

## エンドサイトーシス経路と生合成経路の交叉点

十島 純子, 十島 二郎

### 1. はじめに

エンドサイトーシスはクラスリン被覆小胞を介して, さまざまな細胞外分子や細胞膜タンパク質などを細胞内に取り込む機構である. これらの取り込まれた分子は, 小胞融合により初期エンドソームに輸送された後, 後期/多胞体エンドソームを経て最終的にリソソーム/液胞で分解される. この一連の輸送経路は, Rab, Arfをはじめとする多数の単量体 GTPase により協調的に制御されている. エンドサイトーシス経路は初期エンドソームからリソソーム/液胞に至る経路において, ゴルジ体からの小胞輸送経路である生合成経路に交叉する. 出芽酵母を用いた網羅的なスクリーニングにより, ゴルジ体からリソソームに至る経路には 70 を超えるタンパク質が関与していることが明らかとなっており, これらのタンパク質の多くは VPS (vacuolar protein sorting) タンパク質として高等真核生物でも保存されている. ゴルジ体からリソソーム/液胞に至る経路は, トランスゴルジから後期/多胞体エンドソームを経由する VPS 経路と, トランスゴルジから直接リソソームへと輸送する AP-3 経路の二つに分かれており, これまでの研究において, エンドサイトーシス経路は VPS 経路と後期エンドソームにおいて Rab5 依存的に交叉することが報告されている. 本稿ではエンドサイトーシス経路とこれら二つの生合成経路の交叉点とその過程における Rab5 GTPase の働きについての最近の知見を, 筆者らの報告を中心に紹介する.

### 2. エンドサイトーシス経路における Rab5 GTPase の役割

Rab5 GTPase はエンドサイトーシス経路の主要な調節因

東京理科大学基礎工学部生物工学科 (〒125-8585 東京都葛飾区新宿 6-3-1)

**Points of convergence of the endocytic pathway and biosynthetic pathway**

**Junko Y. Toshima and Jiro Toshima** (Department of Biological Science and Technology, Tokyo University of Science, Nijuku 6-3-1, Katsushika-ku, Tokyo 125-8585, Japan)

投稿受付: 平成 26 年 7 月 1 日

子の一つであり, クラスリン小胞の初期エンドソームへの融合, 初期エンドソーム間の融合, エンドソーム運動などさまざまな過程において機能している<sup>1,2)</sup>. また, 近年では Rab5 は小胞間融合のみではなく, 初期から後期エンドソームへの成熟に関わっていることも明らかにされている<sup>3,4)</sup>. この過程において, 初期エンドソームに局在する Rab5 は後期エンドソームへの成熟段階において不活性化され, エンドソーム膜から解離し, 代わりに Rab7 GTPase が活性化され, 後期エンドソームへとリクルートされる (図 1)<sup>5)</sup>. このような上流の Rab による下流の Rab タンパク質の活性化は “Rab カスケード” と呼ばれ, エンドサイトーシス以外のさまざまな細胞内膜小胞輸送においても同様の機構がみられる. たとえば, 出芽酵母の分泌経路においては, Ypt1p (Rab1) から Ypt31/32p (Rab11), そして Sec4p (Rab8) と, 類似のカスケードが働いていることが明らかにされている<sup>6)</sup>. 出芽酵母には, Rab5 のホモログとして, Vps21p, Ypt52p, Ypt53p の 3 種類が同定されている. これらの三者は, それぞれが哺乳類の Rab5 と約 70% の高い相同性を有するが, 発現量は Vps21p が多く, Vps21p が主要な役割, Ypt52p, 53p は Vps21p の補助的役割を持つと考えられている<sup>7)</sup>. これまでの研究において, Vps21p は細胞膜からリソソーム/液胞へのエンドサイトーシス経路と, ゴルジ体から多胞体エンドソームを介したリソソーム/液胞への VPS 経路の双方において, 機能していることが明らかにされている<sup>7,8)</sup>. また, 電子顕微鏡を用いた微細構造の解析からは, *VPS21* 遺伝子の欠損変異体では直径 40~60 nm のエンドサイトーシス小胞が蓄積することが報告されていた<sup>7)</sup>. しかしながら, Vps21p が細胞内のどこに局在し, どの輸送過程を制御しているかは明らかにされていなかった.

