

氏名(本籍)	しば 芝	よう 陽	こ 子	(神奈川県)
学位の種類	博士(理学)			
学位記番号	博甲第3525号			
学位授与年月日	平成16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	生物科学研究科			
学位論文題目	<b>Studies on Structure and Function of Clathrin Adaptor Proteins</b> (クラスリン・アダプターの構造と機能に関する研究)			
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	沼田治	
副査	筑波大学助教授	理学博士	中村幸治	
副査	京都大学教授	医学博士	中山和久	

### 論文の内容の要旨

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、トランスゴルジネットワーク (TGN) へと輸送され、選別されてエンドソームを経て最終目的地へ輸送される。各オルガネラ間のタンパク質輸送は輸送小胞を介して行なわれる。本研究では、クラスリンコート小胞の TGN およびエンドソームからの形成の調節機構を調べるために、2つのクラスリン・アダプタータンパク質、AP-1 および GGA に注目して研究を行なった。

ヘテロ4量体の AP-1 のサブユニットの一つ  $\gamma$ -アダプチンを bait として酵母 two-hybrid スクリーニングを行ったところ、ラバプチン5が単離された。ラバプチン5は初期エンドソームの融合に関与する低分子量 GTPase、Rab4 や Rab5 のエフェクターであることから、ラバプチン5がクラスリン/AP-1 コート小胞の TGN から初期エンドソームへの輸送を制御する可能性が考えられた。

まず免疫沈降法と間接蛍光抗体法により、 $\gamma$ -アダプチンとラバプチン5の *in vivo* での結合を確認した。pull down assay では、 $\gamma$ -アダプチンとラバプチン5との結合が GDP や GTP  $\gamma$  S の存在下でも変化しないことから、両者は構造的に結合していると予想される。また、 $\gamma$ -アダプチンは Rab4 と共局在していたが、Rab5 とは共局在しなかった。以上のことから、クラスリン/AP-1 コート小胞は、ラバプチン5によりその輸送過程が調節され、TGN で形成された後に Rab4 の局在するエンドソームへ輸送される可能性、もしくはエンドソームからも形成される可能性が考えられる。

ラバプチン5との結合には、 $\gamma$ -アダプチンのイアードメイン (C末端の約100アミノ酸の領域) が関与することを明らかにした。イアードメインにランダム変異を導入して酵母 two-hybrid システムでスクリーニングすることにより、ラバプチン5との結合能を欠いた変異体を単離した。共同研究により  $\gamma$ -アダプチンのイアードメインの立体構造を解明し、ラバプチン5との結合に重要な立体構造上の領域を明らかにした。

次に、別のクラスリン・アダプタータンパク質 GGA について研究を行ない、GGA がユビキチンと結合することを明らかにした。ユビキチン化された受容体などの膜タンパク質は、ユビキチンを選別シグナルとしてリソソームに輸送されて分解されることから、GGA がユビキチン化膜タンパク質の輸送を調節する可能

性が考えられた。

まず GGA 中の約 150 アミノ酸からなる GAT ドメインがユビキチンと直接結合することを示した。また内在性 GGA もユビキチンに結合でき、GGA を細胞内に過剰発現させるとユビキチン化タンパク質が TGN 領域に集合することから、GGA は *in vivo* でもユビキチンと結合できることを示した。ユビキチン結合能を欠いた GAT 変異体の単離、および GAT とユビキチンの複合体の立体構造モデルの作製により、ユビキチンと GAT との結合様式を解明した。

GGA は低分子量 GTPase の ARF の活性型と結合して TGN 膜に結合するが、GAT ドメインを含む GGA の N 末端側領域とユビキチンとの結合が活性型 ARF 存在下で強められることを確認した。

また GGA 自体がユビキチン化され、ユビキチン結合能を欠いた GGA 変異体はユビキチン化されないことから、ユビキチンとの結合が GGA 自体のユビキチン化に必須であることが明らかにした。

以上のことから、ARF によって GGA が TGN 膜に結合した時に、膜上に存在するユビキチン化された積み荷タンパク質と GGA の結合が強められることにより輸送が調節される可能性が考えられる。また、GGA のユビキチン化もこの過程において何らかの役割を果たすと予想される。

## 審 査 の 結 果 の 要 旨

本研究では、クラスリン・アダプター AP-1 複合体のサブユニットである  $\gamma$ -アダプチンおよび GGA の結合タンパク質、およびこれらの結合の細胞内での生理的役割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、 $\gamma$ -アダプチンがラバプチン 5 と結合することや GGA がユビキチンと結合することを発見し、これらの結合の分子基盤の詳細を変異体を用いて生化学的および構造生物学的に解明するとともに、結合が起こる細胞内部位を明らかにした。さらに、これらの実験結果に基づき、TGN とエンドソームの間の細胞内小胞輸送における AP-1 とラバプチン 5 の相互作用、および GGA とユビキチン化タンパク質の相互作用の生理的役割に関して新しい仮説を提唱した点が高く評価できる。これらの研究成果は、細胞内小胞輸送の研究分野に今後大きな発展をもたらすものと期待される。

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。