HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Studies on the role of a mitochondrial protein GC1 in the regulation of Ras-PI3K signaling-mediated endocytosis [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	プラバ, ネパル
Citation	北海道大学. 博士(医学) 甲第13718号
Issue Date	2019-09-25
Doc URL	http://hdl.handle.net/2115/75798
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	theses (doctoral - abstract and summary of review)
Note	配架番号：2494
Additional Information	There are other files related to this item in HUSCAP. Check the above URL.
File Information	Nepal_Prabha_review.pdf (審査の要旨)

Instructions for use

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学位論文審査の要旨

博士の専攻分野の名称　　博士（医　学）　　氏 名　ネパル　プラバ

主査　　教授　佐 邊 壽 孝
審査担当者　副査　　教授　野 口 昌 幸
副査　　教授　武 冨 紹 信
副査　　教授　廣 瀬 哲 郎

学 位 論 文 題 名

Studies on the role of a mitochondrial protein GC1
in the regulation of Ras-PI3K signaling-mediated endocytosis
（Ras-PI3K シグナルを介したエンドサイトーシス制御機構における
ミトコンドリアタンパク質 GC1 の役割に関する研究）

申請者は、低分子量 G タンパク質 Ras と標的因子の一つ phosphoinositide 3-kinase（PI3K）の複合体が、いかにしてエンドソームに動員されエンドサイトーシスを制御するかを解明するため、PI3K 由来ペプチドである Ras and PI3K endosomal localization（RAPEL）の結合因子として同定された glutamate carrier protein 1（GC1）の機能解析を行った。まず、GC1 が RAPEL と相互作用すること、ミトコンドリアへ局在することを確認した。また、メガミトコンドリア法を用いて GC1 がミトコンドリア外膜にも局在することを見出した。トランケーション変異体の作製により、GC1 の N 末端側が RAPEL との結合､C 末端側がミトコンドリア局在に関与することを明らかにした。GC1 陽性のミトコンドリアが Ras-PI3K 複合体陽性エンドソームと近接した。さらに､GC1 が Ras-PI3K のエンドソーム移行、エンドサイトーシスおよびエンドソームの成熟化を負に制御することを明らかにした。

審査にあたり副査の武冨教授から、１）クラスリン依存性と非依存性エンドサイトーシスの生物学的違いは何か、細胞はこれらをどのように使い分けるのか、２）結合分子を同定する手法には酵母ツーハイブリッドもあるが、なぜ質量分析を行ったか、３）48 候補因子には他のミトコンドリアタンパク質が含まれるか、なぜ GC1 を研究対象に選択したか、４）GC1 と RAPEL の相互作用はどのように制御されているか、との質問があった。これらに対し申請者は、１）両者は被覆タンパク質が異なり、積み荷の種類とサイズにより使い分けられる、２）研究室ではツーハイブリッド法でも結合因子探索を行っている、３）複数のミトコンドリアタンパク質が同定されており、うち一つのタンパク質が Ras-PI3K の正の制御因子だったことから GC1 を選択した、４）GC1 の N 末端側を介して結合する、と回答した。

続いて副査の廣瀬教授から、１）因子 X としての GC1 の妥当性および因子 X の必要性、２）ミトコンドリア内外膜の局在を調べる手法の一般性と妥当性、３）RAPEL がどの程度保存されて

いるのか、について質問があった。申請者は、1）実際因子 X として同定された分子が複数あり、RAPEL を欠損する PI3K はエンドソームには移行できないこと、2）バリノマイシンを用いた方法はタンパク質のミトコンドリア内局在を調べるには一般的だが、将来的には電子顕微鏡または超解像顕微鏡を用いて検討する予定である、3）クラス I の PI3K で保存されている、と回答した。

引き続き主査の佐邊教授から、1）エンドソーム膜とミトコンドリア膜の相互作用でエンドサイトーシスが制御される直接的証拠はあるか、2）投稿論文の現況、3）A431 細胞を選択した理由、について質問があった。また、投稿論文では GC1 の基本的機能特性に焦点を当てるよう、学位論文の要約部分に癌文献を追加するようコメントがあった。これらに対して申請者は、1）現在は間接的にエンドサイトーシスを制御することが示されているが、将来的に接触部位でのエンドサイトーシス検討する、2）査読中、3）EGF 受容体発現量の多い A431 と Cos-1 細胞を用いた、と回答した。

最後に副査の野口教授から、1）イムノブロットの電気泳動度について、2）RAPEL と結合しない GC1 変異体を使用したか、3）トランスフェクションに用いた手法、4）LysoTracker で染色された小胞をどのようにエンドソームかリソソームかを判断するか、5）エンドソーム成熟に GC1 のグルタミン酸輸送能や PI3K のキナーゼ活性は必要か、6）細胞内で Ras-PI3K-GC1-エンドソームの複合体を調べたか、との質問があった。また、論文記載内容についていくつか指摘があった。これらに対して申請者は、1）蛍光タンパク質と GST のサイズが類似している、2）現時点では、RAPEL と結合しない GC1 変異体は完成していない、3）siRNA のトランスフェクションにはリポフェクタミンを用いたが、他の手法は試していない、4）後期エンドソームとリソソームは区別ができない、5）現在のところ不明、6）エンドソームとミトコンドリアの近接は観察したが、三者複合体の形成は見ていない、と回答した

本論文は GC1 がエンドサイトーシスの制御に関与することを初めて見出した論文であり、てんかんや癌の悪性化など、エンドサイトーシスと GC1 の関与が個別に報告されている疾患の病態を一元的に理解できる可能性が期待される。審査員一同はこれらの成果を高く評価し、大学院過程における研鑽や取得単位なども併せ、申請者が博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。