

エンドサイトーシスによる細胞外シグナルの下方制御機構の解析

東京理科大学 基礎工学部 生物工学科
十島 二郎

1. はじめに

エンドサイトーシスは様々な細胞外の物質を細胞内へと取り込む機構で、栄養物質の摂取、免疫応答機構、細胞外シグナルの下方制御、病原ウィルスの細胞内への感染など様々な生命現象に関与している。この中で、細胞外シグナルの下方制御はリガンドの結合により活性化した受容体を細胞内へ取り込み、分解する機構であり、細胞の増殖や分化シグナルの制御に重要である。ヒトの幾つかの上皮癌ではこの機構に異常が生じ、増殖シグナルが恒常的に活性化されていることが報告されている。しかしながら、がん細胞において、どのようなエンドサイトーシスの異常が起っているのか、その原因となる遺伝子や分子レベルでのメカニズムについては、まだほとんど明らかにされていない。これは、活性化した受容体のエンドサイトーシス機構がまだ十分に解明されていないからであり、受容体のエンドサイトーシスによる不活性化の基本原理を明らかにすることは、エンドサイトーシス異常により生じるがんの原因究明のために非常に重要である。本研究の目的は、私達の研究室が新規に開発した出芽酵母のエンドサイトーシスマーカーを用いて、「細胞膜上の受容体はどのようにしてクラスリン小胞へと輸送されるか (課題 1)」、また「受容体を含むクラスリン小胞はどのようにして初期エンドソームへと輸送されるか (課題 2)」を明らかにし、リガンドや病原ウィルスの結合により活性化した受容体がどのようにして細胞内へと取り込まれるのか、その分子機構を解明することにある。

本研究では、受容体のエンドサイトーシス機構を調べるモデルとして出芽酵母の接合フェロモン受容体である Ste2 を用いる。Ste2 は G 蛋白質共役型受容体 (GPCR) の一種である。GPCR は 7 回膜貫通型の細胞膜上受容体であり、ヒトゲノムにおいて約 900 種類以上からなる大きなファミリーを形成している。GPCR の脱感作とその後のエンドサイトーシスによる細胞内への取り込みと分解は、GPCR シグナルの下方制御において中心的役割を果たしている。出芽酵母の Ste2 受容体はこれまで GPCR のシグナル伝達、修飾、下方制御の分子機構を明らかにする酵母のモデル受容体として、研究されてきた。私達は、Ste2 のリガンドである α -factor に蛍光物質 (Alexa Fluor) を化学的に結合させることにより、活性化受容体の可視化マーカー (Alexa- α -factor) の作製に成功した (図 1)。このマーカーを用いて、私達はリガンドの結合により活性化した Ste2 受容体の細胞膜上での動態を可視化し、解析することに成功した。これまで、クラスリン被覆ピットの形成と Ste2 受容体の活性化は独立した現象であり、 α -factor の結合により活性化した Ste2 受容体は既に形成されているクラスリン被覆ピットに移動し、エンドサイトーシスされることを明らかにした (参考論文 1)。しかしながら、 α -factor の結合により、活性化した Ste2 受容体がどのような分子機構でクラスリン被覆ピットに輸送されるかは、まだ明らかにされておらず、本研究では活性化した受容体のエンドサイトーシス機構の解明を目指し、上に挙げた 2 課題の研究を行った。

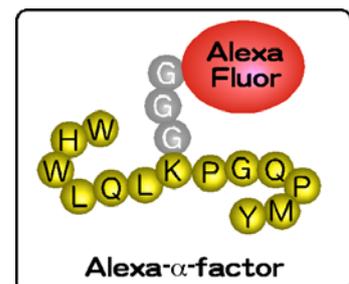


図 1. Alexa- α -factor の構造

課題1. 細胞膜上の受容体はどのようにしてクラスリン小胞へと輸送されるか

2. 方法

最近、私達はリガンドに結合した受容体のエンドサイトーシス部位（クラスリン小胞）への移動は受容体の細胞内領域のリン酸化およびユビキチン化が必要であることを見出した（参考論文2）。この結果は、受容体のクラスリン小胞への移動は、リン酸化/ユビキチン化された受容体を認識する蛋白質が仲介する可能性を示唆しており、この受容体結合蛋白質を同定することは本研究課題の鍵となる。本研究では、エンドサイトーシス関連遺伝子欠損変異体を用いて、受容体のクラスリン小胞への輸送に異常のある変異体の同定を試みた。また、リン酸化型Ste2変異体をベイトとした酵母ツーハイブリッドシステムにより、出芽酵母ゲノムライブラリーをスクリーニングし、リン酸化型受容体に結合する蛋白質の同定を行なった。

3. 結果

受容体のクラスリン小胞への移動を制御する蛋白質について探索した結果、クラスリン小胞に存在し、ユビキチン結合ドメインを持つEde1p およびEnt1p を受容体結合タンパク質として同定した。これらの遺伝子欠損変異体および二重変異体において、受容体のクラスリン小胞への移動に著しい抑制が見られた。また、Ste2p のリン酸化型特異的に結合する蛋白質を、酵母ツーハイブリッドシステムによりスクリーニングを行った結果、哺乳類 14-3-3 タンパク質酵母ホモログであるBmh2p をSte2受容体の新規結合タンパク質として同定した。Bmh2p のSte2受容体への結合がリン酸化依存的であるかを調べるため、脱リン酸化型Ste2との結合を調べた。この結果、Bmh2p は脱リン酸化型（Ste2-6SA）とは結合しなかった（図2）。現在、*BMH2* 遺伝子、およびそのファミリー遺伝子の欠損変異体を用いて、受容体輸送における影響を解析中である。

