

Title	Association of frabin with specific actin and membrane structures
Author(s)	金, 永満
Citation	大阪大学, 2003, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/43983
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"〉 大阪大学の博士論文について 〈/a〉 をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

氏名	金 永 満
博士の専攻分野の名称	博士 (医学)
学位記番号	第 17668 号
学位授与年月日	平成 15 年 3 月 25 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当 医学系研究科臓器制御医学専攻
学位論文名	Association of frabin with specific actin and membrane structures (フラビンと特異的なアクチン構造および膜構造との結合)
論文審査委員	(主査) 教授 門田 守人 (副査) 教授 高井 義美 教授 宮坂 昌之

論文内容の要旨

[目的]

がんの浸潤転移など、細胞の運動はアクチン細胞骨格を介して制御されている。アクチン細胞骨格は、Rhoファミリー低分子量 G タンパク質 (Rho, Rac, Cdc42) により制御されている。この活性化には、GDP/GTP 交換タンパク質 (GEP) が必要である。分子生理化学教室では、Cdc42 特異的 GEP であるアクチン結合タンパク質 Frabin を同定した。Frabin は、N 末端より、F-アクチン結合領域 (FAB)、Dbl 相同領域 (DH)、第 1 ブレックストリン相同領域 (PH1)、FYVE フィンガー領域 (FYVE)、第 2 ブレックストリン相同領域 (PH2) より構成されている。Frabin は L 線維芽細胞で、DH、PH1 に加えて、FAB を介して直接的に Cdc42 を活性化しフィロポディアを形成する。そして、DH、PH1 に加えて、FYVE、PH2 を介して間接的に Rac1 を活性化しラメリポディアを形成することが明らかとなっている。

本研究では、Frabin の各領域と、特異的なアクチン構造および膜構造であるフィロポディアやラメリポディアとの結合について検討した。その結果、Frabin は FAB を通して特異的なアクチン構造を、そして、FAB と DH から PH1、FYVE、PH2 を含む領域を通して膜構造を認識し、その周囲で Cdc42 や Rac を活性化し、細胞形態を変化させると考えられた。

[方法ならびに成績]

1) Frabin の変異体の作成

Frabin-EGFP、aa 1-766 (full length) ; Myc-FAB、aa 1-150 ; Myc-FAB L23R、aa 1-150 (codon 23 の CTC を CGC に置換 (Leu を Arg に置換)) ; Myc-dead DH、aa 353-362 を欠失した aa 169-401 ; Myc-PH1、aa 399-539 ; Myc-FYVE、aa 540-626 ; Myc-PH2、aa 627-766 ; Myc-PH1-FYVE、aa 399-626 ; Myc-FYVE-PH2、aa 540-766 ; そして、Myc-dead DH-PH2、aa 353-362 を欠失した aa 169-766。Cdc42 持続活性型 (DA) (V12Cdc42Hs) と Rac1DA (V12Rac1) については、FLAG-Cdc42DA、FLAG-Rac1DA を作成した。

2) Frabin 変異体のフィロポディアへの結合

Frabin-EGFP が、L 線維芽細胞において、フィロポディアやラメリポディアを形成することを確認した。Frabin

変異体のフィロポディアへの結合を免疫細胞染色にて検討した。Myc-FAB のみが、FLAG-Cdc42DA とともに発現すると、フィロポディアへ濃縮した。Myc-FAB L23R が、FLAG-Cdc42DA とともに発現すると、細胞内に瀰漫性に分布した。Myc-FAB を、FLAG-RhoADA とともに発現しても、ストレスファイバーへは濃縮しなかった。以上の結果から、FAB がフィロポディアのアクチン構造を認識して結合し、この結合には F-アクチン結合活性が必要であることが示唆された。

3) Frabin 変異体のラッフルへの結合

Frabin 変異体のラッフルへの結合を免疫細胞染色にて検討した。Myc-FAB、Myc-FAB L23R、Myc-FYVE、Myc-FYVE-PH2、そして、Myc-dead DH-PH2 が、FLAG-Rac1DA とともに発現させると、ラッフルへ濃縮した。以上の結果から、FAB と FYVE の両者がラッフルの膜構造を認識して結合することと、この結合には F-アクチン結合活性は必要でないことが示唆された。

