

論文の内容の要旨

論文題目 **EGF 刺激依存的な小胞輸送における N-WASP の役割** 大槻 真紀子
氏 名 大槻 真紀子

1 序論

小胞のエンドサイトーシスは、厳密に制御されたカスケードにより形成されており、それぞれの段階において実に多くの蛋白質および脂質の関与が報告されている。小胞が形成されるためにはその場の細胞骨格が適切に再構成される必要があり、したがってアクチン細胞骨格系もエンドサイトーシスに重要な働きを担っていると考えられる。最近、アクチン細胞骨格系の制御因子の 1 つである N-WASP (neural Wiskott - Aldrich syndrome protein) がエンドサイトーシスに関与していることを示唆する報告が相次いでなされた。N-WASP はヒト遺伝性免疫疾患である Wiskott-Aldrich 症候群の原因遺伝子である WASP のホモログである。EGF 刺激等によるシグナル伝達の結果、Rho ファミリー低分子量 G 蛋白質 Cdc42 やイノシトールリン脂質の phosphatidylinositol (4,5) bisphosphates (PIP2) と結合することにより活性化される。その結果、Arp2/3 複合体を介してアクチン重合を促進し、糸状仮足やアクチンコメットの形成や細胞の浸潤など多くの現象に寄与している。N-WASP が実際にエンドサイトーシスにおいてどのような機能を果たしているのか、その作用機序はまだ明らかではない。そこでこの点を解明すべく、主に EGF 刺激依存的なレセプターのエンドサイトーシスにおける N-WASP の機能解析を、細胞生物学的な手法を用いて行なった。

2 N-WASP は EGF 刺激依存的に raft へ移行する

EGF 刺激によって活性化された EGF レセプターは主に clathrin を被膜蛋白質とする小胞 (clathrin coated vesicles : CCVs) により細胞内に取り込まれる。このエンドサイトーシスは細胞膜上の raft と呼ばれるコレステロールやスフィンゴリン脂質に富んだ領域において行われる。そこで、EGF 刺激した HeLa 細胞の細胞抽出液をスクロース密度勾配を利用して、raft 画分、early endosome の marker である Early Endosome Antigen 1 (EEA1) positive な画分、およびその他の蛋白質 (rest) の画分に分画した。各画分を SDS-PAGE で分離し、ウェスタンブロットを行って含有される蛋白質を同定した。EGF 刺激により活性化されて取り込まれる EGF レセプターを抗リン酸化チロシン抗体を用いて検出した。この結果、EGF 刺激前には rest 画分に存在していた N-WASP は、EGF 刺激後速やかに raft 画分へ移行し、その後リン酸化された EGF レセプターと同様に細胞内に取り込まれていく様子が観察された (図 1)。CCVs の主な構成蛋白質である clathrin や dynamin も同様の局在変化を示した。これより N-WASP は EGF 刺激により raft に移行し、リン酸化された EGF 受容体を含む CCVs と共に細胞内に取り込まれていく可能性が示唆された。

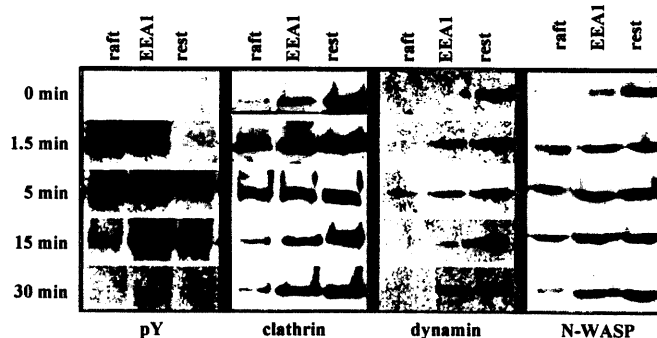


図 1 N-WASPはEGF刺激依存的にraftへ移行する
EGF刺激 (100 ng/ml) したHeLa細胞抽出液をスクロースの密度勾配を用いてraft画分と early endosome (EEA1) 画分およびその他 (rest) の画分に分画した。それぞれの画分を SDS-PAGEにて分離し、抗リン酸化チロシン抗体、抗clathrin抗体、抗dynamin抗体、および抗N-WASP抗体を用いてウェスタンブロットを行なった。抗リン酸化チロシン抗体は活性化されたEGFレセプターの検出に用いた。左の時間はEGF刺激後細胞抽出液を回収した時間を示している。

