

機関番号：12301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20570176

研究課題名（和文）

線虫 *C. elegans* の発生におけるエンドサイトーシスの分子メカニズムの解析

研究課題名（英文）

Analysis of molecular mechanisms of endocytosis in *C. elegans* development

研究代表者

佐藤 健 (SATO KEN)

群馬大学・生体調節研究所・教授

研究者番号：30311343

研究成果の概要（和文）：線虫 *C. elegans* において卵黄成分の取り込みに異常を示す *rme* 変異株の解析により線虫からヒトまで高度に保存された *rme* 遺伝子群を同定した。このうち RME-3 はクラスリン、RME-4 はクラスリン被覆ピットに局在し、RAB-35 を小胞膜上にリクルートすることによって卵黄受容体を初期エンドソームから細胞膜へとリサイクリングさせる因子であることを明らかにした。また Rab-35 と相互作用するエフェクタータンパク質の候補の1つを同定し、エンドサイトーシスにおける役割について解析した。

研究成果の概要（英文）：We analyzed the *rme* mutants which show defects in yolk uptake by oocytes in *C. elegans* and identified novel *rme* genes conserved from the worm to human. We found that the *rme-3* gene encodes clathrin. We also revealed that RME-4 functions on coated pits and/or vesicles to recruit small GTPase RAB-35, which in turn functions in the endosomes to promote receptor recycling. We further identified a candidate for the Rab35 effector molecule and examined its functions in endocytosis.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：細胞生物学

科研費の分科・細目：生物科学・細胞生物学

キーワード：線虫，エンドサイトーシス，低分子量 GTPase

1. 研究開始当初の背景

エンドサイトーシスは細胞が外界からの物質や情報を細胞内に取り込むためのきわめて重要なプロセスであり、様々な生命現象に関与している。その役割は細胞外からの栄養摂取、細胞膜レセプターのダウンレギュレーション、神経シナプスにおけるシナプス小胞の再生など多岐にわたる。これまでにも

出芽酵母を用いた遺伝学的手法、動物細胞を用いた生化学的手法により多くの因子が同定されてきたが、それだけですべての現象が説明できるとはいえず、特に多細胞生物における複雑なエンドサイトーシスの分子メカニズムの理解には遺伝学的手法によるさらなる新規遺伝子の探索が不可欠であった。

低密度リポタンパク質 (LDL) は血中を循環し、コレステロールを細胞に送り届ける役割を担っているが、一方でコレステロールを豊富に含むため悪玉コレステロールとも呼ばれ、血中の量が過剰になると高コレステロール血症や動脈硬化などの原因となる。通常は細胞表面にある LDL 受容体が血中の LDL を捕らえて何度も細胞内に取り込むことで血中 LDL 量が適切に保たれているが、この分子機構についてはいまだ未解明な点が多い

2. 研究の目的

線虫 *C. elegans* の卵黄成分は LDL と類似したタンパク質-脂質複合体であり、LDL の場合と同様にエンドサイトーシスによって卵母細胞に取り込まれる。研究代表者らはこの卵母細胞による卵黄タンパク質のエンドサイトーシスの分子機構に着目し、この過程に異常を示す *rme* 変異株の解析を通じて、様々な新規関連因子を同定してきた。本研究課題では多細胞生物の優れたモデル系である線虫の遺伝学的、細胞生物学的利点を活かす事により、卵黄成分および LDL のエンドサイトーシスに関連する新たな因子の発見とその分子メカニズムの解明を目指した。

3. 研究の方法

本研究では *rme* 変異株のうち、いまだ未解析の *rme-3*, *rme-4* 変異株に焦点をあて、原因遺伝子の同定および卵母細胞におけるこれらの役割について以下のように解析した。

(1) まずこれらの変異体の表現型を詳細に解析し、卵母細胞内においてエンドサイトーシスのどの段階に異常があるのかについて解析を行った。

(2) 発生過程や卵母細胞以外の組織においても異常がないか解析を行った。

(3) 各変異の遺伝学的マッピング等によって原因遺伝子を特定し、得られた *rme* 遺伝子産物について細胞内における局在性や動態について解析を行った。

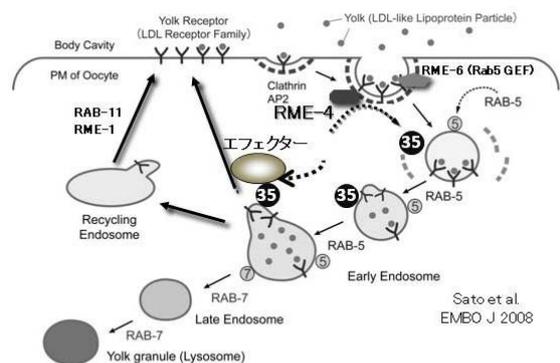
(4) エンドサイトーシスに関連するその他の因子とのタンパク質間相互作用や遺伝学的相互作用についても検討し、エンドサイトーシスのどの段階に働いているのかについて検討した

