

## エンドサイトーシスにおける低分子量Gタンパク質 Arf6の新奇活性化機序の解明

著者	岡田 理沙
発行年	2015
学位授与大学	筑波大学 (University of Tsukuba)
学位授与年度	2014
報告番号	12102甲第7420号
URL	<a href="http://hdl.handle.net/2241/00126039">http://hdl.handle.net/2241/00126039</a>

氏名（本籍）	岡田 理沙
学位の種類	博士（医学）
学位記番号	博甲第 7420 号
学位授与年月	平成 27 年 3 月 25 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
審査研究科	人間総合科学研究科
学位論文題目	エンドサイトーシスにおける低分子量 G タンパク質 Arf6 の新奇活性化機序の解明

主査	筑波大学教授	医学博士	加藤 光保
副査	筑波大学准教授	博士（医学）	渋谷 和子
副査	筑波大学准教授	博士（医学）	松坂 賢
副査	筑波大学講師	博士（理学）	小林 麻己人

## 論文の内容の要旨

### （目的）

クラスリン依存性エンドサイトーシスは生物種・細胞種を問わず広範にみられる生理現象であり、これらに関与するエンドサイトーシス分子はきわめて多彩である。ダイナミン 2 (Dyn2) は陥入した小胞の首の部分にらせん状に集合し、GTP 加水分解活性により構造変化を介して、陥入した小胞をくびり取る。この Dyn2 によるエンドサイトーシスの遂行にはアクチン細胞骨格の再構築が重要な役割をしていることが報告されている。エンドサイトーシスの機構は近年急速に解明が進んでおり、ダイナミンによる細胞膜のくびりとりメカニズムも盛んに解析されているが、どのようにエンドサイトーシスが細胞膜直下のアクチン細胞骨格と相互接続されているのかはほとんど知られていない。この問題を明らかにするために、Dyn2 がアクチン細胞骨格の再構築を活性化する Arf6 の機能に及ぼす影響を解析した。低分子量 G タンパク質である Arf6 はクラスリン依存性エンドサイトーシス、アクチン細胞骨格の再構築において重要な役割をもっている。しかしながら、Arf6 と Dyn2 の機能的な相互作用は不明であった。そこで、本研究では、これらの分子が機能的に相互作用するかどうかを検討した。

### （対象と方法）

HeLa 細胞、HEK293T 細胞を用いた生化学的・分子細胞生物学的解析を主として、Arf6 とダイナミンとの機能的な相互作用を探索した。Dyn2 と Arf6 の結合、Dyn2 と Arf6 のグアニンヌクレオチド交換因子 (GEF) である EFA6 (A-D) との結合、EFA2 (A-D) の発現解析と EFA6 (B, D) ドミナント

ネガティブ変異体の発現による Arf6 の活性化抑制等による Arf6GEF の同定、細胞内局在の免疫蛍光染色による観察、クラスリン依存性トランスフェリンの取り込みに対する EFA6 ノックダウンの影響の解析を行って、Dyn2 と Arf2 の機能的関連を検討した。

#### (結果)

Dyn2 の過剰発現によって Arf6 が顕著に活性化することを見いだした。一方、Dyn2 の GTPase 活性欠損変異体 K44A の過剰発現では Arf6 の活性化は起こらなかった。7 つある Arf6 特異的な GEF のうち、EFA6A、EFA6B、EFA6D は特異的に Dyn2 と相互作用することが示された。さらに、EFA6B と EFA6D の優性不活性化変異体の過剰発現により Dyn2 による Arf6 の活性化は完全に阻害されることを見いだした。これらのことから、EFA6 が Dyn2 による Arf6 の活性化を媒介していることが示された。最後に、EFA6B または EFA6D のノックダウンおよび EFA6B の Dyn2 結合部位ペプチドの過剰発現により、クラスリン依存性エンドサイトーシスのマーカーの 1 つであるトランスフェリンの取り込みが抑制されることを見いだした。このことから少なくとも部分的に、Dyn2 は EFA6B および EFA6D 依存的に Arf6 の活性化に関与することでクラスリン依存性エンドサイトーシスに携わることが示唆された。

#### (考察)

本研究により、クラスリン依存性エンドサイトーシスにおいて Dyn2 が EFA6 を介して Arf6 を活性化することを見いだした。Dyn2 は EFA6A、EFA6B、EFA6D と相互作用することが免疫沈降実験により確認され、さらに免疫細胞染色によってこの相互作用が細胞膜で検出されることを明らかにした。また、クラスリン依存性エンドサイトーシスの 1 つであるトランスフェリンのエンドサイトーシスは EFA6B または EFA6D のノックダウン、および EFA6B のダイナミン結合阻害ペプチドの過剰発現により顕著に抑制されることを示した。加えて、Dyn2 の K44AGTPase 活性欠損変異体を過剰発現した際には、Arf6 の活性化が見られなかったことから、Arf6 の活性化には Dyn2 の GTPase 活性が必須であることを明らかにした。

ダイナミンは EFA6 と結合し、GTPase 活性に伴う構造変化により、EFA6 の GEF 活性を制御して Arf6 の活性を制御し、クラスリン依存性エンドサイトーシスを制御していることが考えられる。一方、ダイナミンによるエンドサイトーシスの遂行にはアクチン細胞骨格の再構築が必要であるという報告もあり、このことから Arf6 の下流で起こるアクチン細胞骨格の再構築がダイナミンの活性を制御してエンドサイトーシスを活性化するというポジティブフィードバック制御の可能性も示唆される。

#### (結論)

エンドサイトーシス後期にクラスリン被覆小胞のネック部分に集合した Dyn2 は、EFA6B/EFA6D と相互作用し、Arf6 を活性化する。活性化された Arf6 は脂質代謝酵素である PIP5K や PLD を介して、アクチン細胞骨格の再構築を促進し細胞膜の変形をもたらすことで、Dyn2 によるクラスリン依存性エンドサイトーシスを支持するという機能ループの存在が示唆される。

## 審査の結果の要旨

(批評)

本研究は、エンドサイトーシスのエフェクター分子として知られているダイナミンが Arf6 と Arf6 のグアニンヌクレオチド交換因子 (GEF) である EFA6 (B, D) との結合し、Arf6 の活性化を誘導することで、ダイナミンによるエンドソームのくびりとりに必要なアクチン細胞骨格の再構成を誘導するという機能ループの存在を示した点で独創性のある優れた発見を行った研究であると判断された。

平成 27 年 1 月 7 日、学位論文審査委員会において、審査委員全員出席のもと論文について説明を求め、関連事項について質疑応答を行い、最終試験を行った。その結果、審査委員全員が合格と判定した。

よって、著者は博士 (医学) の学位を受けるのに十分な資格を有するものと認める。