【230】

氏　名（本籍）	横　尾　友　隆（神奈川県） よこ　お　とも　たか
学位の種類	博　　士（医　　学）
学位記番号	博　甲　第　3777　号
学位授与年月日	平成 17 年 3 月 25 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
審査研究科	人間総合科学研究科
学位論文題目	**$p57^{Kip2}$ Regulates Actin Dynamics by Binding and Translocating LIM-kinase 1 to the Nucleus** （$p57^{Kip2}$ は LIM-kinase 1 と結合し、その局在を変えることによってアクチン再構成を制御する）

主　査	筑波大学教授	歯学博士	吉　田　　廣
副　査	筑波大学助教授	博士（医学）	石　井　朝　夫
副　査	筑波大学助教授	理学博士	照　井　直　人
副　査	筑波大学講師	医学博士	吉　澤　利　弘

論　文　の　内　容　の　要　旨

（目的）

細胞周期は細胞分裂の基本システムで，細胞増殖制御におけるシグナル伝達の最終段階を担い，発生，分化，癌化などに関与する。細胞周期のなかで，G1 期から S 期への進行には G1 サイクリン・CDK 複合体が中心的な役割を果たしているが，CDK に結合して細胞周期を負に制御する一連の CDK 阻害因子も報告されている。p57 はノックアウトマウスの解析で胎生致死となる唯一の CDK 阻害因子で，特異的に骨芽細胞において増殖抑制のみならず，分化の進行に直接的な役割を果たす可能性が示唆され，骨形成において他の CDK 阻害因子では相補できない特別な役割を担っていると考えられる。

そこで，本研究は骨芽細胞中で p57 による増殖の制御に関わるタンパクを探索することを目的とした。

（対象と方法）

1 日令の ddY マウスから初代培養骨芽細胞を単離し，血清飢餓により分化誘導を行った後，cDNA Library を作成した。次に，マウス p57 の C 末端フラグメントを bait として用い，p57 に関わるタンパクを Yeast two-hybrid 法により探索した。p57 とすでに同定した LIM-kinase 1（LIMK-1）の細胞内での結合を強制発現 HEK293T 細胞および初代培養骨芽細胞を用いて免疫沈降法により確認後，この結合による LIMK-1 のリン酸化能に与える影響を強制発現 HEK293T 細胞で免疫沈降法および *in vitro* Kinase 法，LIMK-1 のアクチン再構成に与える影響を強制発現 COS-7 細胞で検討した。また，アクチンファイバーを phalloidin 染色，LIMK-1 および p57 の局在を免疫染色により確認した。

（結果）

Yeast two-Hybrid 法により，これまでに細胞周期制御，とくに p57 とは関連が示唆されていなかった LIMK-1 を p57 の新規の結合因子として同定した。この p57 と LIMK-1 との結合が p57 の中心部にある，他

の CDK 阻害因子にはみられない特徴的な領域を介していることを明らかにした。また，この結合によって，LIMK-1 のリン酸化能に変化はないものの，LIMK-1 は細胞質から核へと局在を変化させることでアクチンの再構成を制御することが明らかとなった。

（考察）

細胞内で LIMK-1 を発現させると，アクチンストレスファイバーが形成されるが，同時に p57 を強制発現させると LIMK-1 が p57 に結合することによって細胞質から核内に移行し，アクチンストレスファイバーの形成が阻害された。したがって，p57 は LIMK-1 との結合を介して，細胞骨格の制御に関わることが明らかになった。また，LIMK-1 による細胞骨格の制御は細胞の形態，遊走などを介して形態形成に重要な役割を果たすと考えられ，p57 が他の CDK 阻害因子にはみられない中心部の特徴的な領域を介して LIMK-1 と結合することにより，形態形成において重要である細胞周期と細胞骨格の制御の連携に係わることが強く示唆された。

（結論）

p57 は，CDK 阻害因子である p21 や p27 に比べてその中心部に機能の知られていない領域を持つことが大きな特徴となっているが，今回の結果は p57 がこの中央領域を介して LIMK-1 と結合し，細胞形態に影響を及ぼすことを明らかにした。従って，p57 は細胞周期の制御に加えて，LIMK-1 を介して直接的に細胞形態の制御を行うことによって形態形成に関与すると考えられた。

審 査 の 結 果 の 要 旨

本研究は，CDK 阻害因子一つである p57 が LIMK-1 と結合することを発見し，結合部位が他の CDK 阻害因子ではみられない中央領域であることを明らかにした。また，この結合によってアクチン再構成が変化することを示した。これらの結果は，p57 と LIMK-1 の結合が，形態形成において重要である細胞周期と細胞骨格の制御の連携に係わることが強く示唆するもので，高く評価される論文である。

よって，著者は博士（医学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。