

56. G タンパク質共役受容体の分解機構の網羅的解析

十島 二郎

東京理科大学 基礎工学部 生物工学科

Key words : GPCR, endocytosis, membrane traffic, endosome

緒言

G タンパク質共役型受容体 (GPCR) は 7 回膜貫通型の細胞膜タンパク質であり、ヒトゲノムにおいて約 900 種類からなる大きなファミリーを形成している。これらの GPCR は血圧の調節、味覚、嗅覚など様々な生体現象に関わるほか、細胞の増殖、遊走などにも必要とされている。重要なことに、GPCR ファミリーの中で約 300 種程度は生理活性物質をリガンドとすると考えられており、これらの GPCR は創薬の標的分子となっている。現在まで開発された医薬品の中で約 40% は GPCR に作用する薬剤である。また、幾つかの GPCR はがん細胞に過剰発現し、細胞の癌化にも関わっていることが報告されている。これらのことから、GPCR シグナルの活性制御機構を明らかにすることは、臨床応用の面からも重要な研究課題である。GPCR はリガンドの結合により活性化し、シグナルを伝えると、クラスリン小胞によりエンドサイトーシスされ、エンドソームを経て、リソソームで分解される。GPCR のエンドサイトーシスによる取り込みは、GPCR シグナルの不活性化のための主たる制御機構であるが、活性化した GPCR のクラスリン小胞への取込み機構、およびエンドサイトーシス後の輸送および分解機構については不明な点が多い。これらの過程は非常に一過的な現象であることに加え、これらの過程を特異的にモニターできる分子マーカーが存在しなかった。このため、GPCR のエンドサイトーシスによる分解機構の解明には、GPCR を特異的に標識し、そのエンドサイトーシス過程を追跡できる分子マーカーが必要であった。私達は以前の研究において、Ste2 GPCR のリガンドである α -factor に蛍光分子を付加することにより、活性化した GPCR のエンドサイトーシス過程を追跡することができる蛍光分子マーカーの作製に成功した [1, 2]。この蛍光マーカーを用いて、私達は多数の出芽酵母変異体の単離に成功した。本研究では、これらの変異体の中で特に、GPCR の初期に関わる遺伝子変異体の解析と、エンドソーム-リソソーム間の輸送に関わる遺伝子の解析を行った。GPCR のエンドサイトーシスによる取り込み過程に関わる遺伝子を解析するため、初期過程ではたらく 4 種類のタンパク質を GFP で標識し、エンドサイトーシス変異体における動態を解析した。この結果、*clc1*、*end3*、*las17*、*sla2* 変異体の 4 つの変異体で顕著な異常が見られることを発見した [3]。また、エンドソーム-リソソーム間の輸送に関わる Rab5、Rab7 タンパク質について解析した。この結果、Rab7 は Rab5 依存的に活性化される機構と、非依存的に活性化される機構が存在することを見出した [4]。

方法

1. エンドサイトーシス蛍光マーカーの作製

出芽酵母でエンドサイトーシスの初期過程で働くと考えられるタンパク質 Ede1p、Syp1p、Yap1801p および Yap1802p の C 末端に 3 つの GFP を付加するために、*3GFP* 遺伝子の上流および下流に各遺伝子の相同領域をクローニングし、相同組換により、各遺伝子領域に挿入した。FEC-3GFP は以下の様に二段階で作製した。まず、各 3GFP 発現酵母 (1 倍体) を交配し、2 倍体を作製した後、孢子形成により再度、1 倍体に戻すことにより、2 種類の 3GFP 融合タンパク質を作製した。さらに、2 種類の 3GFP 融合タンパク質を発現する酵母どうしを交配し、再度 1 倍体に戻すことで 4 種類の 3GFP 融合タンパク質 (FEC-3GFP) を発現する酵母を作製した。変異体については、FEC-3GFP を発現する酵母から各対象遺伝子をノックアウトすることで作製した。

