

## 審査の結果の要旨

氏名 新谷 真未

低分子量G蛋白質は、上流からの刺激に応答して GDP が結合した不活性型から GTP が結合した活性型へと構造を変換し、下流にシグナルを伝える分子スイッチとして多様な生理応答の制御を担っている。新奇G蛋白質 Rab45 は、G蛋白質 Rab ドメインに加え、Ca<sup>2+</sup>結合 EF-hand ドメイン、及びコイルドコイルモチーフをもつというユニークな一次構造からなるが、その生理機能は全く未解明であった。「上皮細胞におけるリサイクリングエンドソーム局在性 G 蛋白質 Rab45 の機能解析」と題した本論文においては、Rab45 がリサイクリングエンドソームに局在し、Rab45 が有する各機能ドメインの協調的な働きによって、上皮細胞の極性形成に参与する VAC (Vacuolar Apical Compartment) と呼ばれる細胞内小器官の形成に参与することを見出している。

### 1. 極性化した MDCK 細胞において Rab45 はリサイクリングエンドソームに局在する

内在性 Rab45 の細胞内局在を調べるため、抗 Rab45 抗体を作製し免疫染色を行った。その結果、極性化した上皮細胞株 MDCK において、Rab45 は小さなドット状構造に局在し、アピカルリサイクリングエンドソームマーカーRab11 と共局在した。これより Rab45 がアピカルリサイクリングエンドソームに局在すると考えられた。

### 2. 脱極性化した MDCK 細胞において Rab45 は VAC に局在する

上皮細胞は、細胞間接着構造によってアピカル膜と基底側膜が厳密に区別され、極性化している。一方で、極性状態の MDCK 細胞を低 Ca<sup>2+</sup>条件下で培養すると、細胞間接着が解離して脱極性化することが知られている。脱極性化した MDCK 細胞における Rab45 の細胞内局在を検討したところ、Rab45 はアクチン陽性な凝集体に局在することが明らかとなった。MDCK 細胞に関する過去の文献から、この凝集体は VAC (Vacuolar Apical Compartment) と呼ばれる細胞内小器官と考えられた。VAC は、上皮細胞間の接着が離れて脱極性化した際に、一過的に観察されるユニークなオルガネラであり、内部は微絨毛に富み、アピカル膜蛋白質は局在するが、基底膜蛋白質は局在しない。そこで低 Ca<sup>2+</sup>条件下で培養した MDCK 細胞において Rab45 と各種マーカーの局在を比較したところ、Rab45 陽性な凝集体にはアピカル膜蛋白質 gp135 が局在したが、基底膜蛋白質  $\beta$ -カテニンは局在せず、Rab45 が局在する凝集体は VAC であると考えられた。

### 3. Rab45 の過剰発現によって VAC の形成が促進され VAC の消失が遅延する

VAC 形成における Rab45 の役割を検討するため、Rab45 の過剰発現が VAC 形成に与える影響を検討した。その結果、低  $\text{Ca}^{2+}$  条件下で培養した MDCK 細胞における VAC 形成が、Rab45 の過剰発現によって顕著に上昇した。一方、Rab45 と同様にアピカルリサイクリングエンドソームに局在する Rab11a の過剰発現は、VAC 形成率にほとんど影響を与えなかった。低  $\text{Ca}^{2+}$  条件下で MDCK 細胞に形成された VAC は、培地の  $\text{Ca}^{2+}$  濃度を通常条件に戻すことでエキソサイトーシスされて消失し、細胞は脱極性化状態から極性化状態に移行する。そこで MDCK 細胞の極性化に伴う VAC 消失過程における、Rab45 の関与を検討した。コントロール細胞では、通常  $\text{Ca}^{2+}$  濃度に戻して 3 時間後には VAC がほとんど消失していた。これに対し Rab45 を強制発現させた細胞では、約 70% の細胞で VAC が観察された。一方、他の Rab 蛋白質を過剰発現させた場合では、VAC の消失遅延はほとんど認められなかった。以上より、各種 Rab ファミリー G 蛋白質の中で、リサイクリングエンドソームに局在する Rab45 が特異的に VAC の形成・消失のダイナミクスに関与する可能性が考えられた。

### 4. Rab45 の各機能ドメインの協調的な働きが VAC 形成に重要である

Rab45 がどのような分子機構で VAC 形成に寄与するかを検討するため、Rab45 各種変異体を発現させ、VAC 形成率を測定した。その結果、Rab ドメインの活性化型変異体 Q600L (GTP 結合型) は野生型同様に VAC 形成率が上昇したが、不活性化型変異体 S555N (GDP 結合型) は形成率に影響せず、Rab ドメインの活性化が VAC 形成の促進に重要であることが明らかとなった。EF-hand ドメインを欠く変異体 ( $\Delta$ EF) では VAC 形成は亢進したが、興味深いことに、形成された VAC は Rab45 の野生型過剰発現時に観察されるものとは異なり、複数の小さな構造体となっていた。一方、EF-hand とコイルドコイルモチーフの両者を欠く変異体 ( $\Delta$ EF/CC) では VAC 形成は亢進しなかった。以上の結果から、Rab45 は Rab ドメインの活性化に加えて、EF-hand 及びコイルドコイルモチーフの各機能ドメインの協調的な働きを介して、VAC の形成を制御する可能性が示唆された。

ヒトでは 60 種類以上の Rab ファミリー G 蛋白質が知られているが、本論文から、ユニークな一次構造をもつ Rab45 は、VAC 形成制御を介して上皮細胞の極性形成に関与する初めての Rab 蛋白質であることが明らかになった。以上を要するに、本論文は、Rab ファミリー蛋白質が有する生理機能、及び上皮細胞の極性制御に関わる VAC の形成機構について、重要な知見を提示しており、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。