

有用なツールである。

### おわりに

上記のように、細胞導入ツールとして興味をもたれているアルギニンペプチドではあるが、これらのペプチドを一種のプロープとして用いることにより、細胞への物質取り込みや、膜透過に関する新しい知見が見いだされてきている。また、ペプチドと細胞との相互作用様式は単一のものではなく、様々な条件によって変化しうることが最近明らかとなってきた。従ってこれらの取り込み様式や細胞との相互作用を詳細に検討することで、新しい細胞応答の概念が見いだされるかも知れない。実際、Prochiantzらは、細胞から分泌された *Antennapedia* 類縁タンパク質が周囲の細胞に取り込まれることにより、周辺細胞の転写が活性化されることを明らかにするとともに、発生におけるこの機序の重要性を示唆している<sup>4)</sup>。様々なRNA/DNA結合タンパク質やウイルスのコートタンパク質に同様のアルギニンに富む配列が存在することから、アルギニンペプチドを用いた研究によって、細胞とこれらのタンパク質の相互作用様式に関する新たな知見も得られるかもしれない。

- 1) Futaki, S. (2006) *Biopolymers*, **84**, 241-249.
- 2) Frankel, A.D. & Pabo, C.O. (1988) *Cell*, **55**, 1189-1193.
- 3) Brooks, H., Lebleu, B., & Vivès, E. (2005) *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **57**, 559-577.
- 4) Joliot, A. & Prochiantz, A. (2008) *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **60**, 608-613.
- 5) Nakase, I., Takeuchi, T., Tanaka, G., & Futaki, S. (2008) *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **60**, 598-607.
- 6) Futaki, S., Suzuki, T., Ohashi, W., Yagami, T., Tanaka, S., Ueda, K., & Sugiura, Y. (2001) *J. Biol. Chem.*, **276**, 5836-5840.
- 7) Goun, E.A., Pillow, T.H., Jones, L.R., Rothbard, J.B., & Wender, P.A. (2006) *ChemBioChem*, **7**, 1497-1515.
- 8) Nakase, I., Niwa, M., Takeuchi, T., Sonomura, K., Kawabata, N., Koike, Y., Takehashi, M., Tanaka, S., Ueda, K., Simpson, J.C., Jones, A.T., Sugiura, Y., & Futaki, S. (2004) *Mol. Ther.*, **10**, 1011-1022.
- 9) Nakase, I., Tadokoro, A., Kawabata, N., Takeuchi, T., Katoh, H., Hiramoto, K., Negishi, M., Nomizu, M., Sugiura, Y., & Futaki, S. (2007) *Biochemistry*, **46**, 492-501.
- 10) Kosuge, M., Takeuchi, T., Nakase, I., Jones, A.T., & Futaki, S. (2008) *Bioconjug. Chem.*, **19**, 656-664.
- 11) Sakai, N., Takeuchi, T., Futaki, S., & Matile, S. (2005) *ChemBioChem*, **6**, 114-122.
- 12) Zhou, H., Wu, S., Joo, J.Y., Zhu, S., Han, D.W., Lin, T., Trauger, S., Bien, G., Yao, S., Zhu, Y., Siuzdak, G., Schöler, H.R., Duan, L., & Ding, S. (2009) *Cell Stem Cell*, **4**, 381-384.
- 13) Sugimoto, K., Nishida, M., Otsuka, M., Makino, K., Ohkubo,

- K., Mori, Y., & Morii, T. (2004) *Chem. Biol.*, **11**, 475-485.
- 14) Takeuchi, T., Kosuge, M., Tadokoro, A., Sugiura, Y., Nishi, M., Kawata, M., Sakai, N., Matile, S., & Futaki, S. (2006) *ACS Chem. Biol.*, **1**, 299-303.
- 15) Inomata, K., Ohno, A., Tochio, H., Isogai, S., Tenno, T., Nakase, I., Takeuchi, T., Futaki, S., Ito, Y., Hiroaki, H., & Shirakawa, M. (2009) *Nature*, **458**, 106-109.

