

## 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

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む機構であり、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 **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。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、上流に位置する **Rab5** の活性制御機構については不明な点が多い。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明らかにされていない。

従来、エンドサイトーシス経路は、ゴルジ体からリソソーム/液胞への輸送経路である **VPS** 経路と後期エンドソームにおいて交差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** 経路が交差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経路は必須ではなく、**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** の機能がエンドサイトーシス経路により制御されるのではなく、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。

以前の研究において、富田、仲田らはエンドサイトーシス蛍光マーカーを用い、約 5000 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スクリーニングし、エンドサイトーシス経路に異常のある 196 種の変異体を単離した (未発表データ)。本研究において、私は **Rab5** の新規活性化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、細胞内小胞輸送に関わる可能性のある遺伝子を 56 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、**Rab5** の N 末端に **GFP** を融合した **GFP-Rab5 (Vps21p)** をこれらの変異体に発現させ、その局在を解析した。以前の研究において、**Rab5** 活性の低下した変異体では初期エンドソーム数が増加することが知られていた。このため、私は各変異体において **GFP-Rab5 (Vps21p)** のエンドソーム局在およびエンドソームの数を解析し、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。これら変異体の中には、ゴルジ体に局在する N 型糖鎖酵素が含まれており、このためゴルジ体でのタンパク質の糖鎖付加が **Rab5** の活性制御に関わっていることが示唆された。出芽酵母の N 型糖鎖はゴルジ体内腔でマンノースを付加されており、本スクリーニングにおいてマンノース転移酵素である **Och1p** および

I 型／II 型マンノース転移酵素複合体のみサブユニットの変異体が単離された。私はどの段階の N 型糖鎖修飾が Rab5 活性に関わるかを調べるため、各糖鎖修飾に関わる N 型糖鎖酵素の変異体について GFP-Rab5 (Vps21p) 局在への影響を調べた。この結果、II 型マンノース転移酵素の下流で糖鎖修飾を行っている酵素の変異体では、Rab5 の局在に影響が見られないことが分かった。

次に、Rab5 の活性に関わる N 型糖鎖修飾タンパク質の同定を試みた。本研究で解析対象とした 56 種の変異体の責任タンパク質の中で、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に着目した。Cdc50p の糖鎖修飾部位であるアスパラギンをグルタミンに置換した変異体を作成し、この変異体における GFP-Rab5 (Vps21p) の局在およびエンドソーム数を解析した。しかしながら、*cdc50* 変異体では Rab5 の局在にほとんど影響は見られなかった。出芽酵母では Cdc50p の機能的ホモログとして Lem3p、Crf1p が発現しており、これら全ての Cdc50p ホモログは N 型糖鎖修飾を受けることが報告されている。このため、これら 3 種の Cdc50p ホモログの糖鎖付加部位に変異を導入した三重変異体 (*cdc50 lem3 crf1*) を作成し、GFP-Rab5 (Vps21p) の局在を調べた。この結果、この変異体において GFP-Rab5 (Vps21p) が局在するエンドソーム数が増加することが分かった。Cdc50 ファミリータンパク質はゴルジ体網 (TGN) で PS の細胞質側へのフリップを制御するタンパク質であり、TGN における PS の局在がエンドソームの形成と輸送に重要であることが示唆された。

Rab7 は Rab5 の下流で働く Rab であり、Rab5 が GEF である Mon1-Cez1 複合体をエンドソームヘリクルートすることにより活性化される。Rab7 の活性制御が上流 Rab5 のみによって行われているのかについて調べるために、3 種の酵母 Rab5 ホモログ *VPS21*、*YPT52*、*YPT53* 遺伝子を全て欠損した Rab5 欠損変異体を作成し、GFP-Rab7 (Ypt7p) の局在を調べた。この結果、Rab5 欠損変異体において GFP-Rab7 (Ypt7p) が正常に液胞膜に局在することが分かった。このことから、Rab7 の活性は Rab5 のみによって制御されているのではなく、Rab5 非依存的に制御する機構が存在していることが考えられた。

ゴルジ体からリソソーム／液胞区画に積み荷を輸送する小胞輸送経路には、前述の VPS 経路に加えて、ゴルジ体から直接液胞へ輸送を行っている AP-3 経路が存在する。AP-3 経路の輸送小胞 (AP-3 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。このため、Rab5 欠損変異体において、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 Rab7 の二重変異体における各経路を介した積み荷輸送への影響を調べた。VPS 経路の積み荷マーカーとして Pep4p-GFP、AP-3 経路の積み荷マーカーとして mCherry-Pho8 を用いて Rab5 と Rab7 の 2 重変異体での局在を調べた。この結果、Rab5 単独欠損では VPS 経路に障害が生じる一方、AP-3 経路は正常であった。これに対して 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 経路を介した制御機構があることが示唆された。