

論 文 要 旨

Studies on intracellular trafficking of E-cadherin: dual roles of a dileucine motif in E-cadherin transport

E-カドヘリンの細胞内輸送機構の研究

—E-カドヘリン輸送におけるダイロイシンモチーフの2つの役割—

宮下 矢蒼衣

【序論および目的】

カドヘリンはカルシウム依存性の細胞間接着分子である。カドヘリンは細胞の形態形成や極性維持に必要であり、転移性癌細胞ではE-カドヘリンの消失が観察される。E-カドヘリンは細胞外領域で2量体を形成し、隣接した細胞のE-カドヘリンとホモフィリックな結合を形成することによって接着している。また細胞内領域ではβ-カテニンと結合し、α-カテニンを介してアクチンフィラメントと結合し、隣接する細胞の細胞骨格を連結する役割をしている。

E-カドヘリンは常に膜に発現した状態を保っているわけではなく、一定時間間隔で細胞内に取り込まれ、一部は膜に戻り、残りは分解に向かい、また新しく合成されたE-カドヘリンが膜へと輸送されるという動的な状態を保っている。細胞はE-カドヘリンの細胞膜への輸送、細胞内への取り込みやリサイクリングを調節することによって接着の強さを調節しており、カドヘリンの動的な細胞内輸送を明らかにすることは重要なことである。

まず第1部ではE-カドヘリンのC末端側に結合しているβ-カテニンに注目した。β-カテニンが結合しないE-カドヘリンは小胞体で輸送が停止し、細胞膜へ発現しないことが知られている。一方で私たちのグループは、細胞内領域をもたないE-カドヘリンは膜に発現することを見出していた。よってE-カドヘリンの膜輸送システムにおける細胞内領域の役割について研究を行った。

次に第2部では、E-カドヘリンの細胞膜近傍に結合しているp120に注目した。p120はカテニン的一种で、p120がカドヘリンから離れるとカドヘリンの膜からの消失が起こることが知られているが、詳細なメカニズムについてはまだ分かっていなかった。そこでp120がE-カドヘリンの膜での発現量を制御するメカニズムについて研究を行った。

第1部 E-カドヘリンの細胞表面への輸送におけるβ-カテニンの結合の意義とダイロイシンモチーフの役割

【材料および方法】

さまざまな細胞内領域を欠失または置換した変異体を作製、MDCK細胞に安定的に発現させ、共焦点レーザー顕微鏡や、生化学手法を用いて検出した。

【結 果】

- (1) β-カテニンが結合しないE-カドヘリンは膜へ輸送されず直接ライソゾームへ輸送され、分解されていた。
- (2) 細胞内領域をもたないE-カドヘリンは膜に発現し、またそれは側底部であった。
- (3) 細胞外領域のみのE-カドヘリンは頂端部、側底部両方に輸送されたため、側底部への輸送には膜に結合していることが重要である。
- (4) 細胞内領域をもたず、細胞外領域の1から3を欠失または2量体を作れない変異体は頂端部

へも輸送された。

(5) 細胞膜近接部位にあるダイロイシンをダイアラニンに置換すると β -カテニンが結合しない E-カドヘリンでも膜へ輸送され、それは側底部であった。

【結論及び考察】

β -カテニンが結合しない E-カドヘリンは小胞体で品質管理を受け、輸送が停止するのではなく、ゴルジ体から直接ライソゾームへ輸送されることによって品質管理を受けていることが明らかになった。またそのライソゾームへの輸送には膜近接部位にあるダイロイシンモチーフが重要である。このモチーフは GGA や AP-1, -3, -4 のような TGN-エンドソーム-ライソゾーム間の輸送を調節しているクラスリン関連アダプター分子による認識サイトとして働いていると考えられる。また E-カドヘリンのダイロイシンモチーフは側底部への輸送シグナルであるという報告があったが、今回細胞内領域がない E-カドヘリンも側底部へ輸送されたため、E-カドヘリンの側底部への輸送に細胞内領域は必要ないことが明らかになった。

(Journal of Cell Science Vol.120, No.24 2007 年 掲載)

第 2 部 p120 による E-カドヘリンエンドサイトーシスの制御とダイロイシンモチーフの役割

【材料および方法】

p120 非結合および LA 置換変異体を作製し、MDCK 細胞に安定的に発現させ、共焦点レーザー顕微鏡や、生化学手法を用いて検出した。

【結果】

- (1) p120 非結合 E-カドヘリンは早期エンドソームに蓄積が見られた。
- (2) エンドサイトーシス速度を調べた結果、2 時間で細胞表面にあった野生型 E-カドヘリンが約 7%、p120 が非結合 E-カドヘリンは約 35% 細胞内に取り込まれた。また野生型の E-カドヘリンと p120 非結合 E-カドヘリンのダイロイシンをダイアラニンに置換すると野生型は 1%、p120 非結合型は 3% にまで取り込みが抑制された。
- (3) p120 非結合 E-カドヘリンの取り込みはクラスリン依存性であった。
- (4) p120 RNA 干渉によって p120 をノックダウンすると、野生型の E-カドヘリン量は減少したのに対して LA 置換型ではほとんど減少しなかった。また p120 ノックダウンによって E-カドヘリンは細胞内小胞に多く見られるのに対し、LA 置換型では膜に留まったままであった。またそのときの取り込み効率は有意差はなかったものの平均すると野生型の方が多く取り込まれていた。
- (5) p120 非結合 E-カドヘリンはリサイクリングの効率も落ちていた。

