

28 遷移状態にあるオルガネラの解析と生理的意義の解明	大場 雄介
-----------------------------	-------

**【目的】** エンドサイトーシスは細胞外の栄養素や病原体、細胞膜の受容体を取り込む機構であり、重要な細胞生理機能の一つである。エンドサイトーシスによって取り込まれた様々な物質はエンドソームと呼ばれる小胞に内包されると、リソソームへと運ばれて分解される分解経路と、再び細胞膜に戻されるリサイクリング経路に振り分けられる。また、エンドソームは初期エンドソーム、後期エンドソーム、リサイクリングエンドソームと明確に分けられており、取り込まれた物質や受容体はこれらのエンドソームを通して適切に輸送されると考えられている。我々は最近、上皮増殖因子 (Epidermal growth factor : EGF) 受容体刺激によってエンドサイトーシスを誘導した時、細胞膜から小胞が形成される初期段階で、初期エンドソームマーカーである Rab5 と後期エンドソームマーカーである Rab7 が同時に局在する小胞が存在することを見出した。このような遷移状態にあるオルガネラはこれまでに報告がなく、このオルガネラの役割や形成メカニズムは未知である。そこで、Rab5<sup>+</sup>Rab7<sup>+</sup>小胞の特徴や形成に関わる因子を検証し、この小胞の生理的意義を明らかにすることを目指した。

**【方法】** 発現プラスミドを導入した A431 細胞を血清飢餓処理し、EGF で刺激して共焦点蛍光顕微鏡でタイムラプス観察した。内在性の Rab5 および Rab7 は EGF 刺激後に細胞を固定し、免疫染色法により可視化して観察した。得られた蛍光顕微鏡画像は MetaMorph ソフトウェアを用いて解析した。

**【結果】** A431 細胞に EGFP-Rab5 および mCherry-Rab7 を発現させ、EGF 刺激後のエンドサイトーシスの様子をタイムラプス観察した。細胞膜から形成されたばかりのリング状に見える大きな小胞には、興味深いことに初期エンドソームマーカーである Rab5 と後期エンドソームマーカーである Rab7 が同時に局在していた。また、この Rab5<sup>+</sup>Rab7<sup>+</sup>小胞には EEA1 および SNX5 が共局在しており、その直径は 2~7 μm と比較的大きかったことから、この小胞はマクロピノサイトーシスによって形成されるマクロピノソームであることが示唆された。次に、Rab5<sup>+</sup>Rab7<sup>+</sup>小胞によって輸送される物質および輸送経路を調べた。EGF 刺激後に形成される Rab5<sup>+</sup>Rab7<sup>+</sup>小胞が EGF 受容体陽性であるかどうかを検証したところ、Rhodamine 標識 EGF との共局在が認められ、すなわち EGF 受容体が内包されていることが示された。また、Rab5<sup>+</sup>Rab7<sup>+</sup>小胞の挙動をタイムラプスイメージングで観察したところ、この小胞はリソソームマーカーのみと共局在したことから、EGF 受容体を分解経路に輸送することが示唆された。次に、Rab5<sup>+</sup>Rab7<sup>+</sup>小胞の形成に関わる因子を探索した。Src 阻害剤である PP2 で処理した細胞では、EGF 刺激後に Rab5<sup>+</sup>Rab7<sup>+</sup>小胞の形成が抑制された。Src は Rab7 をリン酸化するという報告があることから、Rab7 のリン酸化状態が Rab5<sup>+</sup>Rab7<sup>+</sup>小胞の形成に関与すると予想した。そこで、Rab7 のリン酸化模倣変異体およびリン酸化不全変異体を用いて、Rab5<sup>+</sup>Rab7<sup>+</sup>小胞の形成を評価した。予想外に、リン酸化不全変異体 Rab7 の過剰発現により Rab5<sup>+</sup>Rab7<sup>+</sup>小胞の形成が促進され、脱リン酸化状態の Rab7 がこの小胞形成に関与することが示唆された。

本研究の概要図

