

氏名	田中 みなみ		
学位の種類	博 士 (理学)		
学位記番号	博 甲 第 9045 号		
学位授与年月日	平成 31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	生命環境科学研究科		
学位論文題目	Imaging and Analysis of the Actin Binding Protein, Fascin, in Lamellipodia of the Growth Cone (成長円錐ラメリポディア領域におけるアクチン結合タンパク質 fascin の観察と解析)		
主査	筑波大学准教授	博士 (理学)	中野 賢太郎
副査	筑波大学准教授	博士 (理学)	丹羽 隆介
副査	筑波大学教授 (連携大学院)	理学博士	広瀬 恵子
副査	筑波大学准教授	博士 (理学)	桑山 秀一

論 文 の 要 旨

神経伸長は神経ネットワーク形成の重要な過程である。神経細胞の先端部に成長円錐という細胞骨格により支えられる構造が形成され、神経伸長が起きる。成長円錐は周囲に存在する軸索ガイダンス因子（誘導因子や反発因子）を感知し、標的細胞まで神経伸長を促す。成長円錐の辺縁部には、フィロポディアとラメリポディアというアクチン線維からなる2種類の構造がみられる。フィロポディアの内部には、長いアクチン線維がいくつも架橋された太い束が存在する。一方、ラメリポディアには、短く細いアクチン線維からなる網目構造が存在する。これらのアクチン線維からなる細胞骨格は、外的・内的要因によって動的に構造が変化する。この細胞骨格の再構築は、成長円錐の運動を制御する要素の一つである。先行研究では、アクチン線維を架橋する fascin の機能が成長円錐の形成と形態の維持に重要なことが指摘されている。fascin はフィロポディアとラメリポディアの両方に分布しているが、これまでに行われたほとんどの研究は、太いアクチン線維束をもつフィロポディアにおける fascin の役割を対象にしている。ラメリポディア領域における fascin の研究が滞っている原因の一つとして、ラメリポディア領域のアクチン線維からなる細胞骨格構造が顕微鏡の解像限界よりも小さいため、その構造を捉えるのが難しいことが挙げられる。ところが最近、超解像光学顕微鏡が実用化され、この問題を解決する兆しがみえてきた。そこで本論文において著者は、超解像顕微鏡を用いたライブセルイメージング法を検討し、成長円錐のラメリポディア領域のアクチン細胞骨格構造における fascin の分布と分子動態の解明を目指した。

本論文の第一章において著者は、ラメリポディア領域における fascin の分子動態とリン酸化状態の影響について調べた。fascin は分子内に2つのアクチン線維結合部位をもち、それらが別々のアクチン線維と結合することで、アクチン線維を束化する。この fascin のアクチン線維の束化活性は、PKC α によるリン酸化制御を受けることが先行研究から分かっている。本論文の著者は、GFP-fascin (野生型 (WT)) と、そのリン酸化模倣変異体 (S39D) 及び脱リン酸化模倣変異体 (S39A) の3つの蛍光タ

ンパク質を、別々に NG108-15 細胞の成長円錐に発現した。その結果、WT を発現したものに比べ、S39A を発現すると成長円錐の辺縁部に放射状に並ぶアクチン線維が太くなることを発見した。一方、S39D はアクチン線維に微かに局在することを観察した。さらに S39D の発現量を増やすと、成長円錐を形成する細胞の割合が減少し、フィロポディアの数や、ラメリポディア領域のアクチン線維の量が減るといふ阻害効果を見出した。次に著者は、WT、S39D、及び S39A のラメリポディア領域における分子動態を調べるため、光褪色後蛍光回復解析 (FRAP) を行った。その結果、S39A は WT と解離速度に差はほぼなかったのに対し、S39D は解離速度が速いことが分かった。これより著者は、ラメリポディア領域の fascin は、Ser39 のリン酸化によりアクチン線維から外れやすくなる可能性を示すことに成功した。

本論文の第二章において著者は、成長円錐に GFP-fascin と Lifeact-KO を共発現し、ラメリポディア領域における fascin とアクチン線維の局在を調べた。これらの局在を同時に数十 nm の精度で捉えるために、異なる波長の蛍光シグナルを 2 台のカメラで同時計測できる、構造化照明を利用した超解像顕微鏡装置 (2 カメラ SIM) を組立てた。この装置を用いることで、著者はこれまでは観察できなかったラメリポディア領域の細いアクチン線維の網目に沿って fascin がほぼ完全に共局在し、それらが同期して動くことを明らかにした。先行研究で、PKC のアゴニストである TPA を投与すると、fascin がリン酸化され、フィロポディアに付随するアクチン線維束が消えることが報告されている。そこで本論文の著者は、TPA 処理したラメリポディア領域の fascin とアクチン線維を、2 カメラ SIM を用いて観察した。その結果、著者は TPA 処理した fascin がラメリポディアのアクチン細胞骨格から解離し、アクチン線維束が壊れていく一連の過程を記録することに成功した。この結果を踏まえ、著者は fascin の解離によってアクチン線維束が減ると、細胞の硬さが変化するのではないかと考えた。この仮説を検証するため、著者は原子間力顕微鏡を用いて、ラメリポディア領域の弾性率を計測した。TPA 処理の前後で成長円錐のラメリポディア領域に対して、1 μm のステップサイズで 20 μm 四方の範囲のフォースカーブを測定し、弾性率を計算した。その結果、TPA 処理前に比べ、TPA 処理後のラメリポディア領域の平均弾性率は約 4 割低下していた。これより著者は、ラメリポディア領域において fascin が細胞の硬さを制御する要素の一つであると結論した。fascin はがん細胞の転移や浸潤の際に高発現するため、がんの転移マーカーとしても注目されている。著者は、fascin ががん細胞の硬さに影響し、がん細胞の転移などに影響する可能性について、本論文において考察している。

審 査 の 要 旨

成長円錐におけるアクチン線維束化タンパク質 fascin の存在の重要性を指摘した研究は、これまでに複数存在するが、ラメリポディア領域のアクチン線維の網目構造の形成と構造の維持に注目して、fascin の局在とその動態を高分解能で解析した研究は本論文が初めてである。著者が、最新の超解像顕微鏡技術を活用して、ラメリポディア内のアクチン線維と fascin の動態を高分解能ライブ観察することに成功したことは高く評価できる。本実験手法は、細胞内の分子動態を調べる多くの研究に転用可能なため、今後、細胞生物学分野の研究の発展に寄与すると期待される。さらに本論文において著者は、fascin が成長円錐の形態を維持し、リン酸化によってアクチン線維との解離速度を変化する可能性、そして fascin がラメリポディア領域のアクチン線維束の形状と方向性、硬さに影響を与えている可能性を示すことに成功したことも特筆すべき点である。

平成 31 年 2 月 6 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。