The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Role of Rab5 on Regulated Exocytosis
Author(s)	志水, 英之
Citation	大阪大学, 2003, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/45127
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

【21】

氏　　名	志水英之（しみずひでゆき）
博士の専攻分野の名称	博　士（理　学）
学　位　記　番　号	第　１８２１９　号
学位授与年月日	平成 15 年 12 月 22 日
学位授与の要件	学位規則第４条第１項該当 理学研究科生物科学専攻
学　位　論　文　名	Role of Rab5 on Regulated Exocytosis （開口分泌における Rab5 の役割）
論文審査委員	（主査） 教　授　河村　　悟 （副査） 教　授　金澤　　浩　　教　授　小倉　明彦　　助教授　尾崎　浩一

論文内容の要旨

低分子量 GTP 結合蛋白質の一種である Rab family 蛋白質は、細胞内小胞輸送の制御に重要な役割を担っている。中でも、Rab5 は最もよく研究されている Rab 蛋白質の一つであり、エンドソームに局在して endocytosis を制御することが知られている。Rab5 はシナプス小胞上にも局在しており、シナプス小胞の endocytosis を制御しているのではないかと考えられてきた。しかし、最近、シナプス小胞の再形成にエンドソームは必要ないことが示され、シナプス小胞で果たす Rab5 の役割が、改めて問題となってきた。

この問題を解明するため、私は、ショウジョウバエ視細胞の神経終末を用いた Rab5 の機能阻害実験を行った。まず、ショウジョウバエ視細胞において Rab5 の局在を調べるために、EGFP-Rab5 の発現やショウジョウバエ頭部の細胞分画を行い、Rab5 がエンドソームやシナプス小胞に局在していることを確認した。次に、GTP、GDP に対して共に親和性が低い Rab5N142I を視細胞に発現させた結果、シナプス小胞サイズの増加が観察され、シナプス小胞同士が融合している可能性が考えられた。そこで実際にショウジョウバエ頭部からシナプス小胞を分離し、融合過程の in vitro 再構成実験を行った結果、確かに小胞サイズが増加し、Rab5N142I が小胞同士の融合を引き起こすことが示された。また、このシナプス小胞同士の融合の分子機構には n-Synaptobrevin は関与せず、cAMP シグナル系が関与している可能性が高いことが分かった。Rab5N142I はシナプス小胞の exocytosis や再形成は阻害しなかった。しかし、電気生理学的な解析等から、Rab5N142I の発現により、シナプスにおける正常な信号伝達が抑制されることが分かった。以上の結果から、シナプス小胞上において、Rab5 はシナプス小胞同士の融合に関与しており、その制御が効率的な神経伝達に必須であると考えられた。

上の結果は、視細胞神経終末において、シナプス小胞は Rab5 の制御を受けた compound exocytosis により放出されることを示唆している。そこで私は、compound exocytosis における Rab5 の関与を明らかにするため、ショウジョウバエで Rab5 を発現する神経内分泌細胞様の分泌器官を見出し、ureter gland と名づけた。この細胞を用いて FM 1-43 蛍光色素と Ca^{2+} ionophore による分泌顆粒の可視化方法を確立するとともに、Rab5 が分泌顆粒上に局在していることを明らかにした。次に、それぞれ GDP 結合型および GTP 結合型の変異体である Rab5S43N と Rab5Q88L を発現させ、分泌顆粒の exocytosis に対する効果を調べた。その結果、Rab5 は分泌顆粒と細胞膜の融合には関与せず、分泌顆粒同士の融合を制御していることが明らかとなった。さらに詳細な微細構造学的解析などにより、

Rab5Q88L の発現が顕著な compound exocytosis を引き起こしていることを示した。最後に、3 齢幼虫の神経筋接合部の神経終末についても、FM 1-43 を用いてシナプス小胞の exocytosis と endocytosis における Rab5 の機能を検討した。その結果、やはり Rab5 が endocytosis ではなく exocytosis を制御していることが示された。

以上の結果から、Rab5 は、compound exocytosis における分泌顆粒同士の融合を制御する重要な役割を担っていることが分かった。この融合の制御は Rab5 のグアニンヌクレオチド結合状態によって行われている。一方、シナプス小胞の exocytosis においても分泌顆粒の場合と同様に、Rab5 がシナプス小胞同士の融合を制御していることが明らかとなり、compound exocytosis による神経伝達物質の放出が実際に行われていることが強く示唆された。

論文審査の結果の要旨

本論文は、開口分泌における Rab5 の役割について行われた研究である。

ショウジョウバエ視細胞において Rab5 の局在を調べ、Rab5 が視細胞終末のエンドソームやシナプス小胞に局在していることを確認した。次に、GTP、GDP に対して共に親和性が低い Rab5N142I を視細胞に発現させた結果、シナプス小胞サイズの増加が観察され、シナプス小胞同士が融合している可能性が考えられた。そこで実際にショウジョウバエ頭部からシナプス小胞を分離し、融合過程の in vitro 再構成実験を行った結果、確かに小胞サイズが増加し、Rab5N142I が小胞同士の融合を引き起こすことを示した。また、このシナプス小胞同士の融合の分子機構には n-Synaptobrevin は関与せず、cAMP シグナル系が関与している可能性が高いことを明らかにした。Rab5N142I はシナプス小胞の exocytosis や再形成は阻害しなかった。しかし、電気生理学的な解析等から、Rab5N142I の発現により、シナプスにおける正常な信号伝達が抑制されることが分かった。以上の結果から、シナプス小胞上において、Rab5 はシナプス小胞同士の融合に関与しており、その制御が効率的な神経伝達に必須であることを示した。

上の結果により、視細胞神経終末において、シナプス小胞は Rab5 の制御を受けた compound exocytosis により放出されることを想定し、compound exocytosis における Rab5 の関与を明らかにするため、ショウジョウバエで Rab5 を発現する神経内分泌細胞様の分泌器官を見出し、ureter gland と名づけた。この細胞を用いて FM 1-43 蛍光色素と Ca^{2+} ionophore による分泌顆粒の可視化方法を確立するとともに、Rab5 が分泌顆粒上に局在していることを明らかにした。次に、それぞれ GDP 結合型および GTP 結合型の変異体である Rab5S43N と Rab5Q88L を発現させ、分泌顆粒の exocytosis に対する効果を調べた。その結果、Rab5 は分泌顆粒と細胞膜の融合には関与せず、分泌顆粒同士の融合を制御していることを明らかにした。さらに、Rab5Q88L の発現により、顕著な compound exocytosis が引き起こされていることを示した。最後に、3 齢幼虫の神経筋接合部の神経終末についても、FM 1-43 を用いてシナプス小胞の exocytosis と endocytosis における Rab5 の機能を検討した。その結果、やはり Rab5 が endocytosis ではなく exocytosis を制御していることを明らかにした。

以上の結果から、Rab5 は、compound exocytosis における分泌顆粒同士の融合を制御する重要な役割を担っていることが明らかになった。この融合の制御は Rab5 のグアニンヌクレオチド結合状態によって行われている。一方、シナプス小胞の exocytosis においても分泌顆粒の場合と同様に、Rab5 がシナプス小胞同士の融合を制御していることが明らかとなり、compound exocytosis による神経伝達物質の放出が実際に行われていることが強く示唆された。

以上のように本研究は神経筋接合部や分泌器官における Rab5 の役割を明らかにし、開口分泌のメカニズム研究に大きく寄与するものである。よって本論文は博士論文に値すると認める。