

1. 課程博士
2. 梶保 博昭 (かじほ ひろあき)
3. 博士 (薬学)
4. 博薬 第 1071 号
5. 平成16年 3月25日
6. 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. (主査) 東京大学 教授 堅田 利明
教授 新井 洋由
教授 関水 和久
教授 一條 秀憲
講師 東 伸昭
8. 梶保博昭審査結果.pdf Adobe Acrobat MacOS9.2.2

審査の結果の要旨

氏名 梶保博昭

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系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に加えて、受容体刺激に伴う細胞内へのシグナル伝達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の初期段階は形質膜におけるクラスリン被覆小胞の出芽、初期エンドソームへの輸送、そして融合という3段階に分けられるが、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。このうち融合過程の分子機構は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。「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」と題する本論文においては、まず Rab5 結合因子として RIN2、RIN3 を新たに単離・同定している。さらに RIN ファミリーの機能について解析を進め、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考察を加えている。

1. RIN2、RIN3 の単離とそれらの生化学的性状解析

Rab5 結合蛋白質として単離・同定された RIN2、RIN3 は H-Ras と相互作用する RIN1 と高い相同性を有し、様々なシグナル関連ドメインを有するユニークなファミリーを形成することが示された。RIN2、RIN3 は Rab5 の示す GDP 解離活性と GTP γ S 結合活性を有意に促進し、Rab5 に対するグアニンヌクレオチド交換因子 (GEF) 活性を有した。RIN2、RIN3 は、他の多くのG蛋白質に対する通常の GEF とは異なり、GDP 型と GTP 型 Rab5 の両者に結合し、さらに GTP 型 Rab5 により高い親和性を示した。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。

2. RIN ファミリーの細胞内局在

RIN ファミリーの細胞内局在を検討するために RIN1、2、3 を HeLa 細胞に発現させた結果、RIN2、RIN3 は小胞状に局在したが RIN1 は細胞質中に分布した。エンドサイトーシスに介在する様々な Rab メンバーと RIN3 を共発現させると、Rab5 のみが RIN3 陽性小胞と共局在した。また、RIN2、RIN3 の小胞状の局在は Rab5 との結合を必要とした。さらに分子マーカーを用いた免疫染色法により RIN3 が融合段階ではなく輸送段階を制御する因子である可能性が示された。また、蛍光標識したトランスフェリン

の一部は、RIN3 陽性小胞を通過して初期エンドソームに取り込まれる現象が観察された。以上の知見から、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 結合因子としてのアンフィファイシン II の同定とその細胞内局在

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 はエンドサイトーシス過程において足場蛋白質として機能する分子である。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として、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。アンフィファイシン II と RIN3 の細胞内局在を検討し、アンフィファイシン II は単独発現時には細胞質に一様に分布するが、RIN3 との共発現によって RIN3 陽性小胞に局在化することが示された。また、SH3 ドメインを欠くアンフィファイシン II 変異体は RIN3 と共局在しなかった。以上から、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。

4. Rab5-RIN3-アンフィファイシン II 複合体の形成

In vitro における結合実験から、Rab5 は RIN3 に依存してアンフィファイシン II と結合することが示された。また、RIN3、アンフィファイシン II、Rab5 は HeLa 細胞において RIN3 陽性小胞上に共局在した。これらの結果より RIN3-アンフィファイシン II-Rab5 複合体が形成されることが示された。

以上を要するに、本研究は 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 は RIN2、RIN3 と結合して輸送小胞に局在化されること、さらに、4) RIN3、アンフィファイシン II、及び Rab5 が 3 者の複合体を形成することを明らかにしている。これら RIN ファミリー分子の同定と機能解析に関わる結果は、今後の小胞輸送の初期過程に関わる分子基盤を解明する上で重要な知見を提供しており、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。