

令和 4 年 5 月 17 日現在

機関番号：11301
研究種目：若手研究
研究期間：2020～2021
課題番号：20K15786
研究課題名(和文) エンドソームの成熟を制御する新規メカニズムの解明

研究課題名(英文) A novel mechanism of endosome maturation

研究代表者

松井 貴英 (Matsui, Takahide)

東北大学・生命科学研究科・助教

研究者番号：10827794

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：エンドソームは細胞膜からのエンドサイトーシスにより生じる細胞小器官(オルガネラ)で、成熟することで最終的にリソソームへと変化する。エンドソームの成熟は、酵母からヒトまで全ての真核生物に保存された現象であり、共通のメカニズムにより制御されると考えられている。本研究課題では、エンドソーム成熟を制御する新規因子として、これまで機能未知であったTBC1D18を同定することに成功した。TBC1D18を欠損するとエンドソームの肥大化が観察され、エンドサイトーシス経路の異常も観察される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

エンドソーム成熟はあらゆる真核細胞で保存された現象であり、細胞の恒常性維持に必須の機構である。実際にこの機構の破綻によりリソソーム病と総称される様々な疾患が引き起こされることが知られている。しかし、エンドソーム成熟の重要性が知られている一方で、その制御機構は未解明な点が多い。本研究では、新規のエンドソーム成熟制御因子としてTBC1D18を同定することに成功した。本研究をきっかけとして、TBC1D18の作用機序を明らかにすることで、エンドソーム成熟メカニズムの解明にとどまらず、リソソーム病の原因解明の一助となる可能性もある。

研究成果の概要(英文)：Endosome maturation is essential for efficient degradation of internalized extracellular molecules and plasma membrane proteins. Two Rab GTPases, Rab5 and Rab7, are known to regulate endosome maturation, and a Rab5-to-Rab7 conversion mediated by a Rab7 activator, Mon1-Ccz1, is essential for progression of the maturation process. However, the importance and mechanism of Rab5 inactivation during endosome maturation is poorly understood. We showed that Rab5 hyperactivation in addition to Rab7 inactivation occurs in the absence of Mon1. We then identified TBC1D18 as a Rab5-GAP by comprehensive screening of TBC-domain-containing Rab-GAPs. Expression of TBC1D18 in Mon1-KO cells rescued the defects in endosome maturation, whereas its depletion attenuated endosome formation and degradation of endocytosed cargos. Moreover, TBC1D18 was found to be able to interact with Mon1. Thus, TBC1D18 is a crucial regulator of endosome maturation that functions together with Mon1.

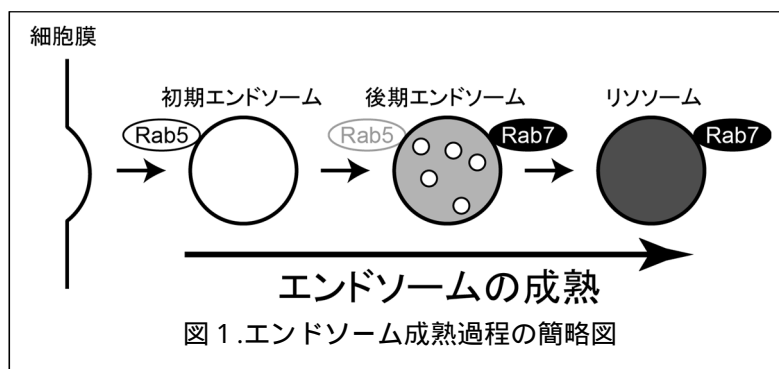
研究分野：細胞生物学

キーワード：endosome lysosome

1. 研究開始当初の背景

我々の体を構成している細胞は、成長因子などの細胞外からの刺激に応答してエンドサイトーシスを起こし、細胞外因子や細胞膜上のタンパク質を小胞の形で細胞内に取り込む。このエンドサイトーシスにより生じた小胞は初期エンドソームと呼ばれる。初期

