

## 論文の要約

報告番号	甲 乙	医 第 1174 号	氏名	Ahmed Alamir Mahmoud Abdallah
学位論文題目	Junctional Rab13-binding protein (JRAB) regulates cell spreading via filamins			
<p>代表的な膜輸送の制御系として知られる Rab ファミリー低分子量 G 蛋白質のメンバーである Rab13 とその活性型に特異的に結合する標的蛋白質 JRAB (junctional Rab13-binding protein) は、接着分子群の tight junction 領域への輸送を制御することで上皮細胞間接着形成に関与している。さらに、最近では、JRAB はアクチン細胞骨格の再編成の制御にも密接に関わっていることが明らかになっている。これまで、JRAB は分子内結合により closed form をとっているが、活性型の Rab13 との結合によってその分子内結合が解除され、open form への構造変化を引き起こすことがわかっている。上皮細胞集団内での位置によって JRAB はその構造を変化させ、そこで異なる機能を発揮することでアクチン細胞骨格の再編成の時空間制御を可能にしていると考えられる。本研究では、JRAB によるアクチン細胞骨格の再編成の制御機構の詳細を明らかにするため、アクチン細胞骨格のダイナミックな変化を容易に捉えることができるマウス線維芽細胞 NIH3T3 細胞を用いて解析を行った。</p> <p>構造的に常に closed または open な JRAB の変異体を作製してそれぞれを NIH3T3 細胞に発現させたところ、各細胞は異なる形態を示した。Closed form の JRAB 変異体 (JRAB<math>\Delta</math>CT) を発現させた細胞では、コントロールの細胞と同様にストレスファイバーの形成が認められたが、open form の JRAB 変異体 (JRAB<math>\Delta</math>CC) を発現させた細胞では、cell spreading が引き起こされ、ストレスファイバーの形成は全く認められなかった。このような、JRAB の構造変化に依存したアクチン細胞骨格の再編成を引き起こす関連分子を同定するために、レトロウイルス発現系を用いて JRAB の野生型、JRAB<math>\Delta</math>CT および JRAB<math>\Delta</math>CC をそれぞれ恒常的に発現させた NIH3T3 細胞株を樹立した。それぞれのセルライゼットを用いて免疫沈降法を行い、まず、actinin-1/4 の抗体を用いてウエスタンブロットを行った。これまでに当研究室では、JRAB 結合蛋白質として actinin-1/4 を見出していたが、本研究で、JRAB<math>\Delta</math>CC に actinin-1/4 が優位に免疫沈降することが確認できた。そこで、actinin-1/4 との結合部位を欠損した JRAB<math>\Delta</math>CC を作製し、NIH3T3 細胞に発現させて細胞の形態を観察したところ、cell spreading が認められた。したがって、JRAB<math>\Delta</math>CC を発現させた NIH3T3 細胞で認められるアクチン細胞骨格の再編成は actinin-1/4 非依存的なものであると考えられた。</p> <p>次に、同じ免疫沈降の試料を用いて質量分析法により新たな結合分子の探索を試みた結果、JRAB<math>\Delta</math>CC に優位に結合する分子として filamin を同定することに成功した。Filamin は cell spreading の制御に関わるという報告があることから、JRAB<math>\Delta</math>CC を発現した細胞で認められる cell spreading は filamin を介したものである可能性が十分に予想された。そこで、JRAB の filamin 結合ドメインを決定し、その部位を欠損した JRAB<math>\Delta</math>CC を作製して cell spreading への影響を検討した。Filamin と結合できない JRAB<math>\Delta</math>CC を発現させた細胞では、</p>				

ストレスファイバーが形成され、cell spreadingは抑制されていた。また、filaminはASB2 (ankyrin repeat and SOCS box protein2) によって細胞内で蛋白質分解されることが知られているが、このASB2をJRABΔCCと共に発現させた場合、JRABΔCCによって引き起こされるcell spreadingが有意に抑制された。

以上の結果から、JRABはopen formになると、新規JRAB結合蛋白質であるfilaminを介してアクチン細胞骨格の再編成を制御し、cell spreadingを引き起こすと考えられた。