

(続紙 1)

京都大学	博士（薬学）	氏名	満 智秋
論文題目	Localization and function of Arfaptins: Arl1-dependent <i>trans</i> -Golgi localization and induction of membrane deformation (Arfaptinの細胞内局在と機能: Arl1依存的なトランスゴルジへの局在とゴルジ体膜の変形)		
(論文内容の要旨)			
<第一章 ArfaptinのArl1依存的なトランスゴルジへの局在>			
<u>Arfaptinの背景</u>			
細胞内のオルガネラ間のタンパク質輸送は、供与オルガネラから出芽した輸送小胞が標的オルガネラの膜に融合することによって行われる。輸送小胞の出芽と融合は、様々な低分子量GTPaseによって調節されており、出芽の過程はArfファミリーの低分子量GTPaseによる調節を受ける。グアニンヌクレオチド交換因子の触媒によって活性型（GTP結合型）に変換されたArfは、アダプタータンパク質やコートタンパク質などをオルガネラ膜上に動員することによって、輸送小胞の形成を促進する。 Arl1は、Arfと相同性を有するArf様（Arf-like: Arl）GTPaseサブファミリーの一つである。Arl1はゴルジ体のトランス領域（トランスゴルジ）に局在し、GRIP（golgin-97/RanBP2/Imh1p/p230）ドメインを有するgolgin-97やgolgin-245/p230をトランスゴルジへと動員することによって、エンドソームからトランスゴルジへの逆行輸送に関与すると考えられている。一方、ArfとArl1に結合するタンパク質としてArfaptin-1とArfaptin-2が知られているが、Arfaptinの細胞内局在や機能は不明であった。			
<u>Arfaptinの細胞内局在の解析</u>			
著者は、Arfaptin-1とArfaptin-2の抗体を用いて間接蛍光抗体法を行うことによって、内在性のArfaptinの細胞内局在を調べた。その結果、Arfaptin-1とArfaptin-2はいずれもゴルジ体、特にトランスゴルジに局在することが判明した。			
<u>ArfaptinのArl1依存的なトランスゴルジ膜上への動員</u>			
Arfaptinは活性型のArfと結合することが知られている。しかし、Arf1とArf3をRNAi法でノックダウンしても、あるいはArf GTPaseのヌクレオチド交換因子の阻害剤であるブレフェルジンA（BFA）で細胞を処理しても、Arfaptin-1/Arfaptin-2のトランスゴルジへの局在には影響がなかった。このことから、Arfaptinのゴルジ体への局在はArf以外によって決定される可能性が示唆された。そこで、Arfaptinと結合する別の低分子量GTPaseのArl1について検討した。RNAi法を用いてArl1をノックダすると、Arfaptin-1/Arfaptin-2がトランスゴルジに局在できずに細胞質へと分散した。さらに、Arl1ノックダウン細胞に野生型 Arl1を発現させてArfaptin-1/Arfaptin-2の細胞内局在を観察したところ、Arfaptin-1/Arfaptin-2のトランスゴルジへの局在が回復することが明らかになった。したがって、Arfaptinは、Arf1やArf3ではなく、Arl1によってトランスゴルジ膜上に動員されると考えられる。			

<第二章 Arfaptinによって誘導されるゴルジ体膜の変形>

ArfaptinはBAR (Bin/Amphiphysin/Rvs) ドメインを有するタンパク質である。BARドメインは二量体化して三日月状の構造をとり、三日月状のカーブの内側の正電荷と細胞膜の負電荷が相互作用して、膜を変形させると推察されていた。Arfaptin-2が*in vitro*で人工脂質二重膜を変形させて管状構造を形成させることができるという報告があるので、Arfaptinが*in vivo*でも膜の変形に関わるのではないかと考えた。

著者は、蛍光タンパク質を融合させたArfaptin-2を細胞に発現させ、Arfaptin-2の動態をタイムラプスイメージング法で観察した。その結果、Arfaptin-2を発現する細胞では、ゴルジ体から出て行くArfaptin-2陽性の小胞や管状構造が高頻度に観察された。得られた結果を定量化したところ、小胞と管状構造の形成頻度は、Arfaptin-2の発現によって著しく増大することが判明した。一方、蛍光タンパク質を融合させたArl1を共発現させると、小胞や管状構造の形成はさらに促進されるとともに、単独では小胞や管状構造を形成できないArl1もArfaptin-2陽性の小胞や管状構造に局在できるようになった。これらの結果から、Arl1によってゴルジ体膜上に動員されたArfaptinがBARドメインを介して膜に結合し、膜の変形を引き起こすと考えられる。

<第三章 構造に基づくArfaptinとArl1の相互作用解析>

Arl1とArfaptinの相互作用を詳細に解明するために、著者は共同研究によってその複合体のX線結晶構造解析を行ない、Arfaptin-2のBARドメインの二量体に2分子のArl1が対称的に結合しているヘテロ四量体の構造を世界で初めて決定した。その複合体は、湾曲した三日月状構造をとっていた。Arl1はゴルジ体膜と結合することがわかっているので、この複合体が形成されることによって、ゴルジ体膜が変形するというモデルを提唱した。

次に、Arl1とArfaptin-2の複合体のX線結晶構造解析の相互作用データをもとにして、Arl1のF51A変異体およびY81A変異体を作製して、GSTプルダウン法による解析を行った。その結果、Arl1(Y81A)変異体はArfaptin-2とだけではなく、Arl1の別のエフェクターであるgolgin-245とも結合できないのに対して、Arl1(F51A)変異体はgolgin-245とは結合できないが、Arfaptin-2との結合能は保持していることが判明した。さらに、野生型Arl1、およびこれら二つのArl1変異体をArl1ノックダウン細胞に発現させてArfaptin-2の細胞内局在を観察したところ、野生型Arl1とArl1(F51A)変異体の発現によってArfaptin-2のゴルジ体への局在が回復するのに対して、Arl1(Y81A)変異体の発現によっては回復しないことが明らかになった。これらの結果から、Arfaptin-2はArl1と相互作用することによってゴルジ体膜上に動員されることが証明された。

