

論文の内容の要旨

論文題目

RIN3とアクチン関連因子CD2APおよびcortactinの相互作用解析

氏名 吉川 学

【序論】

細胞膜から初期エンドソームに向けてのエンドサイトーシスは、細胞外物質の恒常的な取り込みに加えて、過剰なシグナル伝達を回避する細胞膜受容体の脱感作、細胞遊走や神経突起伸長などの細胞極性形成にも重要な役割を果たしている。低分子量 G 蛋白質 **Rab5** はエンドサイトーシス初期過程の制御において中心的な役割を果たす

重要な因子であり、**Rab5** の活性化は **GEF** 活性中心である **Vps9** ドメインをもつ分子群によって担われている。当研究室において単離・同定された **RIN3** は、**Vps9** の他に **SH2**、**PRD** (proline-rich domain)、**RIN** ファミリーに保存された **RH**、**Ras** との結合能を有する **RA** といった様々なシグナル伝達に関与するドメインをもつユニークな蛋白質である(図 1)。しかしながら、**RIN3** の **Vps9** 以外のドメインの役割、および **RIN3** が機能する局面は不明である。私は **RIN3** の各ドメインとの相互作用因子から **RIN3** が機能する局面を明らかにする事が、細胞膜受容体など上流からの刺激に応じたエンドサイトーシスにおける分子基盤を明らかにする上で非常に有用であると考え、**RIN3** の相互作用因子の探索および生理的機能を解明することを本研究の目的とした。

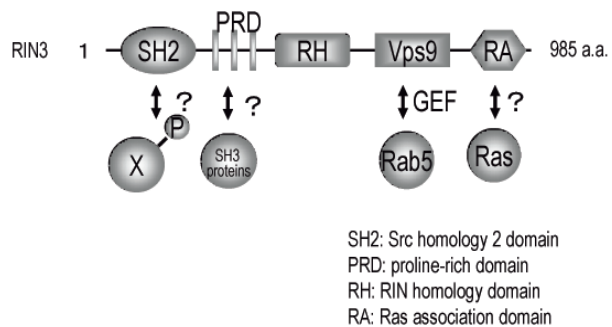


図 1 RIN3 のドメイン構造と予想される相互作用因子

【方法及び結果】

1. RIN3 は CD2AP と結合する

RIN3 の有する SH2 や PRD は一般的に蛋白質間相互作用を担うドメインであることから、これらのドメインを介して RIN3 と相互作用する因子の探索を RIN3 の機能解明の手掛かりとした。エンドサイトーシスに関与すること、およびチロシンリン酸化修飾を受け SH2 ドメインと結合しうること、または PRD と結合する SH3 ドメインを有することを指標として過去の知見から候補因子を抽出し、RIN3 と各因子を HEK293T 細胞に過剰発現させて、共沈降実験により結合能を検討した。その結果、アクチン細胞骨格を制御するアダプター蛋白質 CD2AP (CD2-associated protein) を RIN3 相互作用因子として同定した (図 2)。次に、酵母ツーハイブリッド法により RIN3 と CD2AP の相互作用を検討したところ、RIN3 と CD2AP との共発現により β -galactosidase 活性が亢進した。この結果から、RIN3 が CD2AP と直接結合することが示された。

次に RIN3 上での CD2AP 結合部位を同定するために RIN3 各種ドメイン欠失変異体と CD2AP の共沈降実験を行い、CD2AP が RIN3 の PRD を介して結合することが示唆された。さらに RIN3 と CD2AP の各ドメインのリコンビナント蛋白質を精製し、両者の結合実験を行ったところ、RIN3 の 2, 3 個目の PRD と CD2AP の 2, 3 個目の SH3 ドメインが結合することが示された。

2. RIN3 と CD2AP は培養細胞内で共局在する

次に、HEK293T 細胞内で RIN3 と CD2AP が共局在するかを検討した。過剰発現させた RIN3 と CD2AP を免疫染色したところ、細胞の辺縁にアクチンが集積した構造である膜ラッフル部 (図 3 矢印) および巨大化した小胞 (図 3 矢頭) において共局在する様子が観察された。