### 3. Rab5 のエンドサイトーシス経路における役割

出芽酵母はエンドサイトーシスを含む細胞内膜小胞輸送研究の非常に優れたモデル生物である. 出芽酵母において, Vps21p は主に多胞体/後期エンドソームに局在し, 細胞膜およびゴルジ体からのクラスリン被覆小胞 (CCV) にも局在すると考えられている. GDP 結合型の Vps21p は, GEF である Vps9p により GTP 結合型へと変換され, オル

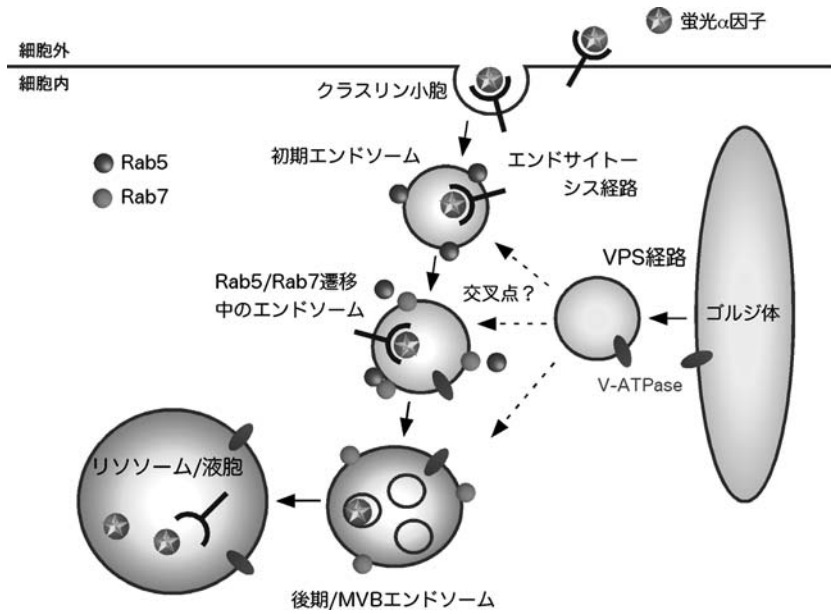


図1 エンドサイトーシス経路におけるVPS経路との交叉, およびRabカスケードによるエンドソーム成熟の模式図

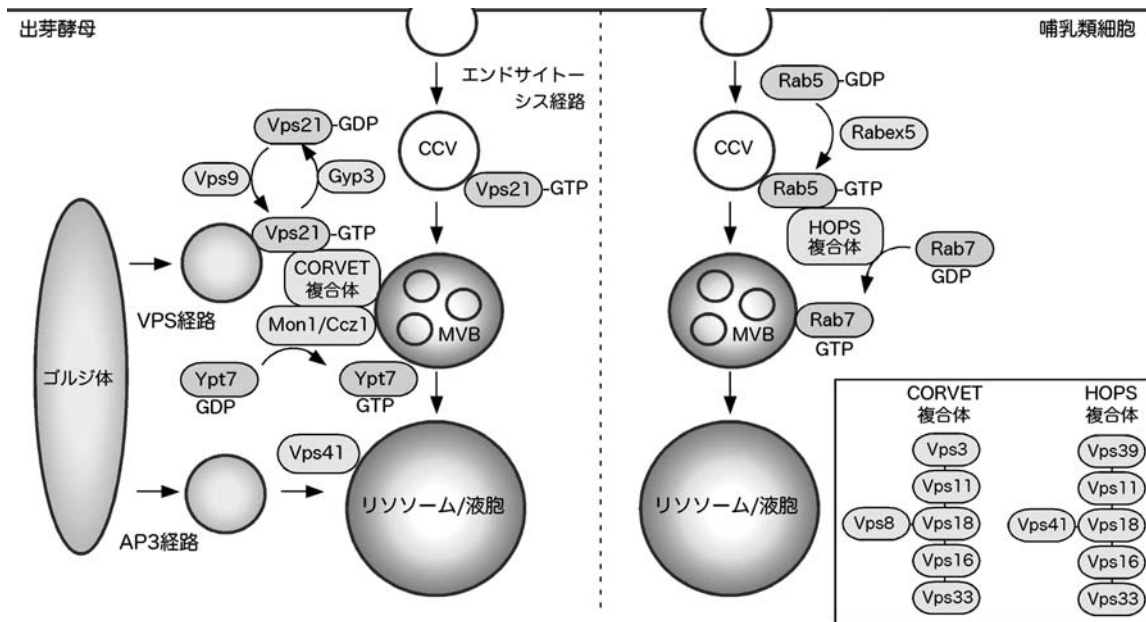


図2 エンドサイトーシス経路と生合成経路を制御する分子機構の概要図

ガネラ膜へとリクルートされる (図2左). 次に, Vps21p はテザリング因子である CORVET 複合体とともに, Ypt7p の GEF である Mon1p/Ccz1p 複合体をリクルートし, その結果として Ypt7p の後期/MVB エンドソーム膜での活性化を引き起こす<sup>3,4)</sup>. 同時に, Vps21p は GAP である Gyp3p により不活性化され, エンドソーム膜から解離する. 類似の経路は哺乳類細胞でもみられ, Rabex5 (酵母 Vps9p) が Rab5 をクラスリン小胞/初期エンドソームへとリクルートする. 次に, Rab5 は CORVET と類似の複合体である