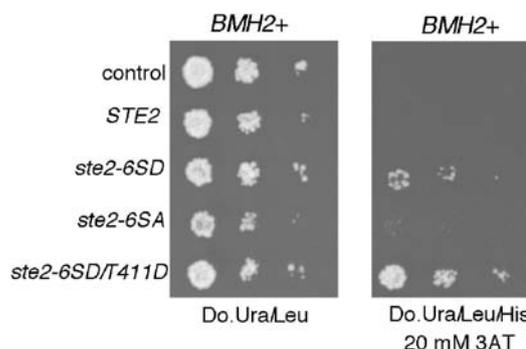


図2. Ste2p のBmh2p へのリン酸化依存的結合

課題2. クラスリン小胞はどのようにして初期エンドソームへ輸送されるか

2. 方法

受容体を取り込んだクラスリン小胞は細胞内へ入った後、初期エンドソームへと輸送されるが、その分子機構についてはまだほとんど明らかにされていない。私達は以前のAlexa- α -factorを用いた研究において、クラスリン小胞と初期エンドソームの会合はアクチン骨格を介して行われることを発見した（参考論文1）。このため本研究では、酵母遺伝子欠損変異体を用いて、Alexa- α -factorの初期エンドソームへの輸送に異常のある変異体スクリーニングし、クラスリン小胞の初期エンドソームの輸送に必要な蛋白質の同定を試みた。また、エンドサイトーシス関連遺伝子の変異体におけるアクチンフィラメントの動態を解析し、クラスリン小胞のアクチンフィラメントを介した輸送機構を調べた。

3. 結果

酵母のゲノムデータベースより、酵母のエンドサイトーシスに関連するタンパク質、約300種類を選び、これらの遺伝子欠損変異体を作成した。これらの各遺伝子欠損変異体を用いて、Alexa- α -factorを取り込ませた後、エンドソームへの輸送に遅延が生じている変異体のスクリーニングを行った。現在までに、約200種類の遺伝子欠損変異体のスクリーニングが完了しており、10種類の変異体を同定した。これらの変異体は、

クラスリン形成異常に異常が見られるものと、Alexa- α -factor の輸送に遅延が生じているものに分類された。現在、残りの遺伝子欠損変異体のスクリーニングを継続しているとともに、スクリーニングで得られた蛋白質の機能解析を進めている。クラスリン小胞のアクチンフィラメントを介した細胞内への取り込み機構の解析については、エンドサイトーシス関連遺伝子欠損変異体についてアクチンフィラメントとクラスリン小胞の動態を解析した。この結果、19 種類の変異体において顕著な異常がみられた。これらの変異体について、さらにクラスリン小胞の輸送について解析したところ、哺乳類 Formin の酵母ホモログである Bnl1、アクチンキャッピングタンパク質である Cap1、アクチン束化タンパク質である Sac6 など 5 種類の変異体において、顕著な異常が認められた。

4. 考察 まとめ

これまで研究において、私達は活性化した受容体のエンドサイトーシスには受容体の細胞内領域に起こるリン酸化およびユビキチン化が非常に重要な役割を果たしていることを明らかにした。これらの修飾は、以前の研究においても、その重要性が示唆されていたが、ユビキチン化が受容体のクラスリン被覆小胞への移動に重要であることを示したのは本研究が初めてである。さらに、私達はリン酸化およびユビキチン化された受容体の結合蛋白質の同定に成功した。今後、これらの蛋白質の受容体輸送における機能を解析することにより、活性化した受容体のクラスリン小胞への輸送の新しい分子機構の解明に繋がることが期待される。本研究で同定した Bmh2p は哺乳類 14-3-3 蛋白質の酵母ホモログであり、以前の研究において、過剰発現することによりクラスリン遺伝子欠損株の生育阻害を回復することから、Bmh2p がクラスリン仲介型エンドサイトーシスに関与していることが示唆されている。今後は、*BMH2* 遺伝子欠損変異体を作製し、Ste2 受容体のエンドサイトーシス効率、およびクラスリ被覆小胞への輸送効率の解析を行う必要がある。また、Bmh2p は蛋白質間相互作用のアダプター - 分子として機能することが明らかになっているため Bmh2p を介して Ste2 受容体と結合している蛋白質を同定することも重要な課題となる。また、クラスリン小胞の初期エンドソームへの輸送機構についても、遺伝子欠損変異体のスクリーニングにより、輸送に必要ないくつかの候補遺伝子の同定に成功した。スクリーニングはまだ途中段階であるが、新しいマーカーを用いたスクリーニングにより、これまで発見されていなかった関連遺伝子の同定に成功した。今後はさらにスクリーニング規模を上げ、最終的には酵母全遺伝子約 6000 種類の変異体について網羅的にスクリーニングする予定である。

最後になりましたが、このような経済環境の厳しい時期におきまして、貴財団より多大なる助成をして頂きましたことを深く感謝いたします。私達の研究室はまだ立ち上がって間もなく、研究資金が非常に不足している時期でありましたが、御陰さまで、研究室も完全に軌道に乗り、多くの研究成果を挙げることができました。今後、これらの成果を基にさらに研究を発展させていきます。また、本研究で得られた成果については、まとめ次第、国内外の研究雑誌、および学会において発表します。

5. 発表論文、参考文献

参考論文 1. Junko Y. Toshima*, Jiro Toshima* (*Joint first authorship), Marko Kaksonen, Adam C. Martin, and David G. Drubin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103: 5793-5798, (2006).

参考論文 2. Junko Y. Toshima, Jun-ichi Nakanishi, Jiro Toshima* (*corresponding authors), and David G. Drubin*. *Mol. Biol. Cell*, 20: 5039-5050, (2009).