中瀬 生彦, 二木 史朗

(京都大学化学研究所生体機能設計化学研究領域)

Development of membrane-permeable peptide vectors and their internalization mechanisms

Ikuhiko Nakase and Shiroh Futaki (Institute for Chemical Research, Kyoto University, Uji, Kyoto 611-0011, Japan)

## ショウジョウバエ生殖質形成における膜輸送系の役割

### 1. 生殖質

細胞内の特定の場所に分子群やオルガネラを時空間的に正しく配置させることは、細胞の分化決定や細胞機能発揮の基盤となっている。多くの動物において、生殖細胞系列は胚発生初期に確立されるが、その分化決定は卵内の特定の細胞質領域(生殖質)に局在する母性因子によって制御される。このような生殖質の形成は、細胞極性確立とRNAやタンパク質の細胞質内局在化機構の解析の良いモデル系の一つとして精力的な研究が進められている<sup>1,2)</sup>。ショウジョウバエの生殖質は、卵形成過程に卵母細胞の後極に形成される。既に数多くの生殖質因子が同定されているが、それらは卵形成過程で逐次的に卵母細胞後極に輸送される(図1)。これらの生殖質因子の局在化過程には、細胞骨格が深く関わっており、生殖質因子が後極まで輸送される過程では微小管が、輸送されてきた生殖質因子を後極につなぎ止める過程ではアクチンがそれぞれ働いていると考えられている<sup>2)</sup>。しかし、その具体的な機構には不明な点が多い。本稿では、近年明らかとなってきた、ショウジョウバエにおけるエンドソーム経路を介したアクチン骨格系制御と生殖質因子の局在化機構との関連について概説したい。

### 2. Oskar

生殖質形成は、卵形成過程で *oskar* RNA が卵母細胞後

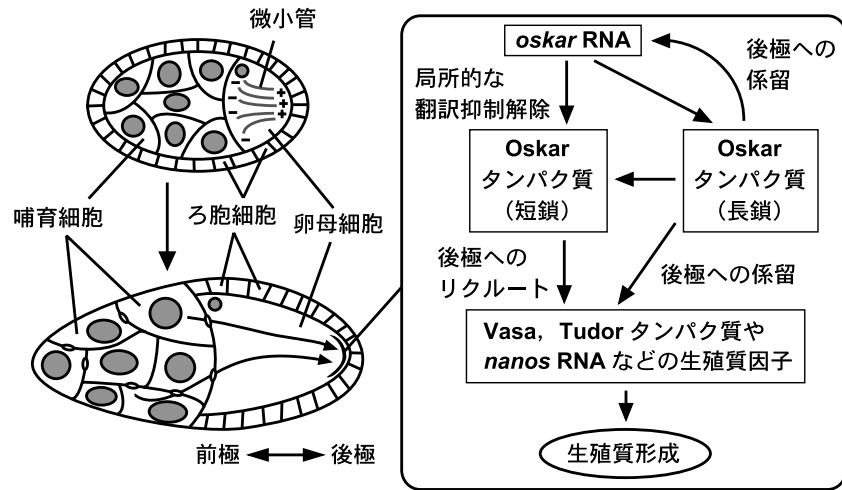


図1 ショウジョウバエの生殖質形成過程

哺育細胞で合成された生殖質因子は、微小管の配向性に依存して、卵母細胞後極へ輸送され、生殖質を形成する。生殖質形成は、*oskar* RNA の後極への局在に端を発する。*oskar* RNA から合成された二つのアイソフォームのうち、短鎖アイソフォームが *Vasa* や *Tudor* タンパク質、*nanos* RNA などの生殖質因子を後極へとリクルートするのに対し、長鎖アイソフォームは *oskar* RNA、および短鎖アイソフォームを含む生殖質因子を後極に係留する。

極に局在することにより開始される (図1)。*oskar* RNA は翻訳が抑制された状態で後極まで輸送され、局所的に後極でのみタンパク質へと翻訳される。Oskar タンパク質には、同一の mRNA の異なる開始コドンから翻訳される二つのアイソフォームが存在する<sup>3)</sup>。短鎖アイソフォームの開始コドンは長鎖アイソフォームと同じ読み枠上に存在するため、長鎖アイソフォームの N 末端 138 アミノ酸以外のアミノ酸配列 (468 アミノ酸) は共通である。それにもかかわらず、遺伝学的解析から二つのアイソフォームの機能は全く異なることが明らかとなっている<sup>3-5)</sup>。すなわち短鎖アイソフォームが他の生殖質因子の後極へのリクルートを、長鎖アイソフォームが *oskar* RNA、およびリクルートされてきた生殖質因子の後極への係留をそれぞれ制御する (図1)。しかし、Oskar タンパク質には分子機能を予測させるような既知のドメインが存在せず、また、ショウジョウバエの近縁種以外では Oskar のホモログが見つからないことから、その分子機能は未だ不明である。

