

【36】

氏 名	東 寛
学位の種類	博士（医学）
学位記番号	乙第832号
学位授与の日付	令和4年10月19日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項
学位論文題目	Regulation of Hook1-mediated endosomal sorting of clathrin-independent cargo by γ -taxilin (γ -TaxilinによるHook1を介したクラスリン非依存性小胞輸送の制御)
論文審査委員	(主査) 教授 石 田 和 之 (副査) 教授 釜 井 隆 男 教授 川 又 均

論 文 内 容 の 要 旨

【背 景】

細胞外の物質や細胞膜上の受容体等を細胞内に取り込む経路であるエンドサイトーシスは、栄養の取り込み、細胞接着、細胞極性、細胞分裂、受容体シグナル等の多様な細胞機能に関与しており、エンドソーム膜の構成成分であるクラスリンの有無でクラスリン依存性エンドサイトーシス（Clathrin-mediated endocytosis : CME）とクラスリン非依存性エンドサイトーシス（Clathrin-independent endocytosis : CIE）に大別される。これまでに、CMEに関わるカーゴ分子の選別、小胞形成、内在化、分解経路、リサイクリング経路等の制御機構については詳細に解明されているが、CIEに関わるこれらの制御機構については解明が進んでいない。しかし、CIEは、MHC-I、 β 1-integrin、E-cadherin、CD98、CD147などの重要な生理機能を担う分子のエンドサイトーシスに関与していることが明らかになっており、その制御機構の解明の重要性が近年増している。特に、がん細胞特異的に発現しているアミノ酸トランスポーターであるLAT1の補助サブユニットとして複合体を形成するCD98や、このCD98と複合体を形成してがん細胞の増殖、転移、浸潤に関与するCD147のエンドサイトーシスの制御機構の解明は重要と考えられている。

【目 的】

所属講座では、これまでに α -Taxilin、 β -Taxilin、 γ -Taxilinから構成されるTaxilin familyが細胞内小胞輸送に関与していることを明らかにしている。本研究では、Yeast two-hybrid法を用いた γ -Taxilin結合分子の網羅的スクリーニングにより見出したCIE関連分子であるHook1を糸口に、

γ -TaxilinによるCIEの新たな制御機構の解明を目的とした。

【対象と方法】

本研究は獨協医科大学組換えDNA実験安全委員会の承認を得て、指針に従って行った。

ヒト子宮頸がん細胞株であるHeLa細胞を用いて、以下の生化学的・分子生物学的解析を実施した。共免疫沈降実験、免疫細胞染色実験を用いて、 γ -TaxilinとHook1の結合および細胞内局在について解析を行った。免疫細胞染色実験を応用した抗体取込み実験を用いて、sorting endosome (SE) から細長いチューブ状の膜小胞 (tubular endosome) を介して細胞膜にリサイクリングされるCD98とCD147の動態に対する γ -Taxilinの関与について解析を行った。免疫細胞染色実験を応用したエンドサイトーシス実験とリサイクリング実験を用いて、 γ -TaxilinによるCD98の細胞内への取込みと細胞膜へのリサイクリングに対する影響を検証した。カバーガラスに播種した細胞の接着を時間経過と共に観察して、 γ -TaxilinによるCD147を介した細胞接着について解析を行った。共免疫沈降実験を用いて、 γ -TaxilinによるHook1を介したCD98やCD147のsorting機構における作用点の解析を行った。

統計解析はtwo-tailed Student's *t*-testまたはone-way analysis of variance (ANOVA) with *post-hoc* Tukey's multiple comparison testを用いて検定を行い、 $P < 0.05$ を有意とした。

【結 果】

γ -TaxilinとHook1は細胞内で共局在していた。共免疫沈降において、 γ -TaxilinはCD98とCD147が結合するHook1のC末端領域 (amino acid : 486-728) に結合し、この γ -TaxilinとHook1との結合はCD98やCD147に対して競合的であった。Hook1は、CD98やCD147のエンドサイトーシスに関与しているがMHCIやCD55のエンドサイトーシスには関与していないことが明らかになっているが、small interfering RNA (siRNA) によって作製した γ -Taxilin遺伝子発現抑制 (γ -Taxilin knock down (KD)) 細胞では、CD98陽性およびCD147陽性のtubular endosomeが増加したが、MHCI陽性およびCD55陽性のtubular endosomeには変化を認めなかった。また、 γ -Taxilin KD細胞では、CD98の細胞内への取り込みには変化がなかったものの、CD98の細胞膜上へのリサイクリングが亢進した。一方、 γ -Taxilin過剰発現細胞では、 γ -Taxilin KD細胞とは逆にCD98陽性のtubular endosomeが減少した。Hook1遺伝子発現抑制 (Hook1 knock down (KD)) 細胞では、既報と同様にCD98陽性のtubular endosomeが減少し、 γ -TaxilinとHook1の両遺伝子のKD細胞 (γ -Taxilin/Hook1 KD細胞) では、 γ -Taxilin KD細胞で増加したCD98陽性のtubular endosomeがHook1 KD細胞と同程度まで減少した。 γ -Taxilin KD細胞では、CD147が関与する細胞接着が亢進したが、 γ -Taxilin/CD147 KD細胞および γ -Taxilin/Hook1 KD細胞では、 γ -Taxilin KD細胞で亢進した細胞接着はCD147 KD細胞およびHook1 KD細胞と同程度まで減弱した。

