

論文の内容の要旨

論文題目

エンドサイトーシス後期過程に介在する 低分子量 G 蛋白質 Arl8 の機能解析

氏名 菊 香 順 史

[序]

リソソームは多数の加水分解酵素を有し、細胞内における多くの蛋白質分解において重要な役割を担うオルガネラである。これまでの研究から、リソソームは直接、後期エンドソーム・ファゴソーム・オートファゴソームなどの分解基質を含む膜オルガネラと融合し、これらの融合によって形成された“ハイブリッドオルガネラ”において基質の分解が進行すると考えられている。したがって、リソソームによる適切な蛋白質分解のためには、リソソームと標的オルガネラとの融合が時空間的に厳密に制御されていることが必要であるが、その制御機構に関しては未だ明らかとされていない。

当研究室で同定した Arl8 (哺乳動物においては Arl8a 及び Arl8b の 2 種のサブタイプが存在) は、オルガネラ間の物質輸送に重要な役割を担っていることが知られている低分子量 G 蛋白質 Arf/Arl ファミリーの一つであり、このファミリーの中ではリソソームに局在することが報告されている唯一の分子である。本研究において私は、エンドサイトーシスされた EGF (Epidermal growth factor) の分解過程における Arl8 の機能的役割の解析を行い、Arl8 が未成熟な後期エンドソームとリソソームの融合に抑制的に機能し、適切な蛋白質分解に重要な役割を果たす可能性を見出したので報告する。

[方法と結果]

1. Arl8 の発現抑制によりエンドサイトーシス初期過程における EGF の分解が亢進する

細胞外の EGF は細胞表面の EGF 受容体と結合すると、エンドサイトーシスにより細胞内に取り込まれ、初期エンドソームを経由して後期エンドソームへと輸送される (取り込み後約 0-60 分)。その後、後期エンドソームとリソソームが融合することによりハイブリッドオルガネラが形成され、そこで EGF は分解される (取り込み後約 60 分以降) (Fig. 1A)。まず、EGF の分解過程における Arl8 の関与を検討するために、siRNA により Arl8 を発現抑制した HeLa 細胞における ¹²⁵I-EGF の分解量を経時的に測定した。その結果、Arl8 の発現抑制により、約 60 分までの EGF の分解量が有意に増加することを見出した (Fig. 1B)。さらに共焦点顕微鏡により蛍光標識した EGF の輸送過程を観察した結果、Arl8 発現抑制細胞では、取り込み後 30 分において後期エンドソーム/リソソームマーカーである Lamp1 と共局在する EGF の割合が増加して

いた。以上より、Arl8 の発現抑制時における EGF の分解亢進は取り込まれた EGF が速やかに後期エンドソーム/リソソームに移行したことが原因である可能性が考えられた。

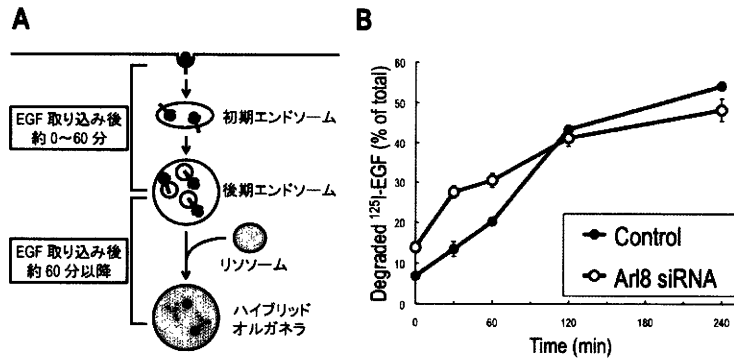


Fig. 1 (A) EGF の輸送過程 (B) Arl8 の発現抑制による ¹²⁵I-EGF の分解への影響

2. Arl8 は後期エンドソームとリソソームの融合制御に関与する

次に、Arl8 の発現抑制により生じる EGF の分解の亢進が後期エンドソームとリソソームの融合を介したものであるかを検討した。後期エンドソームとリソソームの融合過程は、まず低分子量 G 蛋白質 Rab7 による両者の近接化及びドッキングにより開始し、その後、SNARE 分子の働きにより膜融合が進行すると考えられている。まず、この融合に関与することが報告されている SNARE 分子の一つである syntaxin7 の寄与を検討した。その結果、Arl8 発現抑制時におけるエンドサイトーシス初期段階 (取

