

論文審査の結果の要旨

氏名 坂上 史佳

本論文は「背景と目的」「実験材料と方法」「結果」「考察」「結論」の項よりなる。

「背景と目的」の項では、本論文で解析を行った RhoGAP タンパク質 RICS/PX-RICS の、これまでに明らかとなっている知見や、RICS とそのスプライシングバリエーション PX-RICS の分子的特徴と機能が述べられている。また、PX-RICS の機能解明を目指して PX-RICS 結合分子を探索し、細胞内輸送関連タンパク質である GABARAP を同定したこと、また PX-RICS が PX ドメイン（小胞体やゴルジに局在する PI4P と結合するドメイン）を持つこと、さらに、PX-RICS には小胞輸送関連タンパク質に多く見出されているグラニンモチーフが存在することから、細胞内輸送における役割に着目して PX-RICS の機能解析を行ったことについて言及し、本研究の目的を示している。

「結果」の項では、本研究から得られた結果が述べられている。PX-RICS と GABARAP の特異的な結合を免疫沈降実験により確認し、さらに両者が小胞体に強く局在することを示して PX-RICS と GABARAP の機能的関連を示唆している。また、PX-RICS が β -catenin と結合することから、 β -catenin・N-cadherin の細胞内輸送について解析したことが述べられている。PX-RICS ノックアウトマウス由来の MEF 細胞と野生型マウス由来の MEF 細胞で、 β -catenin および N-cadherin の細胞内局在を比較し、ノックアウトマウス由来の MEF 細胞においては細胞間接着領域の β -catenin・N-cadherin の量が減少し、小胞体に蓄積していることを示している。さらにこの β -catenin・N-cadherin の局在には PX-RICS の持つ、どのような機能が関与するのかを、各ドメインの変異型・欠損型ミュータントを用いてレスキュー実験を行っている。その結果、 β -catenin・N-cadherin の輸送には PX-RICS の「GABARAP との結合」「PI4P との結合」「GAP 活性」が必須であることを明らかにしている。さらに β -catenin・N-cadherin 輸送の分子メカニズムを明らかにするため、マスマスペクトロメトリーの手法を用いて PX-RICS の新規結合タンパク質を探索し、14-3-3 タンパク質を同定している。また、PX-RICS と 14-3-3 との特異的な結合を免疫沈降実験により確認し、さらに両者が HeLa 細胞で共局在していることを示している。14-3-3 をノックダウンすると β -catenin・N-cadherin が小胞体に蓄積することを確認し、 β -catenin・N-cadherin の輸送における 14-3-3 の必要性について言及している。さらに PX-RICS-14-3-3 複合体が dynein-dynactin 複合体と結合することを免疫沈降実験によって示し、両者が共局在することも明らかにしている。小胞体からゴルジへの小胞輸送に主要な役割を果たす dynein-dynactin 複合体との結合を示したことで、PX-RICS-14-3-3 複合体の細胞内輸送における重要性を強く示唆している。これまでに知られていなかった β -catenin・N-cadherin の小胞体-ゴルジ輸送の分子メカニズムを明らかにしたことに大きな意義がある。

また本研究では RICS/PX-RICS ノックアウトマウスの表現型の解析についても述べられている。RICS/PX-RICS は脳で強く発現していることや、シナプス後肥厚部に多く局在すること、NMDA 受

容体と結合することから脳高次機能に関与する可能性が示唆されているが、その生理機能については全くわかっていなかった。本研究では RICS/PX-RICS のノックアウトマウスの行動に着目し、複数の行動解析を行っている。明暗往来、オープンフィールド、高架式十字迷路の各試験では RICS/PX-RICS のノックアウトマウスが低不安を示すことを明らかにしている。さらに、うつモデル試験の強制水泳、尾懸垂試験において、RICS/PX-RICS のノックアウトマウスの無動時間（うつ傾向の指標）が顕著に減少していることを示し、RICS/PX-RICS の欠損が抗うつ効果をもつことを明らかにしている。これらの解析により、RICS/PX-RICS の生理機能を初めて明らかにしたことが大きな成果である。

なお、本論文は、西村 教子・林 寛敦・松浦 憲・秋山 徹・中村 勉との共同研究であるが、論文提出者が主体となって実験、解析及び検証を行ったもので、論文提出者の寄与が十分であると判断する。

したがって、博士（理学）の学位を授与できると認める。