HOPS 複合体をエンドソーム膜へとリクルートする. HOPS 複体のサブユニットの一つである Vps39 は Rab7 の GEF として機能し, Rab7 の後期/MVB エンドソーム膜での活性化を引き起こす (図2右)<sup>5)</sup>. 出芽酵母において, Rab5 (Vps21) 遺伝子の欠損は, エンドサイトーシス経路および, VPS 経路の双方に重篤な輸送障害を引き起こし, さらにこれら二つの経路の交叉も阻害することが報告されている (図2左)<sup>6)</sup>. このことから, Rab5 (Vps21p) はエンドサイトーシス経路と VPS 経路を独立して制御し, さ

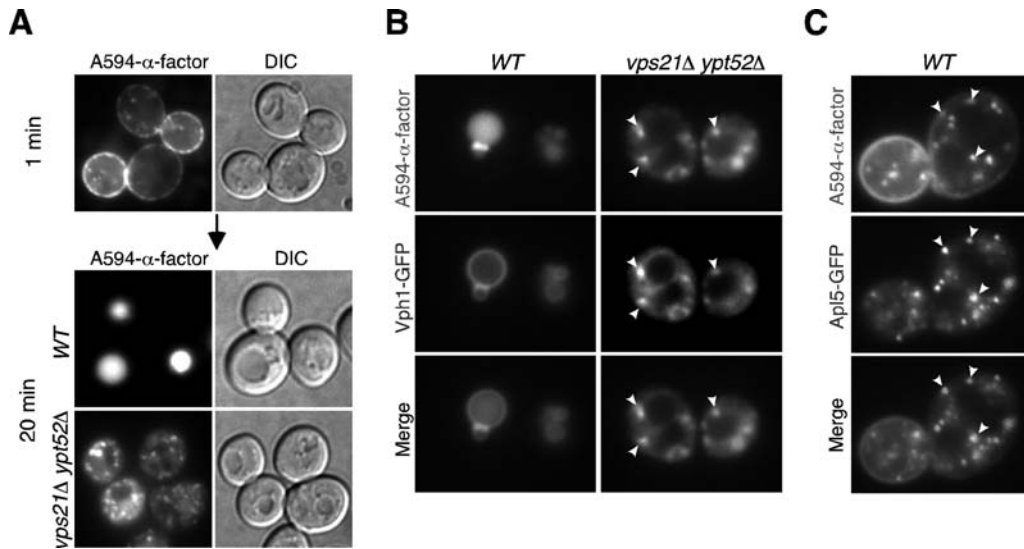


図3 Rab5欠損変異体における蛍光 $\alpha$ 因子の輸送と生合成経路との交叉  
(A) 野生型細胞 (WT) と Rab5 欠損変異体 (*vps21 $\Delta$  ypt52 $\Delta$* ) に蛍光 $\alpha$ 因子を取り込ませた後, 1分と20分の蛍光写真. (B) Vph1-GFPを発現した野生型細胞 (WT) および Rab5 欠損変異体 (*vps21 $\Delta$  ypt52 $\Delta$* ) に蛍光 $\alpha$ 因子を取り込ませた後, 20分の蛍光写真. (C) Apl5-GFPを発現した野生型細胞に蛍光 $\alpha$ 因子を取り込ませた後, 5分の蛍光写真. 矢頭は共局在の見られるエンドソームの例を示す.

