

# 論文の内容の要旨

## 論文題目

### Evectin-2 による細胞内小胞輸送の制御機構の解析

氏名 長谷川純矢

#### 【序】

Recycling Endosome (RE)は、エンドサイトーシスされた Transferrin Receptor (TfR)などを再び形質膜へ戻す細胞内小器官として認識されてきた。しかしながら近年、細胞外への分泌過程でREを通過すること、またREを機能的に欠損させてしまうと分泌が全く起こらなくなること、さらに逆行輸送過程にもREの重要性を示唆する報告がなされてきており、REはエンドサイトーシス及びエキソサイトーシス過程の中継地点として機能しているという認識が徐々に高まりつつある。しかし、REに局在する分子について、REからの輸送を制御する分子等の知見は殆どないのが現状である。

Evectin-2 (Evt-2)はN末にPH domain、C末に疎水性領域を有する機能未知のタンパク質である。EvtにはEvt-1及びEvt-2があり、Evt-1は脳及び網膜に発現が限局しており、Evt-2はユビキタスな発現分布を示す。Evtに関して細胞内局在を示した報告があり、post-Golgi周辺に局在することが示唆されているものの、その詳細な局在や機能解析は全くなされていない。本研究では、ユビキタスに発現が認められるEvt-2に注目し、培養細胞での細胞内局在はREであること、また発現抑制によって、形質膜からEndosomeを経由しGolgi体へと輸送されるコレラ毒素のREからGolgi体への逆行輸送が強く阻害されること、REを通過するが形質膜へ戻るTransferrinのリサイクリングには影響が生じないことを見出した。

## 【方法と結果】

### HeLa 及び COS-1 細胞における Evt-2 の細胞内局在

Myc-tag を付加した Evt-2 (Myc-Evt-2) を HeLa 細胞に導入し、様々なオルガネラマーカーと共染色したところ、RE マーカーである Tfr と *trans*-Golgi network (TGN) マーカーである TGN46 と一部共局在したものの、Evt-2 の局在ははっきりと決められなかった。一方、

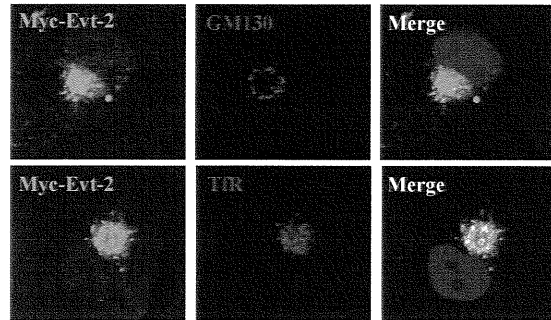


図 1. COS-1 細胞における Myc-Evt-2 の細胞内局在

COS-1 細胞は Golgi 体が Ring 状 (Golgi Ring) に分布し、その中心に RE が局在するという非常にユニークなオルガネラの局在を示す細胞である。

そこで COS-1 細胞を用いて同様な検討を行った結果、TGN46 や他の Golgi マーカー (e.g. GM130) とは局在は一致せず、Tfr と高い共局在性を示した (図 1)。このことから、Evt-2 は RE 及びその近傍に局在することが示唆された。また、Evt-2 の PH domain だけを発現させても RE へ局在したことから (data not shown)、Evt-2 は PH domain を介して RE へ局在していることが示された。

### COS-1 細胞での Evt-2 発現抑制系

次に Evt-2 の機能を解析する目的で、Evt-2 に対する特異的なモノクローナル抗体の作製、また発現抑制系 (RNAi) の構築を試みた。その結果、抑制効率の高い系の構築ができた (図 2)。その条件下でまず、各種オルガネラマーカーの変動を観察したところ、形質膜 / Endosome / TGN 間をサイクルしている TGN46 の局在に異常が生じたが、GM130 などの Golgi マーカー等には大きな影響はなかった (図 3)。

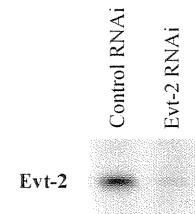


図 2. Evt-2 RNAi の抑制効果 (COS-1)

### COS-1 細胞での Evt-2 RNAi におけるコレラ毒素の逆行輸送

Evt-2 RNAi によって TGN46 に影響が出たこと

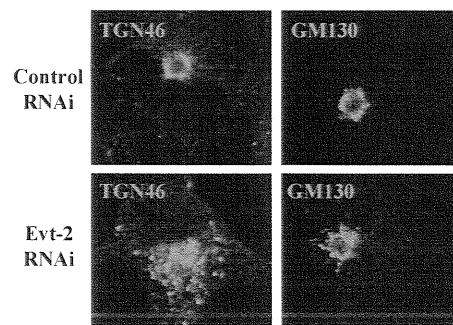


図 3. Evt-2 RNAi によるオルガネラマーカー (COS-1)

