

論文の内容の要旨

論文題目 小胞輸送に介在する低分子量 G 蛋白質 Rab5 の新しい役割：
細胞周期に依存して核内移行する新規の Rab5 結合蛋白質

氏 名 村井 淳

ホスファチジルイノシトール (PI) 3-キナーゼは、受容体刺激によって活性化され、PI、PI(4)P、PI(4,5)P₂のイノシトール環の3位水酸基をリン酸化する脂質キナーゼである。このキナーゼが生成するリン脂質は、PDK1やPKBなどのキナーゼを活性化するセカンドメッセンジャーとして機能するだけでなく、最近では、メンブラントラフィックの制御因子としても重要な役割を果たしていることが示されつつある。また、このような様々な生理応答を厳密に制御するためにPI 3-キナーゼ自身も多様なファミリーを形成している。

当研究室では受容体刺激を介して活性化される 110 kDa の触媒サブユニットと 85 kDa の調節サブユニットからなるヘテロダイマー型PI 3-キナーゼの制御機構を解析する過程で、110 α を触媒サブユニットにもつタイプがチロシンキナーゼ型受容体を介したシグナルによってのみ活性化されるのに対して、110 β を触媒サブユニットにもつタイプはチロシンキナーゼ型受容体と三量体型G蛋白質と共役する受容体により協調的に活性化されることを見出している。そこで私はこのユニークな特性をもつ110 β タイプPI 3-キナーゼの細胞内での機能を明らかにするために、110 β を bait に yeast two-hybrid system による相互作用蛋白質のスクリーニングを行った。その結果、110 β に特異的な相互作用分子として、細胞膜から初期エンドソームへのエンドサイトーシス過程を制御する低分子量G蛋白質のRab5を同定した。さらに、Rab5との相互作用分子として新規のRab5結合蛋白質

質を単離同定し、この蛋白質がRab5との相互作用により細胞周期のM期において特異的に核内に移行することを明らかにした。

1. 新規の Rab5 結合蛋白質の同定とその性状解析

GTPase活性を消失させ構成的活性化型にしたRab5変異体、Rab5 (Q79L)に対して yeast two-hybrid systemによるスクリーニングを行い、新規の結合蛋白質を取得しその遺伝子の全長を決定した。この遺伝子産物 (Rab5bp) は 895 アミノ酸からなり、その N 末端側に SH2 ドメインを、C 末端側には Rab5 に対するグアニンヌクレオチド交換因子である Rabex-5、およびその yeast ホモログである Vps9p と相同性の高い Vps9 ドメインを、さらに C 末端には Rab5 と同じく低分子量 G 蛋白質である Ras との結合に参与する RA ドメインという多様な機能ドメインを有していた (Fig. 1)。次に、この分子と様々な低分子量 G 蛋白質との相互作用を yeast two-hybrid system により検討したところ、Rab5bp は Rab5 (WT)、および Rab5 (Q79L) とのみ相互作用し、構成的不活性型である Rab5 (S34N)、Rab4、Rab7、Rab9、Rab11 および Ras との相互作用は認められなかった。また、この Rab5bp と Rab5 のリコンビナントを用いた *in vitro* での結合実験において、Rab5bp は GTP 結合型 Rab5 と、より強い結合を示した。さらに、Rab5bp は Rab5 の GTPase cycle に影響を及ぼさなかったことから、この分子は Rab5 の新規エフェクターであることが推測された。