エンドソームは徐々に成熟していくことで後期エンドソーム、最終的にリソソームとなる(図1)。リソソームは内腔側が酸性を呈し、様々な加水分解酵素を含むオルガネラで、細胞内のゴミ処理場として機能する。したが

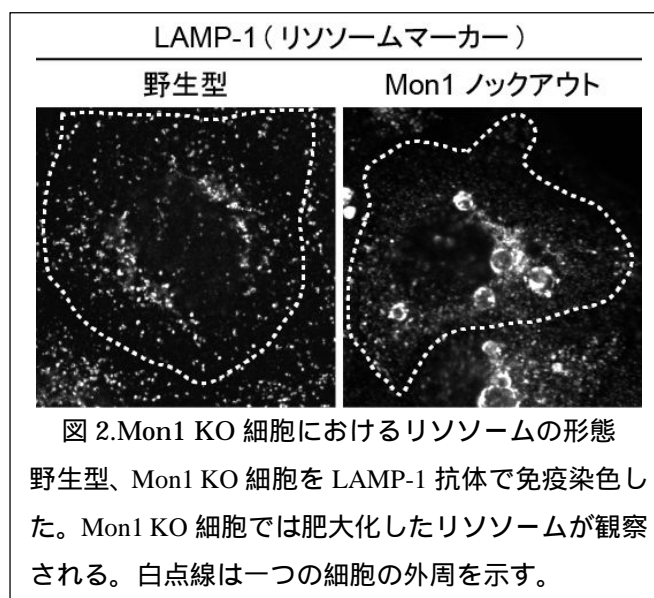


って、エンドソームが正しく成熟し、正常なリソソームが形成されることは細胞内恒常性維持に必要不可欠である。

これまでに、エンドソーム成熟、リソソーム形成には2つの低分子量Gタンパク質 Rab5 と Rab7 が重要な役割を持つことが知られている。まずは初期エンドソーム上の Rab5 が機能し、エンドソームの成熟に伴い、Rab5 は不活化され、後期エンドソーム上から離脱する。代わりに Rab7 が後期エンドソームへとリクルートされ、リソソームへと変化していく。このエンドソーム成熟に伴う Rab5 Rab7 への移行は、真核生物に広く保存された現象で、進化的に保存された共通のメカニズムにより制御されると一般的に考えられている。実際、我々は MDCK 細胞 (イヌ由来の上皮細胞株) において、RNA 干渉法を用いて Rab5 をノックダウン (KD) すると、初期エンドソーム、後期エンドソーム、リソソームの数が顕著に減少することを確認している。ところが所属研究室の先行研究から、CRISPR/Cas9 システムを用いて Rab7 のノックアウト (KO) MDCK 細胞 (イヌ由来の上皮細胞株) を作製したところ、Rab7-KO 細胞では多少の肥大化は観察されたものの、ほとんど野生型と変わらない性質を持つリソソームが形成されることがわかった (Kuchitsu et al. *J Cell Sci.* 131, jcs215442, 2018)。

さらに興味深いことに、Rab7 の上流活性化因子・ Mon1 の KO MDCK 細胞 (Mon1-Ccz1 複合体が機能できない) を作製したところ、Mon1-KO 細胞では、初期、及び後期エンドソーム、リソソームの顕著な肥大化は観察されるものの、野生型と同様の酸性化状態、酵素活性を持つリソソームが存在することがわかった (図2)。

以上の結果から、エンドソームの



成熟、及びリソソーム形成において、Rab5 の機能欠損と Mon1 (あるいは Rab7) の機能欠損では表現型が異なることが明らかとなった。

2. 研究の目的

これまでに、Rab5 がどのように不活化し、エンドソーム膜から離脱するのか、Rab7 が活性化してエンドソーム膜局在するタイミングなど、Rab5 Rab7 への移行過程の詳細は解明されていない。そこで本研究では、Rab5 と Rab7 の間で機能することが示唆されている Mon1-Ccz1 複合体に着目し、Mon1-KO 細胞の機能解析を行うことで、エンドソーム成熟、特に Rab5 Rab7 への移行過程の詳細な分子メカニズム解明を目指した。

