

論文の内容の要旨

上皮細胞におけるリサイクリングエンドソーム局在性 G 蛋白質 Rab45 の機能解析

新谷 真未

【序論】

低分子量 G 蛋白質は、上流からの刺激に応答して GDP が結合した不活性型から GTP が結合した活性型へと構造を変換し、下流にシグナルを伝える分子スイッチとして多様な生理応答の制御を担っている。低分子量 G 蛋白質は一次構造上 Ras, Rab, Rho, Arf, Ran のサブファミリーに分類され、細胞増殖や分化、細胞骨格制御、小胞輸送といった基本的な細胞機能に介在することが明らかにされてきた。その一方で、近年のゲノムプロジェクトの進展に伴い、既存のサブファミリーに属さない新しいタイプの低分子量 G 蛋白質が多数存在することが明らかになり、それらがどのような細胞応答を制御しているか注目されている。

ゲノムデータベースを利用して新たに見出した Rab45 は、C 末端に存在する G 蛋白質 Rab ドメインに加え、N 末端に Ca²⁺結合ドメインである EF-hand、中央領域にはコイルドコイルモチーフをもつというユニークな一次構造からなるが

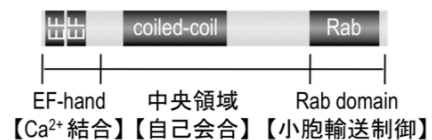


図1. Rab45 の一次構造

（図1）、その生理機能は全く未解明である。本研究において私は Rab45 がリサイクリングエンドソームに局在し、各機能ドメインの協調的な働きにより、上皮細胞の極性形成に関与する VAC (Vacuolar Apical Compartment) と呼ばれる細胞内小器官の形成に関与することを見出した。ヒトでは60種類以上の Rab ファミリー蛋白質が知られているが、Rab45 は VAC 形成への関与が見出された初めての Rab ファミリーG蛋白質である。Rab45 は VAC の形成制御を介して、上皮細胞の極性形成に関わる新奇 G 蛋白質であると考えられた。

【方法・結果】

(1) Rab45 はリサイクリングエンドソームに局在する

一般に Rab ファミリーは、細胞内の様々なエンドソームに局在し、エンドソーム間の物質輸送を制御している。そこで各種エンドソーム類の識別が容易な COS-1 細胞を用いて、Rab45 の細胞内局在を検討した。COS-1 細胞では、ゴルジ体が核近傍にリング状構造(ゴルジリング)として観察され、その内側にリサイクリングエンドソーム、外側に後期エンドソームが分布することが知られている。COS-1 細胞に過剰発現させた Rab45 は、ゴルジリングの内側に局在したことから、Rab45 がリサイクリングエンドソームに局在することが示唆された。

(2) 極性化した MDCK 細胞において Rab45 はアピカルリサイクリングエンドソームに局在する

内在性 Rab45 の細胞内局在を調べる為、抗 Rab45 抗体を作製して Rab45 の免疫染色を行った。その結果、極性化した上皮系細胞株 MDCK において、Rab45 は細胞内で小さなドット状構造に局在し、細胞膜直下でアピカルリサイクリングエンドソームマーカー Rab11 と共局在した。これより Rab45 がアピカルリサイクリングエンドソームに局在すると考えられた。

(3) Rab45 は脱極性化した MDCK 細胞において VAC (Vacuolar Apical Compartment) に局在する

極性状態の上皮細胞は、タイトジャンクションと呼ばれる細胞間接着構造によって、微絨毛を形成するアピカル膜と基底側膜が厳密に区別されることが知られている。一方、極性化した上皮細胞を低 Ca^{2+} 条件下で培養すると細胞間接着が解離し、脱極性化することも知られている。脱極性化した MDCK 細胞における Rab45 の細胞内局在を検討したところ、興味深いことに、Rab45 はアクチン陽性な凝集体に局在することが明らかとなった(図2)。MDCK 細胞に関する過去の文献の検索から、このアクチン陽性の凝集体は VAC (Vacuolar Apical Compartment) と呼ばれる細胞内小器官ではないかと考えられた。VAC は、上皮細胞間の接着が離れて脱極性化した際に、細胞内に一過的に観察されるユニークな細胞内オルガネラであり(図3)、内部は微絨毛に富み、アピカル膜蛋白質は局在するが、基底膜蛋白質は局在しない。そこで、脱極性化した MDCK 細胞において Rab45 と各種マーカー蛋白質との局在を比較したところ、Rab45 陽性の凝集体にはアピカル膜蛋白質 gp135 は局在したが、基底膜蛋白質 β -カテニンは局在せず、Rab45 が局在する凝集体は VAC であると考えられた。

