

学 位 審 査 報 告 書

(ふ り が な) 氏 名	こうさかかずよし 高坂和芳
学位 (専攻分野)	博 士 (理 学)
学 位 記 番 号	理 博 第 号
学 位 授 与 の 日 付	平成 年 月 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	理学研究科 生物科学専攻
(学位論文題目) ADF/Cofilin ホスファターゼ Slingshot-3 の機能解析	
論 文 調 査 委 員	(主査) 大野睦人 教授 阿形清和 教授 森 和俊 教授

理 学 研 究 科

(続紙 1)

京都大学	博士 (理学)	氏名	高坂和芳
論文題目	ADF/Cofilin ホスファターゼ Slingshot-3 の機能解析		
(論文内容の要旨) 細胞骨格の動態制御は、正常発生においては胚や各々の器官を形作る上で重要な役割を果たす。この動態は、モノマータンパク質の重合過程だけでなく、ポリマーの切断あるいは脱重合によっても調節される。アクチン線維の切断と脱重合を調節するのが、Actin Depolymerizing Factor (ADF)/Cofilin ファミリーである。ADF/Cofilin は特定の Ser 残基リン酸化によって活性を抑制され、逆に、脱リン酸化により活性化される。このリン酸化は LIM kinase (LIMK) などが担い、逆に、脱リン酸化は Slingshot (SSH) などが担う。 申請者は哺乳類 SSH ファミリーの 3 つのメンバーのそれぞれについて、種々の細胞株やマウス胚中での発現を検討した。その結果、SSH-3L が上皮細胞に比較的限局して発現することを明らかにし、上皮細胞特有の細胞間結合などの形成に SSH-3L が重要な役割を話すのではないかと推測した。本論文では SSH-3L の細胞生物学的解析、生化学的解析、そして個体レベルでの機能解析の結果を報告した。 MDCK II 上皮細胞を用いて SSH-3L の機能解析を行う系を構築し、内在の SSH-3L を RNAi 法によって減少させたところ、tight junction の裏打ちタンパク質 ZO-1 のシグナルが弱まる傾向があった。逆に、過剰発現させると、その発現の高い細胞集団は発現の低い周囲の細胞より頂端側に細胞塊を形成した。 また、従来 SSH-3L の活性は SSH-1L および SSH-2L の活性に比べ低い、あるいは検出できないとされていたが、この点を再検討し、マウス SSH-3L はリン酸化 ADF/Cofilin レベルを確かに低下させ、この活性は C-tail によって抑制されることを示唆する結果を得た。そこで SSH-3L の活性を調節する因子が存在するとの仮説を立て、SSH-3L と結合するタンパク質を質量分析により探索したが、活性調節因子を見出すことはできなかった。 上記研究と並行して個体レベルで <i>ssh-3</i> 遺伝子の役割を調べるため <i>ssh-3</i> ノックアウト (KO) マウスを作製した。<i>ssh-3</i> KO マウスは生存し、生殖能を持ち、異常も認められず、上皮組織は正常に形成された。<i>ADF</i> 遺伝子 (<i>corn1</i>) 欠失マウスは角膜上皮過形成など眼に表現型を示すが、<i>ssh-3</i> KO マウスはこの表現型を示さない。交配により得た <i>corn1</i>^{-/-} <i>ssh-3</i>^{-/-} 個体の上記表現型は <i>corn1</i>^{-/-} 個体の表現型と変わらなかった。これらの結果より、通常の飼育環境では <i>ssh-3</i> 遺伝子は正常発生ならびに生存に必須ではないことがわかった。			

(論文審査の結果の要旨)

ADF/Cofilinは特定のSer残基リン酸化によって活性を抑制され、逆に、脱リン酸化により活性化される。このリン酸化はLIM kinase (LIMK)などが担い、逆に、脱リン酸化はSlingshot phosphatase (SSH)などが担うことが報告されていた。ADF/CofilinやLIMKに比べて、SSHの機能解析はまだ進んでおらず、特に個体レベルでの解析は報告されていなかった。申請者は哺乳類SSHファミリーに属する3つのメンバー中で、上皮細胞において強く発現するSSH-3Lに着目した。

まず申請者は、SSH-3Lの活性はSSH-1LおよびSSH-2Lの活性に比べ低い、あるいは検出できないとされていた点を再検討し、SSH-3Lはリン酸化ADF/Cofilinレベルを確かに低下させ、この活性はC-tailによって抑制されることを示唆する結果を得た。そこでSSH-3Lの活性を調節する因子が存在するとの仮説を立て、SSH-3Lと結合するタンパク質を探索したが、活性調節因子を見出すことはできなかった。

また、MDCK II 上皮細胞を用いてSSH-3Lの機能解析を行う系を構築し、内在のSSH-3LをRNAi法によって減少させたところ、tight junctionの裏打ちタンパク質ZO-1のシグナルが弱まる傾向があった。逆に過剰発現させると、発現の低い周囲の細胞より頂端側に突出する傾向を示した。予想外にも、いずれの場合もADF/Cofilinのリン酸化レベルに変動は検出できなかった。申請者は、通常の培養条件ではなく、ADF/Cofilinのリン酸化レベルが変動するような条件下に細胞がさらされた場合に、SSH-3Lの役割を明らかにできるのではないかと推論した。

さらに申請者は、個体レベルで*ssh-3*遺伝子の役割を調べるため*ssh-3*ノックアウト(KO)マウスを共同研究により作製し、その表現型を解析した。*ssh-3*KOマウスの腎臓などの器官の破碎液中には、どのSSHメンバーも検出することはできなかった。*ssh-3*KOマウスは生存し、生殖能を持ち、外見上異常は認められなかった。乳腺や表皮などの上皮組織の切片を作成し観察したが、それらは正常に形成されていた。*ADF* 遺伝子(*corn1*)欠失マウスは角膜上皮過形成など眼に異常を示すのに対し、*ssh-3*KOマウスはこの表現型を示さなかった。また、申請者は*corn1*と*ssh-3*の間に遺伝的相互作用がないか検討したが、それを支持する結果は得られなかった。さらに遺伝学的背景にも考慮し、乳がんが多発する背景においても*ssh-3*KOの影響を検討したが異常は発見できなかった。これらの結果より、通常の飼育環境では*ssh-3*遺伝子は正常発生ならびに生存に必須ではないことがわかった。申請者は、腎臓の機能障害などの病態においてSSH-3Lの役割を見いだす事ができるのではないかと議論した。

以上のように申請者は、生化学的解析、細胞生物学的解析、そして個体レベルでの解析の全てにわたり、SSH-3Lの機能を追究した。

よって、本論文は博士(理学)の学位論文として価値あるものと認める。また、平成23年1月21日論文内容とそれに関連した口頭試問を行った。その結果合格と認めた。