らにこれら2経路の後期/多胞体 (MVB) エンドソームでの交叉に関わっていると考えられていた<sup>8)</sup>.

筆者らは以前の研究において, 出芽酵母の酵母接合フェロモン $\alpha$ 因子 ( $\alpha$ -factor) に蛍光分子を付加することにより, エンドサイトーシス過程をリアルタイムに可視化することに成功した<sup>9)</sup>. 蛍光 $\alpha$ 因子 (A594- $\alpha$ -factor) は Gタンパク質共役受容体 (GPCR) の一種である Ste2 受容体に結合し, クラスリンの仲介するエンドサイトーシスにより細胞内に取り込まれ, 液胞にまで輸送される (図1). この蛍光 $\alpha$ 因子を用いて, 筆者らは Vps21pのエンドサイトーシス経路における機能を調べた. 野生型細胞において, 蛍光 $\alpha$ 因子は細胞内に取り込まれて20分後に液胞へ輸送された (図3A). これに対して, Rab5欠損 (*vps21 $\Delta$  ypt52 $\Delta$* ) 変異体では取り込み後20分において, ほとんどが初期エンドソームに局在した (図3A)<sup>10)</sup>. このため, Rab5非存在下では, 後期エンドソームおよび液胞への輸送が阻害されると考えられた. 興味深いことに, 蛍光 $\alpha$ 因子の液胞への輸送は, Rab5欠損変異体において, 遅延はみられるものの完全には抑制されないことがわかった<sup>10)</sup>. このため, エンドサイトーシスによる蛍光 $\alpha$ 因子の細胞膜から液胞への輸送には, Rab5依存的な経路に加えて, Rab5非依存的な経路が存在することが考えられた.

#### 4. VPS経路を介したエンドサイトーシス

生合成経路の中のVPS経路は, 新しく合成されたタンパク質をトランスゴルジから後期/多胞体エンドソームを

経て, リソソームへと輸送する経路である<sup>11)</sup>. 出芽酵母の遺伝学を用いた研究により, この経路には70を超えるタンパク質により制御され, その多くにはVPSの名称がつけられている. たとえば, 哺乳類と出芽酵母に共通して存在するHOPS複合体 (図2右), ESCRT複合体などは多くのVPSタンパク質により構成されている<sup>11)</sup>. VPS経路はエンドサイトーシス経路と交叉し, 最終的には一つの経路となる (図2). この2経路の交叉はエンドサイトーシス経路のエンドソーム内腔を酸性状態に保つのに非常に重要である. エンドソーム内腔の酸性化はエンドサイトーシスにより取り込んだリガンドと受容体の解離や, その他タンパク質の構造の変化のために重要であるが, この酸性化はVPS経路によりゴルジ体から輸送されるV型プロトン輸送体 (V-ATPase) により調節されている (図1)<sup>12,13)</sup>. しかしながら, これらの2経路が交叉する機構については明らかにされていない. 筆者らはエンドサイトーシス経路を蛍光 $\alpha$ 因子で, VPS経路を液胞ATPアーゼ (V-ATPase) のサブユニットの一つであるVph1pの緑色蛍光タンパク質 (GFP) 融合タンパク質を用いて標識し, Rab5欠損変異体において, これら2つのマーカーがエンドソームで共局在することを見いだした (図3B)<sup>8)</sup>. さらに, これらのマーカーが共局在するエンドソームには後期エンドソームのマーカータンパク質は局在しないことが示された<sup>8)</sup>. これらの結果より, VPS経路とエンドサイトーシス経路の交叉はRab5非依存的に起こること, 初期から後期エンドソームへの遷移以前に起こることが示された (図4).



