The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	GTP Hydrolysis by the Rho Family GTPase TC10 Promotes Exocytic Vesicle Fusion
Author(s)	川瀬, 一穂
Citation	大阪大学, 2007, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/48943
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

【58】

氏　　名	川　瀬　一　穂（かわせ　かずほ）
博士の専攻分野の名称	博　士（医　学）
学　位　記　番　号	第　２１６１６　号
学位授与年月日	平成 19 年 10 月 18 日
学位授与の要件	学位規則第４条第２項該当
学　位　論　文　名	GTP Hydrolysis by the Rho Family GTPase TC10 Promotes Exocytic Vesicle Fusion （小胞輸送における Rho ファミリーG タンパク質 TC10 の GTP 水解反応に関する研究）
論　文　審　査　委　員	（主査） 教　授　髙倉　伸幸 （副査） 教　授　目加田英輔　　教　授　岡田　雅人

論　文　内　容　の　要　旨

〔　目　　的　〕

小胞輸送は生命活動において大変重要な役割を担っており、今日までにその経路に関与する様々な因子が同定されている。特に、単量体 G タンパク質である Rab や Arf が重要な役割を果たしていることが明らかにされ、様々な手法によってそのメカニズムが調べられている。また最近では、主に細胞骨格、遺伝子発現および細胞増殖の制御に関わるとされてきた Rho ファミリーG タンパク質の小胞輸送への関与も明らかになりつつある。Rho ファミリーG タンパク質の一員である TC10 は、脂肪細胞におけるインシュリン刺激依存的なグルコーストランスポーター４（GLUT4）のエキソサイトーシスへの関与について詳細に研究されている。また、嚢胞性繊維症の原因遺伝子である嚢胞性繊維症膜貫通調節因子や、記憶に関与する AMPA 型グルタミン酸受容体の細胞膜への輸送への関与も示唆されている。しかし、Rab や Arf とは異なり、TC10 の活性が小胞輸送の過程でどのような制御を受けているかはほとんど明らかになっていない。このメカニズムを解明することにより、糖尿病などの疾患について重要な知見を得ることができ、ひいては治療薬の開発にも貢献することが期待される。そこで TC10 活性の小胞輸送過程での制御メカニズム解明を目的として本研究を行った。

〔　方法ならびに成績　〕

単量体 G タンパク質である TC10 は、他の Rho ファミリーのメンバーと同様に、GTP 結合型と GDP 結合型の２つの形態をとり、分子スイッチとして働く。そこで、細胞内における TC10 の時空間的な活性変化をモニターするために、FRET モニター分子 Raichu-TC10 を作成した。Raichu-TC10 は、緑色蛍光タンパク質（GFP）の変異体であるシアン蛍光タンパク質（CFP）と黄色蛍光タンパク質（YFP）で TC10 とそのエフェクターをはさんだ構造を持つ。また、Raichu-TC10 はその分子内の TC10 の活性変化に伴って CFP と YFP 間での蛍光共鳴エネルギー移動（FRET）の効率に変化が生じるようにデザインされている。このプローブの FRET 効率を計測することで、TC10 が生細胞内において GDP 結合型と GTP 結合型のどちらの形態をとっているかを知ることができる。Raichu-TC10 を発現させた培養細胞を蛍光顕微鏡で観察し、TC 活性の分布を調べたところ、細胞膜に存在する TC10 は GDP 結合型が主であるであるのに対して、小胞上ではより GTP 結合型が多いことがわかった。次にこの活性の変化がいつどこで起きる

のかを調べるために、Raichu-TC10 を発現させた培養細胞を全反射蛍光顕微鏡を用いて高速で観察した。その結果、輸送小胞が細胞膜に融合する直前に、TC10 が GTP 結合型から GDP 結合型へと変換していることが明らかになった。またこの GTP 水解反応は細胞膜のごく近傍で p190RhoGAP-A によって引き起こされていることがわかった。さらに、TC10 の恒常活性型変異体および優勢劣性型変異体の過剰発現により、TC10 の存在する小胞が細胞膜へ融合する回数が減少した。RNA 干渉法による TC10 や p190RhoGAP-A のノックダウンによっても融合の回数が減少することがわかった。以上のことから、TC10 の加水分解は輸送小胞の細胞膜への融合に必要であることが明らかになった。

〔 総　　括 〕

本研究で開発した FRET プローブにより、TC10 の時空間的な活性変化を捉えることができた。輸送小胞上の単量体 G タンパク質の活性変化を検出したのは世界で初めてのことである。またこのプローブを使った解析により、輸送小胞の細胞膜への融合には TC10 の加水分解が必要であり、これは GTP 水解反応促進因子である p190RhoGAP-A によって引き起こされていることが明らかになった。活性型 TC10 が結合する分子のひとつは Exocyst 複合体の構成要素である Exo70 である。輸送小胞が細胞膜に融合する以前にその小胞は細胞膜につなぎとめられる必要があり、Exocyst 複合体はその過程に重要な役割を果たすことが知られている。以上のことから、小胞融合前に起こる TC10 の加水分解は p190RhoGAP-A によって促進され、その水解によって TC10 から解離した Exo70 が構造変化を起こして、さらに Exocyst 複合体の会合状態の変化を引き起こし、それが引き金となって小胞が融合の段階へ進むというモデルを提唱している。

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

小胞輸送は生命活動において大変重要な役割を担っており、その経路には様々な遺伝子が関与することが知られている。Rho ファミリーG タンパク質の一員である TC10 は分子の細胞膜への輸送（エキソサイトーシス経路）に関与すると考えられているが、その詳細な機能とメカニズムは明らかになっていない。そこで細胞内の TC10 の活性制御をモニターできるプローブ Raichu-TC10 を作成し、TC10 の機能解明を目的として研究を行った。その結果、TC10 は細胞内の輸送小胞上において活性が高く、エキソサイトーシス経路の最終段階である輸送小胞が細胞膜へと融合する現象の直前に TC10 の活性低下が必要であることが明らかになった。本研究結果に基づき TC10 は小胞融合過程のトリガーとして機能すると考えられた。本研究成果は、インシュリン刺激依存的なグルコーストランスポーター（GLUT4）などの膜輸送に関わる重要な知見であり、糖尿病などの治療薬開発に今後寄与しうると評価され、博士（医学）の学位授与に値すると考えられる。