

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 4 月 10 日現在

機関番号：13601

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21590530

研究課題名（和文） リンパ球特異的小胞輸送ルートの同定と解析

研究課題名（英文） Identification of ubiquitin-dependent endosomal sorting signal in cytokine receptors

研究代表者

竹下 敏一（TAKESHITA TOSHIKAZU）

信州大学・医学部・教授

研究者番号：60212023

研究成果の概要（和文）：免疫系や神経系では、細胞内の高度に分化した区画を維持しながら、かつ綿密にその区画間の連絡を行っている。この困難な機能が破綻無く働いている背景に、この機能を支えている小胞輸送の存在がある。本研究ではインターロイキン2受容体β鎖（IL-2Rβ）がユビキチン非依存に小胞輸送されることを明らかにし、さらに受容体中の小胞輸送シグナルを同定した。このユビキチン非依存ルートに関わる輸送シグナルの同定は本研究が初めての証明である。

研究成果の概要（英文）：In immune or nerve system, intracellular compartments maintain the function, which is supported by endosomal sorting, keeps the specific substances of the system and exchanges the substances between the compartments without physiological and morphological disorder. Here, we showed ubiquitin-independent endosomal sorting of interleukin-2 receptor β (IL-2Rβ) and identified a novel endosomal sorting signal in the cytoplasmic region of IL-2Rβ. Our report provides the first description of endosomal sorting signal in a ubiquitin-independent manner.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・免疫学

キーワード：小胞輸送

1. 研究開始当初の背景

EGF 受容体をはじめとする多くのサイトカイン受容体は、リガンド結合後、internalization され、また、その細胞内領域がモノユビキチン化を受けてから、小胞輸送される。この小胞輸送に関わる最初の分子は「Hrs」であり、そのモノユビキチン認識領域である ubiquitin interacting motif (UIM) を通して、サイトカイン受容体と結合する。Hrs と会合した受容体は、次にユビキチン依存性小胞輸送を司る ESCRT-I、ESCRT-II、ESCRT-III と呼ばれるタンパク複合体に受け渡されて、最終的にリソソームで分解を受けると考えられている。一部のサイトカイン受容体はユビキチン非依存的に小胞輸送されるが、このユビキチンを介さない小胞輸送経路についての詳細は不明である。一方、Interleukin 2 (IL-2) 受容体 β 鎖はユビキチン依存的に小胞輸送される受容体としてこれまで報告されてきた。そこで我々は、IL-2 受容体 β 鎖の小胞輸送に対する Hrs の関わりを調べたところ、(1) IL-2 受容体 β 鎖と Hrs の結合がユビキチン非依存的であり、さらに、(2) β 鎖の小胞輸送はユビキチンが全く関わらないことを見出した (Journal of Cell Science, 121, 1727-1738, 2008)。我々の結果と以前の報告との相違は、以前の報告は IL-2 受容体 β 鎖と α 鎖の人工的なキメラ受容体を用いて、実験していたことに起因すると考えられる。我々の実験により IL-2 受容体 β 鎖は、これまで報告のない Hrs 結合依存、ユビキチン非依存の新たな小胞輸送ルートを通ることが示唆された。このルートのもう 1 つの特徴は、サイトカイン受容体が後期エンドソームに蓄積され、分解を受けない点でユニークであり、従来のユビキチン依存性小胞輸送系とは異なる。

2. 研究の目的

(1) 我々が見出したサイトカイン受容体のユビキチン非依存性小胞輸送ルートは、その詳細がほとんど分かっていない。T リンパ

球、B リンパ球の増殖分化に関わる IL-4、IL-7 もまたユビキチン非依存性小胞輸送ルートを取ることが、我々のデータから分かってきた。IL-2 受容体 β 鎖をはじめとする我々の結果は、サイトカイン受容体の小胞輸送経路がユビキチン依存的ルートとユビキチン非依存的ルートに大きく分かれることを示唆している。本研究ではこのユビキチン非依存的ルートを明らかにする。

