

論文の内容の要旨

WASP ファミリー結合タンパク質 FBP11 の機能解析

水 谷 清 人

WASP (Wiskott-Aldrich syndrome protein) ファミリータンパク質はアクチン細胞骨格系を制御している。これまで、Wiskott-Aldrich 症候群の原因遺伝子産物である WASP をはじめ、普遍的に発現している N-WASP、また WASP や N-WASP の C 末部と相同性の高い WAVE (WAVE1、2、3) が報告されており、いずれのタンパク質も C 末部の Verprolin 相同領域 (V)、Cofilin 相同領域 (C)、酸性領域 (acidic-region、A) で Arp2/3 複合体を活性化しアクチン重合活性化に関与している。WASP、N-WASP によるアクチン重合活性化は、分子内相互作用によって制御されている。定常状態では C 末部の VCA 領域と中心部に存在する GBD/CRIB 領域が分子内相互作用によって結合しており、VCA 領域におけるアクチン重合が生じない。細胞外から刺激が入ると、活性化された低分子量 G タンパク質である Cdc42 が GBD/CRIB 領域に結合する。その結果、分子内相互作用が阻害され、曝露された VCA 領域にアクチン、Arp2/3 複合体が結合し非常に速いアクチン重合を引き起こす。また、Cdc42 のみならず、ホスファチジルイノシトール 4,5 ニリン酸 (PI(4,5)P₂)、SH3 ドメインを持つ Ash/Grb2、WISH、Nck、WIP ファミリー分子である WIP、WICH、

CR16 といった様々な分子が細胞膜近傍で N-WASP と相互作用し、N-WASP の活性化を制御している。

WASP ファミリー結合タンパク質を探すため、WAVE3 のプロリンに富んだ領域を bait として酵母 two-hybrid 法を行ったところ FBP11 が得られた。FBP11 は formin と結合するタンパク質として同定された WW ドメインを 2 つ持つタンパク質であり、酵母ホモロークと考えられている Prp40 は mRNA 前駆体のスプラインシングに必須の因子であることが明らかとなっていた。また、ヒトホモロークの HYPA は huntingtin の N 末と結合する分子として同定されていた。

WW ドメインは SH3 ドメイン同様、プロリンに富んだ領域と結合することが知られており、N-WASP、WAVEs いずれもそのような配列を保持していることから、まず各タンパク質との結合能を比較した。大腸菌から精製した GST-WW を用いて *in vitro* における結合を比較した結果、全ての WASP ファミリータンパク質と結合することが明らかとなった。また、豚脳細胞抽出液を用いて WW ドメインに結合するタンパク質を探索した結果、主たる結合タンパク質として同定されたものは N-WASP であった。

次に抗 FBP11 抗体を作製し、ウェスタンブロットティング法により FBP11 タンパク質の発現を各種細胞株の細胞抽出液を用いて調べた結果、COS7 細胞、HeLa 細胞、NIH3T3 細胞、HEK293 細胞、N1E-115 細胞、PC12 細胞のいずれにおいても 140kDa 付近にバンドが検出された。この抗体を用いて COS7 細胞で蛍光抗体免疫染色を行ったところ、内在性の FBP11 は核内でドット状に局在し、核スペckル(nuclear-speckle)様に分布していた。核スペckルは mRNA 前駆体のスプラインシングを行う「場」としてスプラインシングに関連する分子が集合し、スプライソソーム (spliceosome) を形成していると考えられており、このような FBP11 の局在は FBP11 の酵母ホモロークである Prp40 がスプラインシングに関

与しており、FBP11 が同様に哺乳動物細胞においてもスプライシングに関与する可能性を示唆している。

同様に、Myc タグを付加した FBP11 を一過的に発現させたところ、内在性の FBP11 で観察された核スペckルに局在した。しかしながら、WW ドメインに変異を導入した FBP11-WWmt や WW ドメインを欠損させた FBP11- Δ WW を発現させた場合には核内に局在するものの核スペckル様の局在は示さなかった。これらの結果は、FBP11 が核内で正常に核スペckル様の局在をとるためには WW ドメインが必須であることを示している。また、C 末部の塩基性領域を欠失させた変異体を細胞に発現させたところ、変異体 FBP11 は細胞全体に局在しており FBP11 の核内移行にはこの領域が必須であることが分かった。

FBP11 の WW ドメインが WASP ファミリータンパク質と結合することから、細胞内においてもそのような相互作用が観察されるか、GFP、GFP-N-WASP、GFP-WAVE1 と Myc-FBP11 を細胞内に共発現させてその局在を観察した。Myc-FBP11 はいずれの場合も核スペckルに局在したが、GFP-N-WASP のみが Myc-FBP11 と共局在した。このことから、N-WASP と FBP11 が細胞内においても機能的に相互作用し、なんらかの役割を果たしている可能性が示唆された。

N-WASP を過剰発現している細胞は EGF 刺激依存的に糸状仮足（マイクロスパイク）を形成することが知られている。FBP11 が N-WASP の局在を制御し、細胞質中の N-WASP 量を調節しているならば、FBP11 の発現によりマイクロスパイク形成を抑制すると考えられる。そこで、COS7 細胞に FBP11 と N-WASP を共発現させて EGF 刺激した時のマイクロスパイク形成を観察した。N-WASP を発現している細胞の 80%では刺激依存的なマイクロスパイク形成が観察されたのに対し、野生型の FBP11 を共発現している細胞ではマイクロスパイク形成が 24%まで抑制されていた。また、核内における N-WASP の量も増加し

ていた。逆に、N-WASP と結合できない FBP11 の変異体 (WWmt) を共発現させた場合はそのような抑制作用は認められなかった。

本研究において私は、FBP11 が N-WASP 結合タンパク質であり、核内において共局在することを明らかにした。また、FBP11 を発現させることで N-WASP 依存的なマイクロスパイク形成が有意に抑制されることを示した。これらの結果は、FBP11 が核内において N-WASP のアダプターとして機能し、細胞質中の N-WASP 量を制御していることが示唆された。