

## 論文の内容の要旨

応用生命工学専攻  
平成 20 年度博士課程進学  
氏名 畠山 理広  
指導教員名 豊島 近

### 論文題目

エンドサイトーシスを制御する新規アダプター分子 Aly2 の機能解析

#### 1) 背景・目的

細胞が様々な外部環境に適応する上で、細胞膜タンパク質を柔軟かつ厳密に入れ替える（再編成する）ことは重要である。

タンパク質を速やかに細胞膜から除去する手段として、エンドサイトーシスを介して細胞内に取り込む機構が知られる。細胞膜タンパク質がエンドサイトーシスされるためにはユビキチン化修飾を受けることで積み荷として認識される必要があるが、(a)ユビキチン化を受ける細胞膜タンパク質が選択される機構、および(b)ユビキチン化が細胞の置かれた様々な状況に応答して制御される機構は多くの場合不明である。

酵母では知られている限り全ての細胞膜タンパク質について、E3 ユビキチンリガーゼ Rsp5 がユビキチン化を触媒する。しかし Rsp5 依存的にエンドサイトーシスされる細胞膜タンパク質の多くは、Rsp5 との結合モチーフとして機能する PY モチーフを持たず、Rps5 とは直接結合できない。従って Rsp5 が働くためにはアダプタータンパク質の助けが必要である。

最近になり、アレスチン様タンパク質ファミリーのタンパク質群が Rsp5 アダプターとして働くことが報告された。これらのタンパク質は PY モチーフおよびアレスチンドメインを有する。アレスチンドメインは GPCR (G protein-coupled receptor) と結合してエンドサイトーシスを促す哺乳類アレスチンとの相同性から命名された。これらアレスチン様タンパク質は PY モチーフを介して Rsp5 と結合するとともに、アレスチンドメインを介して細胞

膜タンパク質と結合することでアダプター機能を果たすと考えられる。

これらアレクチン様タンパク質は細胞膜タンパク質との結合に関して互いに異なる選択性を持ち、多対多の対応関係にある。しかし 10 個のアレクチン様タンパク質のうち標的とする細胞膜タンパク質が同定されているのは 5 つのみであり、残りの 5 つはエンドサイトーシスに関与するかどうかさえ不明である。本研究ではそのうちの 1 つである Aly2 の機能解析を行い、標的を同定するとともに上記(a)、(b)の問題へのアプローチを試みた。

## 2) 結果

### 2-1) Aly2 の標的の探索

*aly2Δ*株はカナバニン（毒性を有するアルギニンアナログ化合物）に耐性であることがわかっていて、そこで *aly2Δ*株ではアルギニントランスポーター Can1 の制御に異常がある可能性を考え、Can1-EGFP の局在を観察した。様々な条件を試したところ、培地にアスパラギン酸またはグルタミン酸を加えた際の Can1 の局在が野生株と異なることがわかった。野生株ではこれらのアミノ酸に応答して Can1 の一部のみが細胞膜から液胞へと局在を変えたが、*aly2Δ*株ではより多くの Can1 が液胞へと局在を変えた。

*aly2Δ*株でアスパラギン酸やグルタミン酸への応答が過剰に起こるのは、これらのアミノ酸の取り込み量が多いからである可能性を考え、次にアスパラギン酸・グルタミン酸トランスポーター Dip5 の局在を観察した。その結果、野生株では Dip5-EGFP は細胞膜と液胞の両方に局在が見られたのに対して、*aly2Δ*株では細胞膜局在が顕著であった。エンドサイトーシス欠損変異株では Dip5 はほとんど細胞膜上に局在したことから、野生株で見られる液胞局在は細胞膜からのエンドサイトーシスを経たものであり、*aly2Δ*株もこの過程に欠損があると考えられた。さらに細胞を高濃度のアスパラギン酸またはグルタミン酸で刺激したところ、野生株ではほとんどの Dip5 が液胞へと輸送されたが、*aly2Δ*株では細胞膜上に留まった。よって Aly2 は Dip5 の正常なエンドサイトーシスに必要であることがわかり、Dip5 が Aly2 の標的であることが示唆された。