- ① Hrs と IL-2 受容体 β 鎖の直接結合がユビキチン非依存性小胞輸送に必須である。Hrs 結合領域 (アミノ酸 349-410) を欠失した IL-2 受容体 β 鎖をマウス B リンパ球細胞株に発現させると小胞輸送が阻害され、異常空胞が観察された。一方、同受容体を線維芽細胞に発現させても、異常空胞は見られない。さらに、この変異 IL-2 受容体 β 鎖は増殖シグナルに必要な領域を保持しているにもかかわらず、マウス B リンパ球細胞株は IL-2 刺激に反応せず死滅した。加えて、Hrs そのものをノックダウンさせると、T、B リンパ球細胞株の細胞増殖は抑制されるが、線維芽細胞では影響を受けない。以上のことから、このユビキチン非依存的な小胞輸送ルートは、リンパ球特異的な機能に必須の役割を果たすことが示唆される。本研究では、このリンパ球に必須なユビキチン非依存的な小胞輸送ルートを明らかにして、その機能的役割を解析する。
- ② Hrs と β 鎖の結合の結合部位は、 β 鎖のアミノ酸 349-410 残基にあり、ここにはユビキチン修飾されるリジン残基はない。このアミノ酸 349-410 には従来知られている既知のアミノ酸配列モチーフもないことから、これまで知られていない新たなモチーフがあると考えられる。最近我々は、Hrs が IL-7 受容体ならびに IL-4 受容体とユビキチン非依存的結合することを見出している。従来、EGF 受容体をはじめとするサイトカイン受容体の

大部分はユビキチン依存的に小胞輸送されて分解され、ユビキチン非依存的な輸送はごく希であると考えられてきた。しかし、IL-2 受容体β鎖をはじめとする我々の結果は、前述したように、サイトカイン受容体の小胞輸送経路がユビキチン依存的ルートとユビキチン非依存的ルートに大きく分かれることを示唆している。ユビキチン非依存的ルートの探索には、IL-7 受容体、IL-4 受容体の Hrs 結合領域を同定し、IL-2 受容体β鎖の結合領域(アミノ酸 349-410)と比較検討して、この結合に関わる新たなモチーフを明らかにすることが解析の突破口となる。従って、このモチーフを明らかにして、さらにこのモチーフを保持し、ユビキチン非依存的ルートを通るサイトカイン受容体および小胞輸送系に関わる分子群を同定する。

3. 研究の方法

Epidermal growth factor receptor (EGF 受容体)では、EGF 刺激の後にユビキチンリガーゼである c-Cbl が受容体に会合し、受容体にユビキチンが1個付加される。このモノユビキチン化修飾を受けた受容体は小胞輸送に関わる一群の分子群によって認識され、初期エンドソームから後期エンドソームへと輸送される。このモノユビキチンを認識する分子の1つに Hrs がある。Hrs の UIM ドメインはサイトカイン受容体のモノユビキチンを認識して会合する領域である。酵母の系では UIM 欠失変異体 Hrs は受容体等の膜タンパク分子と会合できないこと、また、UIM 欠失変異体 Hrs の発現により膜タンパク分子のリソソームへの輸送が阻害されることが報告されている。我々はこの UIM 欠失変異体 Hrs を作製して、IL-2 受容体β鎖との会合を調べたところ、UIM 欠失変異体 Hrs