### 3. エンドサイトーシスと生殖質形成

我々のグループでは、生殖質形成機構に関する新たな知見を得る目的で、*oskar* の活性に依存して生殖質に局在するタンパク質の一つである *Vasa*<sup>4)</sup> の局在を指標とした変異体のスクリーニングを行った。約 5,000 系統について解析

を行った結果、*Vasa* タンパク質の局在が異常となる変異体を数多く単離した。そして、現在までに同定した原因遺伝子の中に複数の膜輸送に関与する因子が含まれることを明らかにしている。その一つが、クラスリン依存的なエンドサイトーシスおよび初期エンドソームの輸送経路において中心的な役割を果たしている、低分子量 G タンパク質 Rab5 のエフェクターとして知られている Rabenosyn-5 (Rbsn-5) であった。Rbsn-5 は、液胞の形成あるいは輸送に異常を示す出芽酵母変異株の解析から特定された遺伝子群の一つとして最初に報告された (出芽酵母における Rbsn-5 ホモログは *Vac1p* または *Pep7p* とよばれる)<sup>6,7)</sup>。その配列は生物種間でよく保存されており、Rab5 結合ドメインおよびホスファチジルイノシトール 3-リン酸 (PI3P) に結合する FYVE (*Fab1p*, *YOTB*, *Vac1p*, and *EEA1*) ドメインを介して、Rbsn-5 は初期エンドソーム上へリクルートされる。局在化した Rbsn-5 は、*Vps45* タンパク質を介して SNARE (可溶性 *N*-エチルマレイミド感受性因子結合タンパク質受容体) 複合体と結合することにより初期エンドソーム膜の融合を調節していると考えられている<sup>8)</sup>。Rbsn-5 を欠損した卵母細胞では、エンドサイトーシスにより卵母細胞内に蓄積される卵黄顆粒や蛍光色素 (FM4-64) の取り込みが観察されなかったことからエンドサイトーシス経路が異常となっていることが確認された<sup>9)</sup>。

そこで次に、エンドサイトーシスの異常が生殖質形成の過程に影響を及ぼしているのか検討したところ、Rbsn-5を欠損した卵母細胞では微小管の配向、および *oskar* RNA の局在が異常となっていた<sup>9)</sup>。同様な表現系は、リサイクリングエンドソームを制御する Rab11 の変異体でも観察されている<sup>10,11)</sup>。 *oskar* RNA の局在は微小管の配向性に依存することから、エンドソーム経路は微小管の配向性を制御していると考えられた。一方、Rbsn-5 に対する特異的抗体を作製して、卵母細胞内における局在を調べてみたところ、Rbsn-5 タンパク質は皮質全体に局在すると共に後極に強いシグナルが認められた。同様な局在パターンは、Rab5, Rab11 等他のエンドソームマーカータンパク質でも確認された。さらに、これらエンドソームタンパク質の後極への集積は、*oskar* 変異体では消失し、皮質全体に様に分布するようになった。また、Oskar タンパク質を卵母細胞の前極に異所的に発現させると Rbsn-5 タンパク質およびエンドソームタンパク質が前極に集積すると共に、FM4-64 の取り込みも前極で活性化された<sup>9)</sup>。これらの結果は、卵母細胞内でのエンドソームタンパク質の局在、およびエンドサイトーシスは Oskar タンパク質によって制御されていることを示している。

前述したように、Oskar タンパク質には機能の異なる二つのアイソフォームが存在する<sup>3-5)</sup>。そこで長鎖アイソフォームと短鎖アイソフォームをそれぞれ単独で卵母細胞前極に発現させたところ、長鎖アイソフォームを発現させたときにのみ、エンドソームタンパク質の前極への集積とエンドサイトーシスの活性化が観察された<sup>9)</sup>。興味深いことに、電子顕微鏡による観察から、Oskar タンパク質の短鎖アイソフォームは生殖質特異的な構造物である生殖顆粒上にあるのに対し、長鎖アイソフォームはエンドソーム上にあることが報告された<sup>12)</sup>。これらの結果は、Oskar タンパク質の長鎖アイソフォームのエンドサイトーシスへの直接的な関与を強く支持している。