3. 研究の方法

Mon1-KO 細胞において Rab7 が実際に不活化されているか、活性化 Rab7 特異的な結合分子 (RILP) を用いた Pull-down アッセイにより評価した。

Mon1-KO 細胞における肥大エンドソームの表現型は、Rab5 常時活性化型変異体過剰発現の表現型と類似していたので、Mon1-KO 細胞での Rab5 の活性化状態もと同様に、活性化 Rab5 特異的な結合分子 (APPL1) を用いた Pull-down アッセイにより評価した。

から Mon1-KO 細胞では Rab5 の活性化状態が亢進していることが明らかとなったので (後述) Mon1-KO 細胞を用いて Rab5 を不活化する因子の探索を行った。Rab の不活性化因子として TBC ドメインを持つタンパク質群が知られている。そこで哺乳類に保存されている 40 種類の TBC タンパク質を一つずつ Mon1-KO 細胞に発現させ、表現型がレスキュー (肥大エンドソームが縮小する) 出来る TBC タンパク質をスクリーニングした。

4. 研究成果

まず、Mon1-KO 細胞では、完全に Rab7 が不活化されていることが確認された。実際に Mon1-KO 細胞では、Rab7 が肥大化したエンドソーム上に局在できないことも確認された。上述 で記載したように、Mon1-KO 細胞の

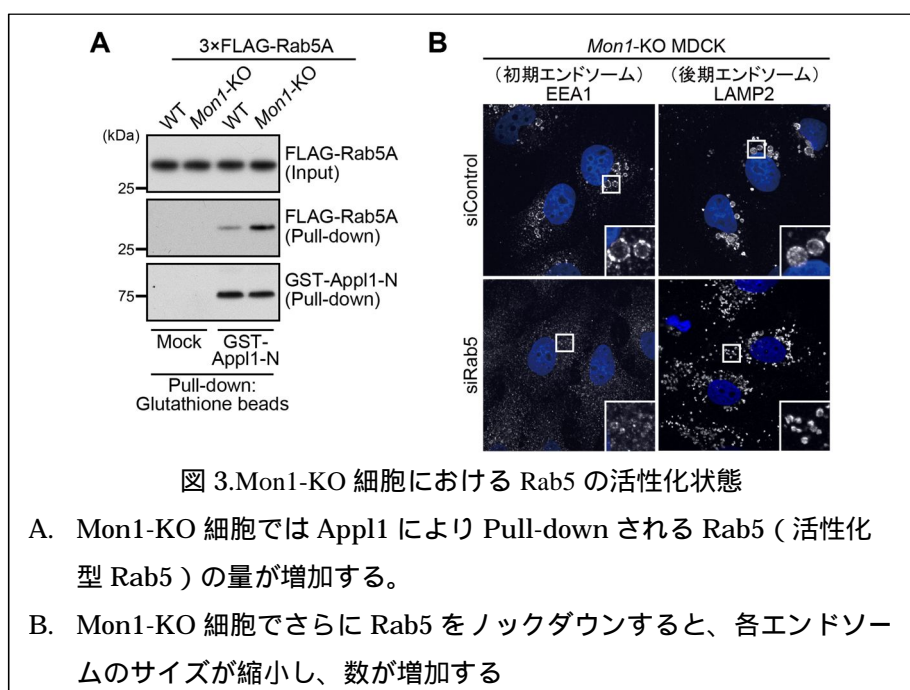


図 3. Mon1-KO 細胞における Rab5 の活性化状態

- A. Mon1-KO 細胞では App11 により Pull-down される Rab5 (活性化型 Rab5) の量が増加する。
- B. Mon1-KO 細胞でさらに Rab5 をロックダウンすると、各エンドソームのサイズが縮小し、数が増加する

