

氏名	いし ざき れい 石 崎 玲
学位(専攻分野)	博 士 (薬 学)
学位記番号	薬 博 第 648 号
学位授与の日付	平 成 20 年 3 月 24 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 学 専 攻
学位論文題目	Functional analysis of BIG1 and BIG2 by RNAi in membrane traffic (低分子量GTPase ARFのグアニンヌクレオチド交換因子BIG1とBIG2の発 現抑制による機能解析)
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

<第一章 BIG2によるAMY-1のゴルジ体への局在化>

AMY-1の背景

AMY-1 (Associate of c-MYC) は、c-MYCを baitとする酵母 two-hybrid スクリーニングにより単離された103アミノ酸からなるタンパク質である。AMY-1は、S期にc-MYCの発現上昇に伴って核に移行する。また、AKAP (A-kinase anchoring protein) 84と結合してミトコンドリア上に局在することも報告されている。さらに、AMY-1は何種類かのAKAPと結合し、AKAP依存的にその局在を変化させること、AKAP上でPKAの活性サブユニットと競合することなどが報告されている。しかしながらこれらの実験は過剰発現系を用いたものであり、内在性AMY-1の局在については不明であった。

内在性AMY-1の局在

著者は、抗AMY-1抗体を作製して免疫蛍光染色により細胞内局在を観察した。その結果、内在性AMY-1は主としてゴルジ体に局在していることが判明した。一方、これまでの研究ではAMY-1がゴルジ体に局在しているという報告はなく、既知のAMY-1結合タンパク質のなかにもゴルジ体に局在するものに関する報告はない。

新規AMY-1結合タンパク質BIG1およびBIG2の同定

「①AMY-1は結合タンパク質に依存してその局在を変化させる、②AMY-1は一群のAKAPに存在するAKAPドメインに結合する、③これまでに報告されているAMY-1結合タンパク質のなかにはゴルジ体に局在するものがない」ことなどから、AKAPドメインを有してゴルジ体に局在する未知のAMY-1結合タンパク質が存在すると考え、AMY-1と共免疫沈降するタンパク質の解析を行なった。

その結果、200kDaと190kDaのAMY-1結合タンパク質を見だし、質量分析によりBIG (Brefeldin A-inhibited guanine nucleotide-exchange factor) 1とBIG2であることを同定した。両者はいずれもゴルジ体に局在する低分子量GTPase ARFのグアニンヌクレオチド交換因子GEFであり、ARFに結合するGDPのGTPへの交換反応を触媒して活性化することにより、輸送小胞の出芽を引き起こす重要な調節因子である。さらにBIG1とBIG2はいずれもAKAPドメインを持つことから、このドメインを介してAMY-1に結合する可能性が想定された。このように、スクリーニングによって、ゴルジ体に局在してAKAPドメインを持つ新規AMY-1結合タンパク質BIG1およびBIG2が得られた。

AMY-1のより詳しい局在解析

BIG1とBIG2は、ゴルジ体の中でも特にTGN (トランスゴルジネットワーク) に局在している。そこで、AMY-1もTGNに局在しているかどうかについて蛍光抗体法により詳しく検討した。その結果、AMY-1はTGNにおいてBIG1およびBIG2と共局在することが明らかになった。そこで、BIG1もしくはBIG2と結合することによりAMY-1のTGNへの局在が決定されるのではないかと考え、siRNAによるBIG1とBIG2のノックダウン実験を行った。BIG2をノックダウンした時に

のみAMY-1のTGNへの局在が完全に消失することから、AMY-1はBIG2と結合してTGNに局在することが証明された。

<第二章 ARFのグアニンヌクレオチド交換因子BIG1とBIG2の発現抑制による機能解析>

BIG1とBIG2の背景

低分子量GTPase ARFは、他の低分子量GTPaseと同様にGDP結合型からGTP結合型になることによって活性化する。ARFはその活性化に伴ってコートタンパク質複合体を供与オルガネラの膜にリクルートし、供与膜からの輸送小胞の出芽を引き起こす。また、ブレフェルジンA(BFA)はARFの活性化を阻害し、ゴルジ体の崩壊やエンドソームの形態変化を引き起こすことが知られている。

BIG1とBIG2は、ARFのグアニンヌクレオチド交換因子であり、主としてTGNに局在している。また、その機能はBFAによって阻害されることが知られている。著者の所属する研究室でのこれまでの研究により、BIG2はリサイクリングエンドソームにも局在し、その機能抑制型変異体を強制発現させると、リサイクリングエンドソームがBFAを処理したときと同様の形態変化を引き起こすことが判明している。しかしながら、BIG2の機能抑制型変異体を用いた実験ではBIG1など他のタンパク質の機能も抑制する可能性があり、BIG1とBIG2にそれぞれ固有の機能については知ることができなかった。

