

氏 名（本籍）	さかき 榊	ぼら 原	とも 智	ひろ 博
学 位 の 種 類	博 士（医 学）			
学 位 記 番 号	医 博 第 2 1 9 8 号			
学 位 授 与 年 月 日	平 成 1 7 年 3 月 2 5 日			
学 位 授 与 の 条 件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当			
研 究 科 専 攻	東 北 大 学 大 学 院 医 学 系 研 究 科 （ 博 士 課 程 ） 医 科 学 専 攻			
学 位 論 文 題 目	受 容 体 を 介 す る エ ン ド サ イ ト ー シ ス に 関 与 す る 新 規 RhoGTPase 活 性 化 タ ン パ ク 質 の 機 能 解 析			

（ 主 査 ）

論 文 審 査 委 員	教 授 貫 和 敏 博	教 授 竹 島 浩
	教 授 柴 原 茂 樹	教 授 片 桐 秀 樹

論文内容要旨

Cbl 結合タンパク 85 kDa (CIN 85) は近年同定されたアダプタータンパク質であるが、エンドサイトーシスの過程で重要な役割を果たしているタンパク質であるエンドフィリンと結合して、いくつかの受容体チロシンキナーゼのエンドサイトーシスに関与することが知られている。一方低分子 G タンパク質である RhoGTPase はアクチン細胞骨格の再編、遺伝子発現、細胞周期制御、細胞極性、膜輸送などの細胞機能において重要な役割を果たしており、そのうち最も研究され重要と考えられている細胞機能はアクチン細胞骨格の再編である。エンドサイトーシスにおいて、その局所では細胞の形態が変化することから、エンドサイトーシスにアクチン細胞骨格と RhoGTPase が関与するという推測がなされてきたが、これらの関与を直接的に示す報告はなく、その詳細は不明である。今回 CIN 85 に結合するタンパク質として、低分子 G タンパク質である RhoGTPase の活性化タンパク質 (CAMGAP1, CIN 85 associated multi-domain containing RhoGAP1) を同定した。本研究はエンドサイトーシスにおける RhoGTPase, アクチン細胞骨格の関連が推測されている背景をもとに、この CIN 85 結合タンパク質である CAMGAP1 の機能解析を目的とした。

CAMGAP1 のアミノ酸配列に、機能ドメインや酵素活性を示す配列が含まれるかをデータベースを用いて検索し、さらに CAMGAP1 のアミノ酸配列と相同性の高いタンパク質も同様に検索した。組織発現分布を調べるためにノーザンブロット解析を行い、また C 末端に存在する RhoGTPase 活性化ドメインの活性を調べるため、*in vitro* で RhoGTPase 活性化実験を行った。CIN 85 との詳細な結合部位を同定するために *in vitro* でのタンパク質結合を、プルダウン実験やブロットオーバーレイ実験により検証した。さらに細胞内での結合を検証するために培養細胞を用いて、共発現実験と免疫沈降実験を行った。CAMGAP1 のエンドサイトーシスにおける役割を調べるため、培養細胞を用いてトランスフェリン取り込み実験を行った。

CAMGAP1 は 869 個のアミノ酸から構成され、特徴的なドメイン構造をもち N 末端側から C 末端側に向かって、Src ホモロジー 3 (SH3) ドメイン、3 つの WW ドメイン、プロリンリッチ領域、pleckstrin homology (PH) ドメイン、そして RhoGTPase 活性化 (RhoGAP) ドメインを含んでいる。そのアミノ酸配列のデータベースを用いた解析により、多くの RhoGAP ドメインを含むタンパク質のなかでも、CAMGAP1 はヒトのタンパク質である ARHGAP9 と ARHGAP12 にそのドメイン構造が類似し、それらのタンパク質とともにサブファミリーを形成していると考えられた。

ノーザンブロット解析により CAMGAP1 のメッセンジャー RNA は、腎臓や肺、小腸、胸腺を含むマウスの組織に広く分布していることが示された。組み換えタンパク質を用いた生化学的

