子の核内への輸送は、一般的な輸送分子の関与によるものではなく、核膜孔複合体との直接的な相互作用による、(2)核内においてアクチニン4はINO80クロマチンリモデリング複合体やリボソームRNA転写複合体と結合し、細胞周期依存的な遺伝子発現に関わる、等の興味深い知見を得ることができた。これらの新たな発見は、核内外における構造タンパク質の動態に対する一般的モデルの考察を可能とし、また、それらの分子の動態が“細胞骨格主導の核機能の制御”に重要な役割を果たしていることを示唆するものである。

以上から、本論文は博士(生命科学)の学位論文として価値あるものと認めた。

平成22年1月26日、論文内容とそれに関連した口頭試問を行った結果合格と認めた。

論文内容の要旨及び審査の結果の要旨は、本学学術情報リポジトリに掲載し、公表とする。特許申請、雑誌掲載等の関係により、学位授与後即日公表することに支障がある場合は、以下に公表可能とする日付を記入すること。

要旨公開可能日： 年 月 日