から、形質膜と Endosome 間、もしくは Endosome と TGN 間の輸送に異常が生じていることが予想

された。そこで、形質膜からエンドサイトーシスされ Endosome を経由し、TGN まで輸送される Cholera Toxin B subunit (CTxB) を指標にして、Evt-2 RNAi でその輸送過程に影響が出るか検討した。コレラ毒素の輸送はこれまで HeLa 細胞を用いて検討することが多かったため、そのオルガネラ局在の特性上、RE を通過するかどうか疑問が残っていた。しかし、COS-1 細胞を用いることによって、コレラ毒素が Golgi Ring の中心、つまり RE を通ることを見出している (data not shown)。まず、Control RNAi において検討したところ、37°C で 60min incubate

するとコレラ毒素は GM130 と共局在、すなわち Golgi 体に到達していた。しかしながら、Evt-2 RNAi においては、コレラ毒素は REにとどまっていた (図 4)。さらに incubate (90min)しても Golgi 体への移行は観察できなかった。また、他の細胞株でも同様なことが起こるか検討す

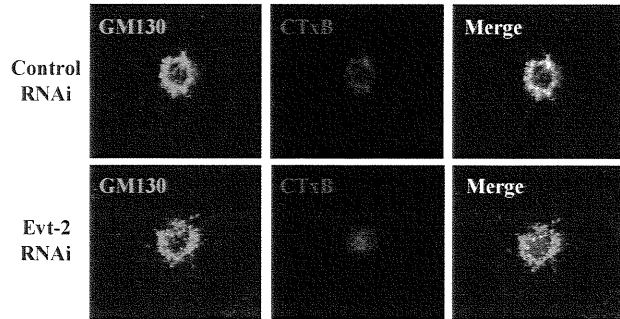


図 4. Evt-2 RNAi によって CTxB の逆行輸送が RE で阻害される (COS-1)

るため、HeLa 細胞においてコレラ毒素の輸送を観察したところ、Evt-2 RNAi で Golgi 体への移行は遅れていた (data not shown)。このことから、Evt-2 は RE からの出芽もしくは TGN への fusion 過程に重要な役割を担っていることが示唆された。

### COS-1 細胞での Evt-2 RNAi における Transferrin のリサイクリング

次に他の輸送過程に影響はないか、エンドサイトーシス後 Early Endosome (EE)及び RE を通過し、形質膜に戻ることが知られている Transferrin (Tf)の輸送について検討した。<sup>125</sup>I-Tf を用いた定量的な解析を行った結果、Control、Evt-2 RNAi において、リサイクリングされる kinetics に大きな違いは認められなかった (図 5)。このことより、Evt-2 は Tf のリサイクリング過程には関与していない

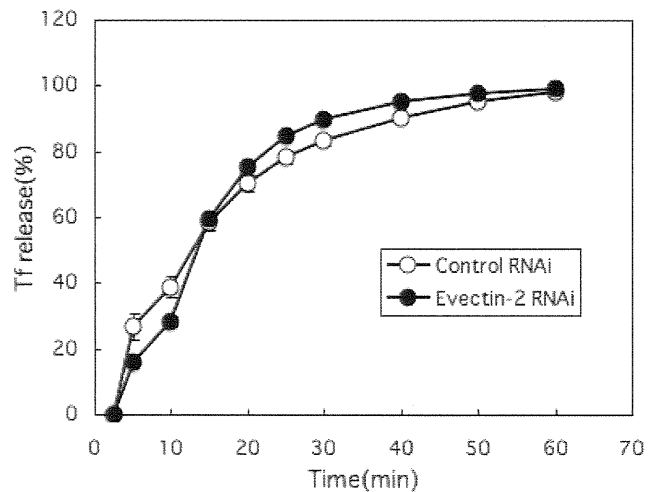


図 5. <sup>125</sup>I-Tf を用いた Kinetics assay (COS-1)

ことが示された。以上のことから、Evt-2 は RE に局在し、RE から形質膜ではなく、RE から Golgi 体への小胞輸送を制御していることが強く示唆された。

### Evt-2 の関与するメカニズムの解析

コレラ毒素の逆行輸送に関与する分子として、SNARE が良く知られている。そこで、まず COS-1 細胞で SNARE RNAi によりコレラ毒素の輸送を観察したところ、逆行輸送に関与する SNARE である Syntaxin6 (Syn6) 及び Syntaxin16 (Syn16)の RNAi において、コレラ毒素の輸送は RE で阻害されていた (図 6)。さらに、それら SNARE

