

京都大学	博士（ 医科学 ）	氏 名	渡 邊 定 則
論文題目	Rho and anillin-dependent control of mDia2 localization and function in cytokinesis. (Rho 及び anillin による Rho 標的分子 mDia2 の細胞質分裂時の局在と機能の調節)		
(論文内容の要旨)			
高等動物細胞の細胞質分裂では、アクトミオシンからなる収縮環と呼ばれる構造の収縮により娘細胞分離が遂行される。この収縮環の形成・維持・機能は、アクチンとミオシンと共に、多くの調節蛋白質が働くことで厳密に制御される。しかし、収縮環の構成蛋白質群がいかに相互作用し協調して細胞質分裂を調節するのかは未だ不明な点が多い。低分子量G蛋白質 Rho は収縮環形成を誘導し細胞質分裂を調節する。Rho 標的分子 mDia は、直鎖状アクチン繊維を誘導するフォルミンファミリー蛋白質に属し、3つのアイソフォーム mDia1, mDia2, mDia3 が存在する。このうち mDia2 が選択的に分裂溝へ局在し、細胞質分裂を調節するが、どのような機構で mDia2 が選択的に分裂溝へ局在し細胞質分裂で機能を発揮するのかは不明であった。本研究は、mDia2 の細胞質分裂期の局在化機構の解明を行ったものである。 ①まず、上流の Rho シグナル伝達を阻害し、その mDia2 の局在への影響を検討した。RNAi による Rho 活性化分子 Ect2 の阻害、あるいは mDia2 の Rho 結合性欠損変異の導入により、mDia2 の分裂溝局在は減弱し、一方でスピンドル中央交差部のセントラルスピンドルへの局在が増加した。このことから、mDia2 は分裂期に複数の部位に局在すること、また、Rho 活性化に応答し、分裂溝に移行し機能することが示唆された。実際に、欠失コンストラクトを用いた解析で mDia2 には分裂溝局在を担うN端領域と、セントラルスピンドル及びミッドボディ局在を担うC端領域が独立してあることが判明した。更に、Rho 結合ドメインを欠く mDia2 の N 端フラグメントでも分裂溝への局在が見出された。これらの結果は、mDia2 の Rho 非依存的な分裂溝への局在メカニズムを示唆するものであった。Rho 標的分子 mDia1,2,3 の中でも mDia2 が選択的に分裂溝へ局在することから、この領域が mDia2 特異的な分裂溝局在の責任部分と考えられた。 ②そこで、この領域を bait とし結合分子を探索した。その結果、新規 mDia2 結合分子として細胞質分裂に必須な足場蛋白質 Anillin を同定した。まず、それぞれの精製蛋白質を用いたプルダウン法により、Anillin はそのN端部分で mDia2 に直接結合することを確認した。更に、anillin と mDia2 の結合様式の詳細を蛍光偏光法により検討した。その結果、Anillin-mDia2 の結合が mDia2 の自己抑制性分子内結合と競合することが示唆された。 ③最後に、この Anillin-mDia2 結合の細胞質分裂での機能的意義を、Anillin RNAi の表現型回復実験により解析した。まず、Anillin RNAi により mDia2 の分裂溝への局在が減弱したが、mDia2 結合部位をもつ anillin の発現で mDia2 局在は回復した。なお、Anillin RNAi により Rho も局在が減弱したが、これは mDia2 結合部位を欠く場合でも回復した。さらに、Anillin RNAi の細胞質分裂失敗についても、mDia2 結合領域をもつ Anillin の発現により有意に回復した。 以上の結果から、mDia2 の細胞質分裂の局在と機能発揮には Rho に加えて Anillin の mDia2 への結合があることで、その活性化状態及び局在が正しく維持され機能する事が示唆された。			

(論文審査の結果の要旨)

アクトミオシンからなる収縮環は、細胞質分裂で必須な働きを為している。申請者らは、これまで **formin** 蛋白質のひとつである **mDia2** によるアクチン重合が収縮環の形成・維持に重要であることを報告していた。しかし、哺乳類細胞質分裂時の **mDia2** の調節機構や、その他の収縮環構成分子との協調機構は不明であった。本研究では、NIH3T3 細胞を用い、**mDia2** の機能発現に重要な分裂溝局在機構を解析した。まず、**mDia2** の RhoA 結合欠損変異体を発現したところ、本変異体は **mDia2** の分裂溝局在を示さず細胞質分裂失敗を惹起することから、**RhoA-mDia2** 結合の細胞質分裂の重要性を見出した。また、**mDia2** の各種部分欠失・変異体の局在観察から、分裂溝及びセントラルスピンドル・ミッドボディへの局在に必要な **mDia2** の分子内領域を同定した。さらに、その分裂溝局在必要領域を用いた結合分子探索により、**mDia2** が結合する新規蛋白質 **Anillin** を同定し、**Anillin** が **mDia2** の分子内抑制相互作用を担う領域に直接結合することを見出した。ついで、**Anillin-mDia2** 結合領域欠失の **Anillin** 変異体を用いた実験で、**mDia2** と **Anillin** の結合が **mDia2** の細胞質分裂の局在と機能に必要なことを確認した。

以上の結果から、**Anillin** との結合により細胞質分裂期の **mDia2** の局在と機能が調節されることが示唆された。

以上の研究は、mDia2 が細胞質分裂を制御する分子機構を明らかにしたもので、細胞生物学に寄与するところが大きい。したがって、本論文は博士（医科学）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24年2月10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。