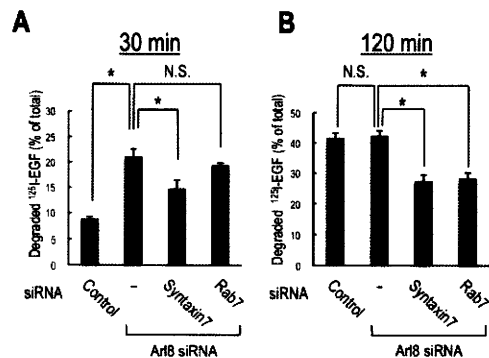


Fig. 2 Arl8 発現抑制時の EGF の分解に対する Syntaxin7 及び Rab7 の発現抑制の影響 EGF 取り込み後 30 分における分解量 (A) 及び 120 分における分解量 (B) (*p<0.001)

り込み後約30分)のEGFの分解亢進はsyntaxin7の発現抑制により有意に減弱した(Fig. 2A)。よって、Arl8の発現抑制によるEGFの分解亢進は後期末ソームとリソソームの融合を介していることが示唆された。次にRab7の寄与に関しても同様の検討を行ったところ、興味深いことにArl8発現抑制時におけるエンドサイトーシス初期段階のEGFの分解亢進は、Rab7の発現抑制により減弱しなかった(Fig. 2A)。一方、通常EGFの分解が進行するエンドサイトーシス後期段階(取り込み後120分)においては、Rab7の発現抑制によりEGFの分解は減弱した(Fig. 2B)。以上の結果より、Arl8の発現抑制は、エンドサイトーシス初期段階における後期末ソームとリソソームの融合を引き起こし、その融合は既存のRab7依存的な様式とは異なることが示唆された。

3. Arl8の発現抑制により異常な後期末ソーム/リソソーム様オルガネラが形成される

次にArl8の機能抑制時における、リソソーム/後期末ソームの形態を観察した。まず、共焦点顕微鏡によりLamp1陽性小胞を観察したところ、コントロールの細胞において細胞質に均一に分散して存在するLamp1陽性小胞が、Arl8発現抑制細胞においては核近傍に集積する様子が観察された(Fig. 3A)。そこで、この核近傍に集積したLamp1陽性小胞がどのような形態のオルガネラであるかを電子顕微鏡により検討した。その結果、Arl8発現抑制細胞において、コントロール細胞には見られない電子密度の濃い異常なオルガネラが核近傍に多数存在しており、これらが核近傍に集積したLamp1陽性小胞であると考えられた(Fig. 3B)。さらに、Percollを用いた密度勾配遠心法による細胞内オルガネラの分画を行ったところ、Arl8発現抑制細胞において、初期/後期末ソームとリソソームの中間程度の密度を有するオルガネラ画分に回収されるLamp1やリソソーム酵素カテプシンD量が顕著に増加していることが明らかとなった(Fig. 3C)。

