

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	<a href="https://hdl.handle.net/11094/43127">https://hdl.handle.net/11094/43127</a>
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、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">＜a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"&gt;https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed</a> >大阪大学の博士論文について</a>をご参照ください。

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

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

The University of Osaka

氏 名	お ば い 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 1 6 4 6 7 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-Scott syndrome 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-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。