

氏 名	あさ の し ろう 麻 野 四 郎
学位(専攻分野)	博 士 (理 学)
学位記番号	理 博 第 2349 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	理 学 研 究 科 生 物 学 専 攻
学位論文題目	アクチン結合タンパク質 Xcoronin のドメイン解析; 二量体形成と機能との関連

論文調査委員 (主 査) 教 授 西 田 栄 介 教 授 永 田 和 宏 教 授 井 口 八 郎

論 文 内 容 の 要 旨

Coronin は種を越えて保存されているアクチン結合タンパク質の一つであり、細胞運動、食作用などの現象に関与していると考えられている。しかし、coronin の細胞内での機能についてはほとんど知られていなかった。Coronin の存在状態、構造、動態を明らかにすることを目的に申請者は実験を行った。まず coronin の C 末端に存在するコイルドコイル領域に着目した。コイルドコイルモチーフはタンパク質間の相互作用に関係することが知られているので、coronin の二量体形成の可能性を考えた。アフリカツメガエル coronin 遺伝子相同産物 Xcoronin A, B に二つの異なるタグを付けて細胞内に発現させて免疫沈降の実験を行ったところ、これらのタンパク質は共沈した。このことから Xcoronin A, B はホモ、ヘテロ多量体を形成することが分かった。2.4M NaCl, 0.6MKI, 2Murea の存在下でも共沈は見られ、Xcoronin 多量体は非常に安定であることが分かった。アフリカツメガエル由来の培養細胞である A6 細胞の抽出液をゲル濾過カラム、ショ糖密度勾配遠心にかけて分画し、Xcoronin の挙動を調べた。Xcoronin は単一のピークとして検出され、内在性 Xcoronin 多量体のストークス半径、沈降係数が求められた。これらの値から Xcoronin 多量体の分子量は約 140kDa であると算出され、アミノ酸組成から算出される Xcoronin 単量体の分子量 62kDa の約 2.3 倍であることが分かった。また、下に述べるように COS7 細胞や大腸菌に発現させた Xcoronin も似た物理化学的性質を示した。以上のことから Xcoronin は二量体を形成すると結論した。Xcoronin の二量体化に関わる領域を決定するために、Xcoronin 各種部分欠失体と Xcoronin 全長を培養細胞で共発現させ、これらのタンパク質の共沈を調べた。C 末端コイルドコイル領域だけを欠いた部分欠失体は Xcoronin 全長とは共沈しなかったが、C 末端コイルドコイル領域断片は Xcoronin 全長と共沈した。さらに、Xcoronin C 末端断片同士でも共沈が見られた。これらの結果より C 末端は二量体化に必要なかつ十分であることが分かった。C 末端に点変異を導入することにより、部分的もしくは完全に二量体形成能を欠いた変異型 Xcoronin を作製した。培養細胞に野生型あるいは変異型 Xcoronin を発現させ、ゲル濾過カラム、ショ糖密度勾配遠心におけるそれらのタンパク質の挙動を調べた結果、野生型は二量体、変異型は単量体で存在していることが分かった。大腸菌に発現させた野生型あるいは変異型 Xcoronin もそれぞれ二量体、単量体であったことから、Xcoronin の二量体化は他の分子を介さずに起こることが分かった。培養細胞に Xcoronin C 端断片を Xcoronin 全長と共発現させて免疫沈降の実験を行った結果、野生型 C 端断片の共発現は Xcoronin 全長の二量体化を阻害することが分かった。Xcoronin は細胞辺縁部に局在する。二量体化がこの局在に必要なかどうかを調べるために、野生型あるいは変異型 Xcoronin を A6 細胞に発現させ、その細胞内局在を調べた。その結果、Xcoronin の二量体形成能と細胞辺縁部への局在の度合いは良い一致を示していることが分かった。Xcoronin C 末端断片を共発現させて Xcoronin 全長の二量体化を阻害すると Xcoronin 全長は細胞辺縁部に局在しなくなることが分かった。以上のことから、Xcoronin の二量体化はその辺縁部への局在に重要な役割を果たしているとは結論した。

論文審査の結果の要旨

アクチン結合タンパク質 coronin は全真核生物を通じて高度に保存されている。また、細胞性粘菌キイロタマホコリカビの coronin 欠失変異体の表現型は非常に重篤であり、細胞運動、細胞質分裂、食作用などのアクチンの関与する様々な現象についての coronin の生体内での機能の重要性が示唆されていた。一方、coronin の細胞内での分子レベルでの機能の詳細についてはほとんど不明であったが、最近当研究室における研究の結果、coronin は細胞の辺縁部に局在し、ラメリボディアの形成や細胞の伸展運動に関与していることが明らかにされた。coronin はアクチンに富む細胞辺縁部でアクチンネットワークの動態を制御しているのだと考えられる。

申請者は coronin の存在状態、構造、機能を明らかにする目的でアフリカツメガエル coronin 遺伝子相同産物 Xcoronin を用いて様々な実験を行った。申請者は免疫沈降、ゲル濾過カラム、ショ糖密度勾配遠心など様々な生化学的手法によって Xcoronin は非常に安定な二量体を形成していることを明らかにした。これは coronin の細胞内での存在状態が明らかになった最初の例であり、価値が高い発見であると考えられる。

また、申請者は種々の変異型 Xcoronin を作製するなど様々な分子生物学的手法によって Xcoronin の二量体化はその C 末端のコイルドコイル領域を介して起こることを示した。C 末端のコイルドコイルモチーフは Xcoronin だけでなくほとんど全ての coronin ファミリー分子において種を越えて保存されている領域であることから、coronin の二量体化はそのファミリー内で普遍的な現象であることが示唆された。また、coronin のコイルドコイルモチーフの意義を最初に明らかにしたという点でも非常に価値ある知見であり、評価できる。

さらに、申請者は培養細胞に発現させた GFP-Xcoronin の蛍光を観察するという細胞生物学的手法を用いることによって Xcoronin の二量体化はその細胞辺縁部への局在に重要であることも示した。アクチンに富む細胞辺縁部に局在してアクチンフィラメントの状態を制御することが coronin の機能に普遍的に重要であると考えられていることから、本申請論文は coronin 分子の存在状態を明らかにしたばかりでなく、その細胞内での機能を明らかにするうえでも大いに意義あるものであり、博士（理学）の学位論文として十分な価値を持つと認められる。

平成13年2月2日論文内容とこれに関連した口頭試問を行った結果、合格と認めた。