



ユビキチンリガーゼ^{RF}FLによるエンドソーム機能制御機構の解明

著者	酒井 了平
URL	http://hdl.handle.net/10236/00028214

氏名	酒井了平
学位の専攻分野の名称	博士(理学)
学位記番号	甲理第190号(文部科学省への報告番号甲第692号)
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位授与年月日	2019年3月16日
学位論文題目	ユビキチンリガーゼRFFLによるエンドソーム機能制御機構の解明
論文審査委員	(主査) 教授 海老原 史樹文 (副査) 教授 平井 洋平 准教授 沖米田 司

論文内容の要旨

エンドサイトーシスは細胞外物質の細胞内への取り込みや、シグナル受容体などの膜タンパク質のダウンレギュレーションを介して、細胞接着、細胞遊走、細胞極性およびシグナル伝達など、多様な細胞プロセスを調節し、細胞恒常性の維持に必須の役割を果たす。エンドサイトーシスには、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) の2つの異なる様式が存在するが、エンドサイトーシスされた小胞は、その様式にかかわらず、まず初期エンドソーム (early endosome; EE) へと運ばれる。その後、小胞内の積荷は、EE から後期エンドソーム (late endosomes; LE) を経てリソソーム (lysosomes; LY) へと輸送されるとリソソーム分解を受ける (リソソーム分解経路)。一方、EE からトランスゴルジネットワーク (trans-Golgi network; TGN) やリサイクリングエンドソーム (recycling endosome; RE) へと輸送されると、再び形質膜 (plasma membrane; PM) へと戻りリサイクリングされる (リサイクリング経路)。EE から PM へと積荷をリサイクルする経路は2つあり、EE から直接 PM へと戻る経路 (fast recycling pathways) と、核近傍に局在化する ERC (endocytic recycling compartment) を経由して PM へと戻る経路 (slow recycling pathways) が知られている。リサイクリング経路の利点は、PM からエンドサイトーシスした積荷を分解することなく再び PM へと輸送することで、積荷の再合成をしないで済む点にある。

Ubiquitin (Ub) は積荷のエンドサイトーシス、エンドソーム選別機構を制御する重要な因子であり、その制御機構に積荷自身の Ub 化やエンドソーム関連因子の Ub 化が報告されている。これまで Ub は EE から LY へのエンドソーム成熟化機構に関与することが数多く報告されてきた。また近年、EE からゴルジ体への逆行性輸送経路の1つであるレトロマー依存性輸送経路における Ub 化の制御機構も報告されている。しかし、Rab11-effector による ERC を介したリサイクリング機能制御機構における、Ub 化の関与は全く知られていない。

そこで申請者は、エンドソームに局在化する E3-ligase RFFL の dominant-negative (DN) 変異体 (Ub ligase 不活性化変異体) を用いることで、slow recycling pathways における Ub 化の重要性を検証し、Proximity dependent biotin identification (BioID) 法による RFFL インタクトーム解析を用いて ERC 制御機構における Ub 化の関与を分子レベルで解明することを試みた。

本論文は以下の内容から構成される。

- (1) RFFL の局在化ドメイン及び RING (Ub 活性) ドメイン変異の局在解析
- (2) RFFL-DN 変異体がエンドソーム機能におよぼす影響の検討
- (3) Proximity dependent biotin identification (BioID) 法を用いた RFFL 結合因子網羅的解析
- (4) 同定した RFFL 結合因子の RFFL による Ub 制御機構について検討

(1) では、RFFL E3-ligase 不活性化変異体によってエンドソームの蓄積が引き起こされることを発見した。そこで (2) では、その蓄積が、どのエンドソーム区画に影響を及ぼすのかを検証した。その結果、EE から LE への輸送には (RFFL の基質である $\Delta F508$ -CFTR を除いて) 影響を及ぼさないのに対して、EE から RE および PM への輸送は、RFFL-DN 変異体によりクラスター化 ERC が形成され、阻害することが明らかとなった。

