

氏名（本籍）	しまむらひろき 島村洋輝（埼玉県）
学位の種類	博士（工学）
学位記番号	甲第1140号
学位授与の日付	2022年3月19日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位論文題目	エンドサイトーシス経路における Rab ファミリータンパク質の新規活性化機構の解明

論文審査委員	（主査）教授 十島 二郎		
	教授 清水 公德	教授 瀬木 恵里	
	教授 西野 達哉	教授 武村 政春	

## 論文内容の要旨

エンドサイトーシスは細胞外の物質や細胞膜タンパク質等の積み荷を細胞内に取り込む機構であり、積み荷をエンドソームからリソソーム／液胞へと輸送する。エンドサイトーシスは全ての真核細胞における基本的な生理現象として知られている。

エンドサイトーシス経路における小胞輸送は主に二つの低分子量 G タンパク質ファミリーである Rab5 と Rab7 により制御されている。これらの Rab タンパク質は真核細胞で広く保存されており、Rab5 は初期エンドソームの形成および初期から後期エンドソームへの成熟に、Rab7 は後期エンドソーム・リソソーム／液胞間の輸送に必要であることが知られている。Rab タンパク質の活性はグアニンヌクレオチド交換因子（GEF）による GDP 型から GTP 型への変換および GTP アーゼ活性化タンパク質（GAP）による GTP の加水分解により制御されている。近年の研究において、Rab の一般的な活性化機構として、上流で働く Rab が下流の Rab の GEF をリクルートすることにより起こる Rab コンバージョン説が提唱されている。エンドサイトーシス経路においては、初期エンドソームで機能する Rab5 が Rab7 の GEF である Mon1-Ccz1 複合体と結合することにより、下流の Rab7 をエンドソームへリクルートすることが明らかになっている。しかしながら、上流の Rab5 がどのように活性化するかについては不明な点が多く残されていた。また、Rab7 の活性化が Rab5 のみによって制御されているのかについても分かっていない。

従来、エンドサイトーシス経路はゴルジ体からエンドソームを介したリソソームへの輸送経路（VPS 経路）と後期エンドソームにおいて融合すると考えられていた。しかしながら、十島らは出芽酵母細胞を用いて、Rab5 の機能がエンドサイトーシス経路と VPS 経路

が交叉する前に必要であること、さらにゴルジ体からの VPS 経路において Rab5 の機能が必要であることを明らかにした (Toshima et al., Nat. Comm, 2016)。また、長野らは Rab5 の活性化にはエンドサイトーシスによるクラスリン小胞の取り込みは必須ではなく、VPS 経路が重要であることを明らかにした (Nagano et al., Comm Biol, 2019)。これらの発見は、Rab5 がエンドサイトーシス経路により活性化されるのではなく、ゴルジ体からの小胞輸送経路により制御されていることを示唆している。

私達の研究室では、以前の研究において、約 6000 種類からなる出芽酵母遺伝子欠損変異体ライブラリーを用いて、蛍光エンドサイトーシスマーカーのリソソーム／液胞への輸送に異常のある 196 種類の変異体を単離することに成功した。本研究において、私は Rab5 の上流活性化因子を同定するために、これらのエンドサイトーシス変異体についてデータベース解析を行い、細胞内小胞輸送に関わる可能性のある遺伝子を 57 種類選出し、これらの中で Rab5 の活性に影響を与える可能性のある変異体の単離を試みた。この結果、23 種類の変異体において Rab5 の局在異常を示す変異体を同定した。さらに、これらの変異体の中で、その遺伝子産物がゴルジ体に局在するものについて調べたところ、N 型糖鎖修飾に関わるタンパク質が 5 種類含まれていることを見出した。さらに、ゴルジ体で糖鎖付加されている標的タンパク質として、PS フリッパーゼ複合体の構成因子である Cdc50 ファミリータンパク質が Rab5 の活性制御に重要であることを明らかにした。また、Rab5 の下流 Rab である Rab7 について、Rab5 に依存しない経路で活性化されることを明らかにした。

