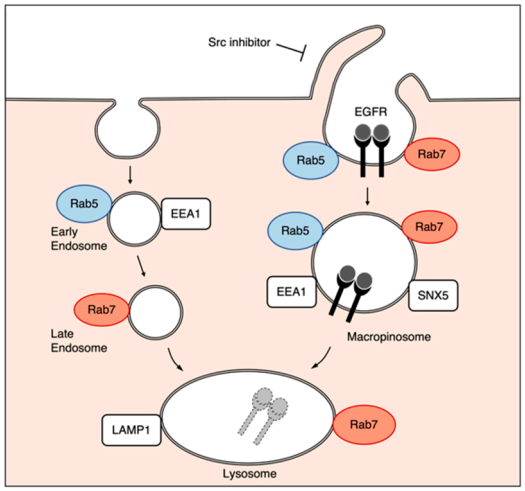
28　遷移状態にあるオルガネラの解析と生理的意義の解明	大場　雄介

【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、$Rab5^{+}Rab7^{+}$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 $Rab5^{+}Rab7^{+}$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、$Rab5^{+}Rab7^{+}$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 $Rab5^{+}Rab7^{+}$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、$Rab5^{+}Rab7^{+}$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、$Rab5^{+}Rab7^{+}$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 $Rab5^{+}Rab7^{+}$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 $Rab5^{+}Rab7^{+}$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、$Rab5^{+}Rab7^{+}$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 $Rab5^{+}Rab7^{+}$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



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

北海道大学 大学院医学研究院 細胞生理学教室

Key words：エンドサイトーシス，マクロピノソーム，Rab7，蛍光イメージング

緒　言

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（カーゴ）は、エンドソームと呼ばれる小胞の中に内包されて細胞内を輸送される。輸送された物質は、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。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に分類され、それぞれ取り込んだ物質や受容体を適切なタイミングで適切な経路に輸送するために機能している。各エンドソームにはそれぞれ特徴的な分子が局在しており、例えば、Ras-related protein Rab-5（Rab5）や Early endosome antigen 1（EEA1）は初期エンドソーム、Ras-related protein Rab-7（Rab7）は後期エンドソーム、Ras-related protein Rab-11（Rab11）はリサイクリングエンドソーム、Lysosome-associated membrane glycoprotein 1（LAMP1）はリソソームに局在する［1〜3］。これらの分子はエンドソーム成熟化とともに遷移することが分かっている。細胞膜から形成されたばかりの小胞には Rab5 や EEA1 のみが局在しており、この小胞は初期エンドソームと呼ばれる。その後エンドソームが成熟化すると Rab7 がリクルートされ、次第に Rab5 と EEA1 は膜から解離して Rab7 のみが局在する後期エンドソームとなる［4］。したがって、これらの分子はエンドソームマーカーとしてエンドソームの種類を見分ける指標として用いられている。我々は最近、上皮増殖因子（Epidermal growth factor：EGF）受容体刺激により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という、これまでの常識を覆すような現象を発見した。そこで、この小胞の特徴やカーゴ、形成に関わる因子を検証することで、$Rab5^{+}Rab7^{+}$小胞形成の分子メカニズムと生理的意義を明らかにすることを目指した。

方　法

1. 試薬・抗体

ヒト EGF 組換え体タンパク質は PeproTech（Rocky Hill, NJ, USA）、PP2 はメルク株式会社（Darmstadt, Germany）から購入した。Rhodamine-EGF、Alexa Fluor 488 標識抗マウスおよび Alexa Fluor 647 抗ウサギイムノグロブリン G（IgG）二次抗体は Thermo Fisher Scientific（Carlsbad, CA, USA）から購入した。抗 Rab5 抗体は BD Biosciences（Franklin, NJ, USA）、抗 Rab7 抗体は Cell Signaling Technology（Danvers, MA, USA）から購入した。

2. 細胞培養・遺伝子導入

ヒト上皮様細胞癌由来細胞株 A431（CRL-1555）は American Type Culture Collection（Manassas, VA, USA）から入手した。細胞は 37℃、5% CO_2湿潤環境下で、1%ペニシリン-ストレプトマイシン（ナカライテスク株式会社、京都、日本）および 10%ウシ胎児血清（Capricorn Scientific, Ebsdorfergrund, Germany）含有ダルベッコ改変イーグル培地（Dulbecco's Modified Eagle's Medium：DMEM、ナカライテスク株式会社）を用いて培養した。細胞への遺伝子導入は Polyethyleneimine "MAX"（PEIMAX, Polysciences, Warrington, PA, USA）を用いた。