また、各種エンドソームに局在する Rab と VAC マーカー gp135 の共局在性を検討した結果、初期エンドソームや後期エンドソームに局在する Rab5 と Rab7 は gp135 と共局在せず、Rab45 と同様にアピカルリサイクリングエンドソームに局在する Rab11a が gp135 と共局在した。よって VAC にはアピカルリサイクリングエンドソームが凝集することが示唆された。

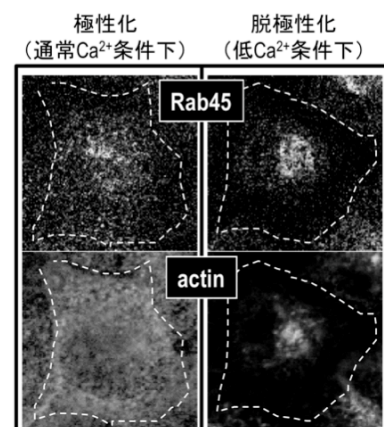


図2. 通常 Ca^{2+} 条件下(左)及び低 Ca^{2+} 条件下(右)で培養したMDCK細胞における内在性Rab45の細胞内局在

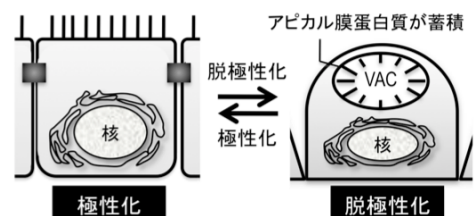


図3. VACは上皮細胞が脱極性化した際に一過的に形成される細胞内小器官である

(4) Rab45 の過剰発現により、VAC の形成促進と消失遅延が観察される

VAC 形成における Rab45 の役割を検討する目的で、Rab45 の過剰発現が VAC 形成に与える影響を検討した。その結果、脱極性化に伴う VAC の形成が、Rab45 の過剰発現によって顕著に上昇した(図4)。一方、Rab45 と同様にアピカルリサイクリングエンドソームに局在する Rab11a、他のエンドソームに局在する Rab5、Rab7 を過剰発現させた場合は、VAC 形成率に殆ど影響を与えなかった。

低 Ca^{2+} 条件下で MDCK 細胞に形成された VAC は、培地の Ca^{2+} 濃度を通常条件に戻すとエキソサイトーシスされて消失し、細胞は脱極性状態から極性状態に移行することが知られている。そこで極性化に伴う VAC 消失に対する Rab45 の関与を検討した。通常 Ca^{2+} 濃度に戻して 3 時間後、コントロールでは半数以上の細胞で VAC が消失したのに対し、Rab45 過剰発現細胞では殆ど VAC が消失しなかった(図5)。他の Rab 蛋白質を過剰発現させた場合は、VAC 消失にほぼ影響を与えなかった。

以上の結果から、各種 Rab ファミリーG蛋白質の中で、アピカルリサイクリングエンドソームに局在する Rab45 が特異的に VAC の形成・消失のダイナミクスに関与することが考えられた。

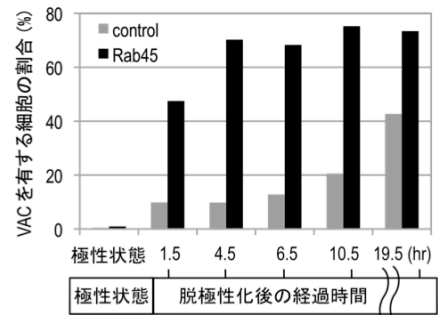


図4. 脱極性化に伴うVAC形成に対する Rab45 過剰発現の影響

Rab45を過剰発現したMDCK細胞を低 Ca^{2+} 条件下で一定時間培養後、VACを有する細胞の割合を測定した。

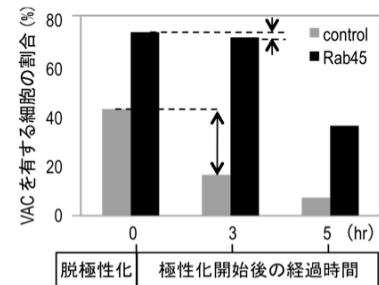


図5. 極性化に伴うVAC消失に対する Rab45過剰発現の影響

Rab45を過剰発現したMDCK細胞を低 Ca^{2+} 条件下で培養してVACを形成させた後、通常の Ca^{2+} 濃度の培地に戻して培養し、VACを有する細胞の割合を測定した。