以前の研究において、十島らは出芽酵母の GPCR の一種である Ste2p 受容体のリガンドである  $\alpha$ -factor に蛍光物質を付加することで、受容体仲介型エンドサイトーシスを経時的に可視化できるエンドサイトーシスマーカーを開発に成功した。十島らはこの蛍光マーカを用い、約 6000 種類からなる出芽酵母遺伝子欠損変異体ライブラリーについてエンドサイトーシス経路を可視化するスクリーニングを実施することで、 $\alpha$ -factor エンドサイトーシスが遅延する遺伝子欠損変異体を 196 種類単離した。本研究において、私は Rab5 の新規活性制御因子を同定するために、データベースを用いてこれらの遺伝子がコードするタンパク質の機能分析を行い、新規に細胞内小胞輸送に関わる可能性のある遺伝子を 57 種類選出した。これらの中から Rab5 の活性に影響を与える変異体を単離するため、私は蛍光タンパク質 GFP を N 末端に融合した GFP-Rab5 タンパク質をそれぞれの変異体に発現させることで、Rab5 活性への影響を解析した。以前の研究において、長野らはゴルジ体からの小胞輸送が Rab5 の活性化に重要であることを見出しており、Rab5 活性が低下した変異体ではエンドソーム間融合が阻害され、GFP-Rab5 によって標識されるエンドソームの数が増加する傾向にあることを示唆している (Nagano et al., Comm Biol, 2019)。私は GFP-Rab5 標識エンドソームの数を定量解析することで、エンドソーム数が増加する変異体を 23 種類同定することに成功した。これらの遺伝子がコードするタンパク質の中で、ゴルジ体に局在するものとして 5 種類の N 型糖鎖修飾に関与するタンパク質が含まれていることから、本実験を通じて新規の Rab5 活性制御因子としてゴルジにおける N 型糖鎖修飾因子が重要な役割を持つことを発見した。

出芽酵母において、一部のタンパク質は小胞体で合成された後に糖転移酵素により N 型

糖鎖を付加され、ゴルジ体へ輸送されたのちにゴルジ N 型糖鎖修飾因子により多段階からなる N 型糖鎖の修飾を受ける。N 型糖鎖はタンパク質の品質管理、相互作用などに関与しており、糖鎖修飾がゴルジ体からの糖タンパク質の分泌輸送効率に重要であることが報告されている。本実験により同定されたゴルジ N 型糖鎖修飾は、1-3 段階目の糖鎖修飾反応に関わる因子のみであり、これはマンノース鎖が 10 から 50 の最大長まで伸長する過程にあたるため、糖鎖の長さが Rab5 活性制御に重要であることが考えられる。私は N 型糖鎖修飾の Rab5 活性に重要な段階を調べるため、今回エンドサイトーシスに異常を示す変異体として単離されなかったゴルジ N 型糖鎖修飾因子についても同様に GFP-Rab5 への影響を解析した。この結果、スクリーニングで単離されなかった N 型糖鎖修飾因子は Rab5 の活性に影響しないことが確認でき、ゴルジ体における 1-3 段階目までの N 型糖鎖修飾反応が Rab5 の活性制御に重要であることを明らかにした。

