平 成 25 年 度

博 士 学 位 論 文

内容の要旨
および
審査結果の要旨

近畿大学大学院
薬 学 研 究 科

薬　学　研　究　科

平成 25 年度

（課程修了による博士論文）

李　　　翠　芳

学位論文審査結果の報告書

氏　　名	李　翠芳
生年月日	(昭和)・平成　59年　02月　05日
本籍（国籍）	中国
学位の種類	博　　士（　薬学　）
学位記番号	第　120　号
学位授与の条件 （博士の学位）	学位規程第５条該当
論文題目	低分子量Gタンパク質によるメンブレントラフィック及びイノシトールリン脂質代謝の制御機構に関する研究

審査委員

（主　査）	杉浦　麗子　教授	印
（副主査）	西田　升三　教授	印
（副主査）	中山　隆志　教授	印
（副　査）		印
（副　査）		印

論　文　内　容　の　要　旨

2013年のノーベル生理学・医学賞は，細胞内の物質輸送機構の解明に関する成果に対して、James E. Rothman博士、Randy W. Schekman博士とThomas C. Südhof博士に授与された。細胞内の物質輸送、即ちメンブレントラフィック（membrane traffic）に関する研究は、糖尿病や精神疾患などの病態解明（Satoh *et al*., J. Biol. Chem. 1993; Jhun *et al*., J. Biol. Chem. 1992; Ishikura *et al*., Acta Physiol. 2008; Howell *et al*., Int Rev Cytol, 2006）、さらには薬の創製に非常に重要である。

小胞体において合成され、正しくフォールディングされた膜タンパク質や分泌タンパク質は，ゴルジ体およびトランスゴルジネットワーク（TGN）を経てさまざまな目的地へと運ばれる．これらの過程には供与側のオルガネラにおける積み荷タンパク質の選別と小胞の出芽，モータータンパク質による輸送，標的となる膜への繋留および融合といったダイナミックな膜動態をともなう．これらの膜動態を総称してメンブレントラフィックとよんでいる。メンブレントラフィックは細胞膜や各オルガネラの膜の恒常性維持、細胞極性の形成、情報伝達物質の放出や取り込み、栄養摂取、抗体分泌など多岐に渡る細胞外環境との相互作用等様々な機能を担っている。メンブレントラフィックの障害はウイルス感染、アルツハイマー病、てんかん、高脂血症、各種神経変性疾患、糖尿病、がんなどの様々な疾病の引き金となることが知られている（Futai *et al*., EMBO J. 2004; Nakajima *et al*., Neuron 2012; Nobukuni *et al*., J Biol Chem. 2005; Liang *et al*., Nature. 1999）。

メンブレントラフィックの制御には、様々なシグナル分子が関与するが、中でも低分子量Gタンパク質に属するRabとRhoファミリーは、このメンブレントラフィックにおいて、極めて重要な制御因子である。RhoファミリーにはRho、Rac、Cdc42をはじめほ乳類で22種類が報告されており、細胞骨格と分泌の制御を通して細胞の形態調節に関わっている（Hall, Annu Rev Cell Biol., 1994; Ridley *et al*., Cell, 1992; Nobes *et al*., Cell, 1995; Leo *et al*., Curr. Bio. 1995; Gasman *et al*., J Cell Sci. 1999）。Rabはほ乳類で60種類以上存在し、メンブレントラフィックに関与する（Touchot *et al.*, Proc Natl Acad Sci. 1987; Stenmark *et al*., EMBO J. 1994; Zerial *et al*., Nat Rev Mol Cell Biol. 2001; Pereira-Leal *et al*., J Mol Biol. 2000）。

