

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	
Issue Date	
Text Version	none
URL	<a href="http://hdl.handle.net/11094/43127">http://hdl.handle.net/11094/43127</a>
DOI	
rights	
Note	

*Osaka University Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/repo/ouka/all/>

氏名	おほいし ひろし 尾葉石 浩
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十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

<sup>125</sup>I で標識した F-アクチンをプローブとしたプ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<sup>-6</sup>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-Jun N-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-クロスリンク活性を示した。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。