次に、私は N 型糖鎖を修飾される標的タンパク質の中から、Rab5 活性を制御する糖タンパク質の同定を試みた。今回スクリーニングを行った細胞内小胞輸送に関わる可能性のある遺伝子 57 種の中で、N 型糖鎖修飾を受けることが報告されている標的タンパク質として、PS フリップアーゼ複合体の構成因子である Cdc50 ファミリータンパク質に着目した。私はこの Cdc50p の糖鎖修飾部位のアミノ酸である N を Q に置換することで、糖鎖が付加できない *cdc50* 変異体を作成し、この変異体の GFP-Rab5 への影響を解析した。この結果、*cdc50* 変異体は Rab5 の活性に影響しないことが分かった。出芽酵母では Cdc50p の機能的ホモログとして Lem3p、Crflp が発現しており、全ての Cdc50p ホモログにおいて N 型糖鎖修飾部位が同定されている。これら CDC50 ホモログ全てを欠損した細胞は生存できないことから、私は全ての Cdc50p ホモログの糖鎖付加を阻害することで影響が見られると考えた。全ての Cdc50p ホモログの糖鎖修飾部位を置換した変異体を調べた結果、GFP-Rab5 活性が低下することを明らかにした。これらの結果より、ゴルジにおける N 型糖鎖修飾を受けた Cdc50p ホモログは、下流の Rab5 活性制御において重要であることを発見した。

以前の研究において、十島らは  $\alpha$ -factor エンドサイトーシスが遅延する遺伝子変異体として 196 種類を同定し、この中に Rab5 と Rab7 の変異体が含まれていたが、Rab5 変異体では正常に液胞/リソソーム構造が形成される一方で Rab7 変異体は著しい液胞/リソソーム構造の形成不全が観察された。この結果から、エンドソーム上で Rab5 により活性化された Rab7 が下流のエンドソーム・液胞輸送を制御する機構とは別に、Rab5 非依存的な Rab7 の活性化機構が存在していると考えられる。私は、出芽酵母の Rab5 遺伝子欠損変異体に GFP を N 末端に融合した GFP-Rab7 を発現させ Rab7 の活性を調べたところ、Rab5 非存在下の細胞においても GFP-Rab7 が液胞膜上に局在することが分かった。Rab7 は活性型 (GTP 型) で液胞膜上、不活性型 (GDP 型) で細胞質中に局在するため、この結果から Rab5 欠損変異体においても Rab7 が活性化されていることを明らかにした。

ゴルジ体から液胞区画に積み荷を輸送する小胞輸送経路として、ゴルジ体からエンドソームを介して液胞へ輸送を行う VPS 経路と別に、ゴルジ体から直接液胞へ輸送を行っている AP-3 経路が存在し、AP-3 経路の輸送小胞は液胞膜上の Rab7 を介して液胞と融合できることが知られている。私は、Rab5 非存在下においてこの AP-3 経路が Rab7 活性化に重



要な役割を持つのではないかと考え、Rab5 欠損と同時に下流の Rab7 も欠損した二重変異体における積み荷輸送への影響を調べた。VPS 経路の積み荷である液胞プロテアーゼ Pep4p の C 末端に緑色蛍光 GFP を付加した Pep4-GFP と、AP-3 経路の積み荷である液胞ホスファターゼ Pho8 に赤色蛍光 mCherry を付加した mCherry-Pho8 を同時に発現させることで、それぞれの経路への影響を解析した。この結果、Rab5 の単独欠損では VPS 経路の積み荷輸送に障害が見られた一方で、AP-3 経路の積み荷が正常に液胞区画へ輸送された。これは Rab5 非存在下において AP-3 経路および Rab7 活性が機能していることを意味する。さらに、Rab5 と Rab7 の二重欠損変異体について同様に調べた結果、Rab5 Rab7 二重欠損では VPS 経路と AP-3 経路の積み荷が全く違う局在を示し、AP-3 経路の輸送が完全に融合能を失っていることを見出した。これらの結果から、私は Rab5 非依存的な AP-3 経路が Rab7 の活性において重要であること明らかにした。

## 論文審査の結果の要旨

エンドサイトーシスは細胞外の物質や細胞膜成分を細胞内に取り込み、膜小胞を介してリソソームへと輸送し分解する機構である。この機構は栄養物質の摂取、免疫応答などの基本的生命現象に関わっているほか、細胞のがん化や病原菌の感染などとも深く関わっており、その分子機構の解明は基礎研究分野だけではなく臨床応用にも重要である。エンドサイトーシスにおける細胞内小胞輸送の制御において、低分子量 G タンパク質 Rab5 と Rab7 が非常に重要な役割を果たしていることが報告されているが、Rab5 の活性を制御する分子機構については不明な点が多い。また、Rab7 は Rab5 により活性化されることが知られているが、Rab5 非依存的な活性化機構については明らかにされていない。

