

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 科 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、① AMY-1 は BIG2 依存的に TGN に局在していること、② BIG1 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。