

氏名	ふじ た ひろ ただ 藤 田 大 雅
学位(専攻分野)	博 士 (薬 学)
学位記番号	薬 博 第 521 号
学位授与の日付	平成 15 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	薬学研究科生命薬科学専攻
学位論文題目	Rho ファミリー新規低分子量 G 蛋白質 Rnd2 の細胞機能とその分子メ カニズム
論文調査委員	(主 査) 教授 根 岸 学 教授 市 川 厚 教授 川 寄 敏 祐

### 論 文 内 容 の 要 旨

細胞骨格系や転写の制御, 小胞輸送の調節など様々な役割を果たす Rho ファミリー低分子量 G 蛋白質において, 近年, よく知られている RhoA, Rac1, Cdc42 以外に新規の 6 蛋白質 Rnd サブファミリーが見出された。Rnd には Rnd1, 2, 3 があり, 組織分布が異なる。その中で, Rnd2 は脳特異的に発現しており, 中枢神経機能の制御に関わるのではないかと考えられる。Rnd の細胞内での機能に関しては, 線維芽細胞で Rnd1, 3 は RhOA によるストレスファイバー形成と Rac1 によるラメリポディア形成の経路に対して抑制的に働くことは示されているが, Rnd2 に関しては全くわかっていない。そこで, 我々は Rnd2 の機能を解明するため, Rnd2 に結合する蛋白質を同定することにより, Rnd2 の働きを解析した。

#### 第一章 Rho ファミリー新規低分子量 G 蛋白質 Rnd2 の結合蛋白質のクローニング

酵母ツーハイブリッド法を用いて, ラット脳 cDNA ライブラリーから Rnd2 と結合する蛋白質をスクリーニングした。その結果, 複数の結合分子を単離し, その中の一つとして Vps4-A を得た。Vps4-A は AAA ATPase ファミリーに属し, その ATPase 活性によって細胞質と初期エンドソームを行き来して, 初期エンドソームからの小胞輸送を調節する分子と考えられている。まず, Rnd2 と Vps4-A の結合を免疫沈降法, pull-down 法で調べたところ, Vps4-A は Rho ファミリーの中で Rnd2 に特異的な結合を示し, GTP 結合型 (活性型), GDP 結合型 (不活性型) Rnd2 両方に結合した。次に, VPS4-A 内の Rnd2 結合部位を検討したところ, ATPase ドメインより上流のアミノ末端側へ Rnd2 が直接結合した。ATPase 活性欠損変異体 Vps4-A<sup>EQ</sup> は, HeLa 細胞に発現すると初期エンドソームに集積して輸送を阻害するため, 初期エンドソームが肥大化する。そこで Rnd2 と Vps4-A<sup>EQ</sup> を共発現すると, 単独では細胞質に存在していた Rnd2 が Vps4-A によって初期エンドソーム膜へ移行した。また, その時の初期エンドソームの大きさを定量したところ, Vps4-A<sup>EQ</sup> 単独の場合よりも常時活性型または不活性型 Rnd2 と共発現した場合の方が初期エンドソームの肥大化を促進した。さらに, エンドサイトーシスマーカー, FM4-64 の取り込みを調べたところ, 常時活性型, 不活性型 Rnd2 は共に Vps4-A<sup>EQ</sup> による初期エンドソームからの小胞輸送の阻害作用を強めた。以上の結果から, Rnd2 は Vps4-A をアダプターとすることで初期エンドソームを介する小胞輸送を制御することが明らかになった。

#### 第二章 Rnd2 の新規エフェクター, Rapostlin のクローニングとその神経機能

酵母ツーハイブリッド法を用いたスクリーニングにより, 私はさらに別の Rnd2 結合蛋白質をクローニングした。この蛋白質は, アミノ末端に FCH ドメイン, カルボキシル末端に SH3 ドメインを持つ新規の蛋白質であり, Rapostlin (apostle of Rnd2) と命名した。まず, Rnd2 と Rapostlin の結合特異性をドットプロット法と動物細胞ツーハイブリッド法で調べたところ, Rapostlin は Rho ファミリーの中で Rnd2 の活性型に特異的に結合し, Rnd2 が結合する領域は Rapostlin の FCH ドメインと SH3 ドメインの間であることがわかった。HeLa 細胞に Rapostlin のみを発現させると微小管と部分的に局在が一致し, 常時活性型 Rnd2 と Rapostlin を両方発現させると共局在してアクチンフィラメントの構造を変化させた。次に, 超遠心で単量体のチュブリンと微小管を分離できる性質を利用して Rapostlin が微小管と結合するが *in vitro* で調べ