本論文において、申請者は Rab5 の上流制御因子を同定するために、エンドサイトーシスに異常を示す約 200 種の出芽酵母遺伝子欠損変異体について、Rab5 の細胞内局在に異常が生じる変異体を解析した。この結果、興味深いことに、タンパク質の N 型糖鎖修飾を触媒する複数のマンノース転移酵素が Rab5 の活性化に関わることを見出した。マンノース転移酵素による N 型糖鎖修飾は、複数の酵素反応からなることが明らかにされている。申請者は糖鎖修飾反応のどの段階が Rab5 活性に関わるかを調べ、II 型マンノース転移酵素による糖鎖の伸長反応が重要であることを明らかにした。次に、申請者はこれら N 型糖鎖修飾酵素の標的タンパク質を明らかにするために、過去の研究に基づいた糖鎖修飾タンパク質のデータベース解析を行い、生体膜リン脂質フリッパーゼ複合体の構成因子である Cdc50p を候補タンパク質として同定した。Cdc50p の糖鎖修飾部位のアミノ酸置換変異体を作成し、この変異体における Rab5 の局在およびエンドサイトーシスに与える影響を解析した結果、Cdc50p 単独の変異体では Rab5 の局在に影響は見られないが、同じ Cdc50p ファミリータンパク質である Lem3p と Crf1p にも同様に変異を導入した三重変異体では Rab5 の細胞内局在が変化し、仲介するエンドソーム間融合が阻害されることを明

らかにした。Cdc50 ファミリーはゴルジ体でホスファチジルセリン(PS)の細胞質側への反転を制御する酵素であることから、ゴルジ体に局在する PS 結合タンパク質が Rab5 の活性制御に重要なはたらきをしていることが示唆された。

さらに、申請者は Rab5 の下流エフェクター分子である Rab7 について、Rab5 非依存的に活性化される機構があることを明らかにした。ゴルジ体からエンドサイトーシスを制御する小胞輸送経路にはゴルジ体から Rab5 を介する VPS 経路に加えて、Rab5 非依存的な AP-3 経路が存在する。申請者は AP-3 経路が Rab7 活性化に重要な役割を持つと考え、Rab5 Rab7 単独欠損と Rab5 と Rab7 の 2 重欠損変異体における VPS 経路および AP-3 経路への影響を解析した。この結果、Rab5 単独欠損では VPS 経路のみに障害が生じる一方、Rab5 と Rab7 の二重欠損変異体では VPS 経路と AP-3 経路双方の輸送に異常が見られることを明らかにした。これらの結果から、Rab7 の活性は VPS 経路を介した Rab5 による制御に加えて、AP-3 経路を介した Rab5 非依存的な制御機構があることを示した。

Rab5 と Rab7 はエンドサイトーシス経路を制御する鍵因子であり、出芽酵母のみならずほとんどの真核生物に存在している。本論文において、申請者は Rab5 の活性化にゴルジ体で機能する PS フリッパーゼ複合体の構成因子である Cdc50 ファミリータンパク質の糖鎖修飾が必要であることを明らかにした。この発見はゴルジ体膜の脂質構成の変化がエンドサイトーシス経路の制御に重要であることを示した重要な研究成果である。また、Rab7 についても従来考えられていた機構とは全く異なる新しい活性化機構を発見した。上述の通り、エンドサイトーシスはヒトの病気とも深く関わっており、本研究で得られた結果は、がんや感染症などのエンドサイトーシスと密接に関わりのある病気に対する新しい治療法の開発にもつながる可能性のある重要なものである。したがって、本論文は博士（工学）の学位論文として十分価値のあるものと認められる。