

審査の結果の要旨

氏名 齋藤 康太

Ras ファミリーに属する低分子量G蛋白質 Rheb は、分裂酵母において増殖に関与する因子として単離されたが、最近になって mTOR (mammalian target of rapamycin) キナーゼを間接的に活性化して、細胞の成長を正に制御することが報告された。さらに、てんかんを主症状とする結節硬化症の原因遺伝子 TSC 複合体 (Tsc1/Tsc2) が、Rheb の GTP アーゼ促進因子 (GAP) として機能することが見出された。これらの知見は Rheb が既知の低分子量G蛋白質とは異なる情報伝達系において機能していることを示唆している。しかしながら、Rheb の直接の標的分子や活性化因子は未同定であり、さらに mTOR 経路が細胞外の栄養状態を感知するメカニズムやてんかんの発症機構についても未解明である。「結節硬化症に関与する低分子量G蛋白質 Rheb の機能解析」と題する本論文では、Rheb が後期エンドサイトーシス経路においてメンブランチラフィックに介在する可能性を新たに提示している。さらに、Rheb の結合因子として新たにグルタミン酸トランスポーターと水チャネルを同定し、これらの局在制御の観点から結節硬化症患者のてんかん発症のメカニズムを論じている。

1. Rheb は細胞内に巨大小胞を形成する

Rheb の細胞内局在を観察するために GFP タグを付与した Rheb を一過的に発現させた結果、巨大な小胞が形成され、その小胞膜上に Rheb の局在を観察した。この小胞は C 末端 4 残基の脂質修飾部位を欠く Rheb Δ C4 変異体では観察されず、変異体は細胞質全体にわたって存在した。さらに Rheb の不活性化型変異体である Rheb/D60K においては、巨大な小胞は形成されず、点状に凝集した局在が観察された。

2. Rheb 小胞はエンドサイトーシスにおいて形成される後期エンドソームに属する

Rheb 小胞が由来する細胞内小器官を同定するために、エンドサイトーシス経路で働くことが知られている各種 G 蛋白質 Rab を Rheb と共発現して局在を検討した。Rheb 小胞は、初期エンドソーム、リサイクリングエンドソームに局在する Rab5 及び Rab11 とは一致しないが、後期のエンドサイトーシス経路に属する Rab7、Rab9 とその一部が一致した。また、細胞表層から取り込まれたデキストランの一部が Rheb 小胞を経由して輸送され、さらに酸性小器官マーカーである LysoTracker が Rheb 小胞に取り込まれた。したがって、Rheb が形成する小胞は、エンドサイトーシス経路において出現する酸性オルガネラの後期エンドソームあるいはリソソームであると考えられた。

3. Rheb 小胞は後期エンドソームからリソソームへとその形状を変化させる

Rheb 小胞が後期エンドソームあるいはリソソームのどちらの形状に類似するかを検討した。予め細胞にデキストランを取り込ませてリソソームを標識した細胞を用意し、

その後 Rheb を発現させ経時変化を解析した。その結果、遺伝子導入後 8 時間において検出される Rheb の局在はリソソームと一致しなかったが、24-48 時間後に Rheb の局在がリソソームと一致した。以上の知見から、Rheb は始め後期エンドソームに発現し、エンドサイトーシスの進行に伴い次第にリソソームへ移行する可能性が考えられた。

4. Rheb 小胞の形成は PI3 キナーゼを必要とするが mTOR の活性化を要求しない

Rheb の GAP である Tsc 複合体は、Akt キナーゼによりリン酸化されて不活化する。そこで、Akt の上流キナーゼである PI 3-キナーゼの阻害剤 LY294002 を用いて Rheb の小胞形成能を検討した。LY294002 処理細胞では、Rheb 発現により巨大な小胞は形成されず、細胞質に小さな小胞が点在する様子が観察された。一方、Rheb の下流で活性化される mTOR の阻害剤である rapamycin 処理は、Rheb による巨大小胞の形成に影響を与えなかった。これらの知見は、Rheb の局在する小胞の形成に Rheb の活性化は必要であるが、Rheb の下流で活性化する mTOR キナーゼは不要であることを示している。

5. Rheb はグルタミン酸トランスポーター-EAAT 及び水チャネル Aquaporin4 と結合する

Rheb に結合する因子を yeast two-hybrid スクリーニングにより探索し、脳グリア細胞において特に発現の多い 2 種類のトランスポーター、グルタミン酸トランスポーター EAAT1/EAAT2 及び水チャネル Aqp4 を同定した。また、Rheb と両トランスポーターを共発現させた細胞において、Rheb と両トランスポーターの共沈降が確認された。

6. Rheb の共発現により EAAT 及び Aquaporin4 の局在は Rheb 小胞へ移行する

両トランスポーターの細胞内動態に対する Rheb の関与を検討する目的で、トランスポーターを発現させた安定発現株をそれぞれ作成した。安定発現株においては、どちらのトランスポーターも細胞膜上にそれらの局在が観察された。しかし Rheb を一過的に発現すると、トランスポーターは Rheb 小胞上にその局在が移行する現象が観察された。

本研究は、Rheb が後期エンドサイトーシス経路においてメンブランチラフィックに関与する可能性を新たに提示している。さらに Rheb の結合因子としてグルタミン酸トランスポーターと水チャネルを同定し、これらが Rheb との共発現によって細胞内小胞に移行することを明らかにしている。これらのトランスポーターはグリア細胞に発現し、グルタミン酸をシナプス間隙から取込み、神経細胞の保護に重要な役割を担っている。したがって、結節硬化症におけるてんかんの発症は、Rheb の不活性化機構 (Tsc1/Tsc2) が欠落してトランスポーターの内在化が進み、過剰なグルタミン酸による神経細胞死の亢進にその病因があると考えられる。これらの研究成果は Rheb の分子的機能の解析という面だけでなく、結節硬化症におけるてんかん症の病因モデルの提示という観点からも意義深く、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。