出液をスクロース密度勾配を利用して、raft 画分、early endosome の marker である Early Endosome Antigen 1 (EEA1) positive な画分、およびその他の蛋白質 (rest) の画分に分画した。各画分を SDS-PAGE で分離し、ウェスタンブロットを行って含有される蛋白質を同定した。EGF 刺激により活性化されて取り込まれる EGF レセプターを抗リン酸化チロシン抗体を用いて検出した。この結果、EGF 刺激前には rest 画分に存在していた N-WASP は、EGF 刺激後速やかに raft 画分へ移行し、その後リン酸化された EGF レセプターと同様に細胞内に取り込まれていく様子が観察された (図 1)。CCVs の主な構成蛋白質である clathrin や dynamin も同様の局在変化を示した。これより N-WASP は EGF 刺激により raft に移行し、リン酸化された EGF 受容体を含む CCVs と共に細胞内に取り込まれていく可能性が示唆された。

3 N-WASP は dynamin とコンプレックスを形成する

そこで実際に N-WASP が直接 CCVs のコンプレックスと結合しているのかどうかを確認した。EGF 刺激した HeLa 細胞抽出液に抗 N-WASP 抗体を添加して免疫沈降を行った結果、dynamin の共沈が確認されたため、dynamin と N-WASP がコンプレックスを形成することが判明した。さらにこのコンプレックスは EGF 刺激後 1.5 分から 5 分にかけて増大し、その後消失したが、この時間変化は N-WASP が raft へ移行する時間変化とほぼ一致した。この結果から、N-WASP と dynamin は raft において EGF 刺激依存的にコンプレックスを形成することが明らかになった。

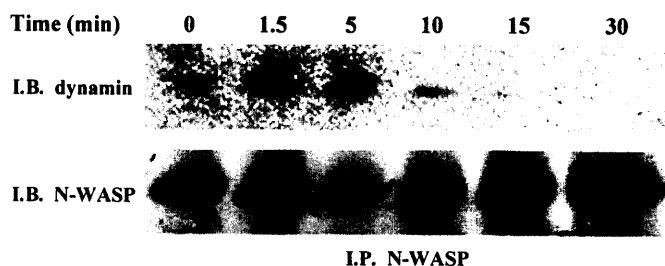


図 2 N-WASPはEGF刺激依存的にdynaminと結合する
HeLa細胞をEGF (100 ng/ml) 刺激した後TGHバッファーで可溶化した細胞抽出液に抗N-WASP抗体を加えて免疫沈降を行なった。得られた沈降物をSDS-PAGEにて分離し、抗dynamin抗体および抗N-WASP抗体を用いてウェスタンブロットを行なった。上の数字はEGF刺激後細胞抽出液を回収した時間を示している。EGF刺激後1.5分から5分にかけてdynaminの共沈が確認された。

dynamin は CCVs のエンドサイトーシスに必要な不可欠な蛋白質である。したがって、N-WASP が raft において CCVs のエンドサイトーシスに関与している可能性が高い。実際、N-WASP を過剰発現させた COS7 細胞では、テキサスレッドでラベルした EGF (EGF-TexRed) の取り込みに対して、約 50 %の細胞において取り込み阻害効果が認められ、N-WASP が CCVs のエンドサイトーシスに関与していることが示唆された。Arp2/3 複合体活性化に必要な verprolin ホモロジドメインを欠損させた変異体 (N-WASP Δ V) およびプロリンリッチ領域を除く N 末端のドメインすべてを欠損させた変異体 (N-WASP Δ N) を過剰発現させた場合にも EGF-TexRed の取り込みは阻害されたが、プロリンリッチ領域のみを欠損させた変異体 (N-WASP Δ P) では阻害効果がみられなかった。したがって、N-WASP の過剰発現による EGF-TexRed の取り込み阻害にはプロリンリッチ領域が必要であると考えられる。