(論文審査の結果の要旨)

<第一章 ArfaptinのArl1依存的なトランスゴルジへの局在>

Arfaptinの背景

細胞内のオルガネラ間のタンパク質輸送は、供与オルガネラから出芽した輸送小胞が標的オルガネラの膜に融合することによって行われる。輸送小胞の出芽と融合は、様々な低分子量GTPaseによって調節されており、出芽の過程はArfファミリーの低分子量GTPaseによる調節を受ける。グアニンヌクレオチド交換因子の触媒によって活性型 (GTP結合型) に変換されたArfは、アダプタータンパク質やコートタンパク質などをオルガネラ膜上に動員することによって、輸送小胞の形成を促進する。

Arl1は、Arfと相同性を有するArf様 (Arf-like: Arl) GTPaseサブファミリーの一つである。Arl1はゴルジ体のトランス領域 (トランスゴルジ) に局在し、GRIP (golgin-97/RanBP2/Imh1p/p230) ドメインを有するgolgin-97やgolgin-245/p230をトランスゴルジへと動員することによって、エンドソームからトランスゴルジへの逆行輸送に関与すると考えられている。一方、ArfとArl1に結合するタンパク質としてArfaptin-1とArfaptin-2が知られているが、Arfaptinの細胞内局在や機能は不明であった。

Arfaptinの細胞内局在の解析

著者は、Arfaptin-1とArfaptin-2の抗体を用いて間接蛍光抗体法を行うことによって、内在性のArfaptinの細胞内局在を調べた。その結果、Arfaptin-1とArfaptin-2はいずれもゴルジ体、特にトランスゴルジに局在することが判明した。

ArfaptinのArl1依存的なトランスゴルジ膜上への動員

Arfaptinは活性型のArfと結合することが知られている。しかし、Arf1とArf3をRNAi法でノックダウンしても、あるいはArf GTPaseのヌクレオチド交換因子の阻害剤であるブレフェルジンA (BFA) で細胞を処理しても、Arfaptin-1/Arfaptin-2のトランスゴルジへの局在には影響がなかった。このことから、Arfaptinのゴルジ体への局在はArf以外によって決定される可能性が示唆された。そこで、Arfaptinと結合する別の低分子量GTPaseのArl1について検討した。RNAi法を用いてArl1をノックダスすると、Arfaptin-1/Arfaptin-2がトランスゴルジに局在できずに細胞質へと分散した。さらに、Arl1ノックダウン細胞に野生型 Arl1を発現させてArfaptin-1/Arfaptin-2の細胞内局在を観察したところ、Arfaptin-1/Arfaptin-2のトランスゴルジへの局在が回復することが明らかになった。したがって、Arfaptinは、Arf1やArf3ではなく、Arl1によってトランスゴルジ膜上に動員されると考えられる。

<第二章 Arfaptinによって誘導されるゴルジ体膜の変形>

ArfaptinはBAR (Bin/Amphiphysin/Rvs) ドメインを有するタンパク質である。BARドメインは二量体化して三日月状の構造をとり、三日月状のカーブの内側の正電荷と細胞膜の負電荷が相互作用して、膜を変形させると推察されていた。

Arfaptin-2が*in vitro*で人工脂質二重膜を変形させて管状構造を形成させることができるという報告があるので、Arfaptinが*in vivo*でも膜の変形に関わるのではないかと考えた。

<第三章 構造に基づくArfaptinとArl1の相互作用解析>

Arl1とArfaptinの相互作用を詳細に解明するために、著者は共同研究によってその複合体のX線結晶構造解析を行ない、Arfaptin-2のBARドメインの二量体に2分子のArl1が対称的に結合しているヘテロ四量体の構造を世界で初めて決定した。その複合体は、湾曲した三日月状構造をとっていた。Arl1はゴルジ体膜と結合することがわかっているので、この複合体が形成されることによって、ゴルジ体膜が変形するというモデルを提唱した。

次に、Arl1とArfaptin-2の複合体のX線結晶構造解析の相互作用データをもとにして、Arl1のF51A変異体およびY81A変異体を作製して、GSTプルダウン法による解析を行った。その結果、Arl1(Y81A)変異体はArfaptin-2とだけではなく、Arl1の別のエフェクターであるgolgin-245とも結合できないのに対して、Arl1(F51A)変異体は golgin-245とは結合できないが、Arfaptin-2との結合能は保持していることが判明した。さらに、野生型 Arl1、およびこれら二つの Arl1変異体をArl1ノックダウン細胞に発現させてArfaptin-2の細胞内局在を観察したところ、野生型Arl1とArl1(F51A)変異体の発現によってArfaptin-2のゴルジ体への局在が回復するのにに対して、Arl1(Y81A)変異体の発現によっては回復しないことが明らかになった。これらの結果から、Arfaptin-2はArl1と相互作用することによってゴルジ体膜上に動員されることが証明された。

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24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。

論文内容の要旨及び審査の結果の要旨は、本学学術情報リポジトリに掲載し、公表とする。特許申請、雑誌掲載等の関係により、学位授与後即日公表することに支障がある場合は、以下に公表可能とする日付を記入すること。

要旨公開可能日： 平成 年 月 日以降