

氏 名 (本籍)	周 森 (中 国)
学 位 の 種 類	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	博 甲 第 5956 号
学位授与年月日	平成 23 年 12 月 31 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	Studies on Tissue Distribution and Signaling Mechanism of Small GTPase ADP-ribosylation Factor 6 (低分子量 G 蛋白質 Arf6 の生体内分布及び情報伝達システムに関する研究)
主 査	筑波大学教授 医学博士 高 橋 智
副 査	筑波大学准教授 博士 (医学) 松 坂 賢
副 査	筑波大学講師 博士 (理学) 小 林 麻己人
副 査	筑波大学助教 博士 (医学) 加 藤 広 介

論 文 の 内 容 の 要 旨

(目的)

低分子量 GTP 結合蛋白質は、グアノシン 3 リン酸 (GTP) を結合し、加水分解してグアノシン 2 リン酸 (GDP) とし、さらにその GDP を GTP に交換することで、細胞内シグナル伝達のスイッチ機能を果たす。このタンパク質は、Ras、Rho、Rab、Ran と Arf の 5 つのサブファミリーに分類され、それぞれ細胞の増殖、分化、運動、小胞輸送などの調節に関与している。低分子量 G 蛋白質の GDP/GTP サイクリングは、グアニンヌクレオチド交換因子 (guanine nucleotide exchange factor, GEF) 及び GTPase 活性化蛋白質 (GTPase-activating protein, GAP) によって調節されている。ADP-リボシル化因子 6 (ADP-ribosylation factor 6, Arf6) は Arf サブファミリーに属し、他の Arf メンバーと比較して幾つの特徴を有する。活性化型 Arf6 は細胞膜に局在し、アクチン細胞骨格再構築や小胞の細胞膜への輸送など、多彩な細胞機能の制御を介して生体内で多様な役割を担っていると考えられている。一方、哺乳動物の個体レベルでの Arf6 の生理機能は、現在までほとんど明らかになっていない。そこで本論文では、生理機能を解析するための基本情報となるマウス個体における Arf6 の発現パターンを検討した。一方、フィブロネクチンによる細胞接着の制御には、Arf6 の活性化が必要であることが既に報告されているが、フィブロネクチンにより活性化されたインテグリンが、どのようなシグナルを用いて Arf6 を活性化するのかはほとんど分かっていない。近年インテグリンが、Arf6 の活性化因子の一つである cytohesin-2 を介して Arf6 を活性化すること、また別の低分子量 G 蛋白質である Arf-like protein 4 (Arl4) が cytohesin を介して Arf6 を活性化することが報告された。そこで本論文では、フィブロネクチンにより活性化されたインテグリンが、Arl4 また cytohesin を介して Arf6 を活性化している可能性を検証した。

(対象と方法)

Arf6 のマウス個体での発現パターンを検討するため、新たなポリクローナル抗 Arf6 抗体を作製し、その抗体を用いたウェスタンブロット法で、生体での Arf6 の発現変動を検討するとともに、in situ ハイブリダイゼーション法により組織での局在を解析した。また、フィブロネクチンで誘発したシグナルにおける

cytohesin および Arl4 メンバーの機能を検討するため、cytohesin 阻害剤、Arl4 の変異体や siRNA を用いて細胞内の機能解析を行なった。

(結果)

特異性の高い抗 Arf6 抗体を作製することに成功した。その抗体と in situ ハイブリダイゼーション法を用いて、個体における Arf6 の発現を解析した。その結果、Arf6 は全身に広く発現するが、その発現レベルは、発生段階に従って組織特異的に変化することを明らかにした。一方 Arf6 の活性化機構の解析では、cytohesin 阻害剤の SecinH3 により、フィブロネクチンによる Arf6 の活性化と細胞伸展が抑制されること、また、Arl4A と Arl4D の過剰発現により、フィブロネクチンによる Arf6 の活性化と細胞伸展を増強されること、反対に、Arl4A と Arl4D を共にノックダウンすることで、フィブロネクチンによる細胞伸展が抑制されることを明らかにした。

(考察)

発生段階に従って、組織特異的に変化する Arf6 発現パターンの結果から、Arf6 は多様な生理機能を果たすことが予想され、その機能は、細胞外シグナルにより制御されると考えられた。また、Arl4A、Arl4D と ArfGEF の cytohesin は、フィブロネクチンによる Arf6 の活性化及び細胞伸展のシグナル伝達に関与していることを明らかにした。この制御機能は、Arl4A/Arl4D の GDP/GTP 活性化サイクルを必要としていると考えられた。

審 査 の 結 果 の 要 旨

本論文では、マウス個体における Arf6 の発現パターンを明らかにした。またフィブロネクチンによる Arf6 を活性化に、Arl4A/D および cytohesin が関与していることを解明した。本論文は、フィブロネクチンによる Arf6 の活性化経路に、Arl4A と Arl4D が関与していることを初めて明らかにしたものとして、高く評価される。

平成 23 年 11 月 7 日、博士（医学）学位論文審査専門委員会において審査委員全員出席のもとに最終試験を行い、論文について説明をもとめ、関連事項について質疑応答を行った結果、審査委員全員によって合格と判定された。

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。