

論文の内容の要旨

論文題目 上皮細胞におけるエンドサイトーシスの新規制御機構の解明

(A novel regulatory mechanism of endocytosis in epithelial cells.)

氏名 浦江 聖也

上皮細胞は生体の内側と外側を分離させる役割を果たすとともに、特定の物質の通過及び輸送を行うことで、生体内に固有の物質環境を作り出している。受容体を介した物質の細胞内への取り込み、すなわちエンドサイトーシスはこのような上皮細胞による物質輸送の最初の工程として重要である。

Cubilin(CUBN)は複数の物質のエンドサイトーシスを担う受容体であり、生体内では腸及び腎尿細管上皮に発現している。CUBN は最初にビタミン B12/内因子複合体の輸送を担う受容体として同定されたが、のちにそのリガンドはアルブミン、トランスフェリン、ヘモグロビン、免疫グロブリン軽鎖、アポリポ蛋白 A-I、HDL など多岐に渡ることが分かった。また CUBN は他の受容体と比較して、膜貫通ドメイン及び細胞内ドメインを有していないことが特徴であり、そのため共役分子に結合することによって初めて正常に機能する。

CUBN の共役分子として最初に同定されたのは megalin である。megalin 自体も複数の物質輸送を担う受容体分子であり、一部の分子については CUBN と共役して輸送を行っていることが知られている。しかし、ビタミン B12/内因子複合体、トランスフェリン、アポリポ蛋白 A-I などのリガンドは CUBN が特異的に輸送しており、また腸管では megalin は発現していないのに CUBN による輸送が行われていることから、CUBN は megalin に依存せずに物質輸送を行えると考えられている。

一方で CUBN の輸送機能に不可欠な共役分子として amnionless(AMN)が知られている。AMN は最初に羊膜形成不全をきたす動物モデルの原因遺伝子として同定されたが、CUBN との機能的関連が考慮されるようになったのは、AMN 及び CUBN のどちらの遺伝子変異でも、Imerslund-Grasbeck 症候群(IGS)という先天性疾患が引き起こされることが分かったからである。実際 AMN の生体内での発現分布は CUBN に類似しており、また後に AMN は CUBN と強固に結合して cubam という受容体複合体を形成していることが発見された。AMN がなくては CUBN は細胞膜に輸送されず、そのため CUBN が正常に受容体として機能するためには AMN が不可欠であることが分かったのである。

先述の IGS の患者では、ビタミン B12/内因子複合体を含む蛋白質の吸収が障害されるため、蛋白尿や大球性貧血が引き起こされる。AMN 及び一部の CUBN の変異が疾患を引き起こすメカニズムとして、CUBN が細胞膜に輸送されなくなることが知られている。以前に我々は培養細胞において cubam の膜発現量を定量的に評価する実験系を確立し、

cubam の膜発現には AMN 依存的な CUBN の糖鎖修飾が必要であることを発見し、cubam の膜発現における分子メカニズムを解明した。

一方、cubam のエンドサイトーシスのメカニズムについては未だに分かっていないことが多い。以前にアダプター分子である ARH 及び Dab2 が AMN 及び megalin に結合して、これらの分子をクラスリン依存的エンドサイトーシスに誘導することが報告された。しかし AMN を介した CUBN のエンドサイトーシスと megalin を介した CUBN エンドサイトーシスに機能的な相違はあるのか、またそもそも cubam のエンドサイトーシスを制御するメカニズムがあるのかについては、何も知見が得られていなかった。

今回これらの cubam の細胞内輸送に関する課題に取り組むため、AMN の結合蛋白分析を行った。同位体ラベルを利用した SILAC 法を用いて、我々は AMN の新規結合蛋白候補として、NVL2 を同定した。NVL2 は AAA-ATPase ファミリーに属する分子であり、これまでは主として核小体に局在してリボソーム合成に関わっていることが知られていた。我々は免疫沈降を用いて、培養細胞内で実際に AMN と NVL2 が結合することを確認した。

免疫染色では、既報通り内在性 NVL2 は核小体に局在していることが複数の培養細胞で確認された。しかし一方で、内因性に AMN を発現していない培養細胞 HEK293T で AMN を強制発現させたところ、NVL2 の局在が核外の細胞質に移動することが見いだされた。さらに実際に AMN 及び NVL2 が細胞質で結合しているかを確認するために、HEK293T 細胞に AMN 及び NVL2 を強制発現させ、proximity ligation assay(PLA)を行ったところ、実際に細胞質での結合シグナルが確認された。また生体組織での免疫染色では、腎及び腸の両方において NVL2 は主として核小体に局在していたが、NVL2 の一部が上皮細胞の細胞質局在しており、そこに同じく発現している AMN と共局在することが分かった。これらの結果から、AMN を発現している細胞では一部 NVL2 が核外に移行して細胞質に局在していることが確認できた。

