

1, 課程・論文博士の区別	課程博士
2, 申請者氏名	梶保 博昭 (かじほ ひろあき)
3, 学位の種類	博士 (薬学)
4, 学位記番号	博薬 第 1071 号
5, 学位授与年月日	平成16年 3月25日
6, 論文題目	小胞輸送の初期過程に介在する Rab5 結合蛋白質 RIN ファミリーの機能解析
7, リンク先 URL	http://
8, 提出ファイルの仕様等	
提出ファイル名	梶保博昭論文要旨.pdf
使用アプリケーション	Adobe Acrobat Mac OS 9.2.2

論文の内容の要旨

論文題目 小胞輸送の初期過程に介在する Rab5 結合蛋白質 RIN ファミリーの機能解析
氏名 梶保 博昭

【はじめに】

細胞内環境の恒常性を保つために、細胞はエンドサイトーシスとエキソサイトーシスという小胞輸送を介して外界との物質交換をおこなっている。このうちエンドサイトーシスは細胞外物質の取り込みだけでなく、受容体刺激に伴う細胞内へのシグナル伝達や受容体の脱感作など、様々な局面において重要な役割を果たしている。エンドサイトーシス経路に関わる様々な細胞内小器官は互いに膜小胞による輸送経路によって結ばれており、多種多様の低分子量 G 蛋白質 Rab ファミリーによってこれら輸送経路が時間・空間的に制御されている。エンドサイトーシス経路にはエンドサイトーシスの初期段階（細胞表層から初期エンドソームまでの輸送経路）は、形質膜におけるクラスリン被覆小胞の出芽、小胞の初期エンドソームへの輸送、そしてエンドソームとの融合という 3 つのステップに分けられるが、このいずれにも低分子量 G 蛋白質 Rab5 が必須の役割を果たしている。このうち初期エンドソームの融合過程は、Rab5 に対するいくつかの標的因子やグアニンヌクレオチド交換因子 (GEF) の同定によってその詳細が明らかにされつつあるが、出芽や輸送段階での分子基盤は未解明である (図 1)。そこで、私はまず Rab5 相互作用因子の探索を行い RIN2, RIN3 を新たに単離・同定した。RIN2, RIN3 は H-Ras と相互作用する RIN1 と全長にわたって高い相同性を有し、SH2 ドメイン、Pro に富む SH3 ドメイン結合領域、Rab5 の GEF に保存された Vps9 ドメイン、Ras に結合し得るドメインなど、様々なシグナル関連ドメインを有するユニークな蛋白質群である。本研究において私は、独自に同定した RIN ファミリーの機能解析を進め、初期エンドサイトーシスの輸送段階に介在する分子基盤についての考察を加えた。

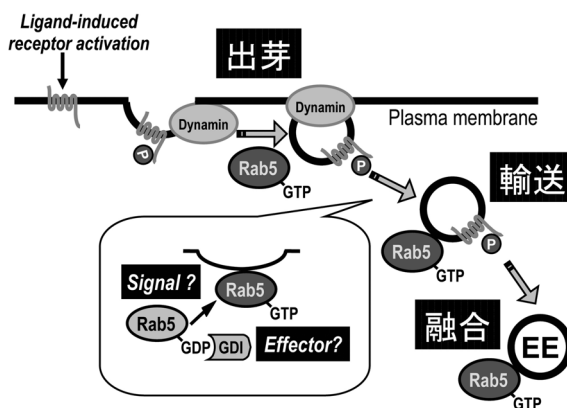


図 1 低分子量 G 蛋白質 Rab5 によるエンドサイトーシスの制御メカニズム

【結果】

1. RIN2, RIN3 の生化学的特性

まず、RIN2, RIN3 がもつ Vps9 ドメインに注目し、RIN2, RIN3 の Rab5 に対する GEF 活性の有無を検討した。バキュロウイルスシステムにより精製した RIN2, RIN3 を用い Rab5 に対する GDP 解離活性と GTP γ S 結合活性を検討したところ、RIN2, RIN3 の添加によりそれぞれの活性が有意に促進された (図 2)。すなわち、RIN2, RIN3 は Rab5 の GEF として機能することが明らかにされた。

次に Rab5 と RIN2, RIN3 の結合に対して GDP/GTP による影響があるかを検討した。方法としては、予め GDP 型、GTP 型に固定した Rab5 とリコンビナント体 Flag-RIN2, RIN3 との結合を比較した。通常 GEF は GDP 型の G 蛋白質のみに結合し GDP を解離させ GTP を結合させる役割を担うが、RIN2, RIN3 は GDP 型および GTP 型 Rab5 に結合し、さらに GTP 型 Rab5 により強い結合活性を示した。この結果は RIN2, RIN3 が GEF として GTP 型 Rab5 を生成し、さらに GTP 型 Rab5 を安定化させる因子としても機能し得ることを示唆している。

