



| | |
|--------------|---|
| Title | Rab proteins involved in the rhodopsin transport in Drosophila |
| Author(s) | 佐藤, 明子 |
| Citation | 大阪大学, 1998, 博士論文 |
| Version Type | |
| URL | https://hdl.handle.net/11094/40839 |
| rights | |
| Note | 著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。 |

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

| | |
|---------------|---|
| 氏 名 | 佐 藤 明 子 |
| 博士の専攻分野の名称 | 博 士 (理 学) |
| 学 位 記 番 号 | 第 1 3 6 6 1 号 |
| 学 位 授 与 年 月 日 | 平成10年3月25日 |
| 学 位 授 与 の 要 件 | 学位規則第4条第1項該当 理学研究科生理学専攻 |
| 学 位 論 文 名 | Rab proteins involved in the rhodopsin transport in Drosophila (ショウジョウバエのロドプシン輸送に関与する Rab 蛋白質) |
| 論 文 審 査 委 員 | (主査) 教 授 徳永 史生 (副査) 教 授 河村 悟 教 授 小倉 明彦 |

論 文 内 容 の 要 旨

上皮細胞や神経細胞などが機能的な分極構造を実現するためには、厳密に制御された多方向への蛋白質選別輸送系が必要である。膜蛋白質の細胞内小器官の間や細胞膜表面への輸送は小胞によって媒介されており、そのほとんどには、Rab family と呼ばれる一群の低分子量 GTP 結合蛋白質が必要である。Rab 蛋白質は30種以上存在し、各膜間の融合の特異性の決定に必要なと考えられている。

ショウジョウバエ視細胞は、光受容部位・軸索・lateral membrane の少なくとも3つの異なる領域を持つ極性細胞である。視細胞の形態形成・維持に細胞内輸送系がどのように関与しているのかを明らかにすることを目標として、光受容部位へのロドプシン輸送に関与する Rab 蛋白質を同定し、その変異がもたらす細胞形態への影響を解析した。ショウジョウバエ網膜に発現する Rab 蛋白質の同定と Dominant Negative mutant の作成

網膜に発現する既知の哺乳類 Rab 蛋白質に相同性の高い7種のショウジョウバエ Rab 蛋白質 (DRab1,2,6,8,10,11,14) と、相同性の低い新しい2種の Rab 蛋白質 (DRabRP3,4) についてコード領域全体を含む cDNA を単離しその配列を決定した。更に、これらのうち6種 (DRab1,2,6,10,11,DRabRP4) については、GTP 結合部位の N を I へと変更した変異蛋白質を熱処理によって発現する形質転換体を作成した。この変異蛋白質を過剰発現させることにより、各 Rab 蛋白質の関与する輸送段階を阻害することが期待される。

DRab1 変異体でのロドプシン輸送阻害と視細胞の形態変化

ショウジョウバエオプシンは合成初期には糖鎖を持つ (40k) が、光受容膜への輸送の過程でそれが切断され、最終的には糖鎖を持たない成熟オプシン (35k) となる。DRab1 変異体では、高マンノース型の糖鎖を持つ39k のオプシンが蓄積し、成熟オプシンはほとんど合成されなかった。この変異体の細胞形態を電顕観察し定量した結果、ゴルジ体が小胞の集団へと解体することがわかった。ER からゴルジ体への輸送小胞の融合が阻害された結果、本来ゴルジ体のある周辺に小胞集団が出現したのだろう。これらの結果から、DRab1 が ER からゴルジ体へのロドプシンの輸送に関与していることが分かった。また、DRab1 変異体では40%ほどの視細胞で光受容膜 (ラブドメア) の縮退と ER 膜の異常な増幅が観察され、網膜変性が起こっていた。

その他の DRab 変異体でのロドプシン輸送阻害と視細胞の形態変化

DRab2,11 変異体では、成熟オプシンが合成されたが、同程度の量の36-37k のオプシンの蓄積も観察された。DRab6,10, DRabRP4 変異体では、オプシン輸送に変化はみられなかった。このことから、DRab2,11 は共にオプシ

ン輸送の遅い段階に関与するが、DRab6,10,DRabRP4 はオプシンの輸送に関わらないと考えられた。次に、電子顕微鏡により DRab11 変異体の視細胞の形態を観察した。DRab11 変異体でも DRab1 変異体と同様に数十%の細胞でラブドメアの縮退が見られ網膜変性が起こっていた。さらに、DRab11 の変異体では、TGN の膨潤とラブドメアの変形が起こっていた。このことは、DRab11 が、TGN からラブドメアへの極性輸送に関与することを示している。以上の結果から、DRab2,11 が TGN から光受容部位へのロドプシン輸送に関与する Rab 蛋白質であると考えられた。

これまで、Rab8 が basolateral 面への輸送に関与することが示されているが、apical 面への輸送に関与する Rab は未だ報告されていない。近年、MDCK 細胞の apical 面への HA 輸送には Rab-NSF-SNAP を必要としないことが示され (Cell.1995 81, 571-80)、さらに Raft による輸送モデルが提唱された (Nature. 1997 387, 569-7)。そのため、Rab 蛋白質が apical 面への輸送に関与しないことが定説になりつつある。しかし、ショウジョウバエ視細胞の光受容部位が上皮細胞の apical 面に相当することが示されており (Dev-Biol. 1995 171, 415-33)、本研究によって見いだされたロドプシンの TGN からラブドメアへの輸送に対する DRab2,11 の関与は、apical 面への小胞輸送にも Rab 蛋白質が必要であることを示唆している。

論文審査の結果の要旨

膜蛋白質は小胞体でペプチドが合成され、糖鎖修飾を受け、ゴルジ体を経て、機能する細胞内の特定の場所に輸送される。この輸送の時に低分子量 G 蛋白質である Rab 蛋白質が働くことが分かってきた。佐藤さん提出の論文では、ショウジョウバエより 9 種類の Rab 蛋白質の cDNA をクローン化し、その内 6 種類について変異を入れたショウジョウバエを作り、野生型と、視細胞の形態変化や代表的膜蛋白質であるロドプシンの変化などを比べることによって生体中でのそれら Rab 蛋白質の働きを明らかにした。

これらの知見は一般的な細胞内物質輸送や細胞形態形成・形態維持機構の研究に新たな視点を与えるだけでなく、特に神経細胞についての知見であることから、神経疾患の治療法研究にとって重要な示唆を与えるものである。よって佐藤さん提出の論文は博士（理学）の学位論文として十分価値のあるものと認める。