

エンドサイトーシスの分子機構の解明

群馬大学 生体調節研究所 細胞構造分野
原 太一

1. はじめに

エンドサイトーシスは細胞外からの物質や情報を細胞内に取り込むシステムであり、様々な生命現象と関連している。それ故、エンドサイトーシスの分子機構や生理的役割の解明はエンドサイトーシスによって調節される生命機能や疾患を理解する上で重要な課題である。エンドサイトーシスによって細胞内へと取り込まれた物質は、最初に初期エンドソームへと輸送される。初期エンドソームでは分解経路（分解される物質）とリサイクリング経路（細胞膜で再利用される物質）の選別が行われる。分解経路に選別された物質は初期エンドソームに留まり、その後初期エンドソームが後期エンドソームへと成熟し、後期エンドソームがリソソームと融合することで内容物や膜貫通型のタンパク質が内腔小胞ごと分解される。一方、リサイクリング経路へと選別された物質は、初期エンドソームからリサイクリングエンドソームへと輸送された後、細胞膜へと戻され再利用される。最近の研究から、このリサイクリングシステムが神経細胞の神経突起伸長や上皮細胞の極性形成、細胞運動に関与することが明かになってきている。すなわち、エンドサイトーシスによる物質の取り込みとリサイクリングシステムによる再分配が細胞や組織構築に機能しており、高次成体機能調節において重要なシステムとして働いていると考えられる。しかしながら、エンドサイトーシスの分子メカニズムにおいて、リサイクリング経路の分子基盤の理解が遅れているのが現状である。われわれの研究グループでは、線虫を用いた遺伝学的解析により、リサイクリング経路に働く新たな制御因子として低分子量GTPase Rab35を同定した。哺乳動物Rab35は神経突起伸長や免疫シナプス形成に関与することが報告されており、Rab35によるリサイクリング制御が高次生命機能に重要な役割を果たしている可能性が考えられる。そこで本研究では、GTPase Rab35によって制御される細胞機能調節機構と生理的役割の解析を起点に、エンドサイトーシスの分子機構に新たな知見を供給することを目的として研究を行った。

2. 方法

① Rab GTPaseはGDP・GTP交換因子によりGDP型からGTP型へと変換され、活性化し、その後、エフェクター分子を介して小胞と細胞膜の繫留、融合、小胞への積み荷の選別、オルガネラ輸送など様々な役割を担っていることが知られている。哺乳動物におけるGTPase Rab35の作用機構を明らかにするには、Rab35のエフェクター因子を同定することが重要であると考えられる。そこで、本研究計画では酵母ツーハイブリッド法により、Rab35と相互作用する新規因子のスクリーニングを行う。

② これまで、哺乳動物におけるRab35の機能解析は培養細胞を用いた解析に限定されており、哺乳動物個体におけるRab35の機能は明らかになっていない。そこで、本研究課題では、Rab35欠損マウスを作製し、Rab35の生理的役割を解析する。マウスES細胞においてRab35遺伝子の発現をOFFにするようにTrapベクターが挿入されたES細胞株を獲得し（Rab35 geo）、キメラマウスの作製を行う。作製した♂キメラマウスと♀C57BL/6Nマウスを交配し、Rab35 geo アレルを有するテロマウスを得る。ヘテロマウス同士の交配により、Rab35ノックアウトマウス（Rab35 geo/geo）の作製を試みる。同時に、Cre/loxPシステムにより、Rab35を時期・組織特異的に欠損できるマウス（Rab35 floxed）の作製を進める。

3. 研究結果と考察

(1) Rab35結合因子の探索

線虫Rab35をbaitにした酵母ツーハイブリッド法によりRab35結合因子の探索を行った。その結果、複数の候補分子が得られ、培養細胞を用いた生化学的解析により相互作用の再確認を行

った。この解析から結合が確認された因子のマウスホモログを獲得し、同様の結合確認を行った。以上の解析から、われわれはAcap2やOCRL1などのRab35相互作用因子を独自に同定した。Acap2は細胞内小胞輸送やアクチン細胞骨格リモデリングの調節に関係するArf6を不活性化させるGAPとして機能することが示されている。また、OCRL1はイノシトール環の5位のリン酸を脱リン酸化するイノシトール5-ホスファターゼであり、その遺伝子変異は筋緊張低下及び腱反射低下といった神経症状を示すロウ症候群や筋尿細管性蛋白尿を呈するデント病と関連することが示されている。OCRL1もまたクラスリンやAP-2などのエンドサイトーシス関連因子と相互作用し、細胞内小胞輸送の制御に関わると考えられている。実際、これらの因子がRab35のエフェクターとして神経突起伸長やファゴサイトーシス形成、細胞質分裂などの細胞機能調節に機能することが報告された (Kobayashi H and Fukuda M., J Cell Sci., 2012; Egami Y et al., J Cell Sci., 2011; Damboumet D et al., Nat Cell Biol., 2011)。われわれは、上記以外の結合候補因子も見出しており、これらの結合因子の局在や活性に及ぼすRab35の影響をRab35欠損細胞や活性化型Rab35発現細胞を用いて解析を進める予定である。

(2) Rab35ノックアウトマウスの作製と解析

哺乳動物個体におけるRab35の生理的役割を明らかにする目的で、Rab35欠損マウスの作製を試みた。マウスES細胞においてRab35遺伝子の発現を阻害するようにpolyA付加シグナルを有するTrapベクターがRab35の遺伝子領域に挿入されたES細胞株を獲得し (Rab35 geo), そのキメラマウスの作製を行った。作製した♂キメラマウスと♀C57BL/6Nマウスを交配し、Rab35 geo アレルを有するヘテロマウスを得ることに成功した。ヘテロマウス同士の交配により、Rab35ノックアウトマウス (Rab35 geo/geo) の作製を試みたところ、Rab35ホモ欠損体が胎生致死となることが明らかとなった。そこで現在、Cre/loxPシステムにより、Rab35をコンディショナルに成獣組織で欠損できるマウスの作製を進めている。

4. 考察 まとめ

本研究課題において、GTPase Rab35のエフェクター候補として複数の因子の同定に成功した。これらの因子はエンドサイトーシスや細胞骨格系の制御に関与することが報告されている。Rab35はこれらのエフェクター因子を統合的に制御することで、神経突起伸長等の高次細胞機能を制御している可能性が考えられる。今後、エンドサイトーシスのリサイクリングと細胞骨格系の相互作用機構について、Rab35によるエフェクター候補因子の制御の観点から解析を進める必要がある。また、Rab35ノックアウトマウスの解析から、Rab35が哺乳動物の初期胚発生に必須の役割を果たしていることが明らかとなった。Rab35がどのような発生制御に関係するかについて解析することで、リサイクリングシステムと哺乳動物の組織構築との関連を明らかにしていきたい。

5. 発表論文、参考文献

①Regulation of endocytic recycling by *C. elegans* Rab35 and its regulator RME-4, a coated-pit protein.

Sato M, Sato K, Liou W, Pant S, Harada A, Grant BD.
EMBO J. 2008;27(8):1183-96.

②Functional analysis of lysosomes during mouse preimplantation embryo development.

Tsukamoto S, Hara T, Yamamoto A, Ohta Y, Wada A, Ishida Y, Kito S, Nishikawa T, Minami N, Sato K, Kokubo T.
J Reprod Dev. 2013;59(1):33-9.