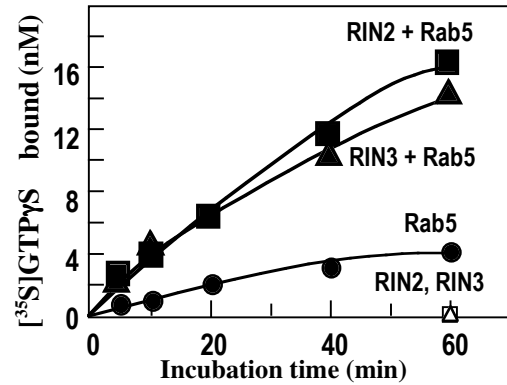
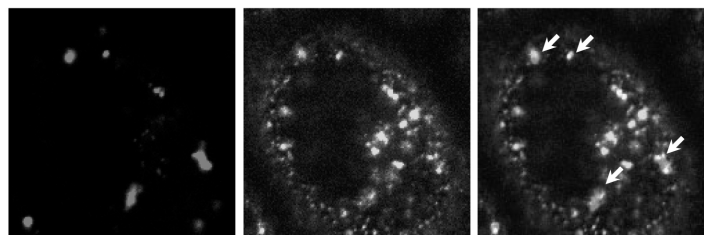


図 2 RIN2, RIN3 は Rab5 の GEF である

2. RIN ファミリーの細胞内局在

RIN ファミリーの細胞内における局在を検討するため、RFP (Red Fluorescence Protein)を融合した RIN1, RIN2, RIN3 を HeLa 細胞内に発現させ共焦点顕微鏡により観察したところ、RIN2, RIN3 は小胞状に局在したが RIN1 は細胞質中に広く分布した。また、Rab5 と結合しない RIN3 の C 末端欠損変異体は小胞状の局在を示さなかった。また、Rab5 の野生型、活性化型変異体、不活性化型変異体の全てが RIN3 陽性小胞と共局在し、その陽性小胞数が野生型、活性化型変異体の発現時に亢進された。この結果は *in vitro* での結合実験において RIN3 が GTP 型 Rab5 とより強い結合活性を示したことと相関性があり、RIN2, RIN3 の小胞状の局在には Rab5 との結合が必要である可能性が示された。次に、エンドサイトーシスに介在する様々な Rab メンバー (Rab4, 5, 7, 9, 11) と RIN3 を共発現すると Rab5 のみが RIN3 陽性小胞と共局在した。この小胞を同定するために、RFP-RIN3 を発現させた HeLa 細胞を抗 Rab5 抗体、および初期エンドソームのマーカー因子である抗 EEA1 抗体により免疫染色した結果、RIN3 陽性小胞は Rab5 の一部と共局在したが EEA1 とは全く共局在しなかった。したがって、RIN3 が初期エンドソームへの融合段階の前、すなわち輸送段階を制御する因子である可能性が示された。そこで RFP-RIN3 発現細胞における蛍光ラベルしたトランスフェリンの取り込みの経時変化を観察したところ、トランスフェリンの一部が RIN3 陽性小胞



RFP-RIN3 Alexa-488 トランスフェリン Merged
図 3 トランスフェリンの一部は RIN3 陽性小胞を
通って初期エンドソームへと運ばれる

を通過していく様子が観察された (図 3)。さらに小胞輸送を細胞内で再構成できる semi-intact の細胞系アッセイを構築し、ビオチン化したトランスフェリンの細胞内への取り込みに対する RIN2, RIN3 の効果を検討した結果、RIN2, RIN3 の添加により取り込みが有意に上昇した。以上の知見から、RIN2, RIN3 は初期エンドソームへの輸送段階を制御する因子であると考えられた。

3. RIN 結合因子アンフィファイシン II の同定

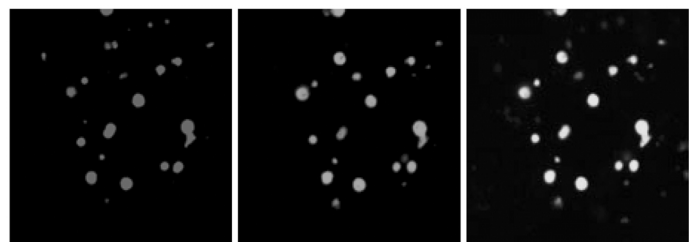
RIN ファミリーが Vps9 ドメイン以外にも様々なドメインを有することから、RIN3 との相互作用分子をさらに探索し、アンフィファイシン II を同定した。アンフィファイシン II は C 末端に SH3 ドメインを有し、ダイナミンやクラスリンなどエンドサイトーシス過程に関与する様々な因子と結合して足場蛋白質として機能する分子である。In vitro での結合実験において RIN2, RIN3 はアンフィファイシン II に結合したが、RIN1 は結合しなかった。さらに RIN2, RIN3 とアンフィファイシン II のそれぞれの結合領域を検討し、RIN2, RIN3 にのみ保存された Pro に富んだ領域とアンフィファイシン II の SH3 ドメインを同定した。