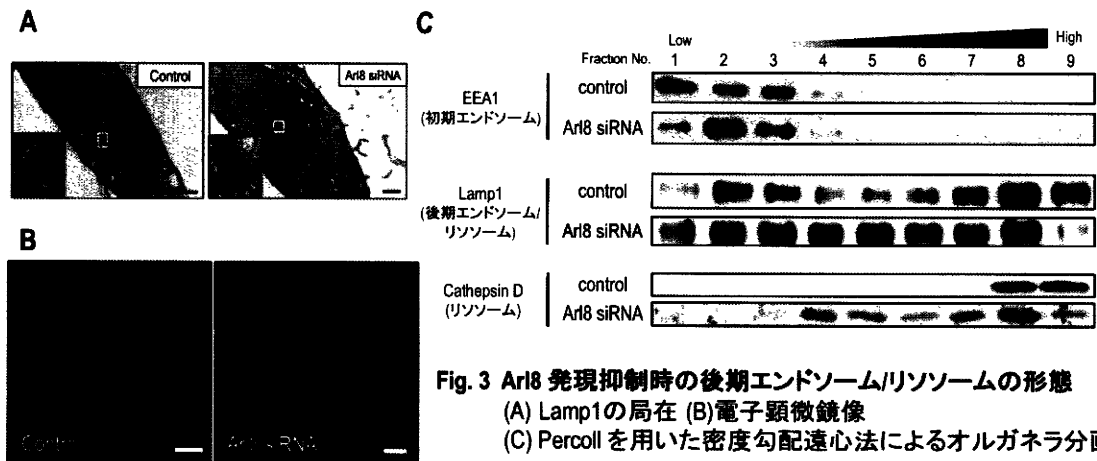


Fig. 3 Arl8 発現抑制時の後期末ソーム/リソソームの形態
 (A) Lamp1の局在 (B)電子顕微鏡像
 (C) Percoll を用いた密度勾配遠心法によるオルガネラ分画

[まとめと考察]

本研究において私は、Arl8 の発現抑制により、エンドサイトーシスの初期段階における EGF の分解が亢進すること、さらにその分解過程は Rab7 非依存的な後期エンドソームとリソソームとの融合を介していることを明らかにした。通常、後期エンドソームはエンドサイトーシスの進行に伴い成熟した後、リソソームと融合する。一方、Arl8 発現抑制細胞においては EGF の分解がコントロールよりも早いタイミングで進行していることから、そのような細胞においては“未成熟”な後期エンドソームとリソソームが融合している可能性が考えられる。また、Arl8 発現抑制細胞では後期エンドソームとリソソームの中間程度の密度を有するオルガネラが増加しており、これらが上述の融合により生じたハイブリッドオルガネラである可能性がある。(Fig. 4)。

一般にリソソームは細胞内に分散して存在し、エンドソームは核近傍に集積して存在している。最近、Arl8 は微小管を介したリソソームの動きに関与することが示唆されており、Arl8 発現抑制細胞においてはリソソームの微小管依存的な移動が阻害されたことにより、リソソームが核近傍に蓄積し、その結果としてエンドソームとの衝突確率が高まり、リソソームとエンドソームの不適切な融合が惹起された可能性が考えられる。

Arl8 による未成熟な後期エンドソームとリソソームとの融合抑制機構は本研究によって初めて提唱されるモデルであり、Arl8 のエフェクター分子の同定及びそれらの機能解析を通じて、リソソームにおける蛋白質分解過程の詳細な分子機構が明らかになることが期待される。

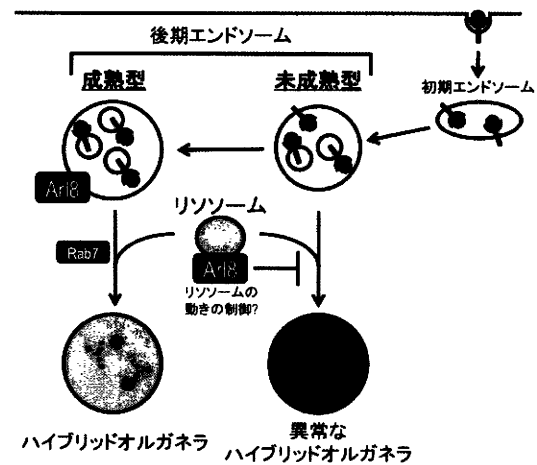


Fig. 4 Arl8 による後期エンドソームとリソソームの融合制御モデル