

学位論文題名

Clathrin-mediated Endocytosis of Mammalian Erythroid
AE1 Anion Exchanger Regulated by the Tyrosine-based
YXXΦ Motif in the N-Terminal Stretch(N末端ストレッチ内YXXΦモチーフに依存する哺乳動物赤血球型
アニオン交換輸送体AE1のクラスリン介在性エンドサイトーシス)

学位論文内容の要旨

赤血球の主要膜内在性タンパク質であるアニオン交換輸送体1 (AE1、赤血球型 AE1 = band 3) は、アンキリンやアデューシンとの結合を介してスペクトリン-アクチン膜骨格を脂質二重層に連結し、赤血球膜が物理的安定性を維持するうえで不可欠の役割を果たしている。赤血球膜構造は好塩基性赤芽球以降の赤芽球成熟過程で形成される。AE1 の膜構造への組み込みの仕組みは不明であるが、時期特異的な AE1 の膜への輸送、あるいは膜から細胞内小胞へのエンドサイトーシスが生じるとされる。本研究では、特にエンドサイトーシスに焦点をあて、これに関わる AE1 の