BIG1とBIG2の発現抑制

著者はRNAiによってBIG1とBIG2を単独および同時に発現抑制した。その結果、BIG1とBIG2には独立した機能と重複した機能があることがわかった。

BIG2単独の発現抑制は、BIG2変異体を用いた実験と同様にリサイクリングエンドソームの形態変化を引き起こす。しかし、BIG1を単独で発現抑制した場合にはこのような変化は起こらない。一方、BIG1とBIG2の両方を発現抑制した場合には、TGNに局在する膜貫通型のエンドプロテアーゼであるFurinのTGNへの局在は見られなくなり、コートタンパク質複合体の一部であるAP-1複合体のゴルジ膜へのリクルートが阻害された。さらに、BIG1とBIG2の同時発現抑制は、Furinの細胞膜からTGNまでの輸送を阻害して、後期エンドソームへの蓄積を引き起こした。これらの結果は、BIG2の独立した機能によるリサイクリングエンドソームの形態維持と、BIG1とBIG2の協調的な機能によるエンドソームとTGN間のタンパク質輸送が行われていることを示唆するものである。

論文審査の結果の要旨

膜で覆われたオルガネラを持つ真核細胞が恒常性を保つためには、タンパク質が適切な場所へと運ばれて機能する必要がある。このオルガネラ間のタンパク質輸送の中でも、輸送小胞の出芽は、低分子量GTPase ARFとそのグアニンヌクレオチド交換因子GEFによって制御されている。この、ARF-GEFはいくつかのサブファミリーに分類されるが、その中でもBIG1とBIG2の属するBIGファミリー分子は、選別輸送において中心的な役割を果たしているトランスゴルジネットワークTGNに局在し、複雑な経路を持つTGN以降の小胞輸送に関わることが知られている。しかしながら、BIGはGEF活性を担うSec7ドメイン以外にも多くの領域を持ち、これらの部位の持つ機能や、輸送を調節する積荷タンパク質の種類とその経路などが不明なままである。

そこで本研究では、BIGのSec7ドメイン以外の領域と結合するAMY-1との相互作用の解析と、BIGの発現抑制による機能解析をおこなった。その結果、①AMY-1はBIG2依存的にTGNに局在していること、②BIG1とBIG2は協調的に後期エンドソームからTGNへの輸送を調節していることが明らかになった。

①まず、本論文第一章では、AMY-1とBIG1あるいはBIG2の相互作用の解析について報告している。AMY-1は何種類かのA-kinase anchoring protein (AKAP)と結合し、その結合を介してPKA活性を調節することが知られているタンパク質である。AKAPとはPKAと結合する一群のタンパク質のことであり、個々のタンパク質はそれぞれ固有のオルガネラに局在しそこにPKAを繋ぎ止めている。しかしながら、内在性AMY-1の局在は不明であった。そこで、AMY-1抗体を作製してその局在を調べたところ、TGNに局在していることが判明した。これまでに知られているAMY-1結合タンパク質でTGNに局在するものはなかったので、結合タンパク質の探索を行った。その結果、AMY-1結合タンパク質としてBIG1とBIG2を同定した。BIG1とBIG2はいずれもTGNに局在するタンパク質でBIG2はAKAPであることも知られている。これらのことからAMY-1はBIG1あるいはBIG2と結合してTGNに局在しているのではないかと考え、RNAiによるBIG1と

BIG2の発現抑制により調べた。その結果、AMY-1はBIG2との結合を介してTGNに局在することが明らかになった。

②次に、第二章では、BIG1とBIG2の発現抑制による機能解析について報告している。細胞内では様々なタンパク質がそれぞれ固有の経路を通過して適切な場所に輸送されている。これらのタンパク質の輸送に対するBIG発現抑制の影響を解析すれば、BIG1とBIG2が輸送を調節している積荷タンパク質の種類とその経路を明らかにすることができる。実際、本研究によってBIG1とBIG2がfurinの後期エンドソームからTGNへの輸送を調節していることが明らかになった。Furinは主にTGNに局在し細胞膜との間をリサイクルしているタンパク質であり、細胞膜から初期エンドソームに取り込まれたfurinは後期エンドソームを通過してTGNに運ばれることが知られている。BIG1とBIG2の発現抑制細胞によりfurinの定常状態でTGNへの局在が見られなくなり、細胞膜から取り込まれたfurinはTGNまでたどり着けずに後期エンドソームに蓄積していた。これらの結果より、BIG1とBIG2は協調的にfurinの後期エンドソームからTGNへの輸送を調節していることが明らかになった。

本研究により複雑な小胞輸送の調節機構の一端が明らかとなった。これらの研究成果は今後の小胞輸送の研究に大きな発展をもたらすものと期待される。

よって本論文は博士（薬学）の学位論文として価値あるものと認める。

さらに、平成20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。