3. プラスミド構築

pFXII-EGFP-Rab5、pFXII-SECFP-Rab5、pFXII-Venus-Rab7、pFXII-mCherry-Rab7、pFXII-iRFP670-Rab11、pFX-EGFP-EEA1、pFX-EGFP-SNX5 は当研究室で以前に作製されたものを使用した。pFXII-LAMP1-iRFP670 は、pFXII-iRFP670-Rab11 から iRFP670 配列を EcoR Ⅰ/Bgl Ⅱで切断し、pFXII-LAMP1-mCherry にサブクローニングして作製した。pFX-mCherry-hRab7a Y183E、pFX-mCherry-hRab7a Y183F は部位特異的変異導入法で作製した。

4. 蛍光顕微鏡観察

顕微鏡観察は、励起光源として LDI レーザー（Chroma Technology Corp., Bellows Falls, VT, USA）、BioPoint MAC 600 フィルターおよびシャッターコントロールユニット（Ludl Electronic Products, Hawthorne. NY, USA）、電動 XY ステージ（中央精機株式会社、東京、日本）を搭載した倒立型リサーチ顕微鏡 IX-83（オリンパス株式会社、東京、日本）を用いた。IX-83 には、冷却 electron multiplying charge-coupled device（EMCCD）カメラ iXon Ultra 888 EM-CCD (Oxford Instruments, Abingdon-on-Thames, UK)、スピニングディスク共焦点ユニット X-Light V3 (CrestOptics, Rome, Italy）を搭載し、各蛍光に対して適切な励起フィルター、蛍光フィルターおよびダイクロイックミラーを用いた。得られた画像は MetaMorph ソフトウェア（Universal Imaging, West Chester, PA, USA）を用いて解析した。

5. 蛍光免疫染色法

4 時間血清飢餓処理した細胞に 100 ng/ml EGF を加えて 37℃で 10 分間インキュベートし、3%パラホルムアルデヒドで細胞を固定した。PBS で洗浄後、0.1% Triton X-100 を加えて室温で 4 分間透過処理した。PBT（0.1%ウシ血清アルブミン（bovine serum albmin：BSA）、0.05% Triton X-100 含有 PBS）で洗浄後、1% BSA を加えて室温で 30 分間ブロッキング処理をした。PBT で洗浄後、一次抗体（抗 Rab5 抗体：1／1,000、抗 Rab7 抗体：1／500）を加えて 4℃で一晩インキュベートした。翌日 PBT で洗浄後、各一次抗体に対する Alexa Fluor 488 および Alexa Fluor 647 標識二次抗体（1：250）を加えて室温で 1 時間インキュベートした。PBT および PBS で洗浄後、共焦点顕微鏡で観察した。

結果および考察

1. エンドソーム形成の初期段階で Rab5 と Rab7 が共局在する小胞が存在する

A431 細胞に EGFP-Rab5 および mCherry-Rab7 を発現させ、EGF 刺激後の細胞をタイムラプス観察した。細胞膜から形成された直後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 だけでなく、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（図 1a）。次に、遺伝子を強制発現させていない A431 細胞を EGF 刺激 10 分後に固定し、Rab5 および Rab7 を免疫染色して観察した。この細胞においても、細胞膜から形成されたばかりの比較的サイズの大きな小胞は Rab5 と Rab7 で共染色されており（図 1b）、内在性の Rab5 と Rab7 でも同様の現象が示された。

2. $Rab5^{+}Rab7^{+}$小胞はマクロピノソームである

次に、$Rab5^{+}Rab7^{+}$小胞に局在する分子を調べたところ、EGF 刺激 10 分後に形成された $Rab5^{+}Rab7^{+}$小胞には、EEA1 および Sorting nexin-5（SNX5）が局在していることがわかった（図 2a、2b）。$Rab5^{+}Rab7^{+}$小胞は EGF 刺激によって形成される直径 2〜7 μm 程度の比較的大きい小胞であること、SNX5 はマクロピノソームのマーカー分子として知られている［5］ことから、$Rab5^{+}Rab7^{+}$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。