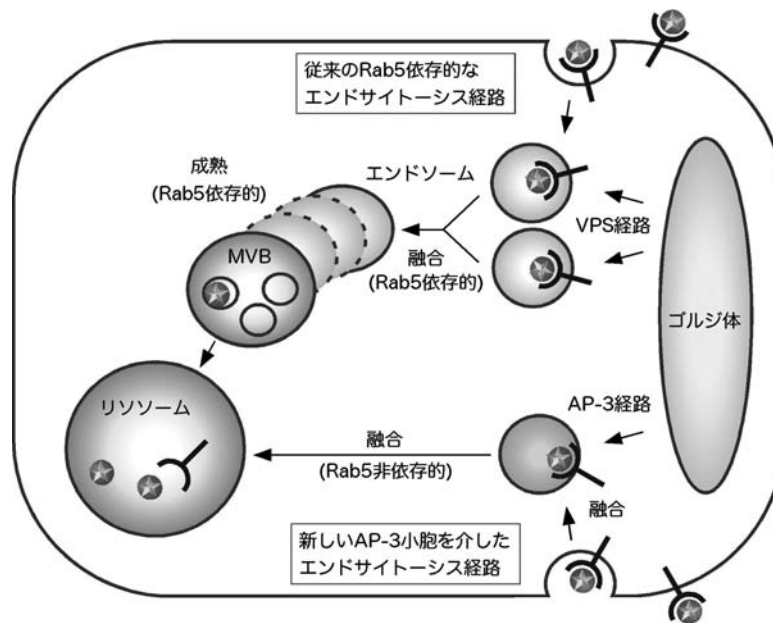


図4 Rab5 依存性エンドサイトーシス経路と非依存性 AP-3 経路を介したエンドサイトーシス経路の模式図  
細胞内に取り込まれたエンドサイトーシス小胞は Rab5 依存性経路と非依存性経路へと分岐し、リソソーム/液胞へと輸送される。

## 5. AP-3 経路を介したエンドサイトーシス経路

トランスゴルジから液胞への生合成経路には、前述の VPS 経路に加えて、トランスゴルジから直接リソソームへと輸送する AP-3 経路が存在する (図2左)<sup>14)</sup>。この経路は VPS 経路同様に、種を超えて幅広く保存されており、この経路により輸送されるタンパク質はクラスリン被覆のアダプターである AP-3 複合体を介して AP-3 小胞に取り込まれる。この経路の分子機構については、未解明な点が多いが、近年、HOPS 複合体のサブユニットである Vps41p が AP-3 複合体の  $\alpha$  サブユニットと直接結合することにより、AP-3 小胞の輸送を仲介していることが示されている (図2)<sup>15)</sup>。筆者らは Rab5 欠損変異体における AP-3 経路を介した輸送について調べ、AP-3 経路は Rab5 非存在下でも正常であることを見いだした。また、Rab5 欠損変異体において、AP-3 経路を欠損させたところ、蛍光  $\alpha$  因子の液胞への輸送に著しい阻害がみられた<sup>8)</sup>。さらに、野生型細胞において、蛍光  $\alpha$  因子がリソソーム/液胞に輸送される過程で Apl5-GFP で標識された AP-3 小胞へ一過的に局在することを見いだした (図3C)。これらの結果より、Rab5 欠損細胞において、蛍光  $\alpha$  因子は AP-3 経路を経て、リソソーム/液胞へと輸送されることが示された (図4)。

以上の結果をふまえて、筆者らは現在次のモデルを考えている (図4)。エンドサイトーシスにより細胞内に取り込まれたクラスリン小胞はエンドソーム成熟の初期過程に

おいて、ゴルジ由来の生合成経路の一つである VPS 経路に交叉し、その後、エンドソーム間の融合等により成熟し、積み荷をリソソームへと輸送する。Rab5 はこれら 2 経路の交叉には必要ではなく、交叉後のエンドソームの融合、成熟過程に必要とされる。また、この経路と平行して、クラスリン小胞は AP-3 経路の小胞にも交叉し、Rab5 非依存性経路によりリソソームへと輸送されることが考えられる。

## 6. おわりに

ヒト免疫不全ウイルス (HIV)、トリインフルエンザ、デングウイルス等、病原ウイルスの人類に与える脅威は近年ますます高まっており、これとともにウイルスの主要感染経路であるエンドサイトーシスの分子メカニズムの解明も重要性を増している。本研究において、エンドサイトーシスの新しい経路の存在が明らかにされたが、その分子機構についてはまだ全く分っていない。これらの機構を明らかにするためには、エンドサイトーシス経路だけでなく、分泌や生合成等、さまざまな細胞内輸送経路を全体として捉え、どのように調和して制御されているのかを明らかにしていく必要がある。