長鎖アイソフォームは生殖質因子の後極へのつなぎ止めに必要である。従って、エンドソーム経路が長鎖アイソフォームの下流で生殖質因子のつなぎ止めに参与している可能性が考えられた。しかし、Rbsn-5 を欠損した卵母細胞では、微小管の配向性が異常となり、*oskar* RNA が正常に後極に局在化しないため、エンドソーム経路が生殖質因子のつなぎ止めに必要かどうかを検討することは不可能であった。そこで、我々は Oskar タンパク質を卵母細胞前極に発現させる異所的生殖質形成において、*rbsn-5* 変異による生殖質因子のつなぎ止めへの影響を検討した。すると

生殖質因子は皮質領域に保留できずに、細胞質へと拡散してしまうことが観察された<sup>9)</sup>。

生殖質因子のつなぎ止めには、アクチン骨格が必要であることが以前から報告されていた<sup>13-15)</sup>。また、アクチン骨格は卵母細胞皮質全体に観察されるが、後極でのみ細いアクチン繊維束が観察されることが報告されている<sup>9)</sup>。このアクチン繊維束は *oskar* 変異体では観察されないことから Oskar 活性に依存して形成されることが分かっている。さらに、Oskar タンパク質を卵母細胞前極に異所的に発現させると、後極と同様にアクチン繊維束が卵母細胞前極にも誘導された。このような結果から、Oskar による生殖質因子の皮層へのつなぎ止めとアクチン繊維束形成との関連性が強く示唆された。我々は、このような Oskar 依存的に形成されるアクチン繊維束が、やはり Oskar によって亢進されるエンドソーム経路にも依存しているのではないかと予想した。そこで、Rbsn-5 の機能欠損がアクチン繊維束の形成に及ぼす影響を検討するため、Rbsn-5 を欠損した卵母細胞の前極に Oskar タンパク質を発現させて、F-アクチンの構造を観察した。その結果、アクチン繊維束は形成されず、異常な F-アクチンの凝集塊が細胞質に多数観察されることが見いだされた。さらに、皮質から拡散した生殖質因子は、しばしば F-アクチン凝集塊に包み込まれているのが観察された<sup>9)</sup>。これらの結果は、Oskar タンパク質を介して活性化されたエンドソーム経路は、後極特異的なアクチン繊維束の形成を誘導することにより、生殖質因子のつなぎ止めに貢献していることを示唆している (図 2)。

#### 4. おわりに

上記の結果により、エンドソーム経路が微小管の配向性の制御を介して *oskar* RNA の局在に必要なだけでなく、Oskar タンパク質の下流で F-アクチン系の再編を制御することにより、生殖質因子のつなぎ止めにも必要であるとの知見を得た。しかし、Oskar タンパク質からエンドサイトーシス、そしてアクチンにいたる過程には依然不明な点が多い。例えば、Oskar タンパク質 (特に、長鎖アイソフォーム) がどのようにしてエンドサイトーシスを活性化するのか、あるいはエンドソーム経路がどのようにして後極特異的なアクチン繊維束の形成を促すのかといった疑問には未だ答えられない。また、F-アクチン形成には、アクチン重合核形成因子 (actin nucleators) やアクチン束化因子 (actin bundling proteins) などが関与している筈であるが、卵母細胞後極特異的なアクチン繊維束の形成に関わるアクチン制御因子の実体についても全く分かっていない。

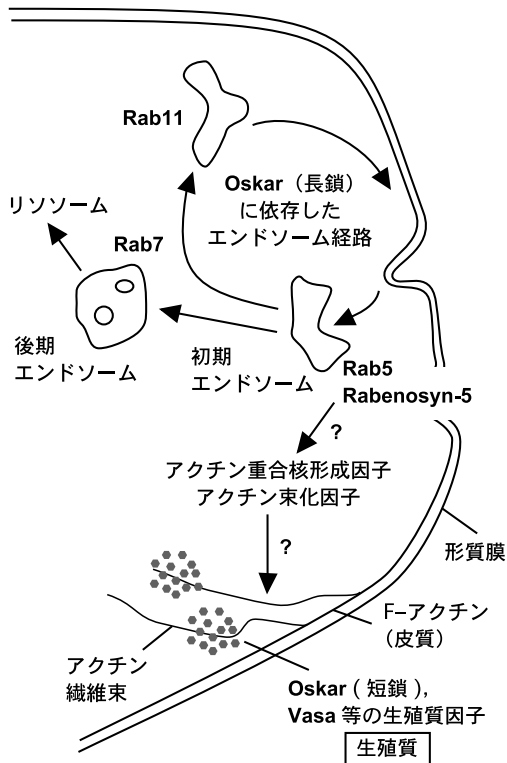


図2 エンドサイトーシスを介したアクチン構造制御による生殖質因子の係留のモデル

卵母細胞後極において、エンドサイトーシスはOskarタンパク質（長鎖アイソフォーム）により活性化される。活性化されたエンドサイトーシスは、アクチン繊維束の形成を促し、生殖質因子の後極への係留を制御する。エンドソーム経路の下流ではアクチン制御因子が機能していることが予想されるが、それらの実体は不明である。