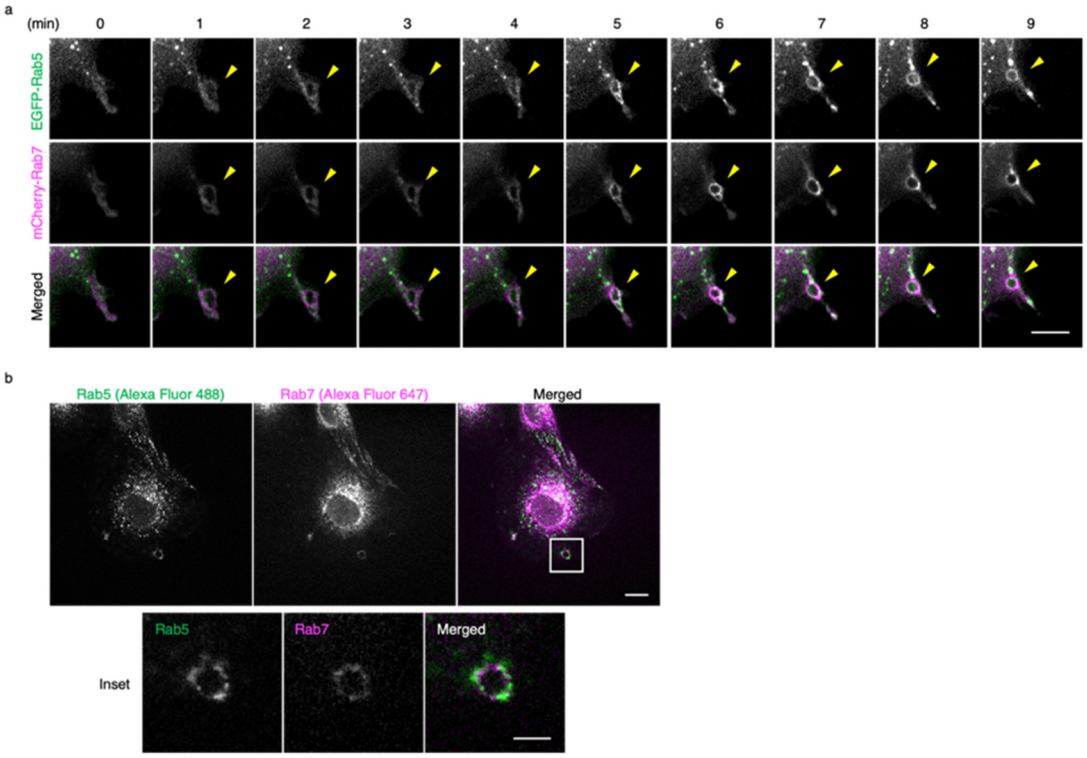


図 1. Rab5^{+}Rab7^{+}小胞の形成

a) EGFP-Rab5（緑）と mCherry-Rab7（マゼンタ）を発現させた A431 細胞を 100 ng/ml EGF で刺激し、共焦点蛍光顕微鏡でタイムラプス観察した。モンタージュ画像は EGF 刺激 6 分後から 10 分間の様子を示す。矢頭は細胞膜から形成された Rab5^{+}Rab7^{+}小胞を示す。スケールバー：10 μ m。

b) EGF 刺激 10 分後に A431 細胞を固定し、内在性の Rab5（緑）および Rab7（マゼンタ）を免疫染色して共焦点顕微鏡で観察した。下の拡大図は、図中の白枠内の Rab5^{+}Rab7^{+}小胞を示す。スケールバー：上段 10 μ m、下段 5 μ m。