次に (3) で、RFFL 結合因子網羅的解析を行うことで、クラスター化 ERC 形成の分子メカニズムを解明することとした。その結果、RFFL 結合タンパク質として、RE 機能を制御する EHD1, MICAL-L1, Rab11-FIPs (Rab11-effectors) を同定した。また、RFFL に点変異を導入し、E3-ligase 活性を不活性化することで、RFFL と Rab11-effector の結合の長期化が引き起こされた。さらに、chemical-induced protein dimerization (CID) 法により強制的に RFFL と Rab11-effectors を結合させると、クラスター化 ERC が形成された。また、RFFL-DN 変異体により Rab11-effector の Ub 化が有意に減少した。以上のことから、RFFL と Rab11-effector の結合の長期化が Rab11-effector の Ub 化の減少を引き起こし、クラスター化 ERC が形成されることが示唆された。

最後に (4) では、RFFL-DN 変異体が強固に Rab11-effector と相互作用したことから、Rab11-effector が RFFL によって Ub 化制御を受けている可能性が考えられた。そこで、RFFL による Rab11-effector の Ub 化制御を検証した。その結果、RFFL KO によって Rab11-effector の Rab11-FIP1C の Ub 化のみ有意に減少が確認され、RFFL 過剰発現では Rab11-FIP2 の Ub 化が上昇し、in vitro Ub 化再構成実験では、全ての Rab11-effector の Ub 化が RFFL によって再構成されたことから、Rab11-effector は RFFL によって Ub 化制御を受けていることが示唆された。また、RFFL KO によって Rab11-FIP1C 以外の Rab11-effector の Ub 化が減少しなかった理由としては、BioID 法を用いた RFFL 結合因子として同定された E3-ligase が補っているためではないかと考えている。

以上、本論文の結果から、RFFL 等の E3 Ub 化酵素による Rab11-effector の Ub 化制御が正常なリサイクリングエンドソームの機能維持に重要であると考えられる。今回の研究により、エンドソームリサイクリングにおける Ub 化の役割について新たな知見が見出せたと考えられる。

論文審査結果の要旨

申請者はユビキチンリガーゼ RFFL の不活性化変異体及び RFFL 結合タンパク質の網羅的解析より、RFFL が Rab11 effector (EHD1, MICALL1, Rab11-FIP1, 2, 5) を直接的にユビキチン化することを発見し、さらに、RFFL を介した Rab11 effector のユビキチン化が正常なリサイクリングエンドソームの形態及び機能の維持に重要であることを明らかにした。本知見はこれまで全く不明であったユビキチン化によるリサイクリングエンドソームの機能制御の分子機構の一端を明らかにした重要な知見である。さらに、BioID 法による RFFL 結合タンパク質網羅的解析により、新規 RFFL 結合分子を複数同定し、RFFL の生理機能の理解に貢献する重要な知見を得ている。本論文の内容は国際誌 *Developmental Cell* (IF: 9.6) 及び国際誌 *Journal of Cell Science* (IF: 4.4) に掲載されており、*Journal of Cell Science* では筆頭著者として発表している。

また、本内容に関して3件のポスター発表と1件の口頭発表が行われており、新学術領域研究「ユビキチンネオバイオロジー」第3回班会議（2016年11月）で優秀ポスター賞を、第91回日本生化学会大会（2018年9月）では若手優秀発表賞を受賞している。審査委員は本論文の内容を中心に面接審査と公開の論文発表会を行い、著者が論文内容及び関連する分野についても学識を有することを確認した。申請者は多種類の実験手法を習得しており、多面的なアプローチから研究を進める能力を有し、研究背景を体系的に理解しており、論理的な思考能力も十分に習得していることから、将来の研究遂行に対しても十分な能力を持つことを確認した。英語能力に関しても、著者は英語論文を自分で執筆し、国際シンポジウムにおいても口頭発表し、活発な議論を英語で行なうなど、十分な語学運用能力を有することが確認された。

以上より、審査委員会は本論文の著者が博士（理学）の学位を受けるに十分な資格を持つと判定した。