(5) Rab45 の各機能ドメインの協調的な働きが VAC 形成に重要である

Rab45 がどのような分子メカニズムで VAC 形成に寄与するか検討する為、Rab45 各種変異体を発現させて VAC 形成率を測定した。その結果、Rabドメインの活性化型変異体 Q600L(GTP 結合型)は野生型同様に VAC 形成率が上昇したが、不活性化型変異体 S555N(GDP 結合型)は形成率に影響せず(図6)、Rabドメインの活性化が VAC 形成の促進に重要であることが明らかとなった。EF-hand ドメインを欠く変異体は VAC 形成を促進したが、興味深いことに、形成された VAC は Rab45 野生型発現時に観察されるものとは異なり、複数の小さな構造体となった。一方、EF-hand とコイルドコイルモチーフの両者を欠く変異体は VAC 形成を促進しなかった。以上より、Rab45 は Rabドメインの活性化に加え、EF-hand 及びコイルドコイルモチーフの協調的な働きを介して、VAC の形成を制御することが示唆された。

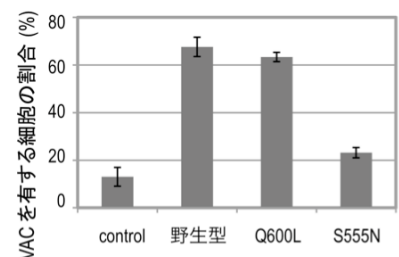


図6. Rab45各種変異体の発現がVAC形成に与える影響

各種のRab45変異体をMDCK細胞に過剰発現し、低 Ca^{2+} 条件下で5時間培養にVACを形成する細胞の割合を測定した。

【まとめ・考察】

上皮細胞株 MDCK を用いて、ユニークな一次構造を有する G 蛋白質 Rab45 の機能解析を行い、1) Rab45 は極性化した MDCK 細胞においてアピカルリサイクリングエンドソームに局在し、脱極性化した MDCK 細胞では VAC に局在すること、2) VAC にはアピカルリサイクリングエンドソームが凝

集すること、3)アピカルリサイクリングエンドソームに局在する Rab の中でも Rab45 の過剰発現によって、特異的に VAC 形成が促進し、消失が遅延すること、4) Rab45 の各機能ドメインの協調的な働きが VAC の形成促進に重要であること、を見出した。

上皮細胞は極性化と脱極性化のサイクルを繰り返すダイナミックな細胞である。例えば組織が損傷した際、上皮細胞は脱極性化して遊走・再接着した後に、再極性化する現象が観察される。このような細胞極性の制御は厳密にコントロールされる必要があり、その破綻は正常な上皮組織の機能を障害するだけでなく、癌をはじめ様々な疾患の原因になっている。VAC は上皮細胞の極性制御に重要な細胞内小器官と考えられているが、その形成機構や機能的役割は殆ど未解明である。本研究で得られた知見を基に、VAC 形成機構として以下のモデルを考えている。概略としては、脱極性化に伴い、Rab45 の働きによってアピカルリサイクリングエンドソームが凝集し、アピカル膜の内化が促進されて、VAC が形成される(図7下)。具体的には Rab45 は、Rab ドメインの活性化によりアピカルリサイクリングエンドソームに局在化し、コイルドコイルモチーフ及びEF-handドメインの働きによって膜同士がつなぎとめられ、一つの大きな凝集体が形成される。そこにアピカル膜由来小胞がつなぎとめられ、VAC が形成されるというモデルである(図7上)。今後は、Rab45 の各機能ドメインと相互作用する因子群の同定及びその機能解析を通じ、上皮細胞における VAC 形成の分子機構が解明されることが期待される。

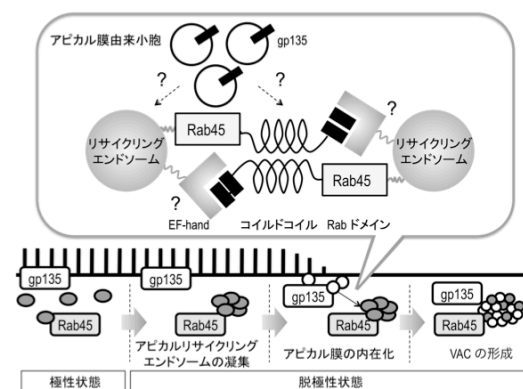


図7. Rab45 によるVAC 形成機構 (モデル図)

【参考文献】

Shintani,M., Tada,M., Kobayashi,T., Kajiho,H., Kontani,K. and Katada,T. (2007)
Biochem. Biophys. Res. Commun. 357, 661-7