本研究では、低分子量Gタンパク質RhoとRabによるGolgi/endosome間のメンブレントラフィックの制御機構に焦点を当てて、生命現象に関する新たな知見を得ることを目的として研究を行った。現在までに、当研究室では、高等生物に極めて近い細胞内シグナル伝達経路を有する分裂酵母モデル生物を用いた独自の分子遺伝学的アプローチにより、幅広い生命現象を明らかにしてきた（Wood *et al*., Nature, 2000）。さらに、当研究室では、メンブレントラフィックに深く関わる低分子量Gタンパク質Rho3、及び低分子量Gタンパク質Rabファミリーに属するYpt3とRyh1が同定された（Kita *et al*., PLoS ONE 2011; Cheng *et al*., Mol Biol Cell. 2002; He *et al*., Genes Cells. 2006）。低分子量Gタンパク質Rho3がクラスリンアダプターAP-1複合体と協調的にGolgi/endosome間のメンブレントラフィックを制御すること（Kita *et al*., PLoS ONE 2011）、Ypt3とRyh1は協調的に細胞分泌に関わることを報告してきた（Cheng *et al*., Mol Biol Cell. 2002; He *et al*., Genes Cells. 2006）。

さらに、当研究室において、新たな細胞内輸送の制御因子を同定する目的で、免疫抑制薬FK506と高温に感受性を示す変異細胞である*its*（immunosuppressant and temperature- sensitive）変異細胞の原因遺伝子の一つとして、クラスリンアダプターアクセサリータンパク質であるSip1を同定した。Sip1はAP-1複合体と結合することで、AP-1複合体をGolgi/endosomeへとリクルートすることが明らかにされた（Yu *et al*., PLoS ONE 2012）。Sip1はヒトp200、出芽酵母LAA1p (YJL207C)と極めて類似したアミノ酸配列を持つクラスリンアダプターAP-1複合体アクセサリータンパク質である（Fernandez *et al*., Mol Biol Cell. 2006; Hirst *et al*., Mol Biol Cell. 2005）。また、2009年にJourdainらは分裂酵母において、Sip1がF-box protein Pof6の結合タンパク質として細胞質分裂に必須な働きをす

ることを報告した（Jourdain *et al*., Biochem J. 2009）。しかしながら、Sip1の他の生理機能については解明されていない。

第1章では、*sip1-i4*変異細胞の温度感受性、FK506、Micafungin、$MgCl_2$とValproic Acid（VPA）感受性を全て回復できる因子として、低分子量Gタンパク質Rho3を同定した。さらに、低分子量Gタンパク質Rhoファミリーのうち、Rho3は、*sip1-i4*変異細胞の示す温度感受性を特異的に回復できることを明らかにした。また、$rho3^+$過剰発現は、*sip1-i4*変異細胞の示すAcid Phosphatase分泌の低下、液胞融合異常、Syb1の局在異常などの細胞内輸送の異常を回復することができた。次に、*sip1-i4*変異細胞において、Apm1とRho3の局在及びタンパク質間の相互作用は異常になったが、Sip1のC末端領域を導入することで、これらの異常は回復された（Yu *et al*., PLoS ONE 2013）。以上の結果から、クラスリンアダプターAP-1複合体アクセサリータンパク質であるSip1はスキャフォールドタンパク質として、AP-1複合体とRho3の局在及び両タンパク質間の相互作用を制御することで、Golgi/endosome間の膜輸送を制御することを明らかにした。

次に、免疫抑制薬FK506と高温に感受性を示す変異細胞である*its*変異細胞の原因遺伝子のもう一つとして、イノシトールリン脂質の一種であうホスファチジルイノシトール-4,5-二リン酸の合成酵素（PI4P5K）である$its3^+$が同定されている（Zhang *et al*., J. Biol. Chem. 2000）。イノシトールリン脂質の一種であるPI4,5P_2は、ホスフォリパーゼC（PLC）により加水分解されて、イノシトール1,4,5-三リン酸（IP_3）とジアシルグリセロール（DAG）などのセカンドメッセンジャーを産生する（Berridge *et al*., Nature. 1984）。IP_3が受容体と結合することにより、Ca^{2+}が放出され、さらにDAGはPKCを活性化すると報告されている（Nishizuka *et al*., Neurosci. Res. 1992）。さらに、近年ではPI4,5P_2自体がセカンドメッセンジャーとして機能することが明らかとなり、細胞骨格調節を始めとした多彩な生理機能が注目を集めている（Takenawa *et al*., Biochim. Biophys. Acta. 2001; Audhya *et al*., EMBO J. 2004）。しかしながら、どのようなシグナルを介してPI4,5P_2がこれらの生命現象に関わるのか、また、PI4,5P_2の細胞内における空間的な分布やダイナミクスがどのように制御されているのかについてはほとんど明らかにされていない。

