

審査の結果の要旨

氏名 村 井 淳

低分子量G蛋白質のRab5は、細胞の小胞輸送において機能しており、エンドサイトーシスに関わるクラスリン被覆小胞と初期エンドソームの融合、及びそれらの輸送に関与することが指摘されている。「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」と題する本論文では、イノシトールリン脂質の3位水酸基をリン酸化するキナーゼ (PI 3-キナーゼ) がRab5と直接結合することを見出すと共に、Rab5と結合する新規の蛋白質Rab5bp2を同定している。さらに共焦点顕微鏡を用いた蛍光抗体観察から、Rab5bp2は細胞分裂期において特徴的な核内移行を示し、細胞内輸送系におけるRab5bp2およびRab5の新たな役割について考察している。

1. PI 3-キナーゼp110 β との結合蛋白質としてのRab5の同定

ヘテロ2量体からなるPI 3-キナーゼのp110 α サブタイプは、低分子量G蛋白質のRasと相互作用することが知られていたが、別のサブタイプであるp110 β に特異的な結合蛋白質としてRab5を同定した。両者の結合は、GTP結合型のRab5に特異的であり、他の低分子量G蛋白質とp110 β の結合は認められなかった。さらにGTP結合型Rab5の結合はPI 3-キナーゼの活性化を促すことが示唆された。

2. 新規Rab5結合蛋白質の同定とその性状解析

酵母のtwo-hybrid systemによりRab5との結合蛋白質を探索した結果、新規分子であるRab5bp1, 2を見出し、Rab5bp2の全長配列を決定した。Rab5bp2にはSH2ドメイン、プロリンに富む領域など、情報伝達を担うドメインが多く見出された。さらにRab5bp2は、Rab5を活性化するヌクレオチド交換因子(GEF)に保存されたVps9ドメインをもつことから、Rab5に対するGEFと予想された。しかしながら、GEF活性は認められず、Rab5bp2がこのドメインを介してRab5と結合することが明らかにされた。

3. Rab5bp2とRab5の細胞内局在

HeLa細胞において、Rab5bp2の細胞内局在を共焦点レーザー顕微鏡を用いて蛍光抗体染色法により観察した結果、多くの細胞においてRab5bp2は小胞上に存在

し、Rab5の局在と核周辺部において部分的な重なりが見られた。一方、一部の細胞においては、Rab5bp2の核内への局在が認められた。Rab5bp2の核内移行は、分裂期に見られる染色体の凝集と共に認められたので、細胞周期に着目して同調培養法を試み、分裂期の細胞を選択して観察した。その結果、細胞分裂に前後してRab5bp2の核内局在が見られた。すなわち、Rab5bp2は細胞周期の制御に関与する可能性が示唆された。

4. Rab5によるRab5bp2の細胞内局在の制御

次に、Rab5bp2の核内移行とRab5との関連を探る目的で、Rab5およびその変異体を過剰発現させたHeLa細胞を用いて、Rab5bp2の細胞内局在を観察した。その結果、野生型Rab5を過剰発現させた細胞の約40%において、分裂期以外の段階においてもRab5bp2の核内移行が認められた。一方、GTPase活性を低下させて不活性型にならない変異体Rab5Q79Lを発現させた場合には、Rab5bp2は各周辺部に局在し、核内へ移行しないことも見出された。以上の結果は、野生型Rab5の機能がRab5bp2の核内移行に必要な可能性を示唆している。

以上を要約するに、本論文はPI 3-キナーゼと結合する分子として先ず低分子量G蛋白質のRab5を見出し、次にRab5の機能を探索する目的からRab5との結合分子を探索し、新規分子のRab5bp2を同定している。Rab5bp2は細胞周期に依存して核内移行するという、Rab5結合分子としては他に例がない興味深い特徴を示した。さらに、Rab5bp2の核内移行には、Rab5のGTPアーゼサイクルが重要な役割を果す可能性が示唆された。これらの研究結果は、小胞の細胞内輸送、特に核への物質輸送におけるRab5の新たな機能を解明する上で重要な知見を与えるものであり、博士（薬学）の学位として十分な価値があるものと認められる。