

論文の内容の要旨

論文題目 逆行性輸送における Sorting Nexin 27 (SNX27)の機能の解析

氏名 相田 健佑

[背景・目的]

Sorting Nexin 27 (SNX27)は、PX domain を有すことを特徴とする Sorting Nexin (SNX) family に属するタンパク質である。当研究室では、これまでに Multidrug resistance-associated protein 4 (MRP4)との相互作用タンパク質群に SNX27 が含まれることを見出し、本タンパク質が MRP4 の細胞膜からの内在化抑制に働くことを明らかにしている(1)。この研究により、SNX27 の細胞膜近傍における機能が見出されたが、その一方で、SNX27 は主に early endosome(EE)に局在することから、SNX27 が EE を起点とする細胞内輸送において、役割を有すことも推測された。EE から始まる細胞内小胞輸送として、細胞膜へのリサイクリング、ESCRT 機構を介したリソソーム分解、ゴルジ体への逆行性輸送などが知られている。本研究では、細胞内小胞輸送に

おける SNX27 の重要性を明らかにするために、蛍光標識 cholera toxin beta subunit (CTxB)を用い、SNX27 の逆行性輸送に対する寄与を検討した。

[方法・結果]

1. SNX27 のノックダウン(KD)により、CTxB の recycling endosome(RE)からゴルジ体への輸送が遅延する

CTxB は、EE から RE を経由してゴルジ体に移行する(2)。COS-1 細胞は、RE とゴルジ体を構造的に区別しやすく、CTxB 局在の経時変化の観察に適していることから(2)、本研究では、COS-1 細胞を用いて解析を行った。

COS-1 細胞に取り込まれた CTxB は、5 分後に、EE マーカーである EEA1、90 分後にゴルジ体マーカーである TGN46 との共局在が観察された。RE はゴルジ体の内側に存在するが、CTxB は 15 分後には TGN46 の内側に局在することが観察された。また、CTxB の逆行性輸送に伴い、SNX27 も CTxB と共局在しながら、EE から RE を経由してゴルジ体まで逆行性輸送されることが確認された。一方、SNX27 を KD した細胞では、コントロール細胞と比べて、15 分後までは、CTxB の逆行性輸送に明確な差は認められなかったが、90 分後においては、CTxB はゴルジ体ではなく、15 分後と同様に RE 局在を示した。

CTxB の逆行性輸送に対する SNX27 の作用は、SNX27 が通常時に存在する EE から生じる膜輸送ではなく、RE からゴルジ体への膜輸送で観察されたことから、本作用発現においては、SNX27 が EE から RE へと移行し、機能発現していることが推測された。

2. CTxB の逆行性輸送には、SNX27 の FERM-like domain を介した機能が必要である

SNX27 は PX domain に加え、PDZ domain、FERM-like domain など機能性ドメインを複数持つ。CTxB の逆行性輸送に関与しているドメインを明らかにするため、各ドメインの機能欠損変異体を構築し、SNX27 KD 細胞において、CTxB の逆行性輸送に対するレスキュー効果を評価した。PDZ domain の変異体である SNX27-H114A、SNX27-Δ67-77 を発現させた場合には、レスキュー効果が確認され、細胞内に取り込まれた CTxB は 90 分後にゴルジ体に存在した。また、両変異体は、野生型と同様に、CTxB の取り込みに伴い、EE からの逆行性輸送を受け、90 分後には CTxB とともにゴルジ体局在を示した。一方、FERM-like domain の変異体である SNX27-W477A は、CTxB と共に RE までは逆行性輸送を受けるもののレスキュー効果は示さず、細胞内に取り込まれた CTxB は 90 分後も RE に存在した。

[まとめ・考察]

SNX27 は通常時は EE に局在するが、CTxB の細胞内移行に伴い、CTxB とともに RE に局在移行し、FERM-like domain を介して、CTxB の RE からゴルジ体への輸送を担うことが示唆された。

[参考文献]

- (1) Hayashi H et al, *JBC* 287(18):15054-65(2012),
- (2) Uchida Y et al, *PNAS* 108(38):15846-51(2011),
- (3) Lunn ML et al, *Nat Neurosci.* 10(10):1249-59(2007),
- (4) Steinberg F et al, *Nat Cell Bio* 15(5):461-71(2013),
- (5) Niu Y et al, *Nat Cell Bio* 15(4):417-29(2013)