(5) さらに酵母 two-hybrid 法や GST プルダウン法を駆使して *rme* 遺伝子産物と相互作用する因子を探索し、得られた因子について細胞内局在性や *rme* 遺伝子産物との機能相関性について解析した。

4. 研究成果

(1) 卵母細胞による卵黄の取り込みに異常を示す *rme* 変異体のうち、まず *rme-4* と *rme-5* 変異株について解析を行った。卵黄受

容体である RME-2 の卵母細胞における局在性について解析を行ったところ、RME-4 と RME-5 は RME-2 のエンドソームから細胞膜へのリサイクリングステップに働いていることが示唆された。次に *rme-5* 変異の原因遺伝子を同定したところ、低分子量 GTPase Rab ファミリーの一つである RAB-35 をコードしていることが明らかとなった。GFP を融合した RAB-35 はエンドサイトーシス経路に広範に存在し、その中でも特に初期エンドソームに局在化していることが明らかとなった。一方、*rme-4* 変異の原因遺伝子を同定したところ、DENN ドメイン、クラスリン結合ボックス、AP-2 結合モチーフをもった新規タンパク質をコードしていることが明らかとなった。解析の結果、RME-4 は RAB-35 の GDP 型またはヌクレオチドフリー型に特異的に結合し、RAB-35 の初期エンドソーム膜への局在化を制御する因子であることが明らかとなった。また、RME-4 は AP-2 のサブユニットである α -アダプチンとも相互作用し、卵母細胞の細胞膜上においてクラスリン被覆ピットに局在することが明らかとなった。以上の結果から、RME-4 はクラスリン被覆ピットに局在し、クラスリン小胞の形成と同時に RAB-35 を小胞膜上にリクルートすることによって卵黄受容体の初期エンドソームから細胞膜への素早いリサイクリングを可能にしていることが明らかとなった。さらに RAB-35 のエフェクター因子を酵母ツーハイブリッド法により探索し、候補遺伝子を同定した。この遺伝子の変異体は卵母細胞による卵黄の取り込みに異常を示すことから、有力な候補であると考えられる。



Rab35-RME-4による受容体のリサイクリングの制御
エンドサイトーシスにおいてはRabファミリーによる連続的な輸送経路の制御が行われる。RAB-35は未知のエフェクターを介して受容体の細胞膜へのリサイクリングを促進していると考えている。

(2) 一方、*rme* 変異体のうち *rme-3* 変異体は高温においてエンドサイトーシスの異常および胚性致死性を示す温度感受性株として同定された。解析の結果、*rme-3* 変異体は多細胞生物における初めてのクラスリン重鎖の変異体であることが明らかとなった。*rme-3* 変異体は高温において特徴的な麻

痺の表現型を示し、神経において野生型クラスリンを発現させることで表現型が回復することから、神経においてもクラスリンが重要な役割をしていることが明らかとなった。このように温度感受性を利用することで発生に必須な遺伝子の個体における機能解析が可能となった。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計5件)

- ① Sato K, Ernstrom G, Watanabe S, Weimer RM, Chen CH, Sato M, Siddiqui A, Jorgensen EM, and Grant BD. Differential requirements for clathrin in receptor-mediated endocytosis and maintenance of synaptic vesicle pools. PNAS. 査読有, 2009, 106(4):1139-44
- ② Sasagawa Y, Otani M, Higashitan N, Higashitani A, Sato K, Ogura T, Yamanaka K*. *Caenorhabditis elegans* p97/CDC-48/UBD-1-NPL-1 controls germ line specific sex determination by controlling TRA-1 level in a CUL-2 dependent manner. J. Cell Science. 査読有, 2009, 122:3663-3672.
- ③ Murakami-Sekimata A, Sato K, Sato K, Takashima A, Nakano A*. O-Mannosylation is required for the solubilization of heterologously expressed human beta-amyloid precursor protein in *Saccharomyces cerevisiae*. Genes Cells. 査読有, 2009, 14(2):205-215.
- ④ Sato M, Grant BD, Harada A, and Sato K. Rab11 is required for synchronous secretion of chondroitin proteoglycans after fertilization in *Caenorhabditis elegans*. J. Cell Science. 査読有, 2008, 121(19):3177-3186
- ⑤ Sato M, Sato K (共筆頭著者および責任著者), Liou W, Pant S, Harada A, Grant BD. Regulation of endocytic recycling by *C. elegans* Rab35 and its regulator RME-4, a coated-pit protein. EMBO J. 査読有 2008, 27(8):1183-1196.

