

Studies on novel clathrin adaptor-related proteins

著者	Takatsu Hiroyuki
内容記述	Thesis (Ph. D. in Sciene)--University of Tsukuba, (A), no.2513, 2001.3.23 Includes bibliographical references
発行年	2001
URL	http://hdl.handle.net/2241/5671

氏名(本籍)	たか　　つ　　ひろ　　ゆき 高　津　宏　之(愛　知　県)
学位の種類	博　士(理　学)
学位記番号	博　甲　第　2513　号
学位授与年月日	平成13年3月23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	Studies on Novel Clathrin Adaptor-related Proteins (新奇のクラスリンアダプター様タンパク質に関する研究)
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　鎌　田　　　博
副　査	筑波大学教授　理学博士　林　　　純　　一
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

真核細胞において、クラスリン被覆小胞はトランスゴルジネットワーク (TGN) からリソソームへの輸送や細胞膜からのエンドサイトーシスに参与する。AP-1とAP-2はそれぞれTGNおよび細胞膜のクラスリン被覆小胞に存在し、クラスリンと膜との仲介をするアダプター複合体である。各複合体はヘテロ四量体 (AP-1: γ -, β 1-アダプチン, μ 1, σ 1; AP-2: α -, β 2-アダプチン, μ 2, σ 2) から成る。最近、新たなアダプター様複合体AP-3 (δ , β 3, μ 3, σ 3) も同定された。しかしながら、さらに別なアダプター複合体が存在する可能性が考えられた。そこで、cDNA プロジェクトにより登録されているEST データベースを検索したところ、 γ -アダプチンと高い相同性を示すが明らかに異なるヒトのcDNA配列をいくつか発見した。こうした背景をもとに、本論文では以下の研究成果について述べている。

まず、EST データベースの情報をもとにして、新奇の γ -アダプチン相同タンパク質 (γ 2-アダプチンと命名) を同定した。 γ 2-アダプチンは785アミノ酸から成り、 γ -アダプチン (γ 1-アダプチンと再命名) と全体で60%の相同性を示した。ノーザンブロット解析では、 γ 2-アダプチンは調べたほとんどすべての組織で発現していることが明らかになった。 γ 2-アダプチンに対する抗体を用いたウェスタンブロット解析では、細胞抽出液の膜画分・細胞質画分いずれにも約87kDaのタンパク質として検出された。間接蛍光抗体法を用いた細胞内局在の観察では、 γ 2-アダプチンは核周辺の小胞様構造に局在したが、 γ 1-アダプチンの染色像とは一致しなかった。また、AP-1複合体のTGN膜への結合を阻害することが知られているプレフェルジンA (BFA) により細胞を処理したところ、 γ 1-アダプチンの膜への結合は阻害されるのに対して、 γ 2-アダプチンでは影響がみられなかった。さらに、酵母Two-hybrid Systemを用いた解析では、 γ 2-アダプチンは γ 1-アダプチンと同様に σ 1と特異的に相互作用することが明らかとなった。一方、 γ 1-アダプチンが β 1-アダプチンと相互作用するのに対して、 γ 2-アダプチンは β 1, β 2ともに相互作用しなかった。以上の結果から、 γ 2-アダプチンは小胞輸送においてAP-1とは異なるステップで機能するような新奇のアダプター様複合体を形成することが示唆された。

次に、 γ 2-アダプチンを同定した場合と同様にして、新奇のアダプチン相同タンパク質 (ϵ -アダプチン) を同定した。ノーザンブロット解析では、 ϵ -アダプチンは調べた全ての組織で発現していることを示した。また、

ϵ -アダプチンとは別に、新たなアダプター様タンパク質として、 $\beta 4$ -アダプチンおよび $\sigma 4$ を同定した。酵母 Two-hybrid System を用いた解析では、 ϵ -アダプチンは $\sigma 4$ と特異的に相互作用することが明らかになった。また、Three-hybrid System を用いた解析では、 ϵ -アダプチンは $\sigma 4$ 存在下でのみ $\beta 4$ -アダプチンと相互作用することが明らかとなった。以上の結果から、 ϵ -アダプチンを含む新奇のアダプター様複合体AP-4の存在が示唆された。

さらに、先に同定したアダプチン相同タンパク質とは異なり、 $\gamma 1$ -アダプチンのEarドメイン様の領域 (AGEHドメイン) をもつ新奇のタンパク質を3種類同定した。ところが、この新奇のタンパク質は、最近、別のグループから報告されたGCA (Golgi-localizing, γ -adaptin ear homology domain, ARF-binding proteins) タンパク質と同じものであった。 $\gamma 1$ -アダプチンのEarドメインには γ -Synergинが相互作用することが知られていたが、酵母 Two-hybrid System を用いた解析では、GGAタンパク質もAGEHドメインを介して γ -Synergинと相互作用することが明らかとなった。また、GGAタンパク質は γ -Synergинと共にゴルジ体様の構造に局在することも明らかとなった。

審 査 の 結 果 の 要 旨

本研究では、ESTデータベースに登録されている配列情報を活用して、複数の新奇のクラスリアダプター様タンパク質を同定し、それらの構造や機能的性質について分子生物学的・生化学的手法を用いて解析している。 $\gamma 2$ -アダプチンに関しては、 $\gamma 1$ -アダプチンと高い相同性を示すものの、細胞内局在や薬剤処理に対する性質などが異なることが明らかにされ、これまでに知られているAP-1とは異なる新奇のクラスリンアダプター様複合体として機能している可能性が示唆されている。またこれとは別に、 ϵ -アダプチンを含む全く新しいクラスリンアダプター様複合体AP-4の存在も明らかにされている。さらに、 $\gamma 1$ -アダプチンのEarドメイン様の領域をもつGCAタンパク質ファミリーは、これまでに知られているアダプター様タンパク質とは構造的に異なるが、そのAGEHドメインには $\gamma 1$ -アダプチンと共通のタンパク質因子 γ -Synergинが結合し売ることが示されている。これらの一連の研究は、いずれも世界に先駆けて行われたものであり、これまで知られていなかった新たなアダプタータンパク質の存在を明確に示したものであることから高く評価できる。

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。