は IL-2 受容体β鎖と会合した。従って、Hrs は UIM ドメイン以外の領域で IL-2 受容体β鎖と会合することが示唆された。次に Hrs の種々の変異体を作製して、この会合領域を調べたところ、アミノ酸 428-466 が会合部位の一部を形成していることが分かった。さらに、IL-2 受容体β鎖の Hrs 結合に関わる領域を種々の欠失変異体を用いて調べた。β鎖のアミノ酸 349-410 の欠失変異体は Hrs との結合能を失っていた。UIM 欠失変異体 Hrs が IL-2 受容体β鎖と会合することは、この両者の会合がユビキチン非依存的であることを示唆している。ユビキチン付加部位のリジン残基を全て欠失させた IL-2 受容体β鎖が Hrs と会合することから、両者の会合はユビキチン非依存的であると結論できる。さらに大腸菌に発現させた Hrs と IL-2 受容体β鎖の会合も確認できたことにより、両者の会合は直接的であることが確認された。IL-2 受容体β鎖の Hrs 結合部位は既知のタンパクタンパク分子相互作用に関わるモチーフが見あたらないことから、新たなタンパクタンパク認識に関わるモチーフが存在すると考えられる。これまで Hrs に代表される小胞輸送分子において、積み荷タンパク分子に対するモノユビキチン以外の結合様式についての報告はない。従って、この様式を明らかにするために、先ず IL-2 受容体β鎖の Hrs 結合部位アミノ酸 349-410 の領域を徐々に狭めた変異体を作製する。アミノ酸10前後まで領域が狭まったならば、key となると予測されるアミノ酸に1つずつ変異を入れて確認、同定する。我々は既に、IL-7 受容体、IL-4 受容体が IL-2 受容体β鎖と同様に Hrs と会合することを見出している。よって、この両受容体の欠失変異を作製して、Hrs との会合に必須な領域を特定し、IL-2 受容体β鎖、IL-7 受容体、IL-4 受容体のそれぞれの結合領域を比較する。

4. 研究成果

(1) サイトカイン受容体のユビキチン非依存性 Hrs 結合部位

我々は Hrs のアミノ酸 428-466 の領域が、IL-2 受容体 β 鎖とのユビキチン非依存的結合に関わっていることを明らかにした。さらに IL-4 受容体 α 鎖についても、この領域 (Hrs のアミノ酸 428-466) と同様の会合を見いだしたことから、IL-4 受容体 α 鎖もまたユビキチン非依存的結合様式で小胞輸送されると結論づけた。従って、IL-4 受容体 α 鎖と IL-2 受容体 β 鎖の Hrs 結合部位を特定して比較することにより、共通のモチーフ探索が可能と考えられた。IL-4 受容体 α 鎖の細胞質領域について種々の長さの欠失変異体を作製し、アミノ酸 400-418 まで Hrs 会合領域を絞り込んだ。この領域のアミノ酸配列中に特徴的な疎水性アミノ酸配列のクラスター (アミノ酸 410-415) が存在した。そこでアミノ酸 410-415 の 5 つの疎水性アミノ酸をアラニンに置換したところ、この変異体は、Hrs との会合が消失した。次に IL-2 受容体 β 鎖について同様に解析を進めた。既に IL-2 受容体 β 鎖はアミノ酸 349-410 の領域で Hrs と会合していることが判っている。この領域には 2 つの疎水性アミノ酸クラスターがあり、またタンパク-タンパク会合に関わることの多い酸性アミノ酸クラスターもあった (図 1)。これらに特徴的なアミノ酸をアラニン置換して Hrs との会合をみると、アミノ酸 336-338 の疎水性アミノ酸をアラニン置換した IL-2 受容体 β 鎖変異体のみ、結合が消失した (図 1)。以上より IL-2 受容体 β 鎖はアミノ酸 336-338 (FFFHL) が、IL-4 受容体 α 鎖はアミノ酸 410-415 (LFLDLL) が Hrs との会合に必須であることが判明した。

