

氏 名（本籍）	こ ばやし ひで ゆき 小 林 秀 行
学位の種類	博 士（医 学）
学位記番号	医 博 第 2 3 0 9 号
学位授与年月日	平 成 18 年 3 月 24 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	Hrs, a Mammalian Master Molecule in Vesicular Transport and Protein Sorting, Suppresses the Degradation of ESCRT Proteins Signal Transducing Adaptor Molecule 1 and 2 （小胞輸送および蛋白輸送に関わる主要分子 Hrs による ESCRT 蛋白 STAM1, STAM2 の分解制 御機構）
	（主 査）
論文審査委員	教授 菅 村 和 夫 教授 佐 竹 正 延 教授 中 山 啓 子

論文内容要旨

目 的

細胞内や細胞表面の蛋白質の分解や輸送は、細胞機能制御における重要なプロセスである。当教室では、サイトカイン刺激によってチロシンリン酸化される分子、Hrs, STAM1, STAM2を同定した。最近、これら分子は、Vps (vacuolar protein sorting) 蛋白質として認識されてきている。Hrs および STAMs は、共に、UIM (ubiquitin-interacting motif) を持ち、Hrs-STAMs 複合体を通して初期エンドソームでの小胞輸送に関係すると報告されている。哺乳類細胞において、Hrs-STAMs 複合体のメカニズムと細胞内機能を探ることを目的とした。

方 法

私は、Hrs コンディショナルノックアウトマウスの作製を試み、Hrs 欠損繊維芽様細胞株を樹立した。Hrs 欠損繊維芽様細胞株に野生型 Hrs および、変異型 Hrs を導入した細胞株を樹立し、Hrs が有する機能について解析を行った。

結 果

Hrs 欠損繊維芽様細胞では、STAM1, STAM2 の発現は減少していた。Hrs 欠損繊維芽様細胞に、野生型 Hrs または、STAMs との結合ドメインをもつ変異型 Hrs (Hrs-dFYVE) を導入した細胞株では、STAM1, STAM2 の発現は正常レベルまで回復した。しかし、STAMs との結合ドメインをもたない変異型 Hrs (Hrs-dC2, Hrs-dM) を導入した細胞株では、Hrs 欠損繊維芽様細胞と同様に、STAM1, STAM2 の発現は減少していた。

STAMs の発現の減少のメカニズムは、転写レベルではなく蛋白質レベルであることが分かった。この結果より、STAM1 は、Hrs との結合によって安定化し、STAM1 との結合を欠いた Hrs 変異体では、STAM1 の分解を生み出すことを示した。また、STAM1 の分解は、プロテアソームによって行われ、STAM1 の ubiquitin-interacting motif (UIM) に依存していることを証明した。さらに、Hrs 欠損繊維芽様細胞に野生型 Hrs を導入した細胞株では、ユビキチン化された蛋白質の蓄積を示し、初期エンドソームにおける STAM1 の発現を回復させた。また、Hrs 欠損によって起こる、肥大化したエンドソームの形態変化を正常化させた。

考 察

Hrs が欠損した Hrs 欠損繊維芽様細胞では、STAM1 と STAM2 の発現の減少がみられ、この要因として、いくつかの因子が考えられた。それは、(1) 転写または翻訳の減少、(2) mRNA

の安定性の減少, (3) 蛋白質安定性の減少である。STAM1とSTAM2の mRNAの量は, Hrsの存在下または非存在下にて変化はみられなかった。STAMs蛋白質の不安定性は, 蛋白質が減少したことが示唆された。以上よりSTAM1の安定性はHrsに依存することが示唆された。