【結論及び考察】

p120 非結合 E-カドヘリンはエンドサイトーシスが野生型よりも約 5 倍亢進しており、その取り込みはクラスリン依存的であった。また多くは早期エンドソームに局在し、リサイクリングも抑制されていることが分かった。p120 が結合しないことによる E-カドヘリンのエンドサイトーシスの亢進には細胞内領域にあるダイロイシンモチーフが重要な役割を果たしていることが分かった。ダイロイシンモチーフはエンドサイトーシスを行うクラスリン関連アダプタータンパク質である AP-2 などによる認識サイトであり、p120 結合部位から 13 残基しか離れていないため、p120 が E-カドヘリンに結合することによってこの部位を隠すことによってエンドサイトーシスを調節していると考えられる。

(Journal of Biological Chemistry Vol.282, No.15 2007 年 掲載)

論文審査の要旨

報告番号	総研第	31号	学位申請者	宮下 矢誉衣
審査委員	主査	秋山 伸一	学位	博士(医学)
	副査	宮田 篤郎	副査	佐藤 正宏
	副査	古川 龍彦	副査	原口 みさ子

Studies on intracellular trafficking of E-cadherin: dual roles of a dileucine motif in E-cadherin transport E-カドヘリンの細胞内輸送機構の研究—E-カドヘリン輸送におけるダイロイシンモチーフの2つの役割—

E-カドヘリンは上皮細胞に発現する細胞間接着分子である。転移性の癌細胞では E-カドヘリンが減少している。E-カドヘリンは膜に発現することで機能する分子であり、膜での発現量を巧妙に調節することによって接着を調節している。本研究では、E-カドヘリンの膜からの取り込みと膜への輸送における細胞内領域の2つのロイシン残基（以下 LL モチーフと略す）の役割を検討した。

その結果以下のことが明らかになった。

- 1) β -カテニンが結合しない E-カドヘリンは直接エンドソームを介してリソソームへ輸送され、2時間以内に分解されている。またその輸送には膜近接領域の KEPLL モチーフが重要である。
- 2) E-カドヘリンが側底部膜に安定に発現するためには、2量体化、アクチンとの結合が必要である。
- 3) p120 が結合しない E-カドヘリンは膜からの取り込みが約 5 倍亢進している。
- 4) E-カドヘリンの細胞内への取り込みには膜貫通領域の LL モチーフが重要である。

このように E-カドヘリンの膜貫通部位から 10, 11 番目の 2 つのロイシン残基が E-カドヘリンの細胞内輸送に重要であることが明らかとなった。LL モチーフは他の膜貫通タンパク質でもエンドサイトーシスやエンドソームからライソソームへの輸送シグナルであることが報告されている。クラスリンのアダプタータンパク質の中には積荷タンパク質の LL モチーフを認識するものがあり、E-カドヘリンの場合もこれらのアダプタータンパク質によって LL モチーフが認識され、選択的輸送が行われていると考えられる。特に、取り込みに関しては p120 結合部位の近くに LL モチーフが位置するため、p120 が E-カドヘリンから外れることによって LL モチーフが露出し、アダプタータンパク質が LL モチーフを認識しやすくなるため取り込みが亢進すると考えられる。

本研究は、E-カドヘリンの膜輸送制御機構を検討したものであり、その結果 E-カドヘリンの膜貫通領域近傍に位置する LL モチーフが E-カドヘリンの品質管理とエンドサイトーシスという 2 つの役割をもつことが分かった。この研究で E-カドヘリンの膜での発現量制御機構が明らかになった点が非常に興味深い。よって本研究は学位論文として十分な価値を有するものと判定した。

最終試験の結果の要旨

報告番号	総研第	31号	学位申請者	宮下矢誉衣
審査委員	主査	秋山 伸一	学位	博士 (医学)
	副査	宮田 篤郎	副査	佐藤 正宏
	副査	古川 龍彦	副査	原口 みさ子

主査および副査の5名は、平成20年 1月31日、学位申請者 宮下矢誉衣 君に面接し、学位申請論文の内容について説明を求めると共に、関連事項について試問を行った。具体的には、以下のような質疑応答がなされ、いずれについても満足すべき回答を得ることができた。

質問1) 細胞質ドメインを全く持たない変異体 (EC0) と細胞質ドメインを一部持つ変異体 (EC81 ΔMP39) の分布に差はないか?

(回答) EC0 も EC81 ΔMP39 も膜に発現しており、分布に差はない。

質問2) 細胞質ドメインを全く持たない変異体 (EC0) が細胞膜側底部に輸送されるのは何故か?