### 2-2) Aly2 の Rsp5 アダプター機能

次に Aly2 が Dip5 のエンドサイトーシスに際して Rsp5 アダプターとして機能するかを調べた。まず *rsp5-1* 株（*RSP5* 温度感受性変異株）で Dip5-EGFP の局在を観察したところ、制限温度下で顕著に細胞膜上に局在した。また Dip5 のユビキチン化状態を抗ユビキチン抗体を用いたウエスタン解析で調べたところ、*rsp5-1* 株ではユビキチン化が低下していた。よって Dip5 も他の細胞膜タンパク質と同様に、Rsp5 によるユビキチン化を受けてエンドサイトーシスされることが示唆された。

Dip5 のユビキチン化は *aly2Δ*株でも低下していた。*in vivo*における Aly2 と Rsp5 の物理的な結合を検討するために共沈降実験を行ったところ、共沈降が見られた。この結合は Aly2 の PY モチーフをアラニンに置換した変異体では見られず、またその変異株では Dip5

のエンドサイトーシスが正常に起こらなかった。以上から Aly2 は PY モチーフを介して Rsp5 と結合すること、およびその結合が機能に必須であることがわかった。

さらに Aly2 は Dip5 と共沈降が見られ、Dip5 と Rsp5 とをつなぐアダプターとして機能することが示唆された。

次に Dip5 のエンドサイトーシスが輸送基質に応答して制御される機構について調べた。細胞をアスパラギン酸で刺激したところ、Aly2 と Dip5 との結合が亢進した。よって Aly2 は基質依存的に Rsp5 を Dip5 へとリクルートしてユビキチン化を促進することでエンドサイトーシスを誘導すると考えられた (図 1)。

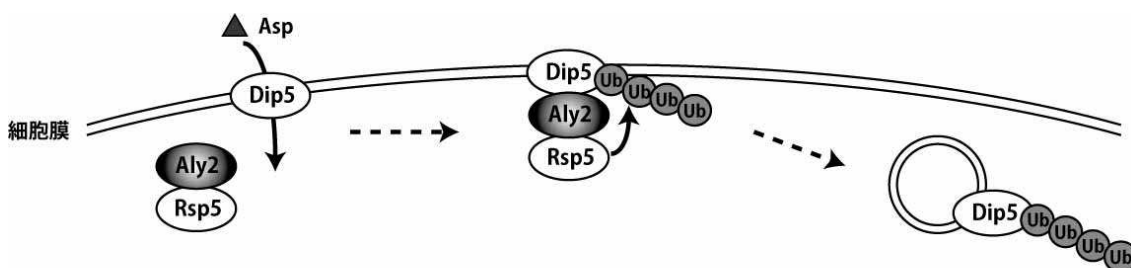


図 1. 輸送基質による Dip5 のエンドサイトーシス誘導

### 2-3) TORC1-Npr1 経路による Dip5 エンドサイトーシス制御機構

Dip5 のエンドサイトーシスはラパマイシン処理によっても誘導され、これにも Aly2 が必要であった。ラパマイシンは栄養源応答に中心的な役割を果たす TORC1 (target of rapamycin complex 1) キナーゼ複合体の阻害剤である。TORC1 下流のキナーゼ Npr1 の遺伝子破壊株では Dip5 のエンドサイトーシスがラパマイシン処理によって正常に誘導されなかったことから、TORC1 は Npr1 を介して Dip5 のエンドサイトーシスを制御していると考えられた。

次に Aly2 が TORC1 経路による制御を受けている可能性を考え、その量に注目したところ、ラパマイシン処理によって Npr1 依存的に増加することがわかった。また Aly2 の過剰発現は Dip5 のエンドサイトーシス誘導に十分であったことから、ラパマイシン処理によって起こる Aly2 量の増加は Dip5 のエンドサイトーシス誘導に寄与していると考えられた。

