

論文審査の結果の要旨

論文提出者氏名 松戸 真理子

Rab タンパク質は、Ras スーパーファミリーに属しており、細胞内小胞輸送の様々な段階を制御する機能を持つことが知られている。哺乳動物細胞では 60 種類以上が同定されており、個々の Rab タンパク質は、特定のオルガネラにターゲティング・局在し、そこで機能する。Rab タンパク質の正確なターゲティング・局在は、その機能発現のために重要であるが、Rab タンパク質のオルガネラターゲティングの分子機構は複雑であり、未だ明らかになっていない部分が多い。本論文では、ゴルジ体にターゲティング・局在し、ゴルジ体を起点あるいは経由した輸送経路を制御する Rab タンパク質 Rab6A について、そのゴルジ体ターゲティング制御に関わる細胞質タンパク質の探索と解析を行い、同定した制御タンパク質 Bicaudal-D (BICD) 2 の作用機序について報告している。

本論文では、はじめに、所属研究室の開発してきたセミインタクト細胞アッセイを用いて、Rab6A のゴルジ体ターゲティング過程を解析するアッセイを構築した。このアッセイは、細胞をすりつぶして行う従来の手法では困難な、単一の細胞内においてタンパク質が機能発現する場所を可視化解析する手法である。まず、セミインタクト細胞アッセイを用いて、Rab6A のリコンビナントタンパク質 (GST-Rab6A) の細胞質依存的なゴルジ体ターゲティング過程の再構成を行った。続いて、各種条件の検討を行い、Rab6A のゴルジ体ターゲティング過程を可視化解析するために最適な条件を確定した。次に、GST プルダウンアッセイおよび構築したアッセイを用いて、Rab6A のターゲティング制御に関わる細胞質タンパク質の探索を行い、GST-Rab6A 結合タンパク質群の中から、ターゲティング制御因子の候補として、BICD2 を同定した。

続いて、Rab6A のゴルジ体ターゲティング制御に対する BICD2 の作用機序を解析した。まず、低分子干渉 RNA による RNA 干渉法を用いて解析を行い、BICD2 が内在性 Rab6 のゴルジ体局在を制御していることを明らかにした。次に、構築したアッセイを用いて、BICD2 が GST-Rab6A のゴルジ体ターゲテ

ィングを促進していることを検証した。さらに、光褪色後蛍光回復法や蛍光抗体法を用いて解析を行い、**BICD2** の C 末端領域がゴルジ体膜に結合する **Rab6A** の膜結合安定化を促進しうることを示した。また、**BICD2** が **Rab6** を膜に結合する GTP 結合型に安定化させることを示した。また、ゴルジ体を起点あるいは経由する順行・逆行輸送経路について解析を行い、**BICD2** が、ゴルジ体から小胞体への逆行輸送経路のうち、ゴルジ体由来の輸送小胞と小胞体膜との融合過程に関与することも示した。

以上の結果から、論文提出者は本論文において、**Rab6A** のゴルジ体ターゲティング制御因子として新しく **BICD2** を同定し、その作用機序として、**Rab6A** のゴルジ体膜への結合安定化に関与していることを証明した。

本研究で構築した **Rab** タンパク質のオルガネラターゲティングアッセイは、**Rab6A** 以外の様々な **Rab** タンパク質やオルガネラ表在性タンパク質のオルガネラターゲティング制御因子の探索や、その因子の機能解析に汎用的に利用できるものであり、本研究結果と合わせて、**Rab** タンパク質のオルガネラターゲティング機構解明に大きく貢献する重要な研究である。したがって、本審査委員会は博士（学術）の学位を授与するにふさわしいものと認定する。