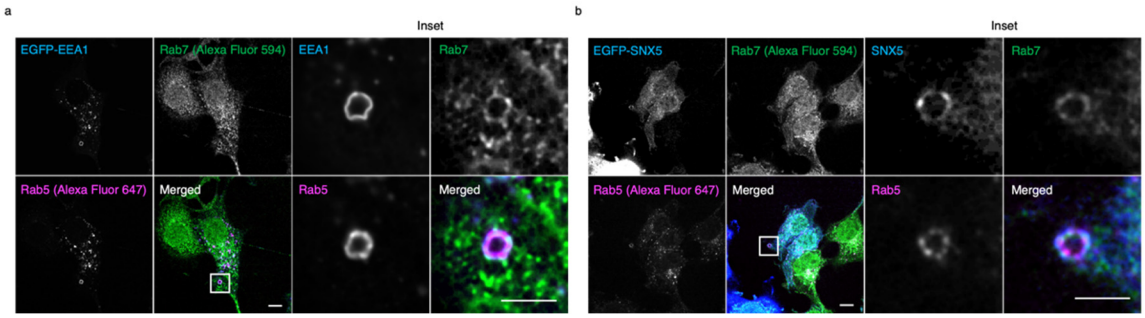


図 2. Rab5^{+}Rab7^{+}小胞は EEA1 および SNX5 と共局在する

a) EGFP-EEA1（青）発現 A431 細胞を 100 ng/ml EGF で刺激し、10 分後に固定した。内在性の Rab5（マゼンタ）および Rab7（緑）を免疫染色し、共焦点顕微鏡で観察した。右の拡大図は、図中の白枠内の Rab5^{+}Rab7^{+}小胞を示す。スケールバー：10 μ m。

b) EGFP-SNX5（青）発現 A431 細胞を EGF で刺激し、10 分後に固定した。a と同様に内在性の Rab5（マゼンタ）および Rab7（緑）を染色して観察した。右の拡大図は、図中の白枠内の Rab5^{+}Rab7^{+}小胞を示す。スケールバー：10 μ m。

3. Rab5$^+$Rab7$^+$小胞は EGF 受容体を分解経路に輸送する

次に、この小胞によって運ばれる物質および輸送経路を調べた。Rab5$^+$Rab7$^+$小胞は EGF 刺激後に形成されることから、EGF 受容体がこの小胞に内包されているかどうかを、Rhodamine 標識 EGF を用いて調べた。Rhodamine 標識 EGF を取り込ませて 10 分後に細胞を固定し、内在性 Rab5 および Rab7 を免疫染色法により可視化して観察した。その結果、Rab5$^+$Rab7$^+$小胞と Rhodamine 標識 EGF は共局在した（図 3a）。また、リサイクリングエンドソームマーカーである Rab11、およびリソソームマーカーである LAMP1 を蛍光タンパク質で可視化し、Rab5$^+$Rab7$^+$小胞の挙動をタイムラプスイメージングで観察した。EGF 刺激後 50 分間観察したところ、Rab5$^+$Rab7$^+$小胞は Rab11 とは共局在せず（図 3b）、LAMP1 のみと共局在した（図 3c）。以上から、EGF 受容体は Rab5$^+$Rab7$^+$小胞に内包され、リソソームへと輸送されることが示唆された。