### 2-4) 細胞周期の進行による Dip5 エンドサイトーシス制御機構

Dip5 は通常の培養条件下でも一部液胞局在が見られ、細胞に刺激を与えなくてもある程度の効率でエンドサイトーシスされていると考えられた。そこで単一の細胞で Dip5-EGFP の局在を経時的に観察したところ、芽が大きくなるタイミング、すなわち M 期に集中してエンドサイトーシスされることがわかった。同調培養した細胞を用いたウエスタン解析で、M 期サイクリンが多い時期に Dip5 の量の減少が見られたこと、さらにノコダゾール処理により M 期で停止させた細胞で Dip5 が顕著に液胞局在を示したこともこれを支持した。

Aly2 の量に注目したところ、M 期に増加することがわかった。またノコダゾール処理に

よっても Aly2 は増加した。さらに Phos-tag (リン酸化タンパク質特異的捕捉試薬) によって捕捉される Aly2 の割合がノコダゾール処理によって増加したことから、Aly2 は M 期特異的にリン酸化されていることが示唆された。以上から Aly2 は M 期特異的に量が増えるとともにリン酸化を受け、それが Dip5 のエンドサイトーシス誘導に寄与していると考えられた。

なお培地にアスパラギン酸やグルタミン酸があると細胞の G1 期から S 期への移行が Dip5 依存的に阻害されることが、細胞の形態観察によりわかった。従って G1 期に進入する前に Dip5 がエンドサイトーシスされることは合目的的であると考えられた。

### 3) まとめ

本研究により Aly2 が Rsp5 アダプターとしてエンドサイトーシスに関与することがわかり、標的として Dip5 が同定された。

また環境に応答してユビキチン化とそれに続くエンドサイトーシスが制御される機構が明らかになった。基質濃度によって Dip5 と Aly2 との結合が制御されるのに対して、TORC1 や細胞周期進行によって制御されるのは Aly2 自体の量やリン酸化であった。

二つの制御点の相違の生理的意義は次のように解釈できる。過剰量の基質が存在する際には対応するトランスポーターのみがエンドサイトーシスされるべきであり、そのためにそのトランスポーター特異的にアレスチン様タンパク質との結合が促進される (個別制御)。それに対してより広い意味での栄養源飢餓 (TORC1 阻害) や細胞周期の進行に対しては、多くの

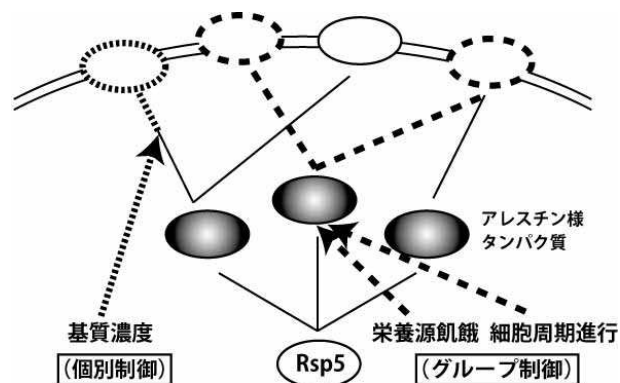


図 2. エンドサイトーシスの個別制御とグループ制御

膜タンパク質を同時にあるルールに従って再編成する必要があるため、細胞はアレスチン様タンパク質自体の機能を制御し、それが選択的に標的とする細胞膜タンパク質のエンドサイトーシスを一括して制御する (グループ制御) (図 2)。

このように本研究では Aly2 の機能解析を通して、エンドサイトーシスの積み荷選択性の分子基盤と環境に応答した制御機構の一端を明らかにすることが出来た。

発表論文

Hatakeyama, R., Kamiya, M., Takahara, T., and Maeda, T.(2010) *Mol. Cell. Biol.*, 30, 5598-5607