- 1) Zerial, M. & McBride, H. (2001) *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 2, 107-117.
- 2) Bucci, C., Parton, R.G., Mather, I.H., Stunnenberg, H., Simons,

- K., Hoflack, B., & Zerial, M. (1992) *Cell*, **70**, 715–728.
- 3) Poteryaev, D., Datta, S., Ackema, K., Zerial, M., & Spang, A. (2010) *Cell*, **141**, 497–508.
- 4) Balderhaar, H.J. & Ungermann, C. (2013) *J. Cell Sci.*, **126**, 1307–1316.
- 5) Rink, J., Ghigo, E., Kalaidzidis, Y., & Zerial, M. (2005) *Cell*, **122**, 735–749.
- 6) Suda, Y. & Nakano, A. (2012) *Traffic*, **13**, 505–510.
- 7) Singer-Kruger, B., Stenmark, H., Dusterhoft, A., Philippsen, P., Yoo, J.S., Gallwitz, D., & Zerial, M. (1994) *J. Cell Biol.*, **125**, 283–298.
- 8) Gerrard, S.R., Bryant, N.J., & Stevens, T.H. (2000) *Mol. Biol. Cell*, **11**, 613–626.
- 9) Toshima, J.Y., Toshima, J., Kaksonen, M., Martin, A.C., King, D.S., & Drubin, D.G. (2006) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **103**, 5793–5798.
- 10) Toshima, J.Y., Nishinoaki, S., Sato, Y., Yamamoto, W., Furukawa, D., Siekhaus, D.E., Sawaguchi, A., & Toshima, J. (2014) *Nat. Commun.*, **5**, 3498.
- 11) Bowers, K. & Stevens, T.H. (2005) *Biochim. Biophys. Acta*, **1744**, 438–454.
- 12) Forgac, M. (2007) *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **8**, 917–929.
- 13) Ueno, K., Saito, M., Nagashima, M., Kojima, A., Nishinoaki, S., Toshima, J.Y., & Toshima, J. (2014) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **443**, 549–555.
- 14) Cowles, C.R., Odorizzi, G., Payne, G.S., & Emr, S.D. (1997) *Cell*, **91**, 109–118.
- 15) Angers, C.G. & Merz, A.J. (2009) *Mol. Biol. Cell*, **20**, 4563–4574.

## 著者寸描

### ●十島純子 (としま じゅんこ)



早稲田大学理工学術院創造理工学部講師，東京理科大学総合研究機構客員研究員，博士（医学）。

■略歴 米国ウィスコンシン州に生る。1996年九州大学医学部卒業。96～98年九州

大学産婦人科学教室臨床医。2002年東北大学大学院医学系研究科博士課程修了。同年カリフォルニア大学バークレー校分子細胞生物学部ポスドク（アメリカ癌学会フェロー）。07～12年東京理科大学総合研究機構研究員。13年より現職。

■研究テーマと抱負 エンドサイトーシスおよび細胞内輸送のライブセルイメージング。エンドサイトーシス経路における様々な小胞融合過程の可視化を目指しています。

■ウェブサイト <http://www.rs.noda.tus.ac.jp/~biost/OPFU/TOSH/index.html>

■趣味 顕微鏡。

### ●十島二郎 (としま じろう)

東京理科大学基礎工学部生物工学科准教授。博士（理学）。

■略歴 鹿児島市に生る。1991年九州大学理学部卒業。91～93年松下電器産業株式会社勤務。99年九州大学大学院理学研究科博士課程修了。2001年東北大学生命科学研究科助手。02年カリフォルニア大学バークレー校分子細胞生物学部ポスドク。07年東京理科大学基礎工学部生物工学科講師。2012年より現職。

■研究テーマと抱負 出芽酵母を用いてエンドサイトーシスをはじめとする細胞内輸送の研究を進めています。出芽酵母の遺伝学と豊富なデータベースより、エンドサイトーシスの分子機構の全容解明を目指しています。

■ウェブサイト <http://www.rs.noda.tus.ac.jp/~biost/OPFU/TOSH/index.html>

■趣味 バイオリン。