3. RIN3 は cortactin と pervanadate 依存的に結合する

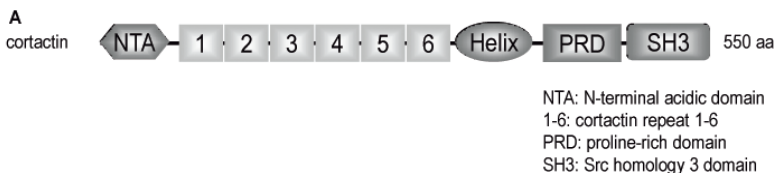


図 4 A (左) cortactin のドメイン構造

図 4 B (右) RIN3 は cortactin と pervanadate 依存的に結合する

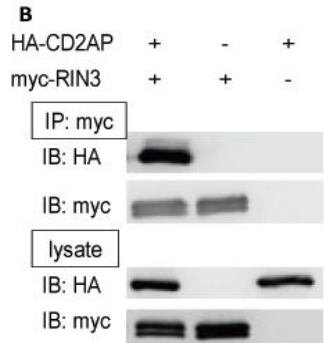
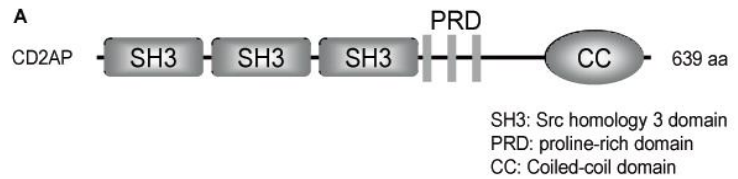


図 2 A (上) CD2AP のドメイン構造

図 2 B (下) CD2AP は RIN3 と結合する

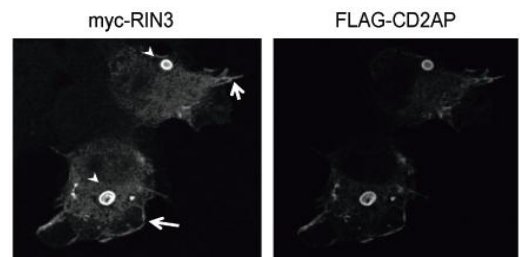
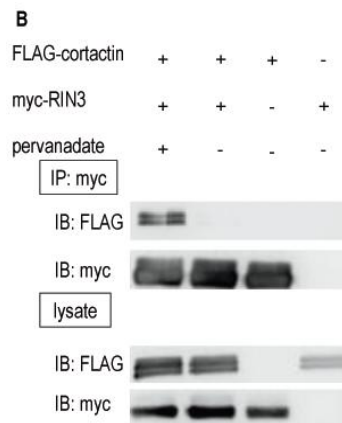


図 3 RIN3 と CD2AP は共局在する



私は修士課程においてチロシンホスファターゼ阻害剤 **pervanadate** 処理により **RIN3** の局在が変化することを見出した。**RIN3** がアクチン骨格の制御因子である **CD2AP** と結合したこと、膜ラッフル部へ局在したことを併せると、**RIN3** は何らかの上流のチロシンリン酸化シグナル依存的にアクチン細胞骨格と協調して働く可能性が考えられた。そこで **pervanadate** 処理により **RIN3** と結合するようなアクチン細胞骨格制御因子が存在するのではないかと考え、アクチン周辺因子と **RIN3** が結合するかを **HEK293T** 細胞を用いた共沈降実験によって検討した。その結果アクチン枝分かれの安定化及びアダプター機能を有する **cortactin** が **RIN3** と **pervanadate** 依存的に結合することを見出した (図 4)。さらに **Sf9** から精製した **RIN3** および大腸菌に発現させた **cortactin SH3** ドメインを用いた結合実験から、これらの結合は直接であることが明らかになった。

4. 培養細胞内における **RIN3** と **cortactin** の相互作用

細胞内における **RIN3** と **cortactin** の相互作用をより詳細に解析するため、**pervanadate** による **RIN3** と **cortactin** の結合量の経時的な変化を検討したところ、2~5分でピークとなり、その後減少した (図 5 A)。また、**HEK293T** 細胞における両者の局在を観察したところ、**RIN3** と **cortactin** が **pervanadate** 処理時に膜ラッフル部で共局在することから (図 5 B)、**RIN3** がチロシンリン酸化シグナル依存的にアクチン細胞骨格と協調して機能していることが示唆された。