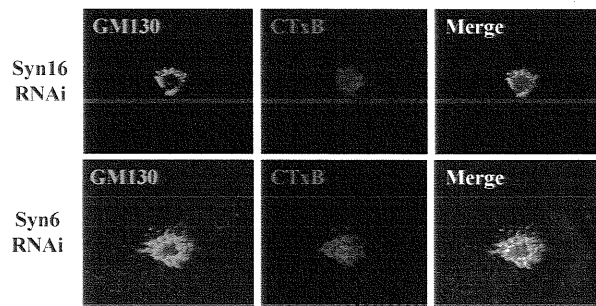


図 6. Syntaxin16/Syntaxin6 RNAi では CTxB の逆行輸送が RE で阻害される (COS-1)

が Evt-2 と協調して逆行輸送を制御していることが考えられたため、免疫沈降実験により相

相互作用を検討した。その結果、小胞上の SNARE (v-SNARE)である VAMP4 とは相互作用せず、Golgi 体に局在する target (t)-SNARE である Syn6 及び Syn16 と相互作用することが示された (図 7)。

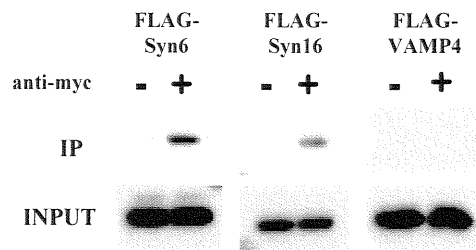


図 7. Myc-Evt-2 と t-SNARE(Syn6, Syn16)は相互作用するが、v-SNARE (VAMP4)とは相互作用しない

【まとめと考察】

本研究において、Evt-2 が RE に局在すること、その局在は PH domain 依存的であること、そしてコレラ毒素の逆行輸送に極めて重要な分子であることを見出した。また、Tf のリサイクリングには影響がないことも示されているので、Evt-2 は RE を通過する全ての cargo 分子の sorting に関与しているのではなく、おそらく Golgi 体へと移行する分子特異的に作用するものと思われる。さらに、Evt-2 は Golgi 体の t-SNARE である Syn6, Syn16 と相互作用して、コレラ毒素の輸送を制御していることが示唆された。おそらく Evt-2 は RE より出芽した小胞上に局在し、t-SNARE との相互作用を介して TGN への targeting に機能していると思われ、SNARE 複合体が形成され Golgi 体へ cargo を輸送した後、Evt-2 は PH domain を介して RE へ戻ることができると考えられる (図 8)。

RE が注目されてきたのはここ数年で、これまで Golgi 体に局在すると考えられていた分子が実は RE に局在しているという報告も幾つか出てきている。これまでの小胞輸送研究は、そのほとんどが HeLa 細胞を用いて行われてきた。今後 COS-1 細胞を用いることによって、RE に局在する分子の発見やこれまで曖昧だった輸送過程を明確にできるものと思われる。

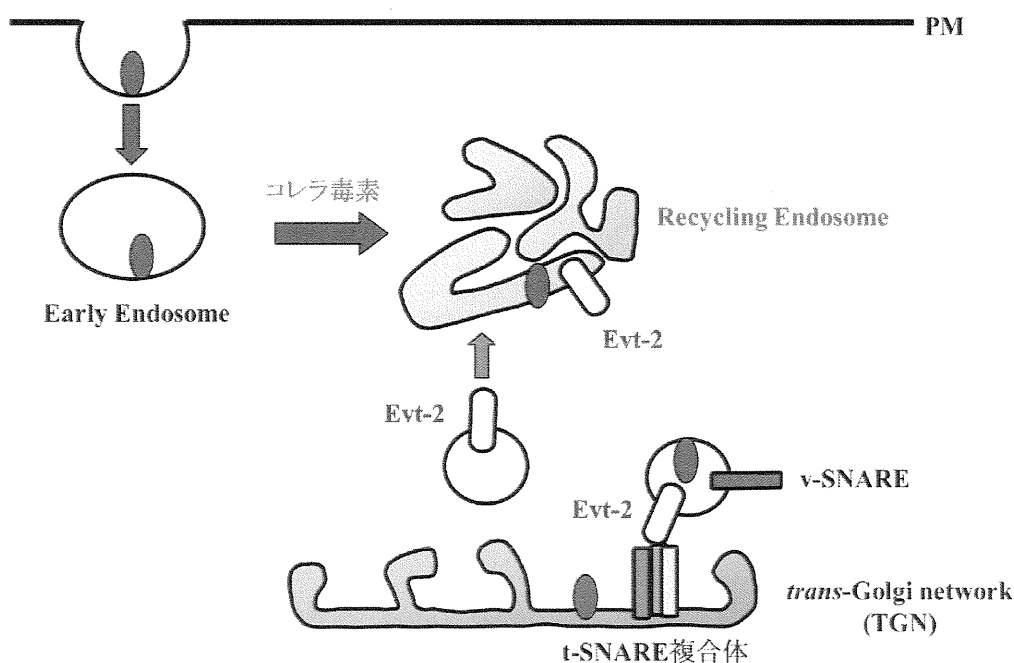


図 8. Evt-2 による小胞輸送制御