第2章では、Its3を過剰発現することにより、細胞増殖が抑制されることを見出した。そこでこのPI4P5K依存的な細胞増殖抑制を指標とした遺伝学的スクリーニングを行うことで、PI4,5P_2を介したシグナル伝達経路に関与する新たな因子の同定ができるのではないかと考えた。スクリーニングの結果、メンブレントラフィックを制御する低分子量Gタンパク質Rabの抑制因子であるRab GAPを同定した。さらに遺伝学的手法を用いて、Gyp10は低分子量Gタンパク質RabであるYpt3とRyh1のGAPとして機能することを示唆するデータを得た。　次に、Its3過剰発現による細胞増殖抑制が起こるメカニズムを調べる目的で、電子顕微鏡を用いてIts3過剰発現細胞を観察した。その結果、大きな塊となった異常な膜構造や細胞膜と細胞壁が陥入した構造がみられた。Calcofluorを用いてIts3過剰発現細胞を染めると、異常な膜構造の中に細胞壁成分が存在することを明らかにした。さらに、Golgi体マーカーであるFM4-64 とKrp1を用いて、Its3との共局在を観察した。その結果、FM4-64 とKrp1（Powner *et al*., Mol. Cell. Biol. 1998）の一部はIts3とともに異常な膜構造に局在したので、この異常な膜構造はゴルジ体から形成されたことを証明した。最後に、Gyp10過剰発現やRab機能低下は過剰発現レベルとエンドジェナスレベルのIts3局在、またその産物であるPI4,5P_2の分布に影響を与える。さらにYpt3の機能低下細胞において、PI4,5P_2の量が顕著に低下したことがわかった（Li *et al*., Genes Cells. 2013）。以上の結果から、Ypt3/Ryh1を介したメンブレントラフィックがPI4P5Kの細胞内局在を制御することで、PI4,5P_2の合成をコントロールする知見を得られた。即ち低分子量Gタンパク質Rabファミリー因子とPI4,5P_2シグナルのクロストークを発見した。

メンブレントラフィックは細正常な生命活動を営むために必須である。本研究で得られた知見を生かし、各種疾患の診断・治療法、新薬開発などの臨床研究開発に貢献できることを期待する。

論 文 審 査 結 果 の 要 旨

細胞内の物質輸送、即ちメンブレントラフィック (membrane traffic) は、細胞内のRNA輸送、細胞内シグナル伝達、細胞周期、アポトーシス、細胞分化等の様々な生命現象の制御、細胞機能の維持に重要であり、原核細胞から真核細胞まで、高度に保存されている。従って、メンブレントラフィックの障害はウイルス感染、アルツハイマー病、てんかん、高脂血症、各種神経変性疾患、がんなどの様々な疾病の引き金となることが知られている。

メンブレントラフィックの制御には、様々なシグナル分子が関与するが、中でも低分子量Gタンパク質に属するRabとRhoファミリーは、このメンブレントラフィックにおいて、極めて重要な制御因子である。RhoファミリーにはRho、Rac、Cdc42をはじめほ乳類で22種類が報告されており、細胞骨格と分泌の制御を通して細胞の形態調節に関わっている。Rabはほ乳類で60種類以上存在し、メンブレントラフィックに関与する。

