京都工芸繊維大学

氏　　名	ながい　りか **永井　里佳**
学位(専攻分野)	博　士（学術）
学位記番号	博甲第　５４７　号
学位授与の日付	平成 22 年 3 月 25 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
研究科・専攻	工芸科学研究科　生命物質科学専攻
学位論文題目	Studies on Syntrophins and Girdin-like protein in Drosophila (ショウジョウバエにおけるシントロフィンとガーディン様タンパク質の研究)
審査委員	(主査)教授　山口政光 教授　遠藤泰久 教授　森　肇 准教授　宮田清司

論文内容の要旨

申請論文は第１章「General Introduction」、第２章「Syntrophin-2 has a role during eye development in *Drosophila*」、第３章「Genetic interaction between *Drosophila* Syntrophin-1 and Syntrophin-2, counterparts of mammalian α1/β1/β2- and γ1/γ2-syntrophins」第４章「A novel *Drosophila* Girdin-like protein is involved in Akt pathway control of cell size」から構成されている。

第１章では本論文の背景と目的が述べられている。シントロフィンは、ジストロフィン関連糖タンパク質複合体(DGC)の構成因子の一つである。DGC は、細胞外基底膜とアクチン細胞骨格を連結する構造的な役割を果たすとともに、様々な細胞外シグナルの受け手としても機能している。シントロフィンは、多様なタンパク質を DGC にリクルートするアダプタータンパク質としての機能が示唆されている。哺乳動物では、α1, β1, β2, γ1, γ2 の５種のシントロフィンが存在し、ショウジョウバエでは、α1, β1, β2-シントロフィンがシントロフィン-１（Syn１）に、γ1、γ2-シントロフィンがシントロフィン-２（Syn２）にそれぞれ対応している。α1, β1, β2-シントロフィンについては、これまでに多くの研究がなされているが、γ1, γ2-シントロフィンに関しての研究はほとんど進んでいない。そこで申請者は、γ1、γ2-シントロフィンのショウジョウバエホモログである Syn2 に焦点を置き、解析を進めた。申請者はまた他のアクチン結合性タンパク質であるヒトのガーディンタンパク質のショウジョウバエホモログ（dGirdin）にも注目した。これは、ヒトのガーディンに特徴的な N 末端のドメイン、コイルドコイルドメイン、Akt リン酸化様配列、PIPs 結合様配列を有している。ガーディンは、近年、Akt の新規の基質としてヒトの培養細胞系で同定され、Akt の制御下でのアクチン細部骨格の形成や細胞運動において、重要な役割を果たすことが示唆されている。

第２章では、まずショウジョウバエ発生過程での Syn2 の発現パターンについて述べている。ウェスタンブロット解析の結果、Syn2 の発現はすべての発生段階で見られ、特に神経系で強く発現していることが明らかとなった。生体内での機能を調べるために、Syn2 を複眼原基特異的にノックダウンすると、成虫複眼の形態異常（rough-eye 表現型）が観察された。複眼内部構造を観察した結果、網膜細胞の不完全な伸長やラブドメアの形態異常が見られた。ラブドメアは蛹期に形

成されるアクチンリッチな構造であるため、申請者は次に蛹期の複眼原基のアクチンの局在を調べた。アクチンの局在異常が観察されたことから、Syn２のノックダウンが蛹期のアクチンの局在制御に影響を与え、その結果、ラブドメアの形態異常が誘導されることが示唆された。これらのことから、Syn２が複眼の形成に必要であることが明らかとなった。

第３章では、申請者が新たに樹立したSyn２突然変異体の表現型解析結果について述べている。Syn2 変異体では、ホモ接合体でも生存可能であり、顕著な形態異常は見られなかった。そこで、申請者はファミリータンパク質である、Syn１による機能相補の可能性を検討した。Syn２変異体において、Syn１をノックダウンした二重変異体では、それぞれ単独の変異体に比べ、相加的な寿命の低下、相乗的な生存率や運動能力の低下が観察された。また、Syn２変異体におけるSyn１のノックダウンは、N-エチルマレイミド感受性因子２（NSF2）の変異体で見られる神経筋接合部でのシナプスの過成長を、相乗的に増強した。これらのことは、Syn１とSyn２が互いに機能相補しうる関係にあることを示唆している。また、免疫染色の結果、主に神経系で Syn２の局在が観察された。これは、哺乳類におけるホモログの局在様式に類似している。以上の結果から、Syn２は神経系において機能し、Syn１とSyn２は、運動やシナプス形態の制御において、部分的に重複した機能を持つ事が示唆された。NSF2 がアクチン制御の上流で機能することが示唆されていることから、Syn はアクチン制御を介して、シナプスの成長を抑制していると考えられる。