4. アンフィファイシン II の細胞内局在

次にアンフィファイシン II と RIN3 の細胞内における局在を検討した。GFP-アンフィファイシン II を単独で発現させると細胞質に一樣に分布したが、RIN3 との共発現により RIN3 の形成する小胞へとリクルートされる様子が観察された。また、RIN2, RIN3 との結合ドメインである SH3 ドメインを欠くアンフィファイシン II 変異体が RIN3 と共局在しなかったことから、アンフィファイシン II は RIN3 との結合を介して輸送過程に関与すると考えられた。

5. Rab5-RIN3-アンフィファイシン II 複合体の形成

最後に Rab5, RIN3, アンフィファイシン II が複合体を形成するかを検討した。まず in vitro における結合実験を行った。HA-アンフィファイシン II と Flag-RIN3 (or Flag-mock) を共発現した HeLa 細胞の可溶性画分を抗 HA 抗体により免疫沈降し、沈降画分を GST-Rab5 と混合後、抗 HA, Flag, GST 抗体を用いイムノブロットを行ったところ、Rab5 は RIN3 に依存してアンフィファイシン II と結合した。次に RFP-RIN3, GFP-アンフィファイシン II, YFP (Yellow Fluorescence Protein)-Rab5 を HeLa 細胞に共発現させて観察したところ、3 者が RIN3 陽性小胞に共局在した (図 4)。これらの結果より RIN3-アンフィファイシン II-Rab5 が複合体を形成することが明らかにされた。



RFP-RIN3 GFP-アンフィファイシン II YFP-Rab5
図 4 RIN3, アンフィファイシン II, Rab5 は共局在する

【まとめ】

本研究で私は、1) RIN2, RIN3 が Rab5 の GEF かつ GTP 型を安定化する因子として機能すること、2) RIN2, RIN3 が初期エンドサイトーシスの輸送過程を制御する因子であること、3) アンフィファイシン II と RIN2, RIN3 が結合して輸送小胞に局在すること、4) RIN3-アンフィファイシン II-Rab5 が複合体を形成することを明らかにした (図 5)。RIN2, RIN3 には Pro に富む配列や

Vps9 ドメインに加えて、SH2 ドメインや Ras 様蛋白質に結合しうるドメインが存在することから、受容体刺激によってチロシンリン酸化された蛋白や活性化された Ras 様蛋白質が RIN ファミリーに結合して活性を制御している可能性も考えられる。本研究による RIN ファミリー分子の同定とそれらの機能解析の結果は、小胞輸送の初期過程に関わる分子基盤の理解にとって重要な知見と考えられる。

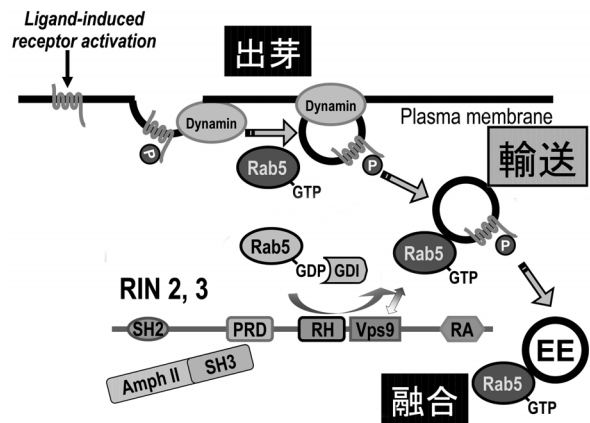


図5 Rab5 と RIN ファミリーによって制御される初期エンドソームへの輸送過程の分子モデル

【参考文献】

- (1) Saito K., Murai J., Kajiho H., Kontani K., Kurosu H., Katada T. *J. Biol. Chem.*, **277**, 3412-8 (2002).
- (2) Kajiho H., Saito K., Tsujita K., Kontani K., Araki Y., Kurosu H., Katada T. *J. Cell Sci.*, **116**, 4159-68 (2003).