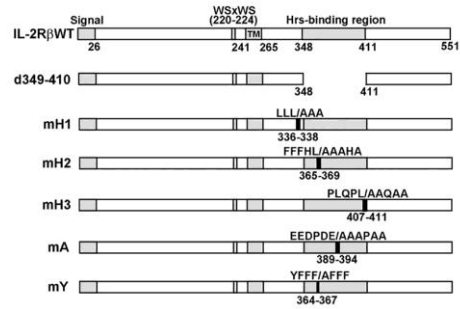


図 1 IL-2 受容体と Hrs 結合領域

(2) Hrs 結合領域をアミノ酸置換した受容体の小胞輸送

次にこの疎水性アミノ酸クラスターのアラニン置換変異体を用いて、受容体の小胞輸送に対する影響を調べた。野生型受容体は IL-2 受容体 β 鎖も IL-4 受容体 α 鎖も LAMP1 陽性後期エンドソームに輸送されたが、疎水性アミノ酸クラスターのアラニン置換変異体は顕著な輸送阻害が認められた。そこで阻害を受けたこのアラニン置換変異体がどの細胞内の区画に小胞輸送されたかを検討した。後期エンドソームは前述の LAMP1 陽性の他に、少なくとも LBPA 陽性後期エンドソームが知られている。LBPA 陽性後期エンドソームはその内部に、サイトカイン受容体等の積み荷分子を含む小胞 (multivesicular body) を内包し、リソソーム分解の前段階とも考えられている。我々はまず、LAMP1 陽性後期エンドソーム、LBPA 陽性後期エンドソームへの各受容体分布を集計した。野生型 IL-2 受容体 β 鎖の各エンドソームへの局在は LAMP1 陽性後期エンドソーム (66%)、LBPA 陽性後期エンドソーム (32%) であり、疎水性アミノ酸クラスターのアラニン置換変異体では LAMP1 陽性後期エンドソーム (34%)、LBPA 陽性後期エンドソーム (44%) であった (図 2)。IL-4 受容体 α 鎖の変異体においても同様の結果が得られている。即ち、変異体は LAMP1 陽性後期エンドソームへの輸送が妨げられる一方、LBPA 陽性後期エンドソームに蓄積していると考えられる。

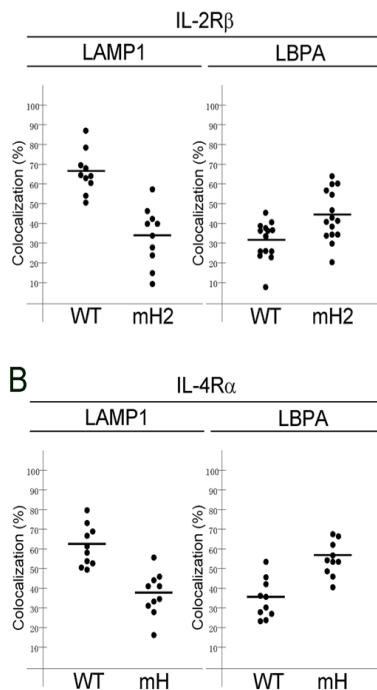


図2 Hrs 結合領域をアミノ酸置換した受容体の小胞輸送阻害

(3) Hrs 結合領域をアミノ酸置換した受容体のリソソーム分解

次にLAMP1陽性後期エンドソームへの小胞輸送が障害されている疎水性アミノ酸クラスターのアラニン置換変異体についてリソソーム分解能を解析した。IL-2受容体 β 鎖ならびにIL-4受容体 α 鎖に対する抗体を ^{125}I で放射性ラベルし、経時的にその抗体の細胞内取り込みと分解を調べた。野生型受容体も変異型受容体も細胞表面から細胞内への取り込みには差が認められない。一方、取り込まれた後の分解は、変異型受容体において明らかに阻害されていた。このことを確認するため、さらに放射性ラベルした ^{125}I -IL-2ならびに ^{125}I -IL-4を用いて同様にリソソーム分解能を解析したところ、同様に変異型受容体発現細胞ではこれらリガンドの分解が阻害されていた。従って、LAMP1陽性後期エンドソームへの輸送阻害がリソソームでの分解阻害に直結すると推測された。