実験では、CAMGAP1のRhoGAPドメインは低分子Gタンパク質RhoファミリーのなかでもRac1とCdc42に対して、そのGTPase活性を上昇させる活性があることが観察された。また *in vitro* でのタンパク質結合実験により、CIN85のN末端から2番目のSH3-BドメインとCAMGAP1のプロリンリッチ領域が結合することが示され、さらにChinese Hamster Ovary (CHO) 細胞を用いた細胞発現実験でCIN85とCAMGAP1は細胞内で同一部位に局在し、結合していることが観察された。

トランスフェリンは細胞膜上のトランスフェリン受容体に結合したあと、クラスリンを介したエンドサイトーシスにより受容体とともに細胞内に取り込まれる。CAMGAP1の3つのWWドメインを含む領域を培養細胞に過剰発現させると、トランスフェリンの細胞内への取り込みが阻害されることが観察された。

以上からCAMGAP1はRac1またはCdc42の制御因子として、またはアダプタータンパク質としてクラスリンを介した受容体のエンドサイトーシスに関与する可能性を示唆している。

審査結果の要旨

細胞は、外界の多様な物質を細胞内に取り込むエンドサイトーシスという機構を持つ。この機構の詳細は最近研究が進展しているが、本学位論文はこれに関連する新規 CAMGAP1 (CIN 85 associated multi-domain containing RhoGAP1) を同定し、その機能を解析したものである。低分子 G タンパク質 RhoGTPase はアクチン細胞骨格の再編、遺伝子発現、細胞周期制御、細胞極性、膜輸送など重要な役割を果たしている。エンドサイトーシスにおいて、局所の細胞形態変化はアクチン細胞骨格と RhoGTPase が関与するという推測がなされてきた。本研究の目的はエンドサイトーシスにおける CIN 85 結合タンパク質である CAMGAP1 の機能解析にある。その結果：

1) CAMGAP1 のアミノ酸配列をデータベース検索したところ、CAMGAP1 (869 個アミノ酸) は N 末から C 末端側に、Src ホモロジー 3 (SH3) ドメイン、3 つの WW ドメイン、プロリンリッチ領域、pleckstrin homology (PH) ドメイン、そして RhoGTPase 活性化 (RhoGAP) ドメインを含む構造と判明した。さらに RhoGAP ドメインを含むタンパク質のなかでも、CAMGAP1 はヒトタンパク質である ARHGAP9 と ARHGAP12 にそのドメイン構造が類似し、サブファミリーを形成している。

2) 組織発現分布のノーザンブロット解析では CAMGAP1 は、腎臓や肺、小腸、胸腺を含むマウスの組織に広く分布している。

3) C 末端 RhoGTPase 活性化ドメインの活性を検討したところ、低分子 G タンパク質 Rho ファミリーのなかでも Rac1 と Cdc42 に対して、その GTPase 活性を上昇させる。

4) CIN 85 との結合部位の同定をプルダウン実験やブロットオーバーレイ実験で検討し、CIN 85 の N 末端から 2 番目の SH3-B ドメインと CAMGAP1 のプロリンリッチ領域が結合することが示された。一方 Chinese Hamster Ovary (CHO) 細胞を用いた細胞発現実験で、CIN 85 と CAMGAP1 が細胞内同一部位に局在する事を確認した。

5) 培養細胞を用いたトランスフェリン取り込み実験を行った。トランスフェリンは細胞膜上のトランスフェリン受容体に結合したあと、クラスリンを介したエンドサイトーシスにより受容体とともに細胞内に取り込まれる。興味あることに CAMGAP1 の 3 つの WW ドメインを含む領域を培養細胞に過剰発現させると、トランスフェリンの細胞内への取り込みが阻害された。

以上より本研究は、CAMGAP1 が ARHGAP とともに RhoGAP のサブファミリーを形成し、Rac1 または Cdc42 の制御因子として、またはアダプタータンパク質としてクラスリンを介した受容体のエンドサイトーシスに関与するという新規知見を示すもので、学位に値すると判断した。