

氏名	こがひろし 古賀裕士
学位(専攻分野)	博士(薬学)
学位記番号	薬博第616号
学位授与の日付	平成19年3月23日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
研究科・専攻	薬学研究科生命薬科学専攻
学位論文題目	Analysis of Interaction of Rab11-FIP/Arfophilin with Rab11 and ARFs and its Role in Membrane Traffic (Rab11 および ARF と相互作用する Rab11-FIP/Arfophilin のメンブレントラフィックにおける役割)
論文調査委員	(主査) 教授 中山和久 教授 伊藤信行 教授 竹島浩

### 論文内容の要旨

我々のからだを構成する細胞内にはさまざまなオルガネラが存在し、そこには固有のタンパク質が局在する。これらの細胞が正常に機能するためには、タンパク質が合成された場所から機能すべきオルガネラへと正確に輸送されなければならない。なかでもトランスゴルジネットワーク (TGN) と細胞膜の間の輸送は複雑であり、さまざまな膜輸送経路 (TGN から直接細胞膜へ輸送する経路, エンドソームを経て細胞膜あるいはリソソームへ輸送する経路, エンドソームから TGN への逆行輸送経路など) が存在する。このような輸送の調節機構の解明は、生命現象を理解する上で基礎的かつ重要な課題である。

細胞内の各オルガネラ間のタンパク質の輸送は、その表面を特異的なコートタンパク質により覆われた輸送小胞を介して行われる。すなわち、あるオルガネラから積み荷タンパク質を含んで出芽した輸送小胞が、標的オルガネラ膜と融合することにより積み荷が受け渡される。一連の小胞輸送の過程はさまざまな低分子量 GTPase による調節を受ける。低分子量 GTPase の ARF には6種類のアイツフォームが存在し、オルガネラ膜上のグアニンヌクレオチド交換因子 (GEF) の働きにより活性型となり、コートタンパク質をオルガネラ膜にリクルートすることにより輸送小胞形成を開始させる。一方、別の低分子量 GTPase の Rab ファミリーには60種類以上が存在し、個々の Rab は別個のオルガネラで機能する。特定のオルガネラ膜に結合した Rab は、膜上に存在する GEF の作用で活性化し、輸送小胞の特異的な繫留、ドッキング、融合などに働く様々な因子を集合させる。これらのうちで、Rab11 はリサイクリングエンドソームに局在し、このオルガネラを経由する様々な輸送過程を調節すると考えられる。

近年、Family of Rab11-Interacting Protein (FIP) が同定され、その C 末端に20アミノ酸からなる相同性の高い Rab11 結合ドメインが存在することが示された。さらに FIP ファミリーのうちの FIP3/Arfophilin-1 と FIP4/Arfophilin-2 は、その C 末端付近の領域を介して ARF5 や ARF6 とも結合することが明らかとなった。このことから、FIP3 と FIP4 は二つの異なるファミリーに属する低分子量 GTPase を結びつけ、小胞輸送を調節する重要なタンパク質であると考えられる。本研究では、FIP3/4 と、ARF5/6 および Rab11 との結合を分子レベルで解析するとともに、細胞内で起こる様々な変化を調べることで、FIP3/4 の細胞内輸送における役割、さらには ARF5/6 と Rab11 の機能の間のクロストークの解明をめざした。

そこでまず、FIP3 と ARF5 および Rab11 との相互作用について検討した。その結果、FIP3 は隣接するが異なる C 末端領域で ARF5 および Rab11 と結合し、さらにこれらの GTPase と同時に結合できることが判明した。FIP3/4 は Rab11 や ARF5/6 と GTP 依存的に結合したが、ARF1 とは結合しないことから、ARF に対する特異性が示唆された。細胞内では、FIP3/4 は Rab11 依存的にリサイクリングエンドソーム膜上に局在するとともに、そこに ARF5/6 をリクルートすることが判明した。これらのことから、FIP3 と FIP4 は ARF5/6 や Rab11 の機能を仲介することにより、リサイクリングエンドソームを経由する小胞輸送を調節する可能性が示唆された。

ARF6はエンドサイトーシスやアクチンのリモデリングなどを細胞膜付近で調節することが報告されているが、ARF5の機能は今までのところ不明である。一方、Rab11は主にリサイクリングエンドソームを介する輸送に関与し、トランスフェリン受容体などのリサイクリングの経路やエンドサイトーシスの経路を調節することが示唆されている。さらにRab11はVSVGのTGNから細胞膜への輸送や志賀毒素のエンドソームからTGNへの逆行輸送に関与することが報告されている。