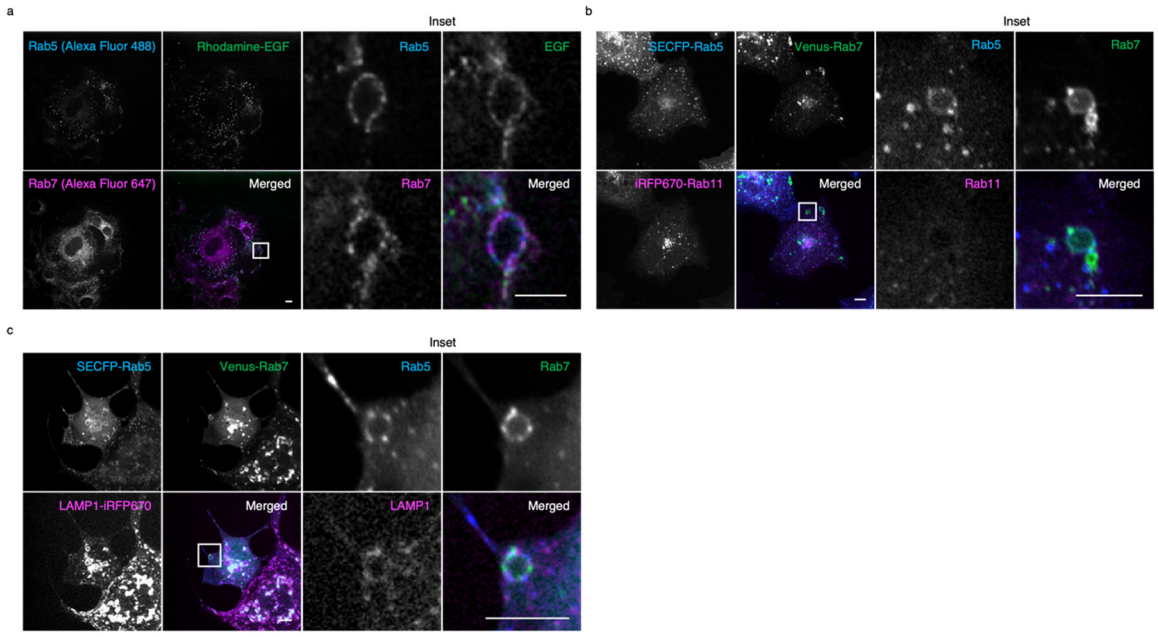


図 3. Rab5$^+$Rab7$^+$小胞の輸送物質および輸送経路の同定

a）A431 細胞に 100 ng/ml Rhodamine-EGF（緑）を添加し、10 分後に固定した。内在性の Rab5（青）および Rab7（マゼンタ）を免疫染色し、顕微鏡観察した。右の拡大図は、図中の白枠内の Rab5$^+$Rab7$^+$小胞を示す。スケールバー：10 μm。

b）SECFP-Rab5、Venus-Rab7 および iRFP670-Rab11 を発現させた A431 細胞に 100 ng/ml EGF を添加し、共焦点蛍光顕微鏡でタイムラプス観察した。画像は EGF 刺激から 28 分後の細胞を示す。右の拡大図は、図中の白枠内の Rab5$^+$Rab7$^+$小胞を示す。スケールバー：10 μm。

c）SECFP-Rab5、Venus-Rab7 および LAMP1-iRFP670 を発現させた A431 細胞に EGF を添加し、b と同様にタイムラプス観察した。画像は EGF 刺激から 34 分後の細胞を示す。右の拡大図は、図中の白枠内の Rab5$^+$Rab7$^+$小胞を示す。スケールバー：10 μm。

4. 脱リン酸化状態の Rab7 は Rab5$^+$Rab7$^+$小胞の形成に関与する

次に、Rab5$^+$Rab7$^+$小胞の形成に関わる因子を調べた。初期エンドソームから後期エンドソームへの成熟化の過程で見られる Rab5/7 スイッチは、GDP/GTP 結合型の Rab5 および Rab7 と、それらのエフェクター、グアニンヌクレオチド交換因子、および GTPase 活性化タンパク質によって制御されることが知られている［6, 7］。本研究で発見された Rab5$^+$Rab7$^+$小胞は通常のエンドソームとは異なる状態であり、Rab5/7 スイッチとは異なるメカニズムで形成や成熟化が制御されていると考えられる。近年、Rab タンパク質の機能は、GDP/GTP による活性制御のほかに、リン酸化

による活性制御も重要であることが明らかになってきている［8］。Rab7 は 72 番目のセリンと 183 番目のチロシンがリン酸化され、後者は Src 依存的であると報告されている［9，10］。そこで、Src 阻害薬である PP2 を用いて、EGF 刺激後に $Rab5^{+}Rab7^{+}$小胞が形成されるかを検証した。その結果、PP2 存在下では小胞形成が抑制された（図 4a）。このことから、リン酸化された Rab7 が $Rab5^{+}Rab7^{+}$小胞の形成に関与すると予想した。次に、Rab7 のリン酸化模倣変異体である Rab7 Y183E、およびリン酸化不全変異体である Y183F を用いて、EGF 刺激後の $Rab5^{+}Rab7^{+}$小胞の形成を評価した。予想外に、Rab7 Y183E の過剰発現では小胞形成が抑制され、Y183F の過剰発現により小胞形成が促進された（図 4b）。これらの結果から、脱リン酸化状態の Rab7 が $Rab5^{+}Rab7^{+}$小胞の形成に関与することが示唆された。