2. 蛍光顕微鏡および電子顕微鏡によるリソソーム形態の解析

蛍光顕微鏡は×100/NA1.40の対物レンズを備えたオリンパスIX83を使用し、Orca-R2 cooled CCDカメラ（浜ホト）を用いた。蛍光強度はImageJ V1.44プログラムを用いることで解析した。電子顕微鏡のサンプルは液化プロパンによる急速凍結法により固定した後、無水アセトンとエタノールで脱水し、レジジン（Quetol-651）に包埋した。その後、70 nmの厚さの切片に切断し、2%酢酸ウラニルおよび鉛染色液で染色し、透過型電子顕微鏡（JEM-1400Plus）により観察した。

結果および考察

1. GPCRのクラスリン小胞を介した細胞内への取り込み機構の解析

GPCRの分解の初期過程にはクラスリンおよび複数のクラスリン結合蛋白質により制御されている[5]。私はエンドサイトーシスの初期過程で働く4つの蛋白質Ede1p, Syp1p, Yap1801pおよびYap1802pに3分子のGFPを付加し、その全てを発現する細胞（FEC-3GFP細胞）を作製し、GPCR取り込みの初期過程を詳細に解析した（図1A）。まず、はじめにFEC-3GFPの蛍光強度について、それぞれのGFP融合タンパク質と比較したところ、FEC-3GFPは各タンパク質の蛍光強度に比べ3~5倍高く、非常に明るいことが分かった（図1B）。FEC-3GFPをマーカーとして野生型細胞におけるクラスリン被覆の形成時間を調べたところ、20~270秒と小胞ごとに大きく異なるが、全体としては平均値 105 ± 35 秒前後をピークとする正規分布の値を示した（図1C）。次に、GPCRのエンドサイトーシスに関わる33種のエンドサイトーシス関連蛋白質の遺伝子欠損にFEC-3GFPを発現させ、クラスリン被覆形成への影響を調べた。この結果、クラスリン被覆小胞の形成時間が伸長しているいくつかの変異体を同定した（図1D）。