申請者はゲノムサイズが最も小さい真核生物であり、高等生物における細胞周期や膜輸送、シグナル伝達経路などの複雑なメカニズムの解明に優れたモデル生物である分裂酵母 (*S. pombe*) を用い、独自の分子遺伝学的アプローチにより、低分子量Gタンパク質によるメンブレントラフィック及びイノシトールリン脂質代謝制御機構を解明してきた。

第一章では、申請者は、クラスリンアダプターAP-1複合体アクセサリータンパク質であるSip1の機能低下細胞を用いて、Sip1と機能的に関連する因子の同定を試みた。スクリーニングの結果、低分子量Gタンパク質Rho3を同定した。また*rho3*$^{+}$過剰発現は、*sip1-i4*変異細胞の示す様々な細胞内輸送の異常を回復することができた。さらに、*sip1-i4*変異細胞において、Apm1とRho3の局在及びタンパク質間の相互作用は異常になったが、Sip1のC末端領域を導入することで、これらの異常は回復された。以上の結果から、Sip1はスキャフォールドタンパク質として、AP-1複合体とRho3の局在及び両タンパク質間の相互作用を制御することで、Golgi/endosome間のメンブレントラフィックを制御することを明らかにした。またこれらの制御機構には、Sip1のC末端領域が重要であることを証明した。Sip1、Rho3、AP-1複合体の三者を介した新たなGolgi/endosome間の細胞内輸送の制御機構を提唱し、この成果から申請者はPLoS ONEという学術雑誌に共著者として掲載された。

次に、免疫抑制薬感受性原因遺伝子のもう一つとして、イノシトールリン脂質の一種であうホスファチジルイノシトール-4,5-二リン酸の合成酵素 (PI4P5K) である*its3*$^{+}$が同定されている。第二章では、申請者はIts3を過剰発現することにより、細胞増殖が抑制されることを見出した。そこでこのPI4P5K依存的な細胞増殖抑制を指標とした遺伝学的スクリーニングを行うことで、PI4,5P$_2$を介したシグナル伝達経路に関与する新たな因子の同定を試みた。スクリーニングの結果、メンブレントラフィックを制御する低分子量Gタンパク質Rabの抑制因子であるRab GAPを同定した。さらに遺伝学的手法を用いて、Gyp10は低分子量Gタンパク質RabであるYpt3とRyh1のGAPとして機能することを示唆するデータを得た。　次に、Its3過剰発現による細胞増殖抑制が起こるメカニズムを調べる目的で、電子顕微鏡を用いてIts3過剰発現細胞を観察した。その結果、大きな塊となった異常な膜構造や細胞膜と細胞壁が陥入した構造がみられた。さらに、Gyp10過剰発現やRab機能低下は過剰発現レベルとエンドジェナスレベルのIts3局在、またその産物であるPI4,5P$_2$の分布に影響を与える。最後にYpt3の機能低下細胞において、PI4,5P$_2$のレベルが顕著に低下したことがわかった。以上の結果から、Ypt3/Ryh1を介したメンブレントラフィックがPI4P5Kの細胞内局在を制御することで、PI4,5P$_2$の合成をコントロールする知見を得られた。即ち低分子量Gタンパク質Rabファミリー因子とPI4,5P$_2$シグナルのクロストークを発見した。この成果から申請者はGenes to Cellsという学術雑誌に筆頭著者として掲載された。

申請者は分裂酵母をモデル生物とし、メンブレントラフィック及びイノシトールリン脂質代謝の

制御因子を同定する目的で、低分子量Gタンパク質であるRho3とYpt3、Ryh1を同定し、機能解析を行った。Rho3のGolgi/endosome間における新たな生理機能、そしてRabによるPI4P5Kの空間的局在制御を見出した。これらの研究成果から、申請者は2報の原著論文を発表しており、博士後期課程学位の要件を満たしている。以上の理由から、博士後期課程学位論文として価値をもつものとする。