

氏名	かとう たかゆき 加藤 隆幸
学位(専攻分野)	博士(医学)
学位記番号	医博第2348号
学位授与の日付	平成13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	Localization of a mammalian homolog of diaphanous, mDial, to the mitotic spindle in HeLa cells (diaphanousの哺乳類ホモログである mDial は HeLa 細胞において紡錘体に局在する)
論文調査委員	(主査) 教授 月田承一郎 教授 武田俊一 教授 成宮 周

論文内容の要旨

Ras 類似低分子量 G 蛋白質の一つ Rho は不活性体の GDP 結合型と活性化体の GTP 結合型の間を往復してアクチン細胞骨格を制御し、細胞の形態変化、運動、細胞質分裂に関与している。mDial は活性化体である GTP 結合型 Rho と結合する分子として同定された。mDial は formin homology (FH) 蛋白質に属し、N 末端に Rho 結合領域と FH 蛋白質で保存されている FH3 領域が、中央にプロフィリンと結合するポリプロリン配列を持つ FH1 領域が、C 末端に FH2 領域が存在する。mDial はその FH1 領域を介してアクチン結合蛋白質の一つプロフィリンと結合することが示されている。mDial はアクチン重合が不断に起こっている細胞の伸展縁に Rho・プロフィリンと共に局在し、その部分欠失体の発現が細胞内にび慢性の F-アクチンを誘導することから、プロフィリンを介してアクチン細胞骨格を空間特異的に制御すると考えられている。更に、多くの種で mDial を含む FH 蛋白質が細胞質分裂に必要であることが報告されている。そこで本論文では mDial の細胞質分裂における役割を明らかにするため、HeLa 細胞における内在性 mDial の M 期での局在を詳細に検討した。

1. HeLa 細胞での内在性 mDial の紡錘体への局在

mDial は間期・M 期共に細胞質にび慢性に存在するが、M 期での特異的な局在を明らかにするため、細胞質 mDial の抽出を試みた。instantaneous fixation 法は細胞の固定と抽出を同時に行う方法であり、細胞骨格への影響が少なく、可溶性蛋白質を選択的に抽出できる。同方法で固定した細胞の免疫染色により mDial が分裂細胞の紡錘体に局在することを見いだした。mDial の紡錘体への局在は M 期の前期から終期のすべての時期で認められた。更に、これを生化学的に確認する為、HeLa 細胞から紡錘体画分を回収し、これを用いてウェスタンブロットを行った。これにより、紡錘体画分に mDial および β -tubulin が含まれることが明らかになった。この結果からも、mDial が紡錘体に局在することが示された。

2. mDial の紡錘体局在ドメインの同定

mDial の紡錘体への局在を決定するドメインを同定するため、まず mDial の様々な部分欠失変異体に GFP を付加した fusion 蛋白質を作製し、これを HeLa 細胞で発現させて細胞内局在を検討した。その結果、この局在には Rho 結合領域と FH1 領域の間が必要であることがわかった。紡錘体局在を示す最小単位 H3 は、mDial の 431 番目から 603 番目までのアミノ酸残基をコードしており、FH3 の C 末端を含むことが明らかとなった。この断片を用いて以下の実験を行った。

3. 紡錘体局在に必要なアミノ酸残基の同定

分裂酵母の FH 蛋白質である Fus1p と Cdc12p の FH3 はこれら蛋白質の spindle pole body への局在に必要である。これら FH 蛋白質と mDial の H3 間で保存されているアミノ酸残基に変異を入れ、その変異体の紡錘体への局在を解析した。その結果、mDial の紡錘体局在には 434 番目と 455 番目の Leu が必須であることが明らかとなった。

4. mDial の紡錘体局在に対する Rho 活性の影響

mDial の紡錘体局在が Rho の活性に依存しているかを明らかにするため、以下の 2 つの実験を行った。まず、チミジン

二重ブロック法でS期に同調させたHeLa細胞にエレクトロポレーションによりRho不活化活性を持つC3酵素を導入した。このC3導入細胞でもmDialは紡錘体に局在した。ついで、RhoAの活性型変異体であるVal14RhoAを、M期のHeLa細胞に微量注入した。このVal14RhoA微量注入細胞においても、mDialは紡錘体に局在した。この2つの実験によりmDialはRho活性に依存せずに紡錘体に局在することが明らかとなった。

動物細胞では細胞質分裂は細胞表層のアクチオシンの収縮によって行われるが、細胞質分裂の位置は紡錘体により決定されることが示されている。細胞質分裂と紡錘体の位置関係を説明できる分子機構は全く知られていない。この点で、アクチン制御分子であり細胞質分裂への関与が示されているmDialが紡錘体に局在する事実は非常に興味深い。今回の結果を基にしたmDialに相互作用する分子の同定や機能解析は、全く不明である紡錘体から細胞表層へのシグナル伝達の解明につながると思われる。

論文審査の結果の要旨

低分子量G蛋白質Rhoはアクチン細胞骨格の形成を制御し、細胞の形態変化・運動・極性・細胞質分裂で重要な役割を果たしている。mDialはRhoエフェクターの一つでFH蛋白質に属し、N端にRho結合領域とFH蛋白質で保存されているFH3領域が、中央にポリプロリン配列を持つFH1領域が、C端にFH2領域が存在する。mDialは細胞質分裂に必須であることが示されている。しかし、mDialによる細胞質分裂の制御機構は不明である。本研究で申請者はmDialによる細胞質分裂の制御機構を解析するため、mDialに対する特異抗体を用いた免疫染色と、GFP-tagを付加したmDial変異体を用いて、その細胞内局在を検討した。その結果mDialは分裂細胞で紡錘体に局在すること、単離した紡錘体画分にmDialが存在することを示した。また、mDial部分欠失体の標識体を細胞に発現させることで、Rho結合領域とFH1間の部位が紡錘体局在に必要であることも明らかにした。この領域の一部にはFH3が含まれるが、mDialのFH3で保存されているアミノ酸を置換した変異体の紡錘体局在を調べることで、434番目と455番目のLeuが紡錘体局在に重要な役割を果たしていることを明らかにしている。

以上の研究は分裂期におけるmDialの紡錘体局在を明らかにすることでRhoのmDialを介した細胞質分裂制御の解明に貢献し、細胞生物学に寄与するところが多い。

したがって、本論文は博士(医学)の学位論文として価値あるものと認める。

なお、本学位授与申請者は、平成13年2月8日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。