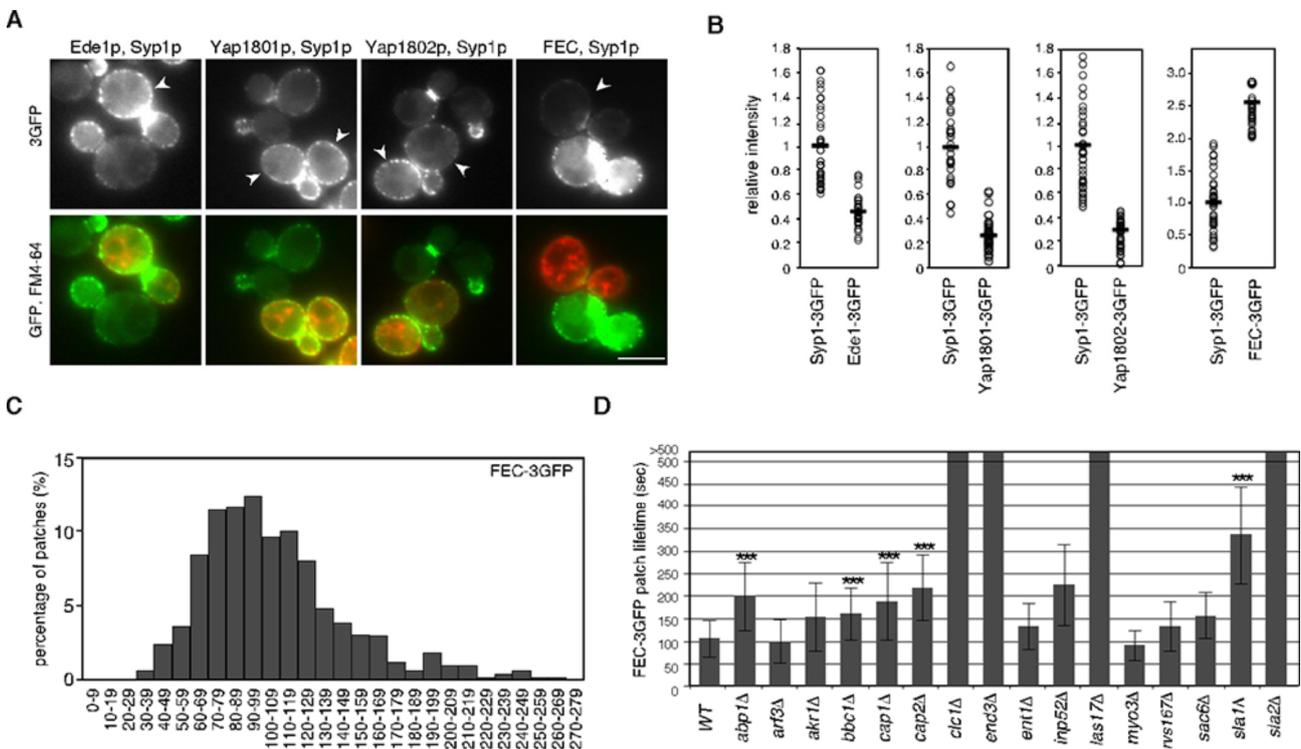


図1. クラスリン形成初期マーカーの作製とエンドサイトーシス変異体における影響

- 4種の初期タンパク質への3GFPの付加とそれら全てを発現する細胞（FEC-3GFP）の作製
- 各初期タンパク質3GFPとFEC-3GFPの蛍光強度の比較
- FEC-3GFPの細胞膜への局在時間（ライフタイム）の分布
- エンドサイトーシス変異体におけるFEC-3GFPのライフタイム

これらの中で、特にクラスリン被覆小胞の形成時間が伸びている *clc1*, *end3*, *las1*, *sla2* 変異体においては、小胞形成時に一過的に見られるアクチン重合にも大きな異常が見られた。また、これら変異体におけるクラスリン被覆小胞の形成部位を 3 次元解析した結果、*sla2* 変異体において小胞の形成部位が増加していることが分かった。さらに、*end3* 変異体ではクラスリン被覆小胞の形成に重篤な異常が見られるのに対して、*las17*, *sla2* 変異体ではアクチン重合に異常が大きく、その結果としてクラスリン小胞の細胞内への取り込みが抑制されていることが分かった。特に興味深いことに、*clc1* 変異体ではクラスリン小胞の形成が損なわれていると共に、アクチン骨格にも重篤な異常を示すが、GPCR のリクルート自体は起こっていることが分かった。*clc1* 変異体について、さらに詳細に解析した結果、クラスリン小胞の形成部位へのアクチン重合因子 WASp (酵母 Las17) のリクルートが損なわれており、野生型細胞では小胞形成時に規則正しくアクチン重合が開始されるのに対して、*clc1* 変異体ではランダムにアクチン重合が起こっていることが分かった。これらの結果は、*clc1* 変異体において GPCR のエンドサイトーシス部位へのリクルートは起こるが、細胞内への取り込み過程に重篤な異常が生じているため、リソソームへの輸送および分解が損なわれていることが示唆された。

本研究により、GPCR の取り込みの初期過程に必要な遺伝子を複数同定した。この中でアクチン骨格の制御因子はアクチン重合/脱重合を介したクラスリン被覆小胞の形成に必要であると考えられる。クラスリン軽鎖をコードする *CLC1* 遺伝子の変異体では、クラスリン被覆小胞自体の形成に異常があるのは当然と思われるが、GPCR の小胞へのリクルートは起こっていた。このことは、クラスリン被覆小胞形成とその小胞への GPCR のリクルートおよび取り込み過程は独立して起こることを示唆している。また、*CLC1* 遺伝子変異体ではエンドサイトーシス部位でのアクチン重合がランダムに起こることを見出した。これは酵母 WASp タンパク質のリクルート異常が第一の原因であるようだが、クラスリン軽鎖が WASp の局在および活性を直接もしくは間接的に制御していることを示している。以前の論文において、*CLC1* 遺伝子変異体では酵母 WASp の制御因子である Sla1p のリクルートが著しく損なわれていることが報告されており [5]、WASp の介したエンドサイトーシス部位でのアクチン重合にはクラスリン軽鎖と Sla1p の相互作用が必要なかもしれない。