(回答) シグナル依存の輸送ではなく、デフォルト経路によるものではないか。

質問3) 細胞内に E-カドヘリンが蓄積している癌細胞で、β-カテニンあるいは p120 の結合部位に変異が見つかったか? また、実験で使用したような欠失を持つような変異が癌細胞で見つかったか?

(回答) β-カテニン結合部位に変異がある癌細胞の報告がある。実験で使用したような欠失をもつ E-カドヘリンは癌細胞では報告されていない。

質問4) 変異カドヘリンを持つ癌細胞に正常カドヘリンを発現させれば、細胞の性質は正常に戻るか?

(回答) 癌細胞では E-カドヘリンだけでなくさまざまな分子の発現が変化しているので、正常カドヘリンを発現させただけでは性質は戻らないと思われる。

質問5) 分解がうまくいかなくなり、細胞内に異常に E-カドヘリンが増えるような例は報告されているか?

(回答) そのような例の報告はない。また実験的に E-カドヘリンを過剰発現させても、タンパク量は総量規制によって常に一定レベルに保たれている。

質問6) LL モチーフ置換変異体は側底部膜へ輸送されるというオーストラリアのグループの結果と異なる結果が得られているがその理由は何か?

(回答) 分からない。しかし最近では我々のデータを支持する論文もある。

質問7) EC81KR という変異体は一度細胞表面に輸送され、その後取り込まれているということだが、その機構は?

(回答) EC81KR は膜に一度運ばれた後、取り込まれて初期エンドソームに蓄積していると考えられる。よってリジン残基はリソソーム輸送に必要であると思われる。

最終試験の結果の要旨

- 質問 8) 二量体を作れない変異体のうち、細胞質ドメインがないもの (ECOWA) は頂端部にも存在するのに、細胞質ドメインがあるもの (EWA) は側底部のみに存在するのは何故か？
(回答) ECOWA はトランスサイトosisによって頂端膜に運ばれているが EWA はアクチンと結合できるためトランスサイトosisが起こりにくくなっているのではないか。
- 質問 9) 細胞質ドメインを持たない変異体が自身では二量体を作れるのに、内在性の E-カドヘリンと二量体を作れないのは何故か？
(回答) MDCK 細胞は犬の細胞だが、変異体はマウスの E-カドヘリンを使用したためと思われる。
- 質問 10) ジロイシンモチーフ (以下 LL モチーフ) の隣にあるリジン、グルタミン酸、プロリン残基はどのような役割をしているのか？
(回答) リジンのユビキチン化が EC81 のリソソームへの輸送に必要と考えている。他の残基については今後の課題である。
- 質問 11) 細胞内への取り込みとリソソームへの輸送に LL モチーフが必要ということだがそれを認識しているアダプター分子は同じと考えるか？
(回答) 同じではないと考えている。細胞内への取り込みには AP-2、リソソームへの輸送には GGA-1, 2, 3 が候補として挙げられる。
- 質問 12) E-カドヘリンの細胞内取り込みにおいて、p120 分子の果たす役割を直接的に証明するにはどうしたらよいか？
(回答) アダプター分子を同定し、そのアダプター分子と E-カドヘリンとの結合が p120 の過剰発現によって阻害されるかを調べればよい。
- 質問 13) アダプター分子の認識部位が LL モチーフであることはすでに分かっていたか？
(回答) 例えば glucose transporter 8 (GLUT8) では細胞内領域の LL モチーフが AP-2 の $\beta 2$ サブユニットと相互作用し、取り込みを制御していることが報告されている。
- 質問 14) 細胞外のカルシウムイオンを除くとカドヘリンのエンドサイトosisが起こると記載されているが、そのメカニズムは？
(回答) E-カドヘリンの細胞外構造が変化し、取り込まれやすくなると考えられる。
- 質問 15) ダイナミンのドミナント・ネガティブ変異体の作用機構は？
(回答) ダイナミンは GTP と結合、加水分解し、それに伴う構造変化によって小胞を膜から切り離す。ダイナミン K44A は GTP 結合部位に変異を持ち、GTP に結合できないため構造変化を起こせず、ドミナント・ネガティブ効果を示す。
- 質問 16) p120 をノックダウンした実験結果、すなわち論文中の図 7 のデータは有意差があるか？
(回答) 有意差はない。
- 質問 17) 今回の研究で、MDCK 細胞を使用した理由は？
(回答) MDCK 細胞は細胞内輸送機構が発達した細胞で研究例も多いので使用した。
- 質問 18) p120 が結合できない EEA という変異体はリソソームに行かないのか？
(回答) リソソームで分解を受けるが、ワイルドタイプに比べて早いわけではない。
- 質問 19) p120 をノックダウンしたときにカドヘリンはリソソームで分解されているのか？
(回答) 膜から取り込まれた E-カドヘリンはリソソームで分解されるという報告がある。

以上の結果から、5名の審査委員は申請者が大学院博士課程修了者としての学力・識見を有しているものと認め、博士(医学)の学位を与えるに足る資格を有するものと認定した。