[学会発表] (計10件)

- ① 井上汐里, 佐藤美由紀, 佐藤克哉, 嶋田淳子, 原田彰宏, 佐藤健, 線虫 *C. elegans* の腸細胞における極性形成過程の時空間

的解析, 第33回日本分子生物学会年会, 2010.12.7, 神戸国際会議場 (兵庫県)

- ② Ken Sato, Ernstrom G, Watanabe S, Weimer RM, Chen CH, Sato M, Siddiqui A, Jorgensen EM, and Grant BD. Differential requirements for clathrin in receptor-mediated endocytosis and maintenance of synaptic vesicle pools. 第62回日本細胞生物学会, 2010.5.20, 大阪国際会議場 (大阪府)
- ③ 三枝慶子, 佐藤美由紀, 佐藤克哉, 嶋田淳子, 原田彰宏, 佐藤健. 線虫 *C. elegans* のシャペロンは腸細胞における微絨毛の形成維持に重要である. 第32回日本分子生物学会年会, 2009.12.12, パシフィコ横浜 (神奈川県)
- ④ 佐藤健, 佐藤美由紀. 線虫 *C. elegans* の受精前後における膜ダイナミクスを制御する低分子量 GTPase. 第82回日本生化学会大会, 2009.10.23, 神戸国際会議場 (兵庫県)
- ⑤ Miyuki Sato, Barth D Grant, Akihiro Harada, Ken Sato. Rab11 is required for synchronous secretion of chondroitin proteoglycans after fertilization in *Caenorhabditis elegans*. 第61回日本細胞生物学会, 2009.6.3, 名古屋国際会議場 (愛知県)
- ⑥ 佐藤健, 原田彰宏, 佐藤美由紀. *C. elegans* の受精卵における減数分裂期膜タンパク質の選択的分解による細胞内秩序維持システムの解析, 第81回日本生化学会大会 2008.12.12, 神戸国際会議場 (兵庫県)
- ⑦ 佐藤美由紀, Barth Grant, 原田彰宏, 佐藤健. 線虫 *C. elegans* における受精に連動した表層顆粒のエキソサイトーシスのメカニズム, 第31回日本分子生物学会大会, 2008.12.11, 神戸国際会議場 (兵庫県)
- ⑧ 佐藤健. 膜タンパク質の小胞体局在化メカニズムの解明. 第81回日本生化学会大会, 2008.12.11, 神戸国際会議場 (兵庫県)
- ⑨ Ken Sato. Molecular mechanisms of Receptor-mediated endocytosis of LDL-like yolk proteins in *C. elegans*. International Symposium for Environmental Medicine. 2008.11.28, 名古屋大学 (愛知県)

- ⑩佐藤健, 佐藤美由紀, 原田彰宏, Barth Grant. 線虫 *C. elegans* におけるエンドサイトーシスの分子メカニズムの解析. 第60 日本細胞生物学会大会, 2008. 7. 1, パシフィコ横浜 (神奈川県)

[図書] (計2件)

- ①佐藤健. 小胞体におけるタンパク質局在化の分子メカニズム. 生化学. 査読無, 2009, 81(7)21-31. 日本生化学会.

- ②佐藤美由紀, 佐藤健. 線虫 *C. elegans* におけるメンブレントラフィック. 蛋白質核酸酵素 12月号増刊メンブレントラフィックの奔流, 査読無, 2008, 2188-2192. 共立出版.

[その他]

ホームページ等

<http://traffic.dept.med.gunma-u.ac.jp/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐藤 健 (SATO KEN)

群馬大学・生体調節研究所・教授

研究者番号：30311343