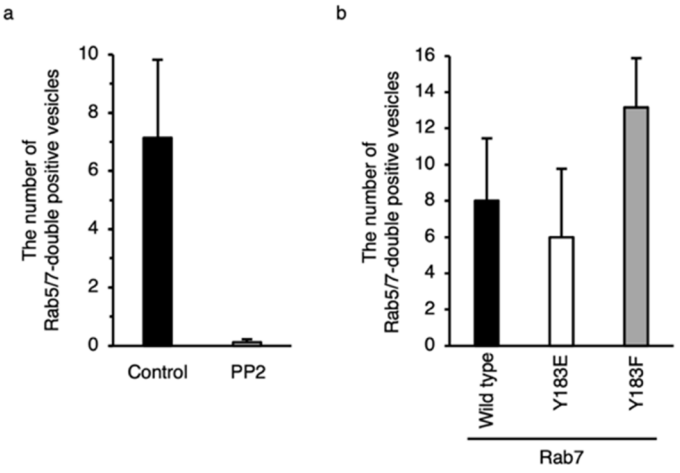


図 4. Rab7 のリン酸化状態は $Rab5^{+}Rab7^{+}$小胞の形成に関与する

a）EGFP-Rab5 および mCherry-Rab7 を発現させた A431 細胞を 100 ng/ml EGF で刺激し、共焦点蛍光顕微鏡でタイムラプス観察した。PP2 処理細胞は、EGF 刺激前に 10μM PP2 で 1 時間インキュベートした。グラフは、EGF 刺激後 50 分間で形成された 1 細胞あたりの $Rab5^{+}Rab7^{+}$小胞の数の平均を示す。エラーバーは標準誤差を示す。

b）EGFP-Rab5 および mCherry-hRab7a（野生型、Y183E、または Y183F 変異体）を発現させた A431 細胞を EGF 刺激し、共焦点蛍光顕微鏡でタイムラプス観察した。グラフは、EGF 刺激後 50 分間で形成された 1 細胞あたりの $Rab5^{+}Rab7^{+}$小胞の数の平均を示す。エラーバーは標準誤差を示す。

文　献

1） Rodman JS, Wandinger-Ness A. Rab GTPases coordinate endocytosis. J Cell Sci; 2000;113(2):183–192. PMID: 10633070

2） Mu FT, Callaghan JM, Steele-Mortimer O, Stenmark H, Parton RG, Campbell PL, McCluskey J, Yeo JP, Tock EPC, Toh BH. EEA1, an early endosome-associated protein. EEA1 is a conserved α-helical peripheral membrane protein flanked by cysteine “fingers” and contains a calmodulin-binding IQ motif. J Biol Chem; 1995;270(22):13503–13511. PMID: 7768953

3） Chen JW, Murphy TL, Willingham MC, Pastan I, August JT. Identification of two lysosomal membrane glycoproteins. J Cell Biol; 1985;101(1):85–95. PMID: 2409098

4） Huotari J, Helenius A. Endosome maturation. EMBO J.; 2011;30(17):3481–3500. PMID: 21878991

5) Kerr MC, Lindsay MR, Luetterforst R, Hamilton N, Simpson F, Parton RG, Gleeson PA, Teasdale RD. Visualisation of macropinosome maturation by the recruitment of sorting nexins. J Cell Sci; 2006;119(19):3967–3980. PMID: 16968745
6) Nordmann M, Cabrera M, Perz A, Bröcker C, Ostrowicz C, Engelbrecht-Vandré S, Ungermann C. The Mon1-Ccz1 complex is the GEF of the late endosomal Rab7 homolog Ypt7. Curr Biol; 2010;20(18):1654–1659. PMID: 20797862
7) Poteryaev D, Datta S, Ackema K, Zerial M, Spang A. Identification of the switch in early-to-late endosome transition. Cell; 2010;141(3):497–508. PMID: 20434987
8) Waschbüsch D, Khan AR. Phosphorylation of Rab GTPases in the regulation of membrane trafficking. Traffic; 2020;21(11):712–719. PMID: 32969543
9) Heo JM, Ordureau A, Swarup S, Paulo JA, Shen K, Sabatini DM, Harper JW. RAB7A phosphorylation by TBK1 promotes mitophagy via the PINK-PARKIN pathway. Sci Adv.; 2018;4(11):1–18. PMID: 30627666
10) Lin X, Zhang J, Chen L, Chen Y, Xu X, Hong W, Wang T. Tyrosine phosphorylation of Rab7 by Src kinase. Cell Signal; 2017;35:84–94. PMID: 28336235