

氏名（本籍）	中嶋 潤 （ 長野県 ）		
学位の種類	博 士 （ 理学 ）		
学位記番号	博 甲 第 7140 号		
学位授与年月日	平成26年 9月30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	生命環境科学研究科		
学位論文題目	Characterization of Dominant Negative Asp11 Mutant Actins (優性阻害となる Asp11 変異アクチンの解析)		
主査	筑波大学教授（連携大学院）	理学博士	上田 太郎
副査	筑波大学教授	学術博士	橋本 哲男
副査	筑波大学教授	理学博士	沼田 治
副査	筑波大学教授	理学博士	漆原 秀子

論 文 の 要 旨

細胞内アクチンフィラメントの重合・脱重合は細胞内で時間的・空間的に制御されており、ADF/コフィリンファミリーのタンパク質が脱重合に中心的な役割を果たすと考えられているが、その具体的な制御機構に不明な点が多い。たとえば、ADF/コフィリンはアクチンフィラメントと協同的に結合すること、植物やアカンサメーバの ADF/コフィリンによる脱重合活性は、アクチンフィラメントの結合ヌクレオチドによって制御されているという報告があるが、そうした制御機構の一般性や生理的意義は分かっていない。また、そうしたアクチン結合ヌクレオチドによるコフィリンとの結合制御にどのような生理的な意義があるかも推測の域を出ていない。

そこでまず、それぞれ異なる蛍光色素で標識した骨格筋アクチンとヒトコフィリンを用いて、アクチンフィラメントが異なったヌクレオチド状態にあるとき、コフィリンとの親和性はどのように変化するかを、蛍光顕微鏡観察により解析した。その結果、ヒトコフィリンも ADP 結合型のアクチンフィラメントとは協同的に結合するが、ADP-Pi 結合型のアクチンフィラメントとはほとんど結合しないことが明らかになった。この結果は、ヒトコフィリンの性質が植物 ADF とよく似ていることを示すとともに、電子顕微鏡観察による先行研究で報告されていたコフィリンとアクチンフィラメントの協同的結合が、数マイクロメートルの広範囲に及ぶことを示した。

さて Asp11 はすべてのアクチンで保存されており、二価の陽イオンを介して ATP の β -および γ -リン酸基と結合する。この Asp11 の変異体のうち、D11Q 変異は、酵母において優性致死であり、D11N 変異は、ヒト α -アクチンにおいて優性に先天性の筋障害を引き起こす。優性阻害となるこうした Asp11 の変異アクチンについて機能解析を行うことは、ヌクレオチド状態に着目してアクチンとコフィリンの相互作用を解明する有力な手段になりえると期待される。しかし、優性阻害になる変異アクチンを大量に精製することは困難であり、これまで Asp11 変異アクチンの詳細な機能解析は行われていない。ところが最近、所属研究室で新たに開発された細胞性粘菌を用いた発現系により優性阻害型の変異アクチンを精製することが可能となった。そこで本研究では、D11Q および D11N 変異アクチンについて詳細な機能解析を行った。その結果、これらの変異アクチンは、塩濃度依存的に重合脱重合し、重合に伴って

結合 ATP を加水分解する活性も有していた。しかし、フィラメント中で、本来強く結合して外液と交換しないはずの結合 ADP が外液の ATP と迅速に交換してしまうという特徴があった。またこれらの変異アクチンは、コフィリンとの相互作用が弱く、コフィリンによりフィラメントが切断されにくかった。さらに、野生型アクチンとの共重合フィラメントもコフィリンにより切断されにくかったことから、これが Asp11 変異アクチンが細胞内で優性阻害となり、酵母の優性致死を引き起こす原因であろうと推測された。また、コフィリンと相互作用しにくいのは、重合に伴って加水分解後に保持しているはずの ADP が外液の ATP と交換してしまうためであることも示された。これらの結果から、重合に伴ってアクチンに結合していた ATP が加水分解されて ADP となり、これがフィラメント中で長期間保持されることにより古いアクチンの目印となって、コフィリンによる切断を誘起するという一連の現象が、生理的に非常に重要であることが実験的に示された。

審 査 の 要 旨

本論文は、真核細胞の様々な活動において重要な働きをするアクチンフィラメントの脱重合制御について、アクチンに結合したヌクレオチドとコフィリンの関連の理解を深めたもので、生化学と細胞生物学をつなぐ領域の研究として高く評価できる。審査では、これらの点を中心とした議論が行われ、とくに実験条件の決定法、材料の選定法について著者の見解が質された。また今後の展開方向としては、時間分解能と空間分解能を改善した顕微鏡観察の必要性が指摘された。審査における関連事項に関する質疑応答においても、著者は適切かつ論理的な議論を展開し、博士（理学）の資格を十分有することが明らかになった。

平成26年7月9日、学位論文審査委員会において、審査委員全員出席のもとに論文の審査及び最終試験を行い、本論文について著者に説明を求め、関連事項について質疑応答を行った。その結果、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（理学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものとして認める。