

論文内容の要旨

申請者氏名 中村 奈央

論文題目 Myotonic dystrophy kinase-related Cdc42-binding kinase, MRCK, is involved in the formation of filopodia through phosphorylation of ERM proteins.
(MRCKによるERMタンパク質リン酸化を介したフィロポディア形成機構)

The Rho family GTPases including Cdc42, Rac, and Rho regulate cytoskeletal reorganization associated with cell morphology and polarity. Cdc42 is involved in the filopodia formation, however, it remains to be clarified how Cdc42 regulates filopodia formation. To address this issue, I attempted to identify putative effectors for Cdc42. I purified one of Cdc42-associated proteins with a molecular mass of about 180 kDa (p180) from bovine brain cytosol and identified p180 as Myotonic dystrophy kinase-related Cdc42-binding kinase β (MRCK β). MRCKs (MRCK α and β) have been identified as an effector of Cdc42, and shows a sequence similarity with Rho-kinase, which is an effector of Rho, within the kinase domain. Here, I found that MRCK β phosphorylated the substrates of Rho-kinase, such as moesin, myosin light chain (MLC), myosin-binding subunit (MBS), and adducin at the same sites phosphorylated by Rho-kinase, in cell-free system. Among these substrates, moesin is thought to be involved in the formation of filopodia. It has been shown that the phosphorylation of moesin at Thr-558 modulates its functions. Moesin is member of ERM (ezrin, radixin, and moesin) proteins and functions as a membrane-cytoskeletal linker. In NIH 3T3 cells, expression of constitutively active form of Cdc42 (Cdc42V12) induced not only filopodia formation but also accumulation of Thr-558 phosphorylated moesin at the tip of filopodia. Coexpression of the dominant negative form of MRCK α inhibited the filopodia formation and accumulation of Thr-558 phosphorylated moesin at filopodia. Furthermore, the expression of moesin mutant with Asp substituted for Thr-558 increased the number of filopodia induced by Cdc42V12. These results suggest that phosphorylation of moesin is involved in the formation of filopodia, and MRCKs are candidate for the kinase that phosphorylates moesin at filopodia.

論文審査結果の要旨

申請者氏名 中村 奈央

低分子量GTP結合蛋白質Cdc42はアクチン系細胞骨格を介してフィロポディアの形成に深く関与していることが知られているが、その分子メカニズムは明らかではない。Cdc42のエフェクターを探索し、その機能を解析することはフィロポディアの形成機構を明らかにする上で重要である。一方、本論文でCdc42のエフェクター蛋白質であるセリンスレオニンキナーゼ、MRCKの基質として注目されたmoesinは細胞膜と細胞骨格をつなぐクロスリンカーとして知られており、そのリン酸化が活性化に重要であると考えられている分子である。本論文ではこのような背景を踏まえて、Cdc42のエフェクターの解析を行い、以下に示す成果を得ている。

(1) アフィニティーカラムを用いてCdc42の新規エフェクターを探索し、Myotonic dystrophy kinase-related Cdc42-binding kinase β (MRCK β) を同定した。

(2) MRCK β はRhoのエフェクターであるRho-キナーゼとキナーゼドメインにおいて高い相同性を有することから、基質を共有する可能性が推測された。本論文ではRho-キナーゼの既知の基質であるmoesin、myosin light chain、myosin phosphataseのmyosin binding subunit、及びadducinを用いてリン酸化アッセイを行い、MRCK β の基質特異性を明らかにした。また、抗リン酸化抗体を用いたイムノプロットを行い、MRCK β がmoesinの558番目のThrをリン酸化することを明らかにした。558番目のThrのリン酸化はmoesinの活性化に重要な役割を果たすことが報告されている。

(3) MRCK α のドミナントネガティブ型を細胞に発現させることにより、Cdc42によるフィロポディア形成、及びリン酸化型moesinのフィロポディアへの集積を阻害することを明らかにした。

(4) moesinのリン酸化サイトである558番目のThrをAspに変換したmutantを細胞に発現させることにより、Cdc42によるフィロポディア形成が促進されることを示した。このmoesin D型はconstitutively active型であると考えられることから、moesinのリン酸化がフィロポディア形成機構に重要な役割を果たすことが示唆された。

以上のように、本論文の結果はCdc42がMRCKを介してERMファミリー蛋白質を活性化、もしくは活性化状態で安定化させることによりフィロポディア形成機構を制御していることを示唆している。本論文はフィロポディア形成機構の一旦を明らかにしたもので、学術上、応用上貢献するところが少なくない。よって審査委員一同は、本論文が博士（バイオサイエンス）の学位論文として価値あるものと認めた。