4) Frabin 変異体による Frabin 全長の表現形の阻害

Frabin 変異体による Frabin 全長の表現形フィロポディアやラメリポディアの阻害効果から両者の結合様式について、免疫細胞染色にて検討した。Myc-FAB を Frabin-EGFP と共に発現させると、フィロポディアやラメリポディアの形成は著明に阻害された。この結果から、FAB とアクチン構造との結合は、saturable なものであり、FAB がアクチン構造自身に加えて、F-アクチン結合タンパク質と結合することが示唆された。一方、Myc-FAB L23R を Frabin-EGFP と共に発現させると、ラメリポディアの形成は著明に阻害されたが、70%にフィロポディアが認められた。Myc-FAB L23R が FLAG-Rac1DA とともに発現すると、ラッフルへ濃縮した結果とあわせると、FAB L23R と膜構造との結合は、saturable なものであり、FAB が特異的な膜構造タンパクと結合することが示唆された。さらに、Myc-dead DH、Myc-PH1、Myc-FYVE、Myc-PH2 それぞれを Frabin-EGFP と共に発現させると、フィロポディアやラメリポディアの形成は阻害された。Myc-PH1-FYVE、Myc-FYVE-PH2 それぞれを Frabin-EGFP と共に発現させると、フィロポディアやラメリポディアの形成はわずかに阻害された。Myc-dead DH-PH2 を Frabin-EGFP と共に発現させると、ラメリポディアの形成は著明に阻害されたが、フィロポディアの形成はわずかに阻害された。FYVE を含む変異体が FLAG-Rac1DA と共に発現するとラッフルへ濃縮した結果とあわせると、膜構造との結合は FYVE だけでは不十分であり、DH、PH1、FYVE、PH2 を含む領域が必要であることが示された。

[総括]

私は、Cdc42 特異的 GEP 活性をも有するアクチン結合タンパク質 Frabin の各領域と、特異的なアクチン構造および膜構造であるフィロポディアやラメリポディアとの結合について検討した。その結果、Frabin は FAB を通して特異的なアクチン構造を、そして、FAB と DH から PH1、FYVE、PH2 を含む領域を通して膜構造を認識し、その結合は saturable なものであることが明らかとなった。したがって、Frabin は特異的なアクチン構造および膜構造の周囲で Cdc42 や Rac を活性化し、細胞形態を変化させると考えられた。

アクチン細胞骨格系は、細胞の運動・接着などの細胞機能を制御しており、ヒトの疾患では筋骨格系の異常からがんの浸潤・転移まで、多岐かつ密接に関連していることから、Frabin の作用機構の解明は、ヒトの疾患の分子機構を解明する上で、重要であると考えられる。

論文審査の結果の要旨

アクチン細胞骨格系は、細胞の運動・接着などの細胞機能を制御しており、ヒトの疾患では筋骨格系の異常からがんの浸潤・転移まで、多岐かつ密接に関連している。アクチン細胞骨格は Rho ファミリー低分子量 G タンパク質 (Rho、Rac、Cdc42) により制御されている。さらに、GDP/GTP 交換タンパク質 (GEP) が、低分子量 G タンパク質の活性化に重要な働きを担っており、複数の分子が同定されている。Frabin は、アクチン結合タンパク質であり、さらに Cdc42 特異的 GEP 活性を有する。Frabin は、Cdc42 を直接活性化しフィロポディアの形成を、Rac を間接的に活性化しラメリポディアの形成を促進する。本申請者は、本研究において、Frabin の各領域と、特異的なアクチン構造お

よび膜構造であるフィロポディアやラメリポディアとの結合について検討した。その結果、Frabin は F-アクチン結合領域 (FAB) を通して特異的なアクチン構造を、そして、FAB と Db1 相同領域 (DH) から第 1 プレックストリン相同領域 (PH1)、FYVE フィンガー領域 (FYVE)、第 2 プレックストリン相同領域 (PH2) を含む領域を通して膜構造を認識し、その周囲で Cdc42 や Rac を活性化し、細胞形態を変化させると考えられた。また、Frabin の各領域による Frabin 全長の表現形の阻害実験から、Frabin の各領域と、特異的なアクチン構造および膜構造であるフィロポディアやラメリポディアとの結合様式が明らかとなった。以上の結果から、Frabin の作用の分子機構をさらに詳しく明らかにすることは、がんの浸潤・転移を理解する上で、重要であると考えられた。

このように、本研究の実験結果が持つ意義は非常に大きく、基礎から臨床への発展性を広げつつあり、今後の生命科学への貢献度が極めて高い研究であるといえる。したがって、博士 (医学) の学位授与に値するものと考えられる。