HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Ras-PI3Kシグナルの時空間制御を介したエンドサイトーシス制御機構に関する研究［論文内容及び審査の要旨］
Author(s)	佐藤, 絢
Description	配架番号：2457
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第13443号
Issue Date	2019-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/74347
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Aya_Sato_abstract.pdf, 論文内容の要旨

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称　博士（医　学）　氏 名　佐藤　絢

学 位 論 文 題 名

Ras-PI3K シグナルの時空間制御を介したエンドサイトーシス制御機構に関する研究

(Studies on the regulatory mechanism of endocytosis by spatiotemporal control of Ras-PI3K signaling)

【背景と目的】低分子量 GTP 結合タンパク質 Ras は、多数の標的因子との結合を時間的、空間的に制御することで多彩な細胞生理機能において中心的な役割を担っている。当研究室はこれまでに、Ras の標的因子の 1 つである phosphoinositide 3-kinase (PI3K) は上皮増殖因子 (epidermal growth factor, EGF) の刺激依存的に Ras と複合体を形成すると、他の標的因子とは異なり細胞膜だけでなくエンドソーム上でも機能することを明らかにしている。実際に、PI3K はエンドソーム上で活性化し、エンドサイトーシスおよびインフルエンザウイルス感染を促進する。しかし、Ras-PI3K 複合体のみがエンドソームに局在するメカニズムは未知である。そこで、本研究は蛍光イメージングを用いてそのメカニズムの解明を目指した。

【材料と方法】第 1 章: Ras の標的因子の Ras 結合ドメイン (Ras-binding domain, RBD) のアミノ酸配列を多重配列アライメントにより比較した。Ras-PI3K 複合体は蛍光タンパク質再構成法により可視化し、その挙動を共焦点顕微鏡で観察した。取得した画像は解析ソフト MetaMorph を用いて定量解析した。細胞のエンドサイトーシス能は、蛍光標識デキストランの取り込みを蛍光顕微鏡下で観察することで評価した。細胞へのインフルエンザウイルス侵入は、蛍光免疫染色法を用いて可視化したウイルス核タンパク質 (nucleoprotein, NP) とエンドソームが共局在する面積を定量することで評価した。ウイルス感染は、NP の蛍光強度を定量することで評価した。合成ペプチドは外部発注により入手した。第 2 章: PI3K の特異的配列に結合する因子は酵母ツーハイブリッド法を用いて探索した。タンパク質間相互作用は免疫沈降法およびウエスタンブロッティングにより評価した。ノックダウン実験は候補因子に対する低分子干渉 RNA (siRNA) を細胞に導入し、定量 PCR 法またはウエスタンブロッティングにより候補因子の mRNA またはタンパク質発現量を評価した。Ras-PI3K 複合体の挙動および細胞のエンドサイトーシス能は第 1 章と同様に評価した。ミトコンドリア–エンドソーム間相互作用の定量は、ミトコンドリアの周囲 0.31 μm 以内に局在するエンドソームの面積を定量することで評価した。エンドソームの酸性化は、pH 感受性蛍光色素標識デキストランを用いて評価した。ミトコンドリア–エンドソーム間相互作用の人為的な誘導は光遺伝学法を用いた。

【結果】第 1 章: Ras の主な標的因子の RBD のアミノ酸配列を比較したところ、PI3K には 28 アミノ酸からなる特異的配列が存在した。この特異的配列を欠損させた変異型 PI3K と Ras の複合体は、野生型 PI3K との複合体と比較して EGF 刺激後にエンドソームと共局在する Ras-PI3K 複合体のシグナルが減弱した。このことから、PI3K の特異的配列を Ras-PI3K endosomal localization (RAPEL) 配列と命名した。RAPEL に蛍光タンパク質を付加して細胞に過剰発現させたところ、コントロールの細胞と比較して EGF 刺激後に Ras–PI3K 複合体のエンドソーム局在が抑制された。また、RAPEL の過剰発現により蛍光標識デキストランの取り込みとインフルエンザウイルスの細胞侵入および感染が抑制された。さらに、RAPEL はペプチドとして細胞に取り込ませてもウイルス感染抑制効果を示した。第 2 章: 酵母ツーハイブリッド法による RAPEL 結合因子探索の結果、候補因子の 1 つとしてミトコンドリア外膜タンパク質の voltage-dependent anion channel 2 (VDAC2) が同定された。VDAC2 ノックダウン細胞はコントロール細胞と比較して Ras-PI3K 複合体のエンドソーム局在が抑制され、pH 感受性蛍光標識デキストランのシグナルが減弱した。また、生細胞内でミトコンドリアとエンドソームの挙動を詳細に観察したところ、コントロール細胞では EGF 刺激後に両者の相互作用が促進されたのに対し、VDAC2 ノックダウン細胞では変化が認められなかった。さらに光遺伝学ツールを用いてミトコンドリア–エンドソーム間相互作用を人為的に誘導すると、エンドソームの酸性化が促進された。

【考察】第 1 章: Ras-PI3K 複合体のエンドソーム局在に必要な配列である RAPEL の過剰発現、および RAPEL ペプチドの細胞への導入はインフルエンザウイルス感染を抑制した。これらの結果から、RAPEL ペプチドを用いた抗ウイルス治療法開発への展開が将来的に期待される。第 2 章: RAPEL 結合因子として同定された VDAC2 は Ras-PI3K 複合体のエンドソーム局在とエンドソームの酸性化を制御した。さらに、VDAC2 は EGF 刺激依存的なミトコンドリア–エンドソーム間相互作用を介してエンドソームの酸性化を促進することが示唆された。そのメカニズムの 1 つとして、両者が相互作用した時にミトコンドリアから放出された ATP がエンドソーム上の vacuolar (H^+) ATPase (V-ATPase) に供給され、V-ATPase が H^+をエンドソーム内に汲み上げることよりエンドソームの酸性化が促進されるという仮説が考えられる。今後はこの仮説を検証し、異種オルガネラ間相互作用によるエンドソーム酸性化促進の分子メカニズムとその生理学的意義を明らかにしたい。

【結論】第 1 章: EGF 刺激依存的な Ras-PI3K 複合体のエンドソーム局在を制御する PI3K の特異的配列 RAPEL を同定した。RAPEL の過剰発現および RAPEL ペプチドの導入は、インフルエンザウイルス感染を抑制した。第 2 章: RAPEL 結合因子として同定されたミトコンドリアの VDAC2 は、Ras-PI3K 複合体のエンドソーム局在を正に制御した。また、VDAC2 はエンドソームの酸性化および EGF 刺激依存的なミトコンドリア–エンドソーム間相互作用を促進した。