

審査の結果の要旨

氏名 吉川 学

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 の活性化はグアニンヌクレオチド交換因子 (GEF) の活性中心である Vps9 ドメインをもつ分子群によって担われている。近年単離・同定された RIN3 は、Vps9 ドメインに加えて、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。「RIN3 とアクチン関連因子 CD2AP および cortactin の相互作用解析」と題した本論文においては、RIN3 が、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、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、HT1080 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ている。

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、RIN3 の機能解明の手掛かりとして、これらのドメインを介して RIN3 と相互作用する因子を探索した。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に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 CD2-associated protein (CD2AP) を RIN3 相互作用因子として同定した。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 培養細胞内で 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および巨大化した小胞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

これまでに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が見出されている。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 が結合する可能性について、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。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された。

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。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、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。

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、運動能の高い HT1080 培養細胞における 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。

本論文から、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連結する足場蛋白質として機能する可能性が見出された。以上を要するに、本論文は、エンドサイトーシス初期過程の膜輸送機構について、新たに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。