表現型と Rab5 常時活性化型変異体過剰発現の表現型とが非常に類似していたことから、

Mon1-KO 細胞では Rab5 の活性化状態が亢進（活性化型 Rab5 の量が増加）している可能性が示唆された。Pull-down アッセイの結果、確かに Mon1-KO 細胞では Rab5 の活性化状態の亢進が観察された（図 3A）。また、Mon1-KO 細胞で観察されるエンドソーム、リソソームの肥大化、数の減少が、Rab5 のノックダウン（KD）によりキャンセルされることもわかった（図 3B）。従って、Mon1-KO の表現型は Rab5 に依存している（Rab5 の下流で起こる）ことが明らかとなった。

以上の結果から、Mon1-KO 細胞で観察される肥大化エンドソームは、Rab5 の過剰活性に起因している可能性が強く示唆される。そこで我々は、「Mon1-KO 細胞では、Rab5 の不活性化が正常に起きていない」と仮説を立て、上述の方法で Rab5 の不活性化因子

の探索を行った。その結果、TBC1D18 と呼ばれる分子を Rab5 不活性化因子として同定することに成句した。図 4 で示すように、TBC1D18 の発現により、Mon1-KO 細胞の肥大化エンドソームが野生型と変わらないサイズへと縮小し、数も増加する。さらに、精製タンパク質を用いた *in vitro* の実験においても、TBC1D18 が Rab5 に対して不活性化能を示すことも確認している。

また、TBC1D18 を KD した細胞では、初期エンドソ

ームが肥大化することが観察された。これは TBC1D18 KD 細胞では、Rab5 を不活化することが出来ないことで、Rab5 常時活性化型変異体過剰発現、もしくは Mon1-KO 細胞と類似状態になっていると考えられる。

TBC1D18 が Rab5 を不活化するには、初期エンドソーム上に TBC1D18 がリクルートされる必要がある。そこでそのリクルート機構を解明するために TBC1D18 の結合タンパク質を探索した。その結果、TBC1D18 が Mon1 と相互作用することを発見した。以上から、Mon1 (Mon1-Ccz1 複合体)には Rab7 の活性化因子としての機能だけでなく、TBC1D18 をリクルートし、Rab5 の不活化を仲介していると考えられる。

本研究内容は、2021 年 11 月 11 日付けで biorxiv 誌にプレプリント版を公表している (doi.org/10.1101/2021.11.11.468194)。

