

氏名(本籍)	戸田 恭子(東京都)		
学位の種類	博士(学術)		
学位記番号	博甲第2,052号		
学位授与年月日	平成11年3月25日		
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当		
学位論文題目	Studies on Structure and Function of Small GTP-binding Protein, ARF (低分子量GTP結合タンパク質ARFの構造と機能に関する研究)		
主査	筑波大学教授	農学博士	村上 和雄
副査	筑波大学教授	Ph. D. (理学)	多比良 和誠
副査	筑波大学教授	農学博士	馬場 忠
副査	筑波大学助教授	医学博士	中山 和久

論文の内容の要旨

ADP-ribosylation factor (ARF) は、低分子量GTP結合タンパク質のファミリーの1つである。これまでに、哺乳類で6種類のARF (ARF1-ARF6) が同定され、構造によって3つのクラスに分類されている。6種類の中でも、ARF1とARF6については比較的研究が進んでいる。ARF1は、細胞質内に不活性なGDP結合型として存在するが、活性型であるGTP型に変換されるとゴルジ体膜に結合し、COP Iコートタンパク質複合体の膜への結合を引き起こすことにより輸送小胞の形成を促進する。一方、ARF6は、細胞膜やエンドソームに局在し、エンドサイトーシス小胞の細胞膜へのリサイクルに関わっていると考えられている。しかしながら、他のARFの機能についてはほとんど調べられていない。本研究では、各ARFの機能を明らかにするために以下の研究を行った。

マウス脳のcDNAライブラリーから、これまでに哺乳類で知られている6種類すべてのARFのcDNAをクローニングした。これらのARFのアミノ酸配列は、哺乳動物間で高度に保存されていた。また、ノーザン・ブロット解析を行い、この6種類のARFのmRNAが、調べたかぎり全てのマウスの組織および培養細胞株に発現していることを示した。この高度なアミノ酸配列の保存性とmRNA発現の普遍性は、この6種類のARFが、細胞内で基本的かつ重要な働きをしていることを示唆している。

さらに各ARFの細胞内局在を調べるため、HAタグをC末端に結合させた各ARFを、培養細胞で発現させた。間接蛍光抗体法で観察したところ、ARF1とARF2は主としてゴルジ体に、ARF3とARF4とARF5はゴルジ体様構造と細胞質に、ARF6は細胞膜付近に局在することが明らかになった。

ARFの機能を解析するために、活性型の変異体(Q71L)を作製した。この変異を導入したARF1, ARF3, ARF5を培養細胞で発現させ、間接蛍光抗体法により観察した。変異型ARF1は、ゴルジ体膜への強い結合を示した。野生型では細胞質中に大部分が観察されるARF3とARF5の変異体もARF1と同様に、ゴルジ体への結合が見られた。

さらにARF3とARF5の機能を解析するため、brefeldin A (BFA) を用いて詳細に検討した。BFAはARF自身やコートタンパク質を膜から遊離させ、ゴルジ体の構造の崩壊を引き起こす薬剤である。ARF1, ARF3, ARF5の変異体を導入した細胞をBFAで処理して、ARFやCOP Iコートタンパク質複合体の構成タンパク質の1つである β -COPの局在の変化を観察した。ARF1の変異体を導入した細胞では、ARF1自体は膜に結合したままで、 β -COPの遊離も起こらなかった。また、ゴルジ体のマーカータンパク質であるmannosidase IIの局在にも変化

は起きず、BFAによるゴルジ構造の崩壊も起こらないことが明らかになった。ARF3またはARF5の変異体が導入された細胞においても、 β -COPの遊離はARF1と同様に抑制された。しかし、ARF3やARF5自体はBFA処理により細胞質に散ってしまう様子が観察された。さらにmannosidase IIとの二重染色により、ARF3やARF5の変異体は、ゴルジ膜から遊離しているのではなく、ゴルジ体の崩壊とともに局在を変化させている様子が観察された。ARF3やARF5の変異体は、コートタンパク質の遊離は防ぐが、ゴルジ構造の崩壊を防ぐことはできないことが明らかになった。以上のことによりARF1の機能と、ARF3とARF5の機能は完全に一致しないことが示唆された。BFA処理時に β -COPが結合しているオルガネラはまだ同定できていないが、数種の抗体との二重染色により、小胞体とゴルジ体の間の構造である可能性が高いと考えられる。

Phospholipase D1 (PLD1) は、ARF1のeffector分子として最近注目を集めており、alternative splicingの有無によって、aとbとの2つのvariantに分けられる。本研究では、まず、PLD1のvariantによる局在の差異が認められるかを検討した。PLD1aとPLD1bを、数種の培養細胞に同時に発現させ、間接蛍光抗体法によりそれぞれの局在を調べた。用いた全ての細胞において、PLD1aとPLD1bは同じ顆粒状の構造に存在している様子が観察された。顆粒状の染色像を示すことから、エンドソーム及びリソソームのマーカータンパク質を認識する抗体との二重染色を行った。この結果、PLD1を後期エンドソームとリソソームに局在していることが示唆された。

現在までに、ARF6はエンドサイトーシスに関わっているという報告及び、ARF6が*in vitro*でPLD1を活性化するという報告がある。このことから、*in vivo*で実際にPLDを活性化しているARFは、ARF6である可能性が考えられた。この2つの関連を検討するため、2つの変異体を作製した。1つはGTP結合型の活性型変異体(Q67L)、もう一つは、GTPに結合できない不活性型の変異体(N122I)である。この2つの変異体とPLD1aとを培養細胞に同時に導入し、細胞内局在を観察したところ、PLD1aとN122I変異体は、同じ顆粒構造に局在していることが明らかになった。これらのことからPLD1はARF6とともにエンドサイトーシスの経路に関与している可能性が示唆された。

審査の結果の要旨

ADP ribosylation factor (ARF) は、細胞内におけるタンパク質の輸送を仲介する輸送小胞の形成に関与する分子であると言われており、哺乳類においてARF1からARF6までの6種類の存在が知られている。しかしながら、これまで一つの動物種から6種類全てのARFが存在するという報告はなかった。また、ARF1とARF6については比較的良く調べられているが、他のARFの機能についてはほとんど報告がない。本論文で6種類全てのARFのcDNAをマウスからクローニングし、その存在と細胞内局在を明らかにした点は高く評価できる。また、ほとんどその機能を調べられていなかったARF3とARF5が、ARF1と同様にゴルジ体で小胞輸送に関与している可能性を示した意義は大きい。さらに、現在注目されている分子であるPLD1の細胞内局在を決定し、従来言われていたARF1ではなく、ARF6によって活性化されることを示唆した点も高く評価される。

よって、著者は博士(学術)の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。