2. GPCR のエンドソーム-リソソーム間輸送の分子機構の解析

スクリーニングにより、GPCR のエンドソーム-リソソーム間輸送に低分子量 GTP アーゼである Rab5、Rab7 およびそれらの相互作用因子が必要であることが示された。Rab5 GTP アーゼはエンドサイトーシス小胞の初期エンドソームへの標的化、エンドソーム間の融合など、エンドサイトーシス経路の初期段階を制御する一方、Rab7 は後期エンドソーム-リソソーム区画に局在し、初期エンドソームの後期エンドソーム、リソソームへの輸送において重要な役割を担っている。この過程において、Rab7 の活性化は Rab5 の活性化に伴い、Rab コンバージョンと呼ばれる機構で連続的に活性化することが報告されている。Rab コンバージョンにおいて、Rab5 は Rab7 のグアニンヌクレオチド交換因子 (GEF) をエンドソーム上にリクルートし、これにより下流の Rab7 が活性化する。この Rab5 による Rab7 の活性化機構は出芽酵母を含む多くの生物種において高度に保存されている。本研究において、私達は Rab5 の存在しない細胞においても GPCR の一部が正常にリソソームへと輸送され、分解されることを見出した。驚いたことに、この細胞において Rab7 は活性化され、リソソーム膜に局在することが分かった (図 2B, *rab5*Δ 細胞)。このことは、Rab7 が Rab5 非依存的に活性化される機構が存在することを示している。私達は以前の研究において、エンドサイトーシスにより細胞内に取り込まれた GPCR は、ゴルジ体からの VPS (液胞タンパク質選別) 経路や AP (アダプタータンパク質) -3 経路と融合した後にリソソームへと輸送されることを明らかにした [2]。Rab5 は主に VPS 経路と融合したエンドサイトーシス経路ではたらくのに対して、AP-3 経路と融合したエンドサイトーシス経路は Rab5 非依存的であることを明らかにした [2]。酵母 *Rab5* (*ScRab5*) および *Rab7* (*ScRab7*) 欠損変異体における GPCR の輸送への影響を調べたところ、*ScRab5* 欠損細胞では AP-3 経路依存的にリソソームで分解されるのに対して、*ScRab7* 欠損細胞では断片化したリソソームへの GPCR の輸送が見られた (図 2B) [4]。興味深いことに、*ScRab5*, *ScRab7* の二重変異体ではリソソーム自体の形成が見られなくなり、GPCR の輸送も完全に抑制された (図 2A, B) [4]。これらの結果より、Rab7 の Rab5 非依存的な活性化が AP-3 経路を介している可能性が考えられた。また、*ScRab5*, *ScRab7* 二重変異体が *ScRab5* または *ScRab7* 単独変異体と比較して、かなり重篤なリソソームの形成異常を引き起こすことを示すことから、Rab5 と Rab7 はリソソームの形成および GPCR のリソソームへの輸送において、部分的に重複した機能を有することが示唆された。今後は GPCR 輸送における、Rab7 の Rab5 非依存的な活性化の分子機構について明らかにし