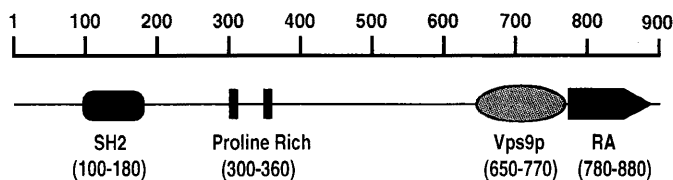


Fig. 1 Rab5bp の全長配列に含まれるドメイン構造

2. Rab5bp と Rab5 の細胞内局在

Rab5は細胞膜から初期エンドソームまでのエンドサイトーシス経路において、細胞膜からのクラスリン被膜小胞の出芽、クラスリン被膜小胞と初期エンドソームおよび初期エンドソームどうしの融合、さらにはこれらの小胞の移動を制御することが知られている。そこで Rab5bp が細胞内において Rab5 のいかなる機能に参与するのかを明らかにするために、HeLa 細胞における Rab5 と Rab5bp の局在を蛍光抗体染色により共焦点顕微鏡を用いて観察した。その結果、多くの細胞において Rab5bp は細胞質中の小胞上に一様に局在するものの、Rab5 との局在の完全な一致は認められなかった。しかしながら、一部の細胞において Fig. 2 に示すように、Rab5bp は核周辺部への局在を示し、このとき Rab5 との局在の一致が部分的に認められた。さらに意外なことに、一部の細胞においては Rab5 が細胞質側に局在するにもかかわらず Rab5bp が核内に局在する様子が認められた。



Fig. 2 Rab5bp の細胞内分布
蛍光抗体染色法により細胞内の Rab5bp を染色、共焦点顕微鏡で観察。中央の細胞において Rab5bp が核内に移行している。

3. 細胞周期に依存した Rab5bp の細胞内局在の変化

Rab5 のエフェクター分子として既に Rabaptin-5(α , β)や EEA1 などが同定されているが、それらは初期エンドソーム同士の融合に関与し、細胞質と初期エンドソーム上に局在する。これまでに Rab5 と相互作用を示す分子が核内に局在するという知見はなく、Rab5bp が核内局在を示した今回の結果は、非常に興味深い現象である。また、Rab5bp の細胞内局在にはいくつかの典型的なパターンが認められることから、その細胞内局在と細胞周期の関連についてさらに解析を加えた。

ダブルチミジンプロック法により HeLa 細胞を S 期に同調した後に細胞周期を進行させ、Rab5bp の細胞内局在の継時変化を共焦点顕微鏡で観察した。Fig. 3 に示すように、M 期移行に伴う染色体凝集と時期を同じくして Rab5bp は核内に移行し、核膜消失とともに凝集した染色体以外の部分に一樣に小胞状の分布を示した。さらに、Rab5bp は分裂終了直前の核膜の再構成にもない再び核内に移行し、分裂が終了して G1 期に移行した細胞では、核内から消失して細胞質の小胞上に一樣な局在を示した。これらの結果は、これまでに単離されている Rab5 のエフェクターの作用とは異なり、Rab5bp が細胞周期の制御に関与する可能性を示唆するものである。