【考 察】

γ -Taxilin KD細胞ではCD98陽性およびCD147陽性の tubular endosomeが増加したが、MHCI陽性およびCD55陽性のtubular endosomeには変化を認めなかった。一方、 γ -Taxilin過剰発現細胞では逆にCD98陽性のtubular endosomeが減少した。これらのことから、 γ -TaxilinがHook1の関与するカー

ゴ分子のtubular endosome形成を抑制していることが示唆された。さらに、 γ -Taxilin KD細胞ではCD98の細胞内への取り込みには変化がなかったものの、CD98の細胞膜上へのリサイクリングが亢進していたことから、 γ -Taxilin KD細胞におけるCD147を介した細胞接着の亢進は、CD147のリサイクリングの亢進によるものと示唆された。また、 γ -Taxilin KD細胞で認められたtubular endosome形成の増加や細胞接着の亢進が γ -Taxilin/Hook1 KD細胞では減弱したことから、 γ -TaxilinはHook1を介してカーゴ分子の制御を行っていることが示唆された。 γ -Taxilinの作用機構に関しては、 γ -TaxilinがHook1に対してCD98およびCD147と競合的に結合することから、 γ -Taxilin がHook1を介したCD98やCD147のSEからtubular endosomeへのsortingを抑制し、CD98やCD147のリサイクリングを負に制御していることが示唆された。

【結 論】

クラスリン非依存性小胞輸送において、 γ -TaxilinはHook1を介したCD98およびCD147の細胞膜上へのリサイクリングを負に制御することが明らかになった。

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

【論文概要】

小胞輸送は細胞運動、細胞分裂、極性形成等の細胞機能に関与しているが、近年、小胞輸送障害が糖尿病、神経変性疾患、自己免疫疾患等の原因となることが報告されている。小胞輸送は、大きくエキソサイトーシス、エンドサイトーシス、トランスサイトーシスに分類されるが、この内、エンドサイトーシスは細胞外物質や細胞膜上のタンパク質を細胞内に取り込む経路であり、エンドソーム膜の構成成分であるクラスリンの有無でclathrin-mediated endocytosis (CME) とclathrin-independent endocytosis (CIE) に大別される。CIEはCMEに比べて不明な点が多いが、取り込まれるカーゴ分子が徐々に明らかになりつつある。これまでにがんの転移、浸潤に関与するCD98やCD147などがカーゴ分子として同定されており、CD98とCD147が小胞輸送分子であるHook 1 を介して初期エンドソームからTubular recycling endosome (TRE) を経て再び細胞膜上へ輸送されることが明らかになっている。しかし、CD98とCD147のTREへのソーティングの制御機構については未だ不明な点が多い。申請論文では、網羅的な相互作用解析を行い小胞輸送関連分子である γ -Taxilin とHook1 の結合を見出し、 γ -TaxilinによるHook1を介したCIEカーゴ分子の細胞内輸送の制御機構について生化学的・分子生物学的実験手法を用いて検討している。

γ -Taxilin遺伝子発現抑制細胞を用いた検討を行い、 γ -TaxilinがCD98/CD147のTREへのソーティングを抑制していることを明らかにするとともに、CD98の細胞膜上へのリサイクリングやCD147のリサイクリングを介した細胞接着を抑制していることを明らかにしている。さらに γ -TaxilinとHook1およびCD98/CD147間の結合解析を行い、 γ -TaxilinとCD98/CD147はHook1のC 末端領域に競合的に結合することを明らかにしている。これらの結果から、申請論文では γ -TaxilinはHook1とCD98およびCD147の結合を抑制することでこれらカーゴ分子のTREへのソーティングを制御していると結論づけている。

【研究方法の妥当性】

申請論文では、クラスリン非依存性小胞輸送の制御機構について、生化学的・分子生物学的実験手法を用いて解析を行うとともに、適切なサンプルサイズの設定および統計処理を実施している。したがって申請論文の研究方法は適切である。

【研究結果の新奇性・独創性】

申請論文では、 γ -TaxilinがHook1とCIEカーゴ分子の結合を競合的に阻害することでこれらカーゴ分子のTREへのソーティングを制御していることを明らかにした。制御機構の解明と新規制御分子の同定を達成した点において新奇性と独創性に優れた研究である。

【結論の妥当性】

申請論文では、多様な実験手法を用いたアプローチがなされており、得られた結果の解釈は妥当なものである。申請論文で提示されたクラスリン非依存性小胞輸送の制御機構モデルは複数の検証結果に基づいたものであるとともに、既存の知見の再検証も実施しており、導かれた結論の信頼性は高い。

【当該分野における位置付け】

申請論文は、 γ -Taxilinがクラスリン非依存性小胞輸送における新たな輸送制御分子であることを明らかにした。 γ -Taxilinによって輸送制御を受けるCD98やCD147はがんの転移、浸潤等に関与しており、それら分子の細胞内動態を明らかにすることは、疾患と細胞内小胞輸送との関連について重要な知見となりうると考えられ、当該分野の進歩に貢献することが期待できる。

【申請者の研究能力】

申請者は、分子生物学的・生化学的実験手法を用いて、細胞内小胞輸送における γ -Taxilinの機能について多角的な実験および解析を行い、その結果を査読付き国際誌に発表しており、十分な研究能力を有している。

【学位授与の可否】

申請者の研究は、解明が進んでいないクラスリン非依存性小胞輸送に対する理解を大きく前進させるものであり、本研究論文は博士（医学）の学位授与に値すると審査委員全員一致で判断した。

（主論文公表誌）

Journal of Cell Science

(135 : jcs258849, 2022)