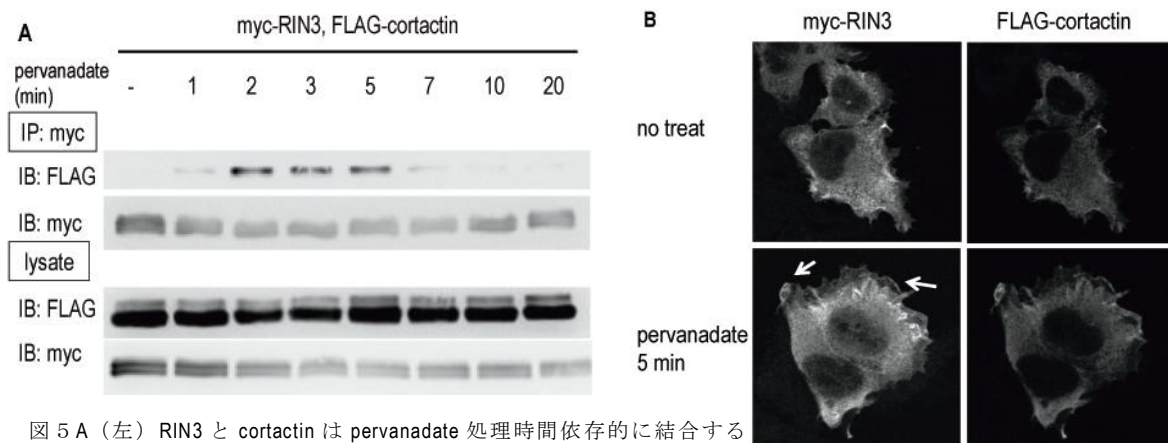


図 5 A (左) **RIN3** と **cortactin** は **pervanadate** 処理時間依存的に結合する

図 5 B (右) **RIN3** と **cortactin** は膜ラッフル部で共局在する

5. 運動性の細胞における **RIN3** の局在

生理的にアクチン細胞骨格のリモデリングが行われている条件下での **RIN3** の局在を観察するため、運動性の高い **HT1080** 細胞における **RIN3** の挙動をタイムラプスにより追跡した。その結果、**RIN3** は細胞の移動方向に存在する膜ラッフル部から内部へと取り込まれる小胞様構造に局在する様子が観察された。

【まとめと考察】

本研究において私は、RIN3 が、①アクチン細胞骨格を制御するアダプター蛋白質 CD2AP と結合すること、②アクチン制御蛋白質 cortactin と pervanadate 依存的に結合すること、さらに③HT1080 細胞において膜ラッフル部から取り込まれる小胞様構造に局在することを見出した。

これらのことから、RIN3 が成長因子受容体などのエンドサイトーシス

において CD2AP, cortactin などアクチン関連因子と協調して Rab5 を活性化することによりエンドサイトーシスを制御している (図 6) というモデルが考えられる。

本研究により RIN3 が Rab5 とアクチン細胞骨格系というエンドサイトーシスに重要な分子群を直接結ぶ可能性が見出されたことは興味深い。また、RIN3 と CD2AP, cortactin の結合は刺激依存性が異なっており、エンドサイトーシスの種類、もしくは段階の違いにより RIN3 が異なる調節を受けてエンドサイトーシスを制御している可能性も考えられる。今後は RIN3 と CD2AP, cortactin が協調して働く可能性がある、細胞の極性移動や接着におけるより詳細な解析が期待される。

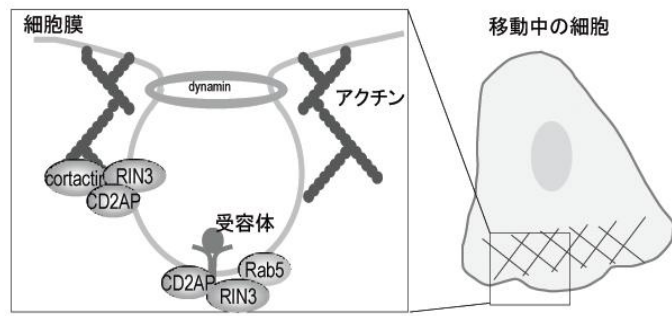


図 6 考えられるモデル