

氏名	ひがし だ ち はる 東 田 知 陽
学位(専攻分野)	博 士 (医 学)
学位記番号	医 博 第 2816 号
学位授与の日付	平 成 17 年 3 月 23 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
研究科・専攻	医 学 研 究 科 脳 統 御 医 科 学 系 専 攻
学位論文題目	Actin Polymerization-Driven Molecular Movement of mDial in Living Cells に関する研究 (アクチン重合に駆動される mDial の生細胞内分子移動)
論文調査委員	(主 査) 教 授 清 水 章 教 授 永 田 和 宏 教 授 瀬 原 淳 子

### 論 文 内 容 の 要 旨

Formin ファミリー蛋白質は、酵母から、ヒトに至るまで広く保存されており、アクチン細胞骨格の再構成に重要な役割を果たしている。以前、我々の研究室では、マウスの Formin 蛋白質である G 蛋白質 Rho のエフェクター分子として mDial を同定し、アクチン線維の形成に関与していることを報告したが、アクチン線維に対する直接的な作用は明らかにできなかった。

しかし、一昨年、Formin 蛋白質の保存された FH1-FH2 領域が、アクチン重合核形成を促進することが生化学的に報告された。細胞内でのアクチン重合核の形成を促進する分子としては、Arp2/3 複合体につぐ発見であった。また、FH1-FH2 領域はアクチン線維の速い伸長端側に結合することが報告された。通常、この反矢じり端側に結合する分子はアクチン伸長を阻害するが、Formin 蛋白質は伸長を阻害しなかった。そのため、直接の観察はなかったが、この領域がアクチン線維の伸長する反矢じり端に継続的に結合する可能性が示唆された。

そこで、細胞骨格に作用する分子の動態を一分子ごとに捉えることができる単分子スペckル法を用いて、蛍光標識した mDial の動態を生細胞内で可視化できるか試みた。すると、mDial の FH1-FH2 領域が、アクチン細胞骨格に会合し、しばしば数十ミクロンもの距離を平均移動速度 2.0  $\mu\text{m}/\text{sec}$  で移動するところを捉えた。さらに、アクチン骨格に対する作用が異なる種々の薬剤を用いて、mDial FH1-FH2 の経時的な速度変化を計測したところ、アクチンの伸長速度変化と mDial FH1-FH2 の移動速度に相関関係があることを見出した。上記の生化学的知見とあわせると、mDial FH1-FH2 領域が、伸長を続けるアクチン線維の反矢じり端に継続的に結合し、細胞内を移動することを可視化することに成功した。

また、野生型 mDial は、細胞内に活性化型 Rho を導入すると、mDial FH1-FH2 同様の速度で移動を開始した。生細胞内において、活性化型 Rho によって mDial の分子内結合が開裂し、mDial の活性化が起きる機構が存在することを明らかにした。

次に、mDial FH1-FH2 がミオシン非存在下でアクチン線維先端を滑走できるのか検討するため、精製アクチンが重合する状態を再構築し、蛍光顕微鏡下で観察する実験法を樹立した。蛍光ラベルした mDial FH1-FH2 に接した部位で蛍光ファロイジンによってラベルしたアクチン線維が、著名に重合する像を捉える事ができた。また、低濃度のファロイジンを用いてアクチンフィラメントを不均質に標識し、*in vitro* のスペckルイメージングを行った。スペckルの移動方向を観察した結果、アクチン線維が mDial FH1-FH2 に接した部位で伸長することが明らかになった。さらに、mDial FH1-FH2 側から重合するアクチン線維の伸長速度は、使用しているアクチン濃度から推測できる反矢じり端の伸長速度に近く、mDial がミオシン非存在下で重合伸長する反矢じり端に連続的に会合することを確認した。

以上の結果から、mDial の Formin 蛋白質の保存された FH1-FH2 領域は、細胞内で、アクチン線維の伸長端に結合し、アクチン伸長速度に従って分子移動することが明らかになった。また、Formin 蛋白質がアクチンの重合促進のみならず、アクチン重合のエネルギーを利用して、自らの分子移動を行う能力があり、ミオシン、キネシン、ダイニンとは違った新たな

な分子モーターとして機能する可能性を示唆した。

#### 論文審査の結果の要旨

Formin 蛋白質は、種を超えて保存されており、細胞質分裂や細胞の極性形成に働いている。近年、Formin 蛋白質で保存された FH1-FH2 領域が、アクチンに直接結合し、その重合核形成を促進することが生化学的に報告された。また、この領域がアクチン線維の伸長する反矢じり端に継続的に結合することが想定されたが、これまで、この作用を細胞内で直接観察した報告はなかった。

本研究で、申請者は、単分子スペckル法を用いて、生細胞内で Formin 蛋白質の一つ、mDial の部分変異体である FH1-FH2 領域の分子移動を捉えた。ついで、アクチンに対する作用が異なる薬物を用いて、アクチンの伸長速度変化と mDialFH1-FH2 の移動速度を測定し、両者に相関関係があることを見出した。また、精製アクチンとリコンビナント mDial を用い、蛍光顕微鏡下でアクチン重合を観察した。アクチンは、ガラス面に固相化した mDialFH1-FH2 に接した部位において連続的に重合し、その重合速度から、mDialFH1-FH2 は、アクチン線維の速い伸長端である反矢じり端に会合していることを確認した。

以上の結果は、mDial の FH1-FH2 領域が、細胞内で、アクチン線維の伸長端に結合し、アクチン伸長速度に従って分子移動することを明らかにし、Formin 蛋白質がアクチンの重合促進のみならず、アクチン重合のエネルギーを利用して、自らの分子移動を行う能力があり、ミオシン、キネシン、ダイニンとは違った新たな分子モーターとして機能する可能性を示唆したもので、細胞生物学に資することが多い。

したがって本論文は博士（医学）の学位論文として価値のあるものと認める。なお、本学位授与申請者は、平成17年1月12日実施の論文内容とそれに関連した諮問を受け、合格と認められたものである。