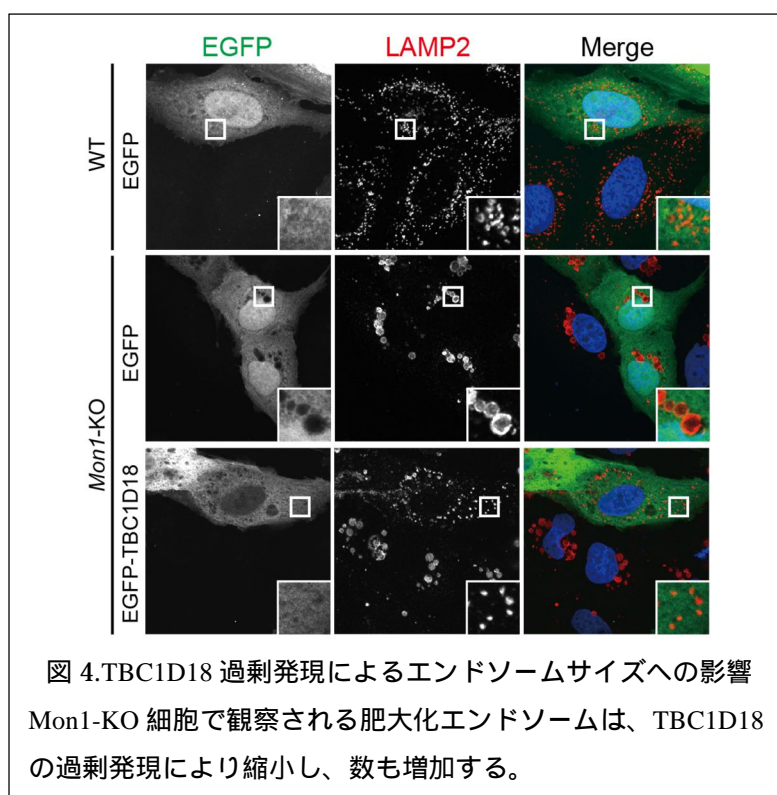


図 4. TBC1D18 過剰発現によるエンドソームサイズへの影響
Mon1-KO 細胞で観察される肥大化エンドソームは、TBC1D18 の過剰発現により縮小し、数も増加する。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

| | |
|---|----------------------|
| 1. 著者名 Matsui Takahide, Osaki Futaba, Hiragi Shu, Sakamaki Yuriko, Fukuda Mitsunori | 4. 巻 e51475 |
| 2. 論文標題 ALIX and ceramide differentially control polarized small extracellular vesicle release from epithelial cells | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 EMBO reports | 6. 最初と最後の頁 e51475 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.15252/embr.202051475 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

| | |
|---|--------------------------|
| 1. 著者名 Osaki Futaba, Matsui Takahide, Hiragi Shu, Homma Yuta, Fukuda Mitsunori | 4. 巻 jcs.257311 |
| 2. 論文標題 RBD11, a bioengineered Rab11-binding module for visualizing and analyzing endogenous Rab11 | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Journal of Cell Science | 6. 最初と最後の頁 jcs.257311 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1242/jcs.257311 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

| | |
|--|------------------------|
| 1. 著者名 Hiragi Shu, Matsui Takahide, Sakamaki Yuriko, Fukuda Mitsunori | 4. 巻 468194v1 |
| 2. 論文標題 TBC1D18, a novel Rab5-GAP, coordinates endosome maturation together with Mon1 | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 biorxiv | 6. 最初と最後の頁 468194v1 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1101/2021.11.11.468194 | 査読の有無 無 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である） | 国際共著 - |

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

| |
|--|
| 1. 発表者名 平城柊、本間悠太、酒巻有里子、松井貴英、福田光則 |
| 2. 発表標題 Mon1-Ccz1非依存的な新規エンドソーム成熟機構の発見 |
| 3. 学会等名 日本生化学会東北支部 第86回例会 |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 平城柊、本間悠太、酒巻有里子、松井貴英、福田光則 |
| 2. 発表標題 エンドソーム成熟における新規Rab5活性制御因子の同定 |
| 3. 学会等名 日本生化学会東北支部 第87回例会 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 平城柊、本間悠太、酒巻有里子、松井貴英、福田光則 |
| 2. 発表標題 エンドソーム成熟における新規Rab5活性制御因子・TBC1D18の同定 |
| 3. 学会等名 第73回日本細胞生物学会大会・ワークショップ「オルガネラ3」 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 平城柊、本間悠太、酒巻有里子、松井貴英、福田光則 |
| 2. 発表標題 新規Rab5不活性化因子・TBC1D18の同定とその機能解明 |
| 3. 学会等名 第94回日本生化学会大会 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 平城柊、本間悠太、酒巻有里子、松井貴英、福田光則 |
| 2. 発表標題 新規Rab5不活性化因子・TBC1D18によるエンドソーム成熟制御機構の解明 |
| 3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会 |
| 4. 発表年 2021年 |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

| | 氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号) | 所属研究機関・部局・職 (機関番号) | 備考 |
|--|---------------------------|-----------------------|----|
|--|---------------------------|-----------------------|----|

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 |
|---------|---------|
|---------|---------|