Osaka University Knowledge Archive

Title	Frabin, a Novel FGD1-related Actin Filament-binding Protein Capable of Changing Cell Shape and Activating c-Jun N-terminal Kinase
Author(s)	尾葉石, 浩
Citation	大阪大学, 2001, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/43127
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

Osaka University

【43】

氏　　名	尾葉石（おばいし）　浩（ひろし）
博士の専攻分野の名称	博　士（医　学）
学　位　記　番　号	第　16467　号
学位授与年月日	平成13年7月4日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学　位　論　文　名	Frabin,a Novel FGD1-related Actin Filament-binding Protein Capable of Changing Cell Shape and Activating c-Jun N-terminal Kinase （フラビン：細胞の形態変化およびc-Jun N-terminal kinase活性化能を有する新規のFGD1関連アクチンフィラメント結合蛋白質）
論　文　審　査　委　員	（主査） 教　授　高井　義美 （副査） 教　授　宮坂　昌之　　教　授　中村　敏一

論　文　内　容　の　要　旨

【目的】

アクチン細胞骨格のダイナミックな再編成は、細胞の形態変化、接着、運動等の多くの細胞機能に必須である。Rhoファミリー低分子量G蛋白質は、Rho、RacおよびCdc42のサブファミリーから構成され、アクチン細胞骨格の重要な制御因子であることが明らかになっている。線維芽細胞において、Cdc42はフィロポディア形成を、Racはラメリポディアおよびラッフル膜の形成を、またRhoはストレスファイバーおよび接着斑の形成を制御している。しかしながら、Rhoファミリーによるアクチン細胞骨格の制御機構は充分に理解されていない。

そこで本研究では、Rhoファミリーによるアクチン細胞骨格の制御機構を明らかにする目的で、新しいF-アクチン結合蛋白質の単離を試みると共に、その蛋白質の性状解析を行った。

【方法ならびに成績】

1）新規F-アクチン結合蛋白質の単離とその遺伝子のクローニング

^{125}Iで標識したF-アクチンをプローブとしたブロットオーバーレイ法によって、ラット胎児脳にSDS電気泳動上での分子量が約105kDのF-アクチン結合蛋白質を検出した。この蛋白質を種々のカラムクロマトグラフィーによって精製し、その部分アミノ酸配列を決定した。その結果、この蛋白質は新規であることが判明し、その部分アミノ酸配列の情報に基づいて、この蛋白質の遺伝子をクローニングした。この蛋白質は766個のアミノ酸からなり、計算上の分子量は86,449であり、また、N末側よりF-アクチン結合（FAB）ドメイン、Dblホモロジードメイン、pleckstrinホモロジー（PH）ドメイン、FYVEドメイン、二番目のPHドメインより構成されていた。N末端のFABドメインを除くドメイン構成は、FGD1と高い相同性を示したので、この蛋白質をフラビン（frabin, FGD1-related F-actin binding protein）と命名した。FGD1は、faciogenitaldysplasia/Aarskog-Scottsyndromeの原因遺伝子として単離され、Cdc42に特異的なGDP/GTP交換反応促進蛋白質（GEP）であることが報告されている。

2）フラビンの生化学的解析

フラビンとF-アクチンとの共役沈降実験を行い、フラビンがF-アクチン結合蛋白質であることを確認した。その結合のストイキオメトリーは、約14：1（アクチン：フラビン）であり、その解離定数は約10^{-6}Mであった。また、フラビンのF-アクチンへの結合はミオシンによって完全に抑制され、フラビンはF-アクチンの側方に結合することが示唆された。さらに透過型電子顕微鏡によってフラビンがF-アクチンの架橋作用を示した。

3）フラビンのマイクロスパイク形成活性の解析

FGD1はCdc42を介してマイクロスパイクを形成することが報告されている。そこで、フラビンのマイクロスパイク形成活性を検討した。Swiss3T3細胞にCdc42の活性型変異体（V12Cdc42）を強制発現させると、マイクロスパイクが形成された。フラビンを強制発現させた細胞でも同様のマイクロスパイクが形成された。

4）フラビンによるc－JunN-terminal kinase（JNK）活性化の解析

FGD1ならびにCdc42はJNKを活性化することが報告されている。そこで、フラビンがJNKを活性化するかを検討した。フラビンあるいはV12Cdc42とHAタグのJNK（HA-JNK）をCOS細胞に共に発現させ、抗HA抗体でHA-JNKを免疫沈降した後、そのリン酸化活性を検討した。その結果、フラビンはV12Cdc42と同様にJNKを活性化した。

【総括】

私は、本研究において、新規アクチン結合蛋白質フラビンを単離し、その性状の解析を行った。フラビンは、Cdc42のGEPであるFGD1と高い相同性を示し、FGD1と同様にマイクロスパイクの形成とJNKの活性を制御していることを明らかにした。また私共は、本研究に引き続いてフラビンの性状をさらに解析し、フラビンがCdc42に特異的なGEP活性を示すことを明らかにすると同時に、フラビンのF-アクチン結合活性がマイクロスパイクの形成に必須であることを見出している。さらに、私共の研究室では、フラビンによるマイクロスパイクの形成の制御機構を詳細に解析し、Cdc42の活性化作用とF-アクチン結合活性が協調的に機能していることを明らかにしている。したがって、フラビンは既存のアクチン細胞骨格に依存して、アクチン細胞骨格を再編成すると考えられる。最近、RacのGEPであるTiam1がアンキュリンを介してF-アクチン結合蛋白質スペクトリンに結合し、Tiam1のアクチン細胞骨格への結合がラメリポディアおよびラッフル膜の形成に重要な役割を果たしていることが報告されている。また、RacとRhoのGEPであるTrioがF-アクチン結合蛋白質フィラミンに結合し、Trioのアクチン細胞骨格への結合がラッフル膜の形成に重要な役割を果たしていることも明らかにされている。このように、フラビンと同様なアクチン細胞骨格の制御機構が少なくともTiam1ならびにTrioにも機能していることが予想され、RhoファミリーのGEPは、その基質の低分子量のG蛋白質の活性化作用と直接的あるいは間接的なF-アクチン結合活性が協調的に機能することによって、アクチン細胞骨格を再編成すると考えられる。

論文審査の結果の要旨

本申請者は、本研究において、新しいF-アクチン結合蛋白質であるフラビンを単離し、その性状を解析した。その結果、フラビンはCdc42に特異的なGDP/GTP交換反応促進蛋白質（GEP）であるFGD1と高い相同性を示した。また、フラビンはF-アクチンの側方に結合し、F-アクチン-クロスリンキング活性を示した。さらに、フラビンはFGD1と同様に、フィロポディア形成を誘導し、c-Jun N-terminal kinaseを活性化した。したがって、フラビンはCdc42のGEP活性を持ち、Cdc42とアクチン細胞骨格の連結分子として機能していると考えられる。

本研究は、実験結果自体の意義もさることながら、今後のこの研究に極めて重要な意義を持つものと考えられる。したがって、今後の発展性や生命科学への貢献度から鑑み、学位授与に十分値するものと認める。