STAM1とSTAM2蛋白質の安定性はどのように失われるのか検証した。一般的に, 2つの主要な蛋白質分解システムには, ユビキチン-プロテアソーム経路とリソソーム経路がある。実験結果より, STAM1の分解は, プロテアソーム依存性であることを示した。また, STAM1のUIMドメインは, 安定性に必須であることが分かった。STAM1のUIMに変異を入れたSTAM1-mUIMは, 明らかに, 野生型STAM1に比べて安定していた。STAM1のUIM機能を説明するのに, 3つの仮説がある。1つ目は, STAM1のUIMは, 分解されるために26Sプロテアソームによって認識されることである。2つ目に, STAM1のUIMドメインは, 他のポリユビキチン化蛋白質と結合しており, それが, プロテアソームに認識され, 分解される可能性である。3つ目は, STAM1のUIMドメインは, 単独または複合体としてE3と結合し, STAMsは, ポリユビキチン化を受けて分解の運命を辿ることである。

Hrs欠損繊維芽様細胞にHrsを導入したものは, STAM1発現ベクターの存在に関係なくユビキチン化蛋白質の蓄積をもたらした。Hrsは, ユビキチン化蛋白質の蓄積を生み出すと考えた。

Hrs欠損繊維芽様細胞およびHrs変異体細胞株では, classEコンパートメントと呼ばれる肥大化したエンドソームの小胞形態が見られた。HrsのUIMドメインの変異体(L265E)においても, 正常なエンドソームの形態を失っていた。正常なエンドソームの形態構築に, 確認されていないUIM結合分子が機能する可能性を見出した。HrsのUIMと同様に, STAM1のUIMドメイン変異体では, 肥大化したエンドソームはみられなかった。classEコンパートメントは, STAMsではなく, HrsのUIMドメインによって決定されることが示唆された。

結 論

HrsがSTAM1の分解や細胞内局在を調節し, ユビキチン化蛋白質の蓄積や, エンドソームの形態をコントロールする主要分子であることを示した。

審査結果の要旨

哺乳類細胞における小胞輸送蛋白 Hrs の機能を探るために、申請者は胎生致死である Hrs 遺伝子ノックアウトマウスから、マウス初代培養繊維芽細胞を不死化することを試みた。SV40 ウイルスの LargeT 抗原を安定に導入することにより、Hrs 欠損繊維芽様細胞株を樹立することに成功した。Hrs 欠損繊維芽様細胞は形態的には著しい変化を示さなかったものの、STAM1、STAM2 の発現が蛋白レベルにおいて減少していた。そこで、Hrs 欠損繊維芽様細胞に野生型 Hrs、あるいは STAMs との結合ドメインをもつ変異型 Hrs (Hrs-dFYVE) を導入した。その結果、これらの細胞株において STAM1、STAM2 の蛋白量は正常に回復し特に異常を認めなかった。しかしながら STAMs との結合ドメインをもたない変異型 Hrs (Hrs-dC2, Hrs-dM) を導入した細胞株では、STAM1、STAM2 の蛋白量が、欠損細胞と同様に減少していた。Hrs 欠損による STAM 蛋白の欠損の原因を調べたところ、その調節機構は転写レベルではなく蛋白レベルで行われていることが明らかとなった。したがって、Hrs は STAM 蛋白安定化に必須であることが判明した。STAM1 の分解機構を解析したところ、Hrs 欠損に起因する STAM の分解はプロテアソーム依存性であり、STAM1 の分子内ドメインでは少なくとも ubiquitin-interacting motif (UIM) が重要であった。また、細胞内小胞の観察の結果、Hrs 欠損細胞株では小胞の肥大化が認められ、この形態は酵母のホモログ分子である Vps27 の欠損時に認められる小胞の異常形態と同様の形態変化であることが示唆された。次に、Hrs 欠損繊維芽様細胞に野生型 Hrs を導入した遺伝子戻し細胞株では、STAM1 の蛋白発現が回復したのみならず、欠損細胞において肥大化していたエンドソーム異常形態が正常化していた。さらに、Hrs 遺伝子戻し細胞においては、エンドソームに一致したユビキチン化蛋白の蓄積が認められた。これらの結果は、Hrs が STAM1 の分解のみならず、ユビキチン化蛋白質の小胞への蓄積をコントロールする主要分子であることを証明するものであり、新しい知見である。

よって、本論文は博士（医学）の学位論文として合格と認める。