



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 [全文の要約]
Author(s)	佐藤, 絢
Description	この博士論文全文の閲覧方法については、以下のサイトをご参照ください。 配架番号：2457 他
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/2115/74349
Type	doctoral thesis
File Information	Aya_Sato_summary.pdf



学位論文（要約）

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)

2019 年 3 月

北海道大学

佐藤 絢

学位論文（要約）

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)

2019 年 3 月

北海道大学

佐藤 絢

【背景と目的】

低分子量GTP結合タンパク質Rasはシグナル伝達の分子スイッチとも呼ばれ、GTPが結合した活性化型とGDPが結合した不活性化型の二つの状態をとる。Ras自身はGTPを加水分解する機能しか持たないが、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、細胞の生存、転写、小胞輸送など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の標的因子であるphosphoinositide 3-kinase (PI3K)のうちクラスIBの触媒サブユニットPI3Kp110 γ (以後PI3Kと記載)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Rasの標的因子とは異なりエンドソーム上で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ことが明らかにされている。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ため、本研究は蛍光イメージング手法を用いてRas-PI3K複合体のエンドソーム局在メカニズムの解明を目指した。

【方法】

第1章: Rasの標的因子のRas結合ドメイン (Ras-binding domain, RBD)のアミノ酸配列は多重配列アライメントにより比較した。細胞への遺伝子導入にはポリエチレンイミンマックス (HEK293T細胞、Cos-1細胞、MDCK細胞、A431細胞) およびnucleofection (MEF細胞)を用いた。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、Alexa Fluor 546 標識デキストランおよびAlexa Fluor 546 標識トランスフェリ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。細胞のインフルエンザウイルスの取り込みは、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) とエンドソームマーカーであるRab7の共局在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。野生型および変異型PI3K γ が恒常的に発現したPIK3CG欠損MEF細胞の樹立は、G418硫酸塩を用いてセクションを行い、コロニーを単離した。第2章: PI3Kの特異的配列に結合する因子は、PI3K-RBDをBaitとして酵母ツーハイブリッド法により探索した。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。HeLa 細胞への遺伝子導入は FuGene HD Transfection reagent を用いた。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 感受性蛍光色素である AcidiFluorTM ORANGE で標識した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 刺激後のエンドソームへの局在が抑制された。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、さらにデキストランの取り込みとインフルエンザウイルス感染も抑制された。RAPEL のトランケーション変異体を作製し、それらを細胞に過剰発現させてウイルス感染を評価した結果、中央のリジン残基が RAPEL の機能に重要であることがわかった。さらに、リジン残基を含む RAPEL の 11 アミノ酸をペプチドとして細胞に取り込ませたところ、ウイルス感染が抑制された。第 2 章: 酵母ツーハイブリッド法を用いて RAPEL 結合因子を探索した結果、候補因子の一つとしてミトコンドリア外膜タンパク質である voltage-dependent anion channel 2 (VDAC2) が同定された。VDAC2 をノックダウンしたところ、コントロールの細胞と比較して Ras-PI3K 複合体のエンドソーム局在が抑制され、デキストランの取り込みも抑制された。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結果、EGF 刺激後に両者の相互作用が増加し、VDAC2 をノックダウンするとその増加が認められなくなった。さらに、VDAC2 を過剰発現させるとエンドソームの酸性化が促進され、光遺伝学的手法によりミトコンドリア-エンドソーム間

相互作用を誘導したところ、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 をペプチドとして細胞に導入した結果、インフルエンザウイルス感染が抑制された。現在使用されている A 型インフルエンザウイルスに対する薬剤は、遺伝子変異による薬剤耐性株の発生が問題となっている。RAPEL ペプチドはウイルスの細胞内への侵入を阻害することができるため、薬剤耐性株の出現を軽減できるこれまでにない抗ウイルス薬になりうると考えられる。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。VDAC2 はエンドソーム上の PI3K と結合することによりエンドソームをミトコンドリアに繫留させ、エンドソームの酸性化を促進する役割を担っていると考えられる。VDAC2 の物質を透過するポアとしての機能がエンドソームの酸性化に重要であるかはまだ明らかになっていないため、VDAC2 をノックダウンした細胞のミトコンドリアとエンドソームを光遺伝学手法により相互作用させ、エンドソームの酸性化が促進されるかを検証することで明らかにしたい。もし VDAC2 がポアとして機能しているとすれば、両者が相互作用した時に VDAC2 を通して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に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。今後はこれらを検証し、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】

本研究により、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 が同定された。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。RAPEL 結合因子としてミトコンドリアタンパク質である VDAC2 が同定され、VDAC2 は Ras-PI3K 複合体のエンドソーム局在を制御した。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

用を促進することが示唆された。これらの結果から、ミトコンドリア-エンドソーム間相互作用によるエンドサイトーシス制御という新たな細胞生理機能の存在が示唆された。