

Title	The DHR1 domain of DOCK180 binds to SNX5 and regulates cation-independent mannose 6-phosphate receptor transport
Author(s)	原, 重雄
Citation	大阪大学, 2008, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/49896
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	原 重 雄
博士の専攻分野の名称	博士 (医学)
学位記番号	第 22458 号
学位授与年月日	平成 20 年 9 月 25 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当 医学系研究科予防環境医学専攻
学位論文名	The DHR1 domain of DOCK180 binds to SNX5 and regulates cation-independent mannose 6-phosphate receptor transport (DOCK180 の DHR1 ドメインは SNX5 に結合し、カチオン非依存性マンノース 6 リン酸受容体輸送を制御する)
論文審査委員	(主査) 教授 高倉 伸幸 (副査) 教授 吉森 保 教授 岡田 雅人

論文内容の要旨

〔目的〕

DOCK180 はアダプター分子 Crk に結合する蛋白質として同定された。DOCK180 の N 端および C 端には SH3 ドメインならびにプロリンに富んだ領域があり、前者には ELMO が、後者には Crk が結合し、DOCK180 の機能を制御している。これらの領域の他に DOCK Homology Region (DHR)-1 および -2 と呼ばれる領域が DOCK ファミリーで保存されている。DHR2 は低分子量 G 蛋白質 Rac の活性化を担うことが明らかになっている。一方、DHR1 はイノシトール三リン酸に結合し DOCK180 を細胞膜へ局在させる機能を持つことが報告されているが、結合蛋白質はこれまでのところ明らかにされていない。DHR1 の新規結合蛋白質を探索することで、DOCK180 の新たな機能を検討することを目的とした。

〔方法ならびに成績〕

293T 細胞に FLAG-DHR1 を発現させ、抗 FLAG 抗体による免疫沈降・液体クロマトグラフ・質量分析により結合蛋白を解析したところ、Sorting nexin (SNX) 1, 2, 5, 6 が同定された。293F 細胞における過剰発現の系を用いて以下のことを確認した。1) SNX1, 2, 5, 6 のうち SNX5 が DHR1 と強固に結合する。2) SNX1, 2, 6 は SNX5 とのオリゴマー形成により DHR1 と間接的に結合する。3) SNX5 は全長 DOCK180 とも結合し、DOCK ファミリー蛋白の中では DOCK180 のみと結合する。4) SNX5 は 3 つのヘリックスから成る BAR 領域と PH 領域を持つが、BAR 領域の最初のヘリックスが DHR1 との結合に必要である。なお、SNX5 と DHR1 が直接結合することは、大腸菌で作製した蛋白質を用いて確認した。SNX5 はエンドソームに局在し、DOCK180 は細胞質に主として存在することから通常の方法ではその共局在は示せなかった。そこで、細胞を固定する前にサポニン処理することで細胞質の過剰の DOCK180 蛋白質を除去したのちに観察すると、エンドソーム上で

両者が共局在することが確認できた。

次にこの SNX5 と DOCK180 複合体の生理的意義につき研究した。SNX5 はレトロマーと呼ばれる蛋白質複合体を形成し、エンドソームからトランスゴルジ装置(TGN)への輸送を司ると報告されている。そこで、この経路を介して輸送されるカチオン非依存性マンノース 6 リン酸受容体 (CI-MPR) の輸送を調べることで DOCK180 が機能的に SNX5 と関連があるか否かを検討した。CI-MPR の細胞内領域と CD8 細胞外領域との融合蛋白 CD8-CI-MPR を発現する HeLa 細胞 (HeLa M 細胞) を、抗 CD8 抗体で染色することで CD8-CI-MPR の局在を観察する系を用いた。RNA 干渉法により DOCK180 および SNX5 をノックダウン(KD)すると、定常状態では TGN に局在する CD8-CI-MPR はエンドソームに再分布した。その細胞の割合は DOCK180 KD では 36.8 ± 4.2%、SNX5 KD では 52.6 ± 1.1% であった。次に細胞表面からの CD8-CI-MPR 取り込みを計測すると、取り込み開始後 30 分で取り込みされる CD8-CI-MPR の量に変化はないが、TGN に運ばれる相対量はコントロール細胞を 100% とすると、DOCK180、SNX5 KD 細胞ではそれぞれ 75.5 ± 4.2%、66.8 ± 7.0% だった。以上の CD8-CI-MPR の局在・動態の変化は Rac1 のノックダウンでは認められず、また、DOCK180 KD 細胞に DHR1 のみを再発現させることで CD8-CI-MPR の局在が回復したことから、SNX5 を介した機能は Rac や Crk の結合から独立していることがわかった。最後に、SNX5 やイノシトールリン酸に結合できない DOCK180 の変異体を再発現させても CD8-CI-MPR の局在変化を回復できないことも明らかにした。また、SNX5 単独ではイノシトールリン酸に結合しないが、DOCK180 を共発現させると結合することも観察した。以上のデータをもとに、脂質と SNX5 との結合を仲介することにより、DOCK180 は CI-MPR の輸送を制御する、というモデルを提唱した。

〔総括〕

DOCK180 の DHR1 の結合蛋白質として SNX5 を同定した。SNX5 と DOCK180 の結合は、両者をノックダウンした際に CD8-CI-MPR の局在変化が誘導されることから、機能的にも関連していることを明らかにした。更に、DOCK180 が関与する CD8-CI-MPR の輸送は、Crk や Rac の機能とは独立しているが、脂質結合能とは関連があることも明らかにし、エンドソームにおける DOCK180 の新たな機能を提唱することが出来た。

論文審査の結果の要旨

DOCK180 は癌遺伝産物 Crk の結合蛋白質として発見された、低分子量 G 蛋白質 Rac の活性化因子である。DOCK180 関連分子群で保存されている 2 つの DOCK Homology Region (DHR) のうち DHR2 は Rac を活性化する機能を有しているが、DHR1 の機能は不明であった。そこで本研究では、DHR1 の結合蛋白質を検索し、Sorting nexin (SNX) 5 を同定した。さらに、DOCK180 は SNX5 と協同して、カチオン非依存性マンノース 6 リン酸受容体のエンドソームからトランスゴルジへの輸送に必要であることを証明した。この機能には、Crk や Rac は関与しないが、DOCK180 のリン脂質への結合が必要であった。DOCK180 が小胞輸送を制御すること、および Rac や Crk を介さない DOCK180 の機能についての報告は初めてである。これによって DOCK180 分子の機能解析における新たな展開が始まったといえる。よって、本論文は学位の授与に値すると考えられる。