

氏名(本籍)	篠塚千早(東京都)
学位の種類	博士(理学)
学位記番号	博乙第1872号
学位授与年月日	平成14年11月30日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
審査研究科	生物科学研究科
学位論文題目	A Study on Function of BIG2,a Guanine Nucleotide Exchange Factor for ADP-ribosylation Factors (ADPリボシル化因子のグアニンヌクレオチド交換因子BIG2の機能に関する研究)
主査	筑波大学教授 農学博士 田仲可昌
副査	筑波大学教授 理学博士 山根國男
副査	筑波大学教授 理学博士 沼田治
副査	金沢大学教授 医学博士 中山和久

論文の内容の要旨

真核細胞のオルガネラ間のタンパク質輸送は、コートタンパク質複合体により覆われた輸送小胞を介して行われる。分泌タンパク質や細胞膜タンパク質、リソソームタンパク質などは、小胞体で合成された後にゴルジ体を経てトランスゴルジネットワーク(TGN)で選別され、目的の場所へと輸送される。輸送小胞はコートタンパク質の種類により分類され、様々な輸送過程に関与する。COPIコート小胞はゴルジ体から小胞体への逆行輸送、クラスリン/AP-1コート小胞やGGAコート小胞はTGNからエンドソームへの輸送に関与すると考えられる。低分子量GTPaseのADPリボシル化因子(ARF)は、GDP結合型から活性を有するGTP結合型へと変換されることによりコートタンパク質のオルガネラ膜上への集合を促し、輸送小胞の形成を調節する。ARFのGDP型からGTP型への変換はグアニンヌクレオチド交換因子(ARF-GEF)により触媒される。ARF-GEFはいずれも分子の中心部分に触媒活性に必須なSec7ドメインを有する。ARF-GEFはその大きさや機能から2つのグループに分類される。高分子量型に分類されるBIG1、BIG2、GBF1は約200kDaで、抗生物質ブレフェルジンA(BFA)に感受性で、主としてゴルジ体領域で機能すると予想される。約40kDaの低分子量型ARF-GEFはBFAに対して非感受性で、主として細胞膜付近で機能する。

本研究は、まだ機能のわかっていなかったBIG2に注目して機能解析をすることにより、輸送小胞形成の調節機構を明かにすることを目的とした。

酵母Sec7pのSec7ドメインの配列をもとにして作製したプローブを用いてヒト肝臓cDNAライブラリーをスクリーニングすることにより、1785アミノ酸からなるBIG2全長をカバーするcDNAをクローニングした。ノーザンブロット解析により、BIG2のmRNAはすべての組織で発現しており、BIG2が細胞にとって基本的な機能を果たしていることを示唆した。蛍光抗体法で細胞内局在を調べたところ、BIG2はゴルジ体領域に存在することが明らかになった。

次に、BIG2の機能を調べるために、BIG2を過剰発現させた細胞をBFA処理した時のBIG2や種々のオルガネラマーカーの局在の変化を調べた。細胞をBFA処理すると、BFAがARF-GEF活性を阻害するために、ARF1およびCOPIやAP-1などのコートタンパク質のゴルジ体膜上への集合が阻害され、結果的としてこれらのコートタンパク質は細胞質へと遊離するとともに、ゴルジ体やTGNの膜が管状化することが知られている。過剰発現させた

BIG2はTGN付近に局在したが、BFA処理するとTGNを起点とした管状構造に局在するようになった。この管状構造の形成は、微小管重合阻害剤ノコダゾールにより阻害されることから、微小管に沿って形成されることが明らかになった。興味深いことに、このBIG2陽性の管状構造にはARF1も共局在した。さらに、BFAによるAP-1のTGN膜からの遊離はBIG2過剰発現により阻害され、AP-1も管状構造に共局在した。これに対して、COPIのゴルジ体膜からの遊離は抑制されなかった。

さらに、BIG2のSec7ドメインに点突然変異を導入したドミナント・ネガティブ変異体を作製し、細胞に対する効果を調べた。このBIG2変異体は野生型とは異なり、BFA処理をしなくてもTGNを起点とする管状構造に局在した。この際に、AP-1およびGGAはTGN膜から遊離したが、COPIのゴルジ体膜からの遊離は観察されなかった。

以上のような観察結果から以下のことが示唆された。

- 1) BIG2はARF1の活性化を介してTGN膜へのAP-1やGGAの集合を促進するが、COPIのゴルジ体膜への集合には関与しない。
- 2) BFAによるコートタンパク質の膜からの遊離と、TGN膜の管状化は必ずしも共役した現象ではなく、BFAの標的がARF-GEF以外にも存在することを示唆する。

審 査 の 結 果 の 要 旨

本研究では、ARF-GEFのひとつBIG2の細胞内での機能について解析している。様々な工夫をこらした実験により、BIG2がARF1の活性化を介して、TGNでのAP-1コート小胞やGGAコート小胞の形成を調節するが、ゴルジ体でのCOPIコート小胞の形成には関与しないことを証明するとともに、阻害剤BFA処理により観察されるコートタンパク質の膜からの遊離とTGN膜の管状化が共役した現象ではないことを明らかにした点が高く評価できる。この結果は、細胞内小胞輸送の研究分野に今後大きな貢献をするものと期待される。

よって、著者は博士（理学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。