第４章では、dGirdin の生体内機能解析の結果について述べている。翅原基特異的に dGirdin をノックダウンすると、細胞サイズの減少が観察された。この細胞サイズの減少は、AKt の遺伝子量を半減させることで増強された。また、dGirdin のノックダウンは、翅原基におけるアクチンの蓄積にも影響することが観察された。Akt シグナル経路は、細胞の増殖や成長を制御する重要な経路としてよく知られている。Akt シグナル経路は、タンパク質合成の制御によって、細胞サイズの調節に関与していると考えられているが、アクチンの制御による細胞サイズの調節に関しては、まだ報告がされていない。ガーディンは、近年、Akt の新規の基質としてヒトの培養細胞系で同定され、Akt の制御下でのアクチン細部骨格の形成や細胞運動において、重要な役割を果たすことが示唆されている。申請者は本研究の結果から、dGirdin が Akt シグナル経路の影響下でアクチン細胞骨格を修飾することで、細胞サイズの調節に関与していることを示唆した。

論文審査の結果の要旨

シントロフィン（Syn）は、ジストロフィン関連糖タンパク質複合体の構成因子の一つであり、細胞外基底膜とアクチン細胞骨格を連結する構造的な役割を果たすとともに、様々な細胞外シグナルの受け手としても機能している。申請者は、哺乳動物γ1、γ2-シントロフィンのショウジョウバエホモログである Syn2 に焦点を置き、解析を進めた。Syn2 はすべての発生段階で検出されるが、特に神経系で強く発現していることが明らかとなった。Syn2 を複眼原基特異的にノックダウンすると、成虫複眼の形態異常（rough-eye 表現型）が観察され、網膜細胞の不完全な伸長やラブドメアの形態異常が見られた。ラブドメアは蛹期に形成されるアクチンリッチな構造であるため、次に蛹期の複眼原基のアクチンの局在を調べた。アクチンの局在異常が観察されたことから、Syn２のノックダウンが蛹期のアクチンの局在異常をもたらし、その結果、ラブドメアの形態異常が誘導されることが示唆された。これらのことから、申請者は Syn２が複眼の形成に必須である

と結論した。

申請者は、ノックダウン系統に加え、Syn２突然変異体を複数系統作製した。Syn2 変異体では、ホモ接合体でも生存可能であり、顕著な形態異常は見られなかった。そこで申請者は、ファミリータンパク質である Syn１による機能相補の可能性を考え、Syn１/Syn２二重変異体を用いて解析を進めた。それぞれ単独の変異体に比べ、相加的な寿命の低下、相乗的な生存率や運動能力の低下が観察された。また、Syn２変異体における Syn１のノックダウンは、N-エチルマレイミド感受性因子２（NSF2）の変異体で見られる神経筋接合部でのシナプスの過成長を、相乗的に増強した。これらのことは、Syn１と Syn２が互いに機能相補しうる関係にあることを示唆している。また、免疫染色の結果、主に神経系で Syn２の局在が観察された。以上の結果から、Syn２は神経系において機能し、Syn１と Syn２は、運動やシナプス形態の制御において、部分的に重複した機能を持つ事が示唆された。NSF2 がアクチン制御の上流で機能することが示唆されていることから、そのメカニズムは未解明ではあるが、Syn はアクチン制御を介して、シナプスの成長を抑制していると考えられる。

また、申請者はショウジョウバエガーディン（dGirdin）の生体内機能についても解析した。翅原基特異的に dGirdin をノックダウンすると、細胞サイズの減少が観察された。この細胞サイズの減少は、AKt の遺伝子量を半減させることで増強された。また、dGirdin のノックダウンは、翅原基におけるアクチンの蓄積にも影響することが観察された。Akt シグナル経路は、細胞の増殖や成長を制御する重要な経路としてよく知られている。Akt シグナル経路は、タンパク質合成の制御によって、細胞サイズの調節に関与していると考えられているが、アクチンの制御による細胞サイズの調節に関しては、まだ報告がされていない。申請者はこれらの結果から、dGirdin が Akt シグナル経路の影響下でアクチン細胞骨格を修飾することで、細胞サイズの調節に関与していることを明らかにした。

これらの研究は、シントロフィンやガーディンの生体内機能についての理解を深めるものであり、その学問的意義は高く評価できる。学位論文は英文で丁寧に作成されており、論旨も明解であった。本論文の内容は、査読制のある国際的学会誌にすでに発表済みである下記の２編の論文を基礎としている。

1. **Nagai, R.**, Hashimoto, R., Tanaka, Y., Taguchi, O., Sato, M., Matsukage, A. and Yamaguchi, M.: Syntrophin-2 is required for eye development in *Drosophila*. ***Exp. Cell Res.*** 316, 272-285, 2010.
2. Puseenam A., Yoshioka Y., **Nagai, R.**, Hashimoto R., Suyari, O., Itoh, M., Enomoto, A., Takahashi, M. and Yamaguchi, M.: A novel *Drosophila* Girdin-like protein is involved in Akt pathway control of cell size. ***Exp. Cell Res.*** 315, 3370-3380, 2009.