私たちは、そのようなアクチン制御因子を同定し、その活性がどのようにエンドソーム経路と関連しているのかを明らかにすることにより、細胞極性化の過程で広く観察される膜輸送系による細胞骨格系制御機構に対する新たな知見を提供できるのではないかと期待している。今回行ったVasaタンパク質の局在を指標とした変異体のスクリーニングからはRbsn-5の他に、アクチン骨格やエンドサイトーシスの制御に関わる因子が多数単離されている。これらの因子の解析により、生殖質因子を後極につなぎ止める機構の理解が進むことが期待される。

- 1) Extavour, C.G. & Akam, M. (2003) *Development*, 130, 5869–5884.
- 2) St Johnston, D. (2005) *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 6, 363–375.
- 3) Markussen, F.H., Michon, A.M., Breitwieser, W., & Ephrussi, A. (1995) *Development*, 121, 3723–3732.

- 4) Breitwieser, W., Markussen, F.H., Horstmann, H., & Ephrussi, A. (1996) *Genes Dev.*, 10, 2179–2188.
- 5) Vanzo, N.F. & Ephrussi, A. (2002) *Development*, 129, 3705–3714.
- 6) Weisman, L.S. & Wickner, W. (1992) *J. Biol. Chem.*, 267, 618–623.
- 7) Webb, G.C., Zhang, J., Garlow, S.J., Wesp, A., Riezman, H., & Jones, E.W. (1997) *Mol. Biol. Cell*, 8, 871–895.
- 8) Nielsen, E., Christoforidis, S., Uttenweiler-Joseph, S., Miaczynska, M., Dewitte, F., Wilm, M., Hoflack, B., & Zerial, M. (2000) *J. Cell Biol.*, 151, 601–612.
- 9) Tanaka, T. & Nakamura, A. (2008) *Development*, 135, 1107–1117.
- 10) Jankovics, F., Sinka, R., & Erdélyi, M. (2001) *Genetics*, 158, 1177–1188.
- 11) Dollar, G., Struckhoff, E., Michaud, J., & Cohen, R.S. (2002) *Development*, 129, 517–526.
- 12) Vanzo, N., Oprins, A., Xanthakis, D., Ephrussi, A., & Rabouille, C. (2007) *Dev. Cell*, 12, 543–555.
- 13) Jankovics, F., Sinka, R., Lukácsovich, T., & Erdélyi, M. (2002) *Curr. Biol.*, 12, 2060–2065.
- 14) Polesello, C., Delon, I., Valenti, P., Ferrer, P., & Payre, F. (2002) *Nat. Cell Biol.*, 4, 782–789.
- 15) Babu, K., Cai, Y., Bahri, S., Yang, X., & Chia, W. (2004) *Genes Dev.*, 18, 138–143.

田中 翼, 中村 輝

(理化学研究所 発生・再生科学総合研究センター,  
生殖系列研究チーム)

#### Roles of vesicle trafficking in *Drosophila* germ plasm assembly

Tsubasa Tanaka and Akira Nakamura (Laboratory for Germline Development, RIKEN Center for Developmental Biology, 2-2-3 Minatogima-minamimachi, Chuo-ku, Kobe, Hyogo 650-0047, Japan)

#### DNA 鎖間架橋 (ICL) の修復機構

##### はじめに

生命の遺伝情報を担うゲノムDNAは外的・内的要因により絶え間なく損傷を受けている。DNA損傷はそのまま固定されると、突然変異の原因となり、ひいてはがんなどの疾患を引き起こす可能性がある。細胞はDNA損傷に対する防御機構を備えており、DNA修復はその一つである。DNA鎖間架橋 (interstrand crosslink; ICL) は細胞にとって最も重篤なDNA損傷であるが、他のDNA修復系に比