4 N-WASP は endophilin A と結合する

N-WASP と dynamin は直接結合しないため、この N-WASP/dynamin コンプレックスは第三の蛋白質によって介在されていると考えられた。N-WASP のファミリーである WAVE1 のプロリンリッチ領域をベイトに用いた酵母の two-hybrid system において、endophilin A の human ホモログ SHGL3 の Src ホモロジー3 (SH3) ドメインが単離・同定された。endophilin A は lysophosphatidic acid acyl transferase(LPA-AT)活性部位をもち、clathrin coated-pit の首の部分において dynamin と結合し、clathrin coated-pit を細胞膜からくぶり取る過程を制御していることがすでに明らかにされている蛋白質である。WAVE1 のプロリンリッチ領域は N-WASP と非常に高い相同性があることから、N-WASP と dynamin をつなぐ蛋白質は endophilin A ではないかと考えた。そこで endophilin A の Glutathione S-Transferase (GST) 融合蛋白質を作製し、細胞抽出液を用いてプルダウンアッセイを行なった結果、endophilin A の SH3 ドメインと N-WASP のプロリンリッチ領域が結合することがわかった。In vivo に置いても、Myc タグ付きの endophilin A と N-WASP の双方を過剰発現した細胞抽出液を用いて抗 Myc 抗体または抗 N-WASP 抗体で免疫沈降を行ったところ、いずれの抗体を用いた場合においても N-WASP と endophilin A と dynamin の共に免疫沈降物に含まれていた (図 2)。したがって、この三者がコンプレックスを形成しうることが確認された。endophilin A

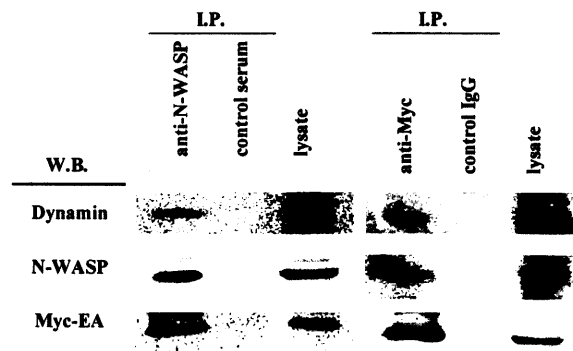


図 3 N-WASPとdynaminとendophilin Aはコンプレックスを形成する
Myc タグ付 endophilin A (Myc-EA) と N-WASP を過剰発現させた COS7 細胞抽出液に、抗N-WASP抗体 (左)、抗Myc抗体 (右) を用いて免疫沈降を行った。それぞれのコントロール抗体として未免疫ウサギ血清 (control serum)、未免疫マウス抗体を (control IgG) を用いた。得られた免疫沈降物をSDS-PAGEにより分離し、抗N-WASP抗体、抗Myc抗体、抗dynamin抗体を用いてウェスタンブロットを行なった。

は生体内でも安定したホモおよびヘテロ二量体を形成しており、endophilin A の二量体のうち、一方の SH3 ドメインにおいて dynamin と、もう片方の SH3 ドメインで N-WASP とが結合することによりコンプレックスを形成していると考えられる。この時、endophilin A のみを過剰発現させた細胞抽出液を用いた場合には、endophilin A と dynamin の共沈はみられなかったことから、二量体 endophilin A の一方の SH3 ドメインに N-WASP が結合している方が、もう片方の SH3 ドメインに dynamin が結合しやすくなるのではないかと予想される。

5 endophilin A は N-WASP のアクチン重合活性を増強する

N-WASP は様々な蛋白質と結合することにより活性化され、Arp2/3 複合体を介したアクチン重合を促進する。そこでピレンラベルした G-アクチンを用いて、N-WASP のアクチン重合活性に対する endophilin A の影響を測定した。この結果、endophilin A 自身にはアクチン重合活性は無いが、N-WASP のアクチン重合活性を増強することが判明した。endophilin A の SH3 ドメイン単独でも増強効果がみられた。また、N-WASP の主な活性化因子である PIP2 と、endophilin A の LPA-AT 活性の基質である LPA および生成物である PA の影響を測定したところ、N-WASP 単独に対しては、PIP2 > PA > LPA の順に活性増強効果が見られたが、endophilin A 存在下では、PIP2 よりも PA の方がより強い増強効果が示された。したがって、clathrin coated-pit の首の部分、つまり endophilin A/N-WASP/dynamin のコンプレックスが形成されており、かつ endophilin A の LPA-AT 活性によって豊富に PA が存在している場においては、N-WASP によるアクチン細胞骨格系の制御が生じている可能性が高いと考えられる。