FIP3/4のドミナントネガティブ変異体を細胞に発現させると、VSVGのTGNから細胞膜への輸送が阻害された。さらに、この変異体による輸送阻害はARF5/6とRab11の両方との結合に依存した。これらのことから、FIP3/4は輸送小胞の出芽に関与するARF5/6と、融合に関与するRab11の機能を仲介することにより、TGNとエンドソームの間の輸送を調節すると考えられる。

本研究により、輸送小胞が形成される過程とその輸送小胞が正しく選別輸送される過程が協調して機能する可能性が示された。

### 論文審査の結果の要旨

細胞が正常に機能するためには、合成されたタンパク質が必要とされるオルガネラに正確に輸送され、機能することが必要である。オルガネラ間のタンパク質輸送では、主に低分子量GTPaseのARFとRabがそれぞれ膜の出芽と融合を調節することが知られている。近年、Rab11と相互作用するファミリーとしてFIPが同定された。FIPファミリーのうち、FIP3とFIP4はRab11だけでなくARF5やARF6ともそのC末端領域を介して結合する（別名Arfophilin-1, Arfophilin-2の由来）。Rab11, ARF5/6のFIP3やFIP4への結合はいずれもGTP依存的である。そこで、本研究ではFIP3やFIP4とARF5, ARF6およびRab11との結合を分子レベルで解析し、FIP3やFIP4の細胞内小胞輸送における役割を解明することをめざした。

まずyeast two hybrid法およびGST pull down法により、FIP3とFIP4のC末端領域にはARF結合ドメインとRab11結合ドメインが別個に存在することを見出し、さらにFIP3とFIP4がARF5やRab11と同時に結合できることを明らかにした。一方、FIP3やFIP4はARF1とは結合しないことからARFに対する特異性が示唆された。これらの結果から、FIP3とFIP4はARF5/6やRab11の機能のクロストークを担う重要な因子であることが示唆された。

次に、共同研究によりFIP3とRab11の複合体のX線結晶構造解析を行い、FIP3とRab11との結合に重要な立体構造を解明した。その結果、FIP3はC末端のRab11結合ドメインでダイマーを形成し、その両側にRab11を一分子ずつ結合していることが明らかになった。さらに、GST pull down法によりFIP3とRab11の結合に重要ないくつかのアミノ酸を同定した。これにより、FIP3とRab11は、静電的相互作用と疎水的相互作用の両方を介して、お互いを厳密に認識していることがわかった。

間接蛍光抗体法を用いた解析により、FIP3/FIP4は細胞内でRab11依存的にリサイクリングエンドソームに局在し、ARF5/ARF6はFIP3/FIP4依存的にリサイクリングエンドソーム膜上にリクルートされることが判明した。

Rab11は主にエンドサイトーシス/リサイクリング経路を調節することが示唆されているが、Rab11の変異体がVSVGのトランスゴルジ網(TGN)から細胞膜への輸送、志賀毒素のエンドソームからTGNへの輸送に関与するという報告もある。そこで、FIP3やFIP4の様々な輸送経路に対する影響を調べたところ、FIP3/FIP4のドミナントネガティブ体を過剰発現した細胞では、VSVGのTGNから細胞膜への輸送が阻害された。一方、トランスフェリンのリサイクリングなどには影響が見られなかった。これらのことから、FIP3やFIP4はRab11やARF5/6の機能を仲介することによりTGNとエンドソームの間の輸送を調節すると考えられる。さらに本研究では機能不明のARF5との関連が示唆されることから、今後興味深い知見が得られると予想される。

小胞輸送は様々なGTPaseやコートタンパク質が複雑に相互作用することにより調節される。ARFやRabは小胞輸送において中心的役割を果たすことから、それらの細胞内局在などの研究は、細胞の基本的なメカニズムの一つであるオルガネラ間のタンパク質輸送の機能解明へと繋がる。本研究により、FIP3やFIP4はARFとRab11の二つの低分子量GTPase経路を結びつける因子と考えられ、さらに小胞輸送において膜の出芽と融合が協調して働く可能性が示唆された。これらの

研究成果は今後の細胞内小胞輸送の研究分野において大きな発展をもたらすことが期待される。

よって本論文は博士（薬学）の論文として価値あるものと認める。

さらに平成19年2月21日論文内容とそれに関連した口頭試問を行った結果合格と認めた。