



Title	Rab11BP/Rabphilin-11, a Downstream Target of Rab11 Small G Protein Implicated in Vesicle Recycling
Author(s)	萬本, 明子
Citation	大阪大学, 2000, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/41838
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、 https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed 大阪大学の博士論文について 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	萬本明子
博士の専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	第15229号
学位授与年月日	平成12年3月24日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 医学系研究科生理系専攻
学位論文名	Rab11BP/Rabphilin-11, a Downstream Target of Rab11 Small G Protein Implicated in Vesicle Recycling (小胞のリサイクリングに関与する低分子量G蛋白質 Rab11 の新規標的蛋白質 rabphilin-11の精製と性状解析)
論文審査委員	(主査) 教授 高井 義美 (副査) 教授 宮坂 昌之 教授 米田 悦啓

論文内容の要旨

【目的】

細胞が運動する際には、その先端部分での細胞外マトリックスとの接着と後方での脱着が繰り返し行われる。この時、インテグリン等の接着分子は、細胞の後方の脱着部位ではエンドサイトーシスされ、その一部は進行方向先端の新たな接着部位に小胞に乗ってリサイクリングされ、細胞膜上に組み込まれると考えられているが、この小胞輸送の制御機構の詳細は明らかではない。このエンドサイトーシスやリサイクリングなどの細胞内小胞輸送は Rab ファミリー低分子量G蛋白質 (Rab) により制御されている。Rab は現在40種類以上のメンバーが見い出されており、それぞれが細胞内の特定の部位での小胞輸送を制御していることが明らかになっている。私共の教室では、Rab の中でエンドサイトーシスを制御する Rab 5 やリサイクリングを制御する Rab11 が、ホルボールエステル刺激による細胞運動をストレスファイバーや接着斑の再構成を介して制御していることを明らかにしている。そこで、本研究では、細胞運動における小胞輸送の役割を明らかにする目的で、小胞のリサイクリングを制御する Rab11 に注目し、その標的蛋白質を同定して単離するとともに、その性状を解析した。

【方法ならびに成績】

1) Rab11 標的蛋白質の単離

Rab11 をグルタチオン S-トランスフェラーゼ (GST) 融合蛋白質として大腸菌で発現させ、精製した。この GST-Rab11 を [³⁵S] GTP γ S を結合させて標識し、これをプローブとした blot overlay 法を用いて、牛大脳細胞質画分より GTP-Rab11 に特異的に結合する140kDa の蛋白質 (p140) を同定した。牛大脳細胞質画分より MonoQ、hydroxyapatite、MonoQ、phenyl-5PW カラムクロマトグラフィーを連続して行い、p140 を高度に精製した。さらに、精製した p140 の部分アミノ酸配列を決定した後、その結果に基づき、ラット脳 cDNA ライブラリーより p140 の cDNA をクローニングしてその一次構造を決定し、rabphilin-11 と命名した。Rabphilin-11 は分子量100,946 で908 個のアミノ酸から構成され、そのN末端領域に poly-proline region を、C末端領域に WD-40 repeat を有していた。

2) Rabphilin-11 の生化学的性状の解析

Rabphilin-11 の N末端領域 (1-631aa) および C末端領域 (632-908aa) をマルトース結合蛋白質 MBP との融合蛋白質として大腸菌で発現させ、精製した。 [³⁵S] GTP γ S-GST-Rab11 blot overlay 法を用いてそれぞれの蛋白質の GTP-Rab11 との結合性を検討した結果、rabphilin-11 の Rab11 結合領域は N末端領域であることが明らか

かとなった。さらに、rabphilin-11はGDP-Rab11には結合せず、GTP-Rab11にのみ特異的に結合し、また他の低分子量G蛋白質であるRab3A、Rab5やRhoAには結合しなかった。

3) Rabphilin-11の組織分布

ノーザンブロット解析の結果、rabphilin-11のmRNAは、検討したラットのすべての組織に普遍的に発現していることが明らかとなった。

4) Rabphilin-11の細胞内局在

GTP-Rab11 (Rab11Q70L) または GDP-Rab11 (Rab11S25N) を発現させたMDCK細胞において、rabphilin-11の局在を免疫蛍光染色法にて検討した。GTP-Rab11を発現させた細胞では、Rab11とrabphilin-11は核周辺領域のおそらくゴルジ体およびリサイクリングエンドゾームに共に局在していた。GDP-Rab11を発現させた細胞ではRab11とrabphilin-11は細胞質全体に存在していた。また、HeLa細胞をfibronectin上で培養すると、ラメリポディアが形成され、微小管がラメリポディアの方向に伸びており、この時GTP-Rab11とrabphilin-11は核周辺領域と微小管に沿って存在した。Rabphilin-11のN末端領域は微小管に沿って存在したが、C末端領域は細胞質全体に存在していた。

5) Rabphilin-11の機能の解析

Rabphilin-11がRab11と同様に小胞のリサイクリングに関与しているか否かをトランスフェリンの取り込みを用いて検討した。Rabphilin-11のN末端領域を発現させたHeLa細胞では、周囲の発現していない細胞と同様にトランスフェリンの核周辺領域への集積が認められたが、C末端領域を発現させた細胞では集積は認められなかった。さらに、rabphilin-11の細胞運動に対する影響を金コロイド法を用いて検討した。Rabphilin-11のC末端領域を発現させたHeLa細胞では細胞運動は抑制されたが、N末端領域または全長を発現させた細胞では抑制されなかった。以上の結果より、rabphilin-11は、小胞のリサイクリングと細胞運動の制御に関与している可能性が示唆された。

【総括】

本研究では、牛大脳細胞質画分から、新規のGTP-Rab11結合蛋白質であるrabphilin-11を見出した。Rabphilin-11はGTP-Rab11に特異的に結合し、MDCK細胞において核周辺領域にGTP-Rab11と共に局在することから、Rab11の標的蛋白質であると考えられた。また、rabphilin-11はRab11と同様に小胞のリサイクリングを制御し、Rab11とともに、運動方向に伸びていく微小管に沿って局在し、細胞運動の制御にも関与している可能性が示唆された。これらの結果からRab11-rabphilin-11系は、おそらく微小管に沿った小胞のリサイクリングの制御を介して細胞運動を制御していると考えられた。今後は、Rab11-rabphilin-11系の作用機構を明らかにすることによって、細胞運動の制御における小胞輸送の役割を明らかにしていく必要がある。

論文審査の結果の要旨

本申請者は、本研究により、低分子量G蛋白質Rab11の新規標的蛋白質rabphilin-11を同定して精製し、そのcDNAをクローニングして一次構造を決定した。また、Rabphilin-11はin vitroの系ではGTP-Rab11に特異的に結合し、細胞内ではGTP-Rab11と共に核周辺領域に局在することを明らかにした。さらに、rabphilin-11はRab11と同様に小胞のリサイクリングを制御すると共に、運動方向に伸びていく微小管に沿って局在し、細胞運動の制御にも関与していることを明らかにした。

本研究は、実験結果自体の意義もさることながら、今後の発展性にも期待できるものがあり、生命科学への貢献度が極めて高い研究であるといえる。したがって、学位授与に十分値すると思われる。