Kobe University Repository : Kernel

PDF issue: 2025-12-05

Role of the Guanine Nucleotide Exchange Factor Ost in Negative Regulation of Receptor Endocytosis by the Small GTPase Rac1

家口，勝昭

(Degree)
博士（医学）
(Date of Degree)
2008-03-25
(Resource Type)
doctoral thesis
(Report Number)
甲4143
(URL)
https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1004143

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。

氏　　名	家口　勝昭
博士の専攻分野の名称	博士（医学）
学　位　記　番　号	博い第 1887 号
学位授与の　要　件	学位規則第 5 条第 1 項該当
学位授与の　日　付	平成 20 年 3 月 25 日

【 学位論文題目 】

Role of the Guanine Nucleotide Exchange Factor Ost in Negative Regulation of Receptor Endocytosis by the Small GTPase Rac1(低分子量 GTP 結合タンパク質 Rac1 による受容体エンドサイトーシスの負の調節におけるグアニンヌクレオチド交換因子 Ost の機能)

審　査　委　員

主　査　　教　授　清野　　進

教　授　中村　俊一

教　授　廣明　秀一

[緒言]

Rhoファミリー低分子量GTP結合タンパク質は細胞内において不活性型であるGDP結合型あるいは活性型であるGTP結合型として存在し、その変換を介して細胞極性、遺伝子発現、細胞周期、細胞運動、アクチン細胞骨格の調節などのシグナル伝達系の分子スイッチとして機能している。さらに、Rhoファミリー低分子量GTP結合タンパク質の一種であるRac1の恒常活性化型は、ヒト子宮頸癌由来HeLa細胞においてトランスフェリン受容体（TfR）のクラスリン依存性エンドサイトーシスを負に調節することが報告されている。しかし、その詳細な調節機構は明らかとなっていない。

本研究では、Rac1によるクラスリン依存性受容体エンドサイトーシスの調節機構を解明することを目的とし、Rac1の上流で機能しているグアニンヌクレオチド交換因子（GEF）OstによるRac1の活性調節機構の解析を行った。OstにはOst-I、II、IIIの3種類のスプライスバリアントが存在するが、細胞内におけるスプライスバリアント間の生理機能の違いは解明されていない。そこで、Ostスプライスバリアントを過剰発現させてTfRのエンドサイトーシスに対する効果を検討した。その結果、Ost-IIIのみ抑制効果を示した。また、Rac1のエフェクターでクラスリン依存性受容体エンドサイトーシスへの関与が示唆されているSynaptojanin2とOstの細胞内共局在を検討した。その結果、Ost-IIIはリサイクリングエンドソームと考えられる核周辺領域でSynaptojanin2と共局在し、Ost-I, Ost-IIは細胞膜周辺で共局在を示した。また、Ostスプライスバリアント間でOst-III特異的に結合するタンパク質としてγアミノ酪酸受容体結合タンパク質（GABARAP）を同定した。上記のシグナル伝達系におけるGABARAPの機能を検討した結果、Ost-IIIによるRac1の活性化を抑制することでRac1によるクラスリン依存性受容体エンドサイトーシスの負の調節を解除することが明らかとなった。以上のように、HeLa細胞内におけるRac1によるTfRのエンドサイトーシスの調節経路を同定した。

[実験方法と結果]

TfRのエンドサイトーシスにおけるRac1の機能の解明

Rhoファミリー低分子量GTP結合タンパク質の代表的な分子であるRhoA、Rac1、Cdc42の*TfR*エンドサイトーシスへの関与を検討するために、それぞれの野生型、恒常的活性型をHeLa細胞への遺伝子導入によって発現させ蛍光標識トランスフェリンを添加した後、共焦点顕微鏡で観察した。その結果、Rac1の恒常活性型のみが受容体エンドサイトーシスを顕著に抑制した。次に、内在性Rac1の機能を検討するために、DNA干渉法によりHeLa細胞におけるRac1の発現をノックダウンした。その結果、Rac1の発現がノックダウンされた細胞においてTfRのエンドサイトーシスが顕著に亢進していることが確認された。この結果より、内在性Rac1は受容体エンドサイトーシスの調節に重要な機能を担っていることが示唆された。