たところ、Rapostlin の FCH ドメインを含むアミノ末端側で微小管と結合することがわかった。さらに、PC12 細胞、ラット海馬初代培養細胞に Rnd2 や Rapostlin を発現させ、神経突起の形態を調べた。その結果、常時活性型 Rnd2 と Rapostlin を共発現させると神経突起の分枝化がおきたが、不活性型 Rnd2 と Rapostlin または常時活性型 Rnd2 と微小管結合部位であるアミノ末端側を欠失した Rapostlin では分枝化はおきなかった。また、アミノ末端側の Rapostlin を発現させると神経突起の分枝化が抑制された。従って、Rapostlin は Rnd2 のシグナル依存的に、神経細胞において神経突起の分枝化を引き起こし、この Rapostlin の機能に Rapostlin と微小管の結合が重要であることがわかった。これらのことから、Rapostlin が Rnd2 の初めてのエフェクターであり、微小管とアクチンフィラメントを制御することによって神経突起分枝化をおこすことがわかった。

以上の結果から、新規低分子量 G 蛋白質 Rnd2 はアダプターの Vps4-A とエフェクターの Rapostlin を介して、初期エンドソームからの小胞輸送や、神経突起分枝化の制御を行うことを初めて明らかにした。この研究は、Rnd2 の細胞機能やその分子メカニズムの全体像を明らかにする契機となると考えられる。

### 論文審査の結果の要旨

Rho ファミリー低分子量 G 蛋白質は、細胞骨格や転写の制御、小胞輸送の調節など多彩な生理機能の調節分子である。Rho ファミリーの中で、RhoA, Rac1, Cdc42 は非常によく研究され、活性調節因子や下流のエフェクター分子が多数同定され、その分子機構の解明はかなり進んでいる。しかし、Rho ファミリーには少なくとも現在までに 14 種類の分子が見いだされており、その多くの機能についてはほとんど解明されていない。本論文は、脳神経系に主に発現している Rho ファミリー G 蛋白質、Rnd2 の細胞機能を分子レベルで研究したものであり、Rnd2 のエフェクターとその神経機能を解明したものである。

第一章では Rnd2 の情報伝達経路を分子レベルで明らかにするため、Rnd2 に結合する分子を酵母の two-hybrid 法を用いてスクリーニングし、Rnd2 が、クラス E の VPS 蛋白質の 1 つで、初期エンドソームからの小胞輸送を制御する分子、Vps4-A に結合することを見いだした。Vps4-A は AAA-ATPase ファミリーに属し、ATP の水解により初期エンドソームからの輸送を調節している。Rnd2 は GTP 結合活性型と GDP 結合は活性型共に Vps4-A に結合し、Vps4-A により、初期エンドソームにターゲティングされた。また、Rnd2 は Vps4-A により初期エンドソームに運ばれ、Vps4-A によるエンドソームからの小胞輸送を促進した。これらのことから、Vps4-A は初期エンドソームにおける Rnd2 のアダプター蛋白質として働き、エンドソームからの小胞輸送を調節していることが推察される。

第二章では、Rnd2 のエフェクター分子を同定するため、やはり酵母の two-hybrid 法で Rnd2 の結合蛋白質をスクリーニングし、新規の蛋白質をクローニングし、Rapostlin と命名した。Rapostlin はアミノ末端に FCH ドメインを、カルボキシ末端に SH3 ドメインをもち、Rnd2 は両ドメインに挟まれた領域に結合した。また、この結合は Rnd2 の活性型特異的であり、Rapostlin がエフェクターであることがわかった。Rapostlin は FCH ドメインを含むアミノ末端で微小管に直接結合し、カルボキシ末端の相同性から N-WASP を介してアクチン骨格を制御する可能性が示唆された。Rapostlin は Rnd2 が結合すると、PC12 細胞やラット海馬初代培養細胞において、神経突起の分枝化を引き起こした。また、Rapostlin の微小管と結合するアミノ末端領域のみの変異体はラット海馬初代培養細胞の分枝化を抑制し、ドミナントネガティブとして働いた。これらの結果から、Rapostlin は Rnd2 の下流のエフェクターであり、2 つの異なる細胞骨格分子である微小管とアクチン骨格を繋げるリンカーとして働くことが推定され、神経細胞の神経突起の分枝化を制御する重要な調節分子であることがわかった。

以上本研究は、神経系に主に発現する Rho ファミリー G 蛋白質の 1 つ、Rnd2 のアダプターとエフェクター分子をクローニングし、それらの細胞内における分子機能を解析し、Rnd2 の細胞機能を明らかにしたものであり、Rho ファミリーの神経機能のメカニズムの解明に寄与するものと思われる。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。

更に、平成15年2月24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。