(4) 考察

本研究ではサイトカイン受容体の疎水性アミノ酸クラスターが、ユビキチン非依存的な小胞輸送の輸送シグナルとして機能していることを明らかにした。IL-2受容体 β 鎖ならびにIL-4受容体 α 鎖の疎水性アミノ酸クラスターは各々「FFFHL」ならびに「LFLDLL」とアミノ酸配列に幅がある。従って、このクラスターの特異性は厳密なアミノ酸の1次配列に規定されておらず、Hrsはむしろ疎水性アミノ酸全体をひと塊として認識していると考えられる。これまで報告のある小胞輸送シグナルはチロシンモチーフシグナルYXX ϕ およびジロイシンモチーフシグナル(D/E)XXXL(LI)が代表である。双方とも数多くの膜タンパクや積み荷タンパクに見いだされ、その大部分はアダプタータンパクAP-2と結合して小胞輸送される。この2つのモチーフは輸送シグナルとしても働くが、どちらかといえばclathrin-dependent internalizationに働くシグナルとして同定されている。一方、今回の疎水性アミノ酸クラスターのアラニン置換変異体はinternalizationに影響しないことから、このクラスターは小胞輸送のみに働くシグナルである。今回のIL-2受容体 β 鎖ならびにIL-4受容体 α 鎖の疎水性アミノ酸クラスターは、ユビキチンを認識するHrsが、ユビキチン非依存性に結合する点でユニークであるが、我々に次の疑問を投げかける。少なくとも、今回の2つの受容体のみがユビキチン非依存性にHrsと会合するとは考えにくい。よって、どのような受容体や積み荷タンパクが同様式でHrsに認識されるのであろうかと。Epidermal growth factor receptor (EGFR)はEGFが受容体に会合して受容体がリン酸化およびユビキチン化等の活性化を受けてはじめてinternalizationされる。つまり、EGFが会合しない限り、EGFRは細胞表面に留まっている。一方、IL-2受容体 β 鎖ならびにIL-4受容体 α 鎖はリガンド刺激なしに恒常的にinternalizationされ、細胞内に取り込まれている。EGFRと比較するとリガンド刺激なし

で internalization される IL-2 などの受容体がユビキチン非依存性に Hrs と結合することは合目的と言える。即ち、リガンド等刺激に非依存性に internalization される受容体または積み荷タンパクの一群で疎水性アミノ酸クラスターを持つグループが、このユビキチン非依存性の小胞輸送を受けると示唆される。

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 1 件)

- ① Amano Y., Yamashita Y., Kojima K., Yoshino K., Tanaka N., Sugamura K., Takeshita T.: Hrs recognizes a hydrophobic amino acid cluster in cytokine receptors during ubiquitin-independent endosomal sorting. **J Biol Chem**, 286, 15458-15472, 2011. DOI 10.1074/jbc.M110.191924
(査読有り)

[学会発表] (計 5 件)

- ① 天野勇治、小嶋克彦、吉野和寿、竹下敏一: Hrs recognizes a hydrophobic amino acid cluster in cytokine receptors during ubiquitin-independent endosomal sorting. 日本免疫学会、千葉、2011 年 11 月 29 日
- ② 天野勇治、小嶋克彦、山下勇毅、吉野和寿、竹下敏一: Identification of Hrs-binding motif in the cytokine receptors delivered to lysosome in ubiquitin-independent manner. 日本分子生物学会、神戸、2010 年 12 月 8 日
- ③ 天野勇治、小嶋克彦、山下勇毅、吉野和寿、竹下敏一: Identification of Hrs-binding motif in the cytokine receptors delivered to lysosome in ubiquitin-independent manner. 国際免疫学会、神戸、2010 年 8 月 24 日
- ④ 山下勇毅、小嶋克彦、天野勇治、吉野和

寿、竹下敏一: 細胞内小胞輸送と細胞増殖における IL-2 受容体 β 鎖の Hrs 結合領域の役割、日本免疫学会、大阪、2009 年 12 月 2 日

- ⑤ 天野勇治、小嶋克彦、山下勇毅、吉野和寿、竹下敏一: ユビキチン非依存的に小胞輸送されるサイトカイン受容体の Hrs 会合モチーフの同定、日本免疫学会、大阪、2009 年 12 月 2 日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

竹下 敏一 (TAKESHITA TOSHIKAZU)
信州大学・医学部・教授
研究者番号: 60212023

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

小嶋 克彦 (KOJIMA KATSUHIKO)
信州大学・医学部・助教
研究者番号: 80345743

吉野 和寿 (YOSHINO KAZUHISA)
信州大学・医学部・助教
研究者番号: 40551859

天野 勇治 (AMANO YUJI)
信州大学・医学部・助教
研究者番号: 50624681