TfRのエンドサイトーシスにおけるOstの機能の解明

Rac1に対するGEFであるOstスプライスバリアントをそれぞれHeLa細胞内に遺伝子導入により過剰発現させ、蛍光標識トランスフェリンを添加した後、共焦点顕微鏡で観察した。その結果、Ost-IIIのみが顕著にTfRのエンドサイトーシスを抑制した。また、Rac1の発現をノックダウンしたHeLa細胞にOst-IIIを遺伝子導入し同様の実験で効果を検討したところ、Ost-IIIによる受容体エンドサイトーシスの抑制効果はみられなかった。よって、Ost-IIIはRac1を介してTfRのエンドサイトーシスを抑制していることが明らかとなった。

TfRのエンドサイトーシスにおけるGABARAPの機能の解明

Ostスプライスバリアントのうちで唯一Ost-IIIが受容体エンドサイトーシスを抑制する理由を解明するために、酵母ツーハイブリッド法を用いてOst-IIIに特異的に相互作用する分子の探索を行った。その結果、Ost-IIIのC末端領域と特異的に相互作用する分子としてGABARAPを同定した。GABARAPはタイプAγアミノ酪酸受容体に結合する分子として同定され、そのクラスタリングに関与していることが報告されている。また、GABARAPのC末端は脂質修飾を受けることが報告されており、オートファジーへの関与も示唆されている。TfRのエンドサイトーシスにおけるGABARAPの機能を検討するために、Ost-IIIとともにHeLa細胞内に遺伝子導入により過剰発現させ、蛍光標識トランスフェリンを添加した後、共焦点顕微鏡で観察した。その結果、GABARAPはOst-IIIによるTfRのエンドサイトーシスの抑制効果を部分的に解除することが明らかとなった。また、抑制効果を解除するためにはC末端の脂質修飾が必要であることも明らかとなった。

Rac1のOst-IIIによる活性化に対するGABARAPの効果の検討

OstスプライスバリアントのRac1に対するGEF活性を検討するために、Rac1のエフェクターであるPAK1のCRIBドメイン（67-150アミノ酸領域）を用いてプルダウンアッセイを行った。その結果、Ost-I、Ost-II、Ost-IIIのすべてが Rac1に対するGEF活性を示した。次に、OstスプライスバリアントのGEF活性に対するGABARAPの効果を検討するためにOst-I、Ost-II、Ost-IIIのそれぞれをGABARAPとHeLa細胞で共発現させ、プルダウアッセイを行った。その結果、GABARAPはOst-I、Ost-IIに対して何の効果も示さなかったが、Ost-IIIのRac1に対するGEF活性を抑制することが明らかとなった。

Ostスプライスバリアントの細胞内局在の検討

Ost-I、Ost-IIはRac1に対するGEF活性があるにも関わらず、TfRのエンドサイトーシスを抑制する効果が見られない理由を解明するために、Rac1のエフェクターであるSynaptojanin2の細胞内局在を検討した。Synaptojanin2はRac1の活性型に結合し、小胞輸送に関与していることが報告されている。HeLa細胞にOstスプライスバリアント、野生型Rac1、Synaptojanin2を過剰発現させ、共焦点顕微鏡でそれぞれの細胞内局在を検討した。その結果、Ost-IはRac1、Synaptojanin2とラッフル膜で、Ost-IIは細胞膜近傍の小胞で、Ost-IIIはリサイクリングエンドソームと考えられる核周辺領域でそれぞれ共局在していた。この結果より、スプライスバリアントごとにRac1の活性化部位が異なるため、TfRのエン

ドサイトーシスに対する効果が異なると考えられる。Ost-III は核周辺領域で Rac1 を活性化し、Synaptojanin2 と共局在して TfR のエンドサイトーシスの調節行っていることが示唆された。

[考察]

恒常的活性型 Rac1 がクラスリン依存性受容体エンドサイトーシスを抑制することはこれまでに報告されてきたが、内在性 Rac1 の受容体エンドサイトーシスの調節への関与は明らかにされていなかった。本研究において、内在性 Rac1 の発現を siRNA によりノックダウンしたとき、リガンド依存的なトランスフェリン受容体のエンドサイトーシスが顕著に促進された。この結果より、内在性 Rac1 が受容体エンドサイトーシスの負の調節に関与していることが示唆された。

