

提出日：平成 29 年 5 月 19 日

平成 28 年度 大阪大学蛋白質研究所 拠点事業

(2) 研究成果の概要

課題名	細胞内小胞輸送を制御するタンパク質翻訳後修飾の解析		
研究代表者	氏名	西河 淳	
	所属機関名・部局名	東京農工大学・大学院農学研究院	
	職名	教授	
事業名 (該当の事業名の右欄に○)	○	共同研究員	
		超高磁場NMR 共同利用研究課題	
		クライオ電子顕微鏡共同利用研究課題	
		客員フェロー	
蛋白研受入担当教員名	高尾 敏文 教授		
<p>細胞はタンパク質の選択的な輸送によりその生理的な機能を維持している。この選択的な輸送には数多くの因子が関わっていることが知られており、本研究で焦点を当てている sorting nexin 5 (SNX5)も細胞内の小胞輸送、ことに逆行輸送やマクロピノサイトーシスにおいて重要な役割を担ってとされている。我々はこれまでの研究でヒト結腸ガン由来細胞への広範なキナーゼの阻害剤であるスタウロスポリンの作用により等電点に変化するタンパク質の一つとして SNX5 を同定し、質量分析計により 3 箇所のセリン或いはスレオニン残基がリン酸化修飾を受けることを明らかにした。そして、3 箇所のリン酸化部位をアラニン(擬似非リン酸化)またはグルタミン酸(擬似リン酸化)に置換した変異体を作製して、SNX5 とヘテロダイマーを形成して機能する SNX1 や SNX2 との結合能を免疫沈降で確認した結果、3 箇所のうち 226 番目のセリンをグルタミン酸に置換した変異体がヘテロダイマーを形成できないことを発見した。そこで、SNX5 が重要な役割を果たしていると思われる cation independent mannose 6-phosphate receptor (CI-M6PR)の逆行輸送とマクロピノサイトーシスに関してこの部位のリン酸化の影響を検討した。</p> <p>SNX5 の knock down (KD)細胞にワイルドタイプ (wt)、S226A、S226E のいずれかを再導入することでリン酸化が輸送に与える影響を観察した。レトロマー依存的な CI-M6PR の逆行輸送については、SNX6 が SNX5 の機能を補完する可能性が考えられたため、SNX5 と SNX6 の両者をノックダウンしたダブルノックダウン細胞を用いた。結果、ダブルノックダウン細胞で観察された CI-M6PR の局在異常は wt もしくは S226A の再導入により回復したが、S226E 変異体では回復しなかった。また、マクロピノサイトーシスの検証ではデキストランを使用し EGF 刺激を加えた際のデキストランの取り込み率を確認した。結果、CI-M6PR の逆行輸送の検証と同様に、SNX5 ノックダウン細胞で見られたデキストランの取り込み不全は wt もしくは S226A の再導入で回復したのに対して S226E では回復が観られず、Ser226 のリン酸化は SNX5 を不活性化させていることが考えられた。これの知見から Ser226 のリン酸化による SNX5 の活性化状態の調節が細胞内輸送における SNX5 の機能を制御している可能性が示唆された。</p>			

※本様式は、“拠点事業成果報告”として、拠点ホームページにて公開させていただく予定です。

※必ず A4 用紙 1 枚におさめて下さい。 ※提出期限：平成 29 年 5 月 19 日（金） ※提出の際は PDF 変換して下さい。

※提出先：大阪大学蛋白質研究所拠点プロジェクト班 E-mail: tanpakuken-kyoten@office.osaka-u.ac.jp