ていきたいと考えている。

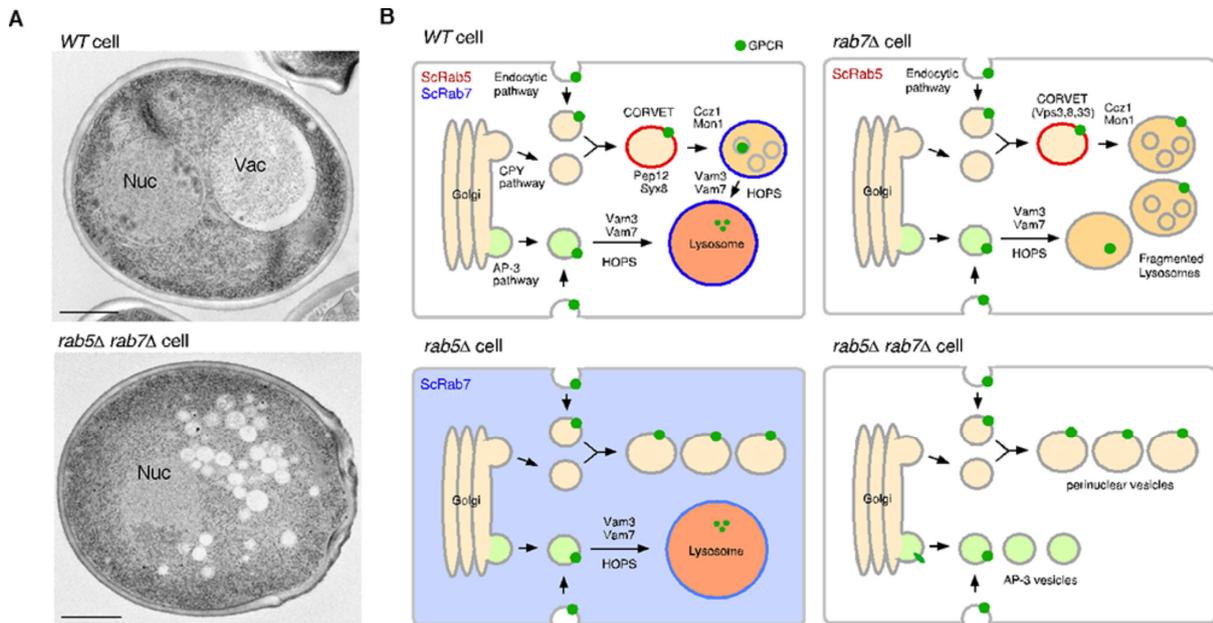


図2. 酵母 *Rab5* および *Rab7* 欠損変異体におけるリソソームの形態と GPCR の輸送モデル
 A) 野生型細胞と酵母 *Rab5*、*Rab7* 遺伝子欠損変異体の電子顕微鏡写真
 B) 野生型細胞、酵母 *Rab5* 欠損、*Rab7* 欠損、*Rab5*、*Rab7* 二重欠損細胞における GPCR の輸送モデル

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者であり、蛍光顕微鏡解析をして頂いた東京工科大学医療保健学部の十島純子教授に感謝します。

文献

- 1) Toshima JY, Toshima J, Kaksonen M, Martin AC, King DS, Drubin DG. Spatial dynamics of receptor-mediated endocytic trafficking in budding yeast revealed by using fluorescent alpha-factor derivatives. Proc Natl Acad Sci U S A. 2006 Apr 11;103(15):5793-8. Epub 2006 Mar 30. doi: 10.1073/pnas.0601042103
- 2) Toshima JY, Nishinoaki S, Sato Y, Yamamoto W, Furukawa D, Siekhaus DE, Sawaguchi A, Toshima J. Bifurcation of the endocytic pathway into Rab5-dependent and -independent transport to the vacuole. Nat Commun. 2014 Mar 25;5:3498. doi: 10.1038/ncomms4498.
- 3) Miyashita M, Kashikuma R, Nagano M, Toshima JY, Toshima J. Live-cell imaging of early coat protein dynamics during clathrin-mediated endocytosis. Biochim Biophys Acta Mol Cell Res. 2018 Nov;1865(11 Pt A):1566-1578. doi: 10.1016/j.bbamer.2018.07.024. Epub 2018 Aug 3.
- 4) Shimamura H, Nagano M, Nakajima K, Toshima JY, Toshima J. Rab5-independent activation and function of yeast Rab7-like protein, Ypt7p, in the AP-3 pathway. PLoS One. 2019 Jan 25;14(1):e0210223. doi: 10.1371/journal.pone.0210223. eCollection 2019.
- 5) Lu R, Drubin DG, Sun Y. Clathrin-mediated endocytosis in budding yeast at a glance. J Cell Sci. 2016 Apr 15;129(8):1531-6. doi: 10.1242/jcs.182303. Review.