

京都大学	博士（ 医 学 ）	氏 名	坂 本 智 子
論文題目	Liprin-α controls stress fiber formation by binding to mDia and regulating its membrane localization. (Liprin-αは、mDiaとの結合を介し、mDiaの細胞形質 膜への局在化を調節することにより、アクチンストレスファイバーの形成を制御する)		
(論文内容の要旨)			
細胞運動、極性形成、細胞質分裂などいくつかの細胞反応は、低分子量 G 蛋白質 Rho の制御の下で、細胞骨格再編成を介して惹起される。Rho は、細胞内外の刺激に応答し、GDP 結合型（不活性型）と GTP 結合型（活性型）の間を往復して細胞内分子スイッチとして働く。Rho 標的分子 mDia は、Formin ファミリーに属し、哺乳類では、mDia1、 2、 3 の 3 つのアイソフォームが発現している。mDia は N 末-C 末間の分子内結合により不活性化状態にあるが、活性型 Rho の結合により、この分子内結合が開裂して活性化されると、長い直鎖状のアクチン線維重合を誘導する。しかし、in vitro で活性化 mDia が重合するアクチン線維に比べ、細胞内で観察されるアクチン線維は 0.3-2.3μm と非常に短く、細胞内では mDia を不活性化する機構が存在すると考えられていた。そこで、mDia の新規結合蛋白質の同定を通じて、Rho-mDia 経路の細胞内機能発現機構の解明を試みた。 mDia の N 末端領域を bait として、マウス脳の可溶性画分を対象に pull-down を行い、LAR（膜貫通型チロシンホスファターゼ）結合タンパク質 Liprin-αを単離・同定した。Liprin-αは、神経細胞においては、active zone の形成・維持、神経伝達物質の放出、AMPA 受容体のシナプス後膜へのターゲティングなどへの関与が報告されていたが、培養細胞における機能は、細胞運動、接着斑の disassembly の制御などを除いて、殆ど不明であった。 ついで、Liprin-α3 の様々な部分欠失変異体を作製し、免疫沈降法を用いて、mDia への最小結合領域が Liprin-α3 の中央領域にあること、Liprin-α3 は全ての mDia アイソフォームと結合することを見出した。大腸菌にて発現させたリコンビナント蛋白質を用いた pull-down およびゲル濾過法により、mDia、Liprin-α3 が直接結合すること、mDia1 抗体を用いた免疫沈降によって、マウス脳に加え 293F 細胞内においても複合体を形成することを明らかにした。 次に、Rho-mDia 経路への Liprin-αの作用を検討するために、RNAi 法により HeLa 細胞、NIH 3T3 細胞で Liprin-αを枯渇させたところ、mDia 依存的なアクチンストレス線維の増強、接着斑の増大を認めた。反対に、mDia1 結合領域を含む Liprin-αの断片を強制発現させると、アクチンストレス線維、接着斑の減弱が見られ、更に同断片は活性型 Rho が誘導するアクチンストレス線維形成も抑制することが判明した。 細胞分画法を用いた解析では、mDia1 は活性化に伴い、細胞質から細胞膜へ移行した。そこで、同解析を Liprin-α枯渇細胞および mDia1 結合領域を含む Liprin-αの断片を強制発現させた細胞を用いて行ったところ、前者では mDia1 の細胞膜画分の有意な増加を、後者では減少を認めた。また、Liprin-αの mDia 結合領域を、mDia1 の N 末端領域と共発現させると、mDia1 の細胞膜局在を呈する細胞の割合が、共発現させていない細胞と比較して有意に減少することを見			

出した。この減少は、Liprin- α に結合できない mDia1 変異体では見られなかった。
以上の結果から、Liprin- α は活性型 mDia の N 末端領域に直接結合し、細胞内局在を調節することで、mDia1 の活性を負に制御し、細胞内のアクチン細胞骨格の制御を行っていることが明らかになった。
（論文審査の結果の要旨）
Rho標的分子mDiaは、Rhoにより活性化され直鎖状のアクチン線維を生成するが、mDia活性の細胞内調節機構には不明な点が多い。本論文は、mDiaの新規結合蛋白質の同定を通じRho-mDia経路の細胞内調節機構の一端を明らかにした。
まず、mDiaのN末端断片をbaitとしたpull-down法によりマウス脳可溶性画分よりmDia 結合蛋白質としてLiprin- α を単離・同定した。両者の結合は、マウス脳、293F細胞で確認された。ついで、Liprin- α の部分欠失変異体を用いた免疫沈降でLiprin- α はその中央領域でmDiaに結合すること、また、リコンビナント蛋白質を用いたpull-downとゲルろ過でLiprin- α とmDiaの直接結合が証明された。ついで、HeLa細胞、NIH 3T3細胞で、RNAiによりLiprin- α を枯渇させるとmDia依存的なアクチンストレスファイバー、接着斑の形成の亢進、反対に、mDia1結合領域を含むLiprin- α の断片の強制発現でそれらの抑制が観察された。さらに、細胞分画法と免疫染色法により、Liprin- α 枯渇細胞およびmDia1結合領域を含むLiprin- α の断片の強制発現細胞での内因性mDiaの細胞内分布の解析により、Rho活性化に伴うmDia1の細胞質から細胞膜への移行が、Liprin- α により結合依存的に減少することが見出された。以上の結果から、Liprin- α は、mDiaとの結合を介してmDiaの細胞形質膜への局在を調節することにより、アクチンストレスファイバーの形成を抑制的に制御していることが分かった。
以上の研究は、Rho-mDia経路の細胞内アクチン形成の調節機構の解明に貢献し、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23年12月22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。