6 N-WASP の raft への移行には endophilin A によって制御されている

一般的に EGF 刺激によりチロシンキナーゼが活性化され、その結果、レセプターの細胞内ドメインにアダプター蛋白質である Ash/Grb2 や clathrin adaptor complex AP2 が結合し、clathrin がリクルートされると考えられている。clathrin coated-pit 形成されていくために Epsin が ENTH ドメインを介して AP2 と結合することが必要である。したがって、Epsin Δ ENTH を細胞内に過剰発現すると、比較的早い段階で clathrin coated-pit 形成が阻害される。また、endophilin A の SH3 ドメインを過剰発現した場合には、dynamin と内在性の endophilin A との結合が阻害され、clathrin coated-pit は形成されるが、細胞膜から解離することができない。このように Epsin Δ ENTH や endophilin A の SH3 ドメインを過剰発現させてエンドサイトーシスを阻害した場合には、N-WASP の EGF 依存的な raft への移行が生じないことを細胞染色の結果から明らかにした。

N-WASP はもともとアダプター蛋白質 Ash/Grb2 の SH3 ドメインと結合する蛋白質として単離・同定された蛋白質であり、この Ash/Grb2 によって EGF レセプターにリクルートされてくると考えられていた。実際に SH3 ドメインに結合できない N-WASP Δ P

は raft へ移行できなかつた。しかし、Epsin Δ ENTH を過剰発現させても刺激依存的なチロシンキナーゼの活性化は正常に生じていると考えられるにもかかわらず、Epsin Δ ENTH を過剰発現させた COS7 細胞では、N-WASP の raft へのリクルートは観察されなかつた。したがって、N-WASP の raft への移行には Ash/Grb2 だけではなく clathrin coated-pit が正常に形成されることが必要であり、N-WASP はプロリンリッチ領域において clathrin coated-pit の構成蛋白質と相互作用することにより raft への移行が制御されていると考えられる。また、endophilin A の SH3 ドメインを過剰発現させた場合にも N-WASP の raft への移行は観察されなかつたことから、N-WASP の raft へのリクルートは endophilin A の SH3 ドメインとの結合によって制御されていることが示唆された。

7 結論

本研究において私は Arp2/3 複合体を介したアクチン重合による細胞骨格系の制御因子である N-WASP が EGF 刺激依存的に raft に移行し、clathrin coated-pit の細胞内への取込みに必須な dynamin とコンプレックスを形成していることを明らかにした。N-WASP を細胞内に過剰発現させると、EGF-*TexRed* の取り込みが阻害されたことから、N-WASP が CCVs の取り込みに関与していることが示唆された。この N-WASP/dynamin コンプレックスは endophilin A によって介在されていると考えられ、実際に N-WASP と dynamin と endophilin A がコンプレックスを形成することを示した。endophilin A は SH3 ドメインにおいて N-WASP のプロリンリッチ領域と結合し、N-WASP のアクチン重合活性を増強することを明らかにした。さらに endophilin A の SH3 ドメインによって N-WASP の raft への移行が制御されている可能性が示唆された。

また、endophilin A を過剰発現させて免疫沈降を行なった結果、N-WASP を共に過剰発現させた場合に endophilin A と dynamin の共沈が検出されたことから、N-WASP は clathrin coated-pit を細胞膜から切断する過程に必要な endophilin A と dynamin の結合の安定化に寄与していると考えられる。clathrin coated-pit は多様な蛋白質からなるコンプレックスであり、その構成蛋白質間の相互作用が時間的にも空間的にも極めて精緻に制御された一連の反応により形成されている。N-WASP は多くのドメイン構造を持っており、多種多様な蛋白質およびリン脂質と結合できる。この性質により N-WASP は、CCVs のエンドサイトーシスにおいて clathrin coated-pit が安定に存在できる足場を提供する、いわゆる scaffolding protein として重要な役割を担っているのではないかと考えられる。