

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、 〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉 大阪大学の博士論文について 〈/a〉 をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

氏名	かわせ 川瀬 かず一 穂
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 高倉 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が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、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。