

エンドサイトーシス経路における RING 型ユビキチンリガーゼの機能解析

関西学院大学大学院理工学研究科
生命科学専攻 沖米田研究室 安藝 美咲

【研究目的】 遺伝的な変異や環境ストレスにより構造異常となったタンパク質は小胞体，ゴルジ体，形質膜といった様々な場所で品質管理機構によってユビキチン化を受け，分解される．特に膜タンパク質が品質管理機構により分解されると，本来の機能を発揮できず様々な疾患を引き起こす．その膜タンパク質の 1 つに CFTR (Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator) があり，この遺伝子変異は白人間で頻度が高い遺伝病の嚢胞性線維症 (cystic fibrosis :CF) を引き起こす．以前我々は CF 患者由来気道上皮細胞を用いたユビキチンリガーゼ siRNA 網羅的スクリーニングを行い， $\Delta F508$ CFTR の形質膜安定性を制御する RING 型ユビキチンリガーゼ (RING-E3) を同定した．また，この RING-E3 domain 点変異体は，巨大なエンドソームを形成し，エンドサイトーシス経路を乱すことから，RING-E3 は異常膜タンパク質のユビキチン化だけではなく，エンドソーム自身の機能制御に関与する可能性が考えられた．そこで，本研究では，エンドサイトーシス経路における RING-E3 の機能解析を目的とした．

【実験方法】 ①先行研究において，RING-E3 H333A 変異体を過剰発現させると，エンドサイトーシスされた $\Delta F508$ CFTR や Transferrin receptor (TfR) が細胞内に凝集体を形成する事を発見した．そこで，まず RING-E3 H333A 変異体のリサイクリング経路への影響を検討するため，クラスリン依存的エンドサイトーシスを受ける TfR, WT CFTR, および低濃度 EGF 刺激を与えた EGFR, クラスリン非依存的エンドサイトーシスを受ける CD59 のリサイクリングに対する RING-E3 H333A 過剰発現の影響を免疫蛍光染色法で調べた．②RING-E3 H333A のリソソーム輸送への影響を検討するため，クラスリン非依存的エンドサイトーシスを受ける高濃度 EGF 刺激を与えた EGFR, ピノサイトーシスを受ける Dextran のリソソーム輸送に対する RING-E3 H333A 過剰発現の影響を免疫蛍光染色法で調べた．③ RING-E3 KD によっても，RING-E3 H333A 過剰発現と同様に積荷に影響を与えるのか，ユビキチン化を受けクラスリン依存的エンドサイトーシスをされ，リソソームへと輸送される， $\Delta F508$ CFTR のリソソーム輸送に対する影響を免疫蛍光染色法で調べた．また，RING-E3 KD によるリソソームの大きさ，数への影響を解析した．

【実験結果と考察】 ①RING-E3 H333A は，TfR のリサイクリングを遅らせ，WT CFTR のリサイクリング量を減少させ，低濃度刺激 EGFR および CD59 のエンドソームでの蓄積を引き起こした．従って，RING-E3 はリサイクリング経路の制御を行う可能性が考えられる．②RING-E3 H333A は，高濃度刺激 EGFR および Dextran のリソソーム輸送に影響を与えなかった．従って，RING-E3 H333A はリソソーム輸送制御に関与しないと考えられる．③RING-E3 KD は，エンドサイトーシスされた $\Delta F508$ CFTR のリソソーム内への輸送を抑制した．また，RING-E3 KD は，リソソームの大きさや数には影響しなかった．以上の結果から，RING-E3 は異常 CFTR のユビキチン化制御によるエンドサイトーシス選別輸送制御に加えて，リサイクリングされる積荷の輸送を選択的に制御する可能性が考えられる．