次に AMN と NVL2 の相互作用をさらに詳しく調べるために、我々は AMN の断片から成る合成ペプチドを用いて実験を行ったところ、NVL2 が AMN の細胞内領域と結合することが分かった。AMN の細胞内領域には 2 か所の生物種間保存性が高い領域が存在しており、これらは両方とも既知のエンドサイトーシスシグナルモチーフであることが既に報告されている。これらのモチーフと NVL2 との相互作用の関係を調べるために、それぞれのモチーフを変異させた合成 NVL2 蛋白を用いて実験を行ったところ、AMN と NVL2 の結合には AMN 細胞内領域の C 末端よりのモチーフ(第 2 モチーフ)が必要であることが分かった。また先述の AMN 発現による NVL2 の核外移行も、この第 2 モチーフに依存していることが見いだされた。一方で我々は AMN 細胞内領域と同様のエンドサイトーシスシグナルを有する LDLR および megalin が NVL2 と結合するかについても調べたが、結合を示す実験結果は得られなかった。

さらに我々は NVL2 が cubam の細胞内輸送機能にどのように関わっているのかを調べ

た。CUBN 及び AMN の両方を HEK293T 細胞で強制発現させ、内因性 NVL2 をノックダウンさせた実験系を用いたところ、cubam の膜発現は NVL2 ノックダウンにより障害されることはなかった。一方 cubam のエンドサイトーシスは NVL2 ノックダウンによって有意に障害され、またこれはノックダウン耐性の NVL2 の強制発現によってレスキューされた。このことから、NVL2 は cubam のエンドサイトーシスを促進する働きを有していることが分かった。

NVL2 が cubam のエンドサイトーシスを促進する分子メカニズムを解明するために、これまで知られている関連分子との相互作用をさらに詳しく調べた。その結果、NVL2 とアダプター分子 ARH の直接的な相互作用は見られなかったものの、NVL2 ノックダウンにより AMN と ARH の結合量が増えることが分かった。このことから NVL2 は cubam 受容体から ARH を引き離し、受容体を含む膜小胞が早期エンドソームと癒合できるように促し、また同時に ARH 分子がリサイクルされるように促進している可能性が示唆された。

今回の研究により、我々は核小体蛋白 NVL2 が AMN と相互作用し、さらに膜受容体 cubam のエンドサイトーシス機能を制御していることを発見した。近年、核小体は従来知られていたリボソーム合成の機能以外に、DNA 修復、細胞周期、細胞増殖、テロメラーゼ活性など様々な機能に関わっていることが報告されている。我々の研究結果は核小体蛋白が膜受容体の細胞内輸送を制御していることを示す最初の報告であり、新規の受容体輸送機構であるのみならず、核小体機能についても新たな知見をもたらすものである。この分子制御機構が生体内でどのような重要性を持つのかについては、今後さらなる検証が必要である。

また NVL2 は AMN と特異的に相互作用しており、megalin との相互作用は見られなかった。このことは megalin を介さない cubam エンドサイトーシスに特有の調節機構が存在することを示唆する。しかし一方で、NVL2 が結合を介さずに受容体エンドサイトーシスを制御している可能性もあり、megalin を含めた他の受容体に NVL2 が機能的影響を与えていないか、今後検証する必要がある。

さらに NVL2 は cubam 受容体とアダプター分子 ARH の分離に寄与していることが示唆された。クラスリン依存性エンドサイトーシスでは、膜より切離された輸送小胞から、それまで小胞を被覆していたクラスリン格子などのエンドサイトーシス関連分子が離脱することで初めて輸送小胞が早期エンドソームと癒合できるため、関連分子離脱の過程は非常に重要である。これまでに受容体とアダプター分子の分離を促進する分子メカニズムは知られておらず、今回得られた NVL2 作用機序の知見は、クラスリン依存性エンドサイトーシスの過程における新たな分子メカニズムの発見となり得る。NVL2 がクラスリン依存性エンドサイトーシスの分離段階でどのような作用を及ぼしているのかについては、更なる研究が期待される。

今回我々は cubam 受容体の新規輸送制御機構として、核小体蛋白 NVL2 によるエンド

サイトーシス制御機構を発見した。この発見はさらに AMN 特異的なエンドサイトーシス制御機構の存在を示唆するとともに、クラスリン依存性エンドサイトーシスにおける新たな分子メカニズムの存在をも示唆している。これらの事実は、特に腸管及び腎尿細管での上皮細胞におけるエンドサイトーシスの分子制御機構に新たな知見をもたらすものである。