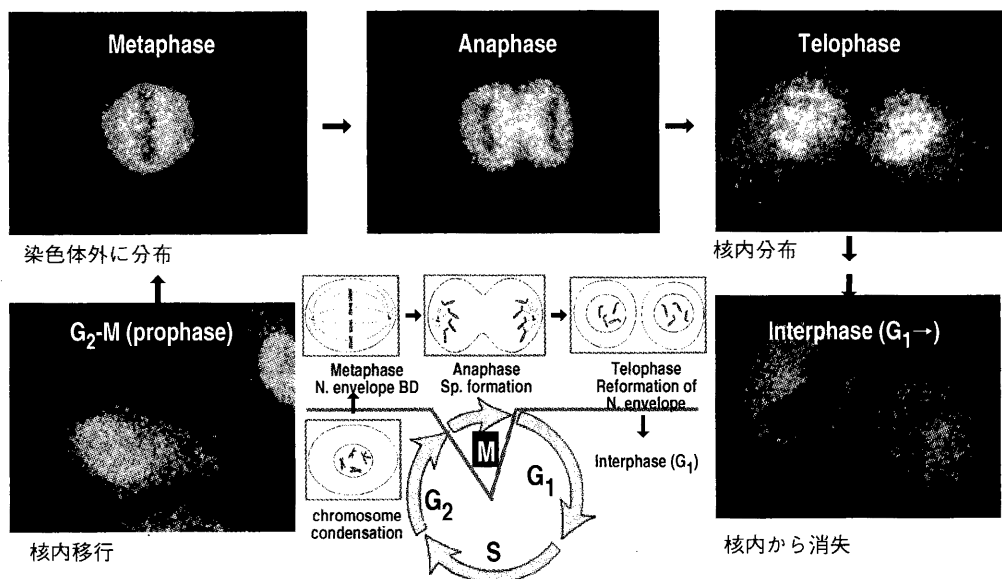


Fig. 3 細胞分裂期における Rab5bp の細胞内分布の変化
蛍光抗体染色法により分裂期の細胞を染色し、共焦点顕微鏡で観察。

4. Rab5 による Rab5bp の細胞内局在の制御

Rab5bp は細胞周期に依存して M 期に核内へ移行したが、この核移行と Rab5 との関連を検討するために、Rab5 の各変異体を過剰発現させた細胞を用いて Rab5bp の細胞内局在を観察した。野生型の Rab5 を発現させた細胞の約 40% では、M 期以外の段階においても Rab5bp の核内への移行が認められた。一方、GTPase cycle が停止した変異体である Rab5Q79L を発現させた細胞では、核膜周辺部への Rab5bp の局在化が起きるものの、核内への移行は認められなかった。これらの結果は、Rab5bp の核移行に Rab5 の GTPase cycle が必要である可能性を示唆している。

まとめ

本研究により、Rab5の相互作用分子として同定したRab5bpが細胞周期のM期に依存して核内に移行し、この核内移行にはRab5のGTPase cycleが必要であることが示唆された。これまでに報告されているRab5に関する知見は細胞膜から初期エンドソームへのエンドサイトーシス制御に限られており、本研究より示されたRab5の新しい役割、すなわち細胞周期に依存する核内移行への関与は極めて興味深いもの知見である。今後このRab5bpの核移行への詳細なメカニズム、およびM期におけるその機能を明らかにすることは、Rab5の新たな機能を解明するための重要な研究課題であると考えられる。

A Rab5 (WT)

B Rab5 (Q79L)

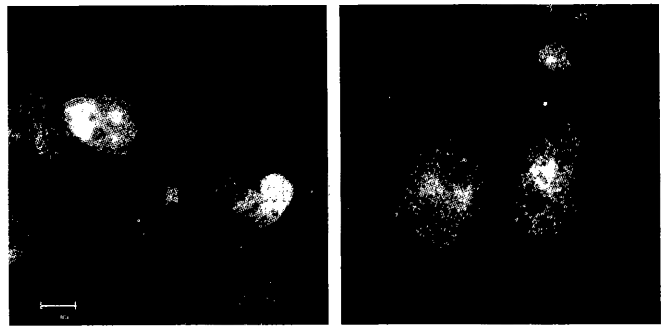


Fig. 4 野生型 (A) および変異型 (B) Rab5 を発現させた時の Rab5bp の細胞内分布

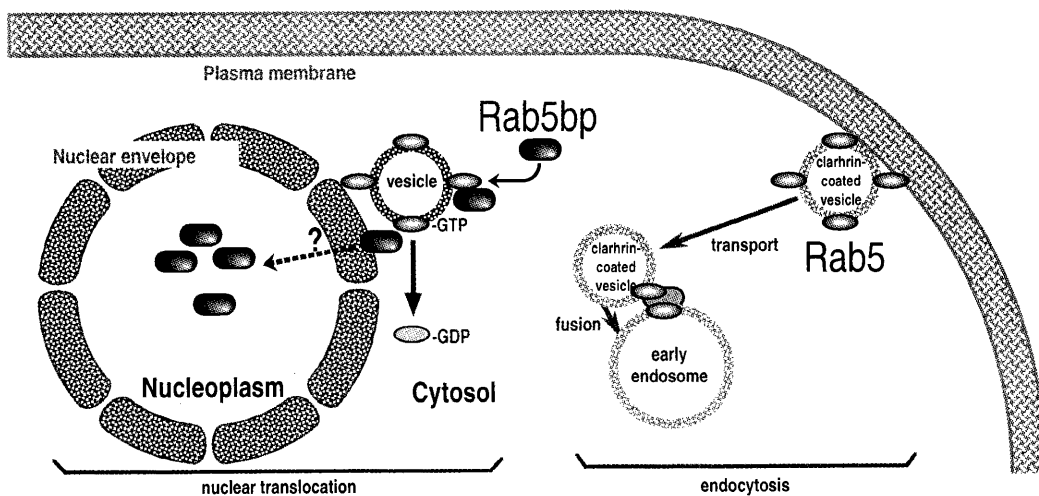


Fig. 5 Rab5 によるエンドサイトーシス制御と Rab5bp の核内移行