Ost-III/Rac1 を制御する上流のシグナル伝達系はほとんど解明されておらず、上流因子の同定は Ost-III/Rac1 の生理的機能を解明するのに重要である。EGF 刺激により Rac1 が細胞膜及び核周辺領域で活性化され、TfR のエンドサイトーシスが抑制された。よって、生理的機能は不明だが、EGF は Ost-III/Rac1 シグナルを活性化する上流因子のひとつと考えられる。また、Rac1 の発現のノックダウンにより TfR のエンドサイトーシスが促進されたことから、トランスフェリン自体が Ost-III/Rac1 シグナルを活性化する可能性も考えられる。今後の研究で Ost-III/Rac1 シグナルの上流因子を明らかにしていく予定である。

受容体エンドサイトーシスのシグナル伝達系においてRac1 の下流で機能していると考えられるSynaptojanin2 はPI4,5P_2を基質とするホスファチジルイノシトール5'脱リン酸化酵素である。Synaptojanin2 の強制発現およびノックダウン実験においてクラスリン依存性エンドサイトーシスが阻害されるという報告がある。これはPI4,5P_2がクラスリン被服ピット形成において重要な因子であり、Synaptojanin2 が細胞膜でPI4,5P_2の量を調節していることを示唆している。Ostスプライスバリアントと Synaptojanin2 の共発現実験において、Ost-I、Ost-IIは細胞膜近傍で、Ost-IIIは核周辺領域でSynaptonajanin2 と共局在していた。Ost-III はRac1 を核周辺領域で活性化することでSynaptojanin2 の細胞膜への移行を抑制し、クラスリン依存性エンドサイトーシスを抑制しているのではないかと考えられる。

Ost-III 特異的に結合する分子として単離された GABARAP は、Ost-III に結合することで Rac1 による受容体エンドサイトーシスの負の調節を抑制した。また、この抑制には GABARAP の C 末端の脂質修飾が必要であり、この修飾が GABARAP の細胞内局在を決定していると考えられる。Ras において脂質修飾はエフェクターとの相互作用に関与しているので、GABARP の脂質修飾が Ost-III との相互作用、あるいはそれ以外の分子との相互作用に関与している可能性も考えられる。一方、GABARAP の機能がトランスフェリン受容体のエンドサイトーシスに特異的であるのか、それ以外のエンドサイトーシスの系でも機能しているのか、今後の研究において解明する予定である。

神戸大学大学院医学系研究科（博士課程）

論文審査の結果の要旨

受付番号	甲 第1884号	氏 名	家口 勝昭
論文題目 Title of Dissertation	Role of the guanine nucleotide exchange factor Ost in negative regulation of receptor endocytosis by the small GTPase Rac1 低分子量GTP結合タンパク質Rac1による受容体エンドサイトーシスの負の調節におけるグアニンヌクレオチド交換因子 Ost の機能		
審査委員 Examiner	主 査 Chief Examiner 溝野 進 副 査 Vice-examiner 廣明 秀一 副 査 Vice-examiner 中村 俊一		
審査終了日	平成 20年 1月 16日		

（要旨は１，０００字～２，０００字程度）

Rho ファミリー低分子量 GTP 結合タンパク質は細胞内において不活性型である GDP 結合型あるいは活性型である GTP 結合型として存在し、その変換を介して種々のシグナル伝達系の分子スイッチとして機能している。Rho ファミリー低分子量 GTP 結合タンパク質の一種である Rac1 の恒常活性化型は、ヒト子宮頸癌由来 HeLa 細胞においてトランスフェリン受容体（TfR）のエンドサイトーシスを負に調節することが報告されている。しかし、その詳細な調節機構は明らかとなっていない。

本研究者は、Rac1 によるクラスリン依存性受容体エンドサイトーシスの調節機構を解明することを目的とし、Rac1 の上流で機能しているグアニンヌクレオチド交換因子（GEF）Ost による Rac1 の活性調節機構の解析を行った。

[　実験方法と結果　]

RhoA、Rac1、Cdc42 の *TfR* エンドサイトーシスへの関与を検討するために、それぞれの野生型、恒常的活性型を HeLa 細胞に発現させ蛍光標識トランスフェリンを添加し、共焦点顕微鏡で観察した。その結果、Rac1 の恒常活性化型のみが受容体エンドサイトーシスを顕著に抑制した。内在性 Rac1 の機能を検討するために、siRNA を用いて Rac1 の発現をノックダウンした結果、TfR のエンドサイトーシスが顕著に亢進した。

次に、Rac1 に対する GEF である Ost スプライスバリアントをそれぞれ HeLa 細胞内に発現させ、蛍光標識トランスフェリンを添加し共焦点顕微鏡で観察した。その結果、Ost-III のみが顕著に TfR のエンドサイトーシスを抑制した。また、Rac1 をノックダウンした細胞に Ost-III を発現させ同様の実験で効果を検討したところ、Ost-III によるエンドサイトーシスの抑制効果はみられなかった。よって、Ost-III は Rac1 を介して TfR のエンドサイトーシスを抑制していることが明らかとなった。

TfR のエンドサイトーシスにおける Ost-III 特異的な抑制機構を解明するために、酵母ツーハイブリッド法を用いて Ost-III 特異的に相互作用する分子の探索を行った。その結果、Ost-III の C 末端領域と特異的に相互作用する分子として GABARAP を同定した。次に GABARAP を Ost-III とともに細胞内に発現させ、エンドサイトーシスにおける GABARAP の機能を検討した。その結果、GABARAP は Ost-III によるエンドサイトーシスの抑制効果を部分的に解除した。

Ost スプライスバリアントの Rac1 に対する GEF 活性及び GEF 活性における GABARAP の効果を検討するために、Rac1 のエフェクターである PAK1 の CRIB ドメインを用いてプルダウンアッセイを行った。その結果、Ost-I、Ost-II、Ost-III のすべてが Rac1 に対する GEF 活性を示した。また、GABARAP は Ost-III の Rac1 に対する GEF 活性のみ抑制した。Ost-I、Ost-II は Rac1 に対する GEF 活性があるにも関わらず、TfR のエンドサイトーシスを抑制する効果が見られなかった。この理由を解明するために、Rac1 の活性型に結合することが報告されている Synaptojanin2 の細胞内局在を検討した。HeLa 細胞に Ost スプライスバリアント、野生型 Rac1、Synaptojanin2 を発現させそれぞれの細胞内局在を検討した。その結果、Ost-I は Rac1、Synaptojanin2 とラッフル膜で、Ost-II は細胞膜近傍の小胞で、Ost-III は核周辺領域でそれぞれ共局在していた。この結果より、TfR のエンドサイトーシスに対する効果の違いは Rac1 の活性化部位の差であることが示唆された。

[　結論と考察　]

Rac1 のノックダウン細胞では、トランスフェリン受容体のエンドサイトーシスが顕著に促進された。この結果より、内在性 Rac1 が受容体エンドサイトーシスの調節機構に重要な機能を担っていることが明らかとなった。受容体エンドサイトーシスのシグナル伝達系において Rac1 の下流で機能している Synaptojanin2 は PI4, $5P_2$ を基質とするホスファチジルイノシトール５’脱リン酸化酵素である。Synaptojanin2 の過剰発現およびノックダウン実験においてクラスリン依存性エンドサイトーシスが阻害されるという報告がある。これは PI4, $5P_2$ がクラスリン被服ピット形成において重要な因子であり、Synaptojanin2 が細胞膜で PI4, $5P_2$ の量を調節していることを示唆している。Ost スプライスバリアントと Synaptojanin2 の共発現実験において、Ost-I、Ost-II は細胞膜近傍で、Ost-III は核周辺領域で Synaptonajanin2 と共局在していた。Ost-III は Rac1 を核周辺領域で活性化することで Synaptojanin2 の細胞膜への移行を抑制し、クラスリン依存性エンドサイトーシスを抑制しているのではないかと考えられる。GABARAP は、Ost-III に結合し Rac1 に対する GEF 活性を抑制した。また、この抑制には GABARAP の C 末端の脂質修飾が必要であり、この修飾が GABARAP の細胞内局在を決定していると考えられる。Ras において脂質修飾はエフェクターとの相互作用に関与しているので、GABARP の脂質修飾が Ost-III との相互作用、あるいはそれ以外の分子との相互作用に関与している可能性も考えられる。

本研究は、Rac1 の活性調節に着目しトランスフェリン受容体のエンドサイトーシスのシグナル伝達経路を明らかにした。さらに、Ost-III/Rac1 シグナルの負の調節因子である GABARAP を同定しその役割についても重要な知見を得たものとして価値ある集積であると認める。よって、本研究者は、博士（医学）の学位を得る資格があると認める。

The candidate, having completed studies on role of the guanine nucleotide exchange factor Ost in negative regulation of receptor endocytosis by the small GTPase Rac1, with a specialty in molecular biology, and having advanced the field of knowledge in the area of the small GTPase Rac1, is hereby recognized as having qualified for the degree of Ph.D.(Medicine).