OUKA
The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	ヒトRME-8の機能解析
Author(s)	藤林, 明美
Citation	大阪大学, 2008, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/49706
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

【6】

氏名	藤林明美（ふじばやしあけみ）
博士の専攻分野の名称	博士（理学）
学位記番号	第 22382 号
学位授与年月日	平成20年6月23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	ヒトRME-8の機能解析
論文審査委員	（主査） 教授 関口 清俊 （副査） 教授 岡田 雅人　教授 小倉 明彦　教授 吉森 保

論文内容の要旨

真核生物の細胞は、高度に発達した細胞内膜系を利用してエンドサイトーシスと呼ばれる細胞外からの物質の取り込みを行っている。エンドサイトーシスは、単なる栄養摂取だけでなく、細胞表面の受容体の発現量調節や細胞極性の維持など多細胞システムの構築や維持にも深く関わっている。RME (receptor-mediated endocytosis)-8 は、卵黄蛋白質の摂取ができない線虫変異体の遺伝学的解析より同定された蛋白質で、様々なタイプの細胞のエンドサイトーシスに関与している。線虫だけでなく、ショウジョウバエ、シロイヌナズナでもそのホモログは存在し、正常な発生や生存に必要であることが報告されている。しかし、これらの RME-8 がエンドサイトーシスのどの段階で機能しているかについては未だ不明な点が多い。そこで本研究では、報告数の少ないヒトの RME-8 に着目し、この蛋白質の完全長 cDNA をクローニングするとともに細胞分画法や免疫蛍光法を用いて、ヒト RME-8 の細胞内局在を解析した。また、発現抑制の系や欠失変異体の発現系を構築して、この蛋白質のエンドサイトーシスにおける機能の解析を行った。

RT-PCR および 5'-RACE 法を用いてヒト RME-8 の完全長 cDNA をクローニングした結果、この蛋白質は 2243 アミノ酸残基からなり、他の RME-8 と同様、分子中央部に DnaJ ドメインをもつことが判明した。細胞分画法等を用いてヒト RME-8 の生化学的な性質を調べたところ、この蛋白質は膜に強く結合する膜表在性蛋白質であり、N 末端側 453 残基に膜結合領域が存在することが分かった。

次に、免疫蛍光法や免疫電顕法を用いてヒト RME-8 の細胞内局在について調べた結果、ヒト RME-8 は初期エンドソーム様の構造に局在し、初期エンドソームマーカーと一部共局在するが、後期エンドソームマーカーとは共局在しなかった。また、小胞輸送を制御している Rab1～11 の活性化型変異体を発現させ、ヒト RME-8 の局在が変化するかを調べた。その結果、ヒト RME-8 は Rab5 の活性化型変異体、Rab5aQ79L の発現によって生じる肥大化したエンドソームに局在するが、他の Rab 変異体ではそのような影響は観察されず、ヒト RME-8 は主に初期エンドソームに局在して機能している可能性が示唆された。

そこで、合成した siRNA を細胞に導入してヒト RME-8 の発現を抑制し、エンドソームマーカーの局在やリガンドの取り込み等に影響がないかを調べた。しかし、ヒト RME-8 の発現を抑制してもエンドソームマーカーの局在に変化はなく、EGF や transferrin の輸送にも著しい影響は観察されなかった。ところが、ヒト RME-8 及びその欠失変異体を細胞に発現させたところ、野生型及び N 末端側領域を欠失した変異体ではエンドサイトーシスへの影響は特に観察されなかったが、C 末端側 425 残基を欠失した変異体では細胞内に非常に大きな空胞が形成され、EGF や transferrin の取り込みが阻害された。また、C 末端側半分を欠失した変異体では、初期エンドソーム様の小胞が肥大化し、EGF や transferrin の初期エンドソームからの輸送が遅延していることが示された。

以上の結果より、ヒト RME-8 は N 末端側領域を介して主に初期エンドソームに局在し、C 末端側領域で初期エンドソームから後期エンドソームあるいはリサイクリングエンドソームへの膜輸送に関与していると考えられる。

論文審査の結果の要旨

藤林明美君は、卵黄蛋白質の摂取ができない線虫の変異体から同定された蛋白質RME (receptor-mediated endocytosis)-8のヒトオルソログの全長cDNAをクローニングし、これが2,243アミノ酸残基からなる膜表在蛋白質であり、初期エンドソームを介する膜輸送に関わる蛋白質であることを様々な生化学的および細胞生物学的手法を駆使して明らかにした。また、N末端領域およびC末端領域を欠失させた様々な変異RME-8の強制発現系を用い、ヒトRME-8がN末端領域で膜に結合することを示すとともに、C末端領域を欠失したRME-8変異体が初期エンドソームを介する膜輸送に対して強いdominant-negative効果を発揮することを初めて明らかにした。研究背景の理解、研究遂行における自主性および独自性、プレゼンテーションの明快さのいずれにおいても、申請者は博士の学位に値する十分なレベルに達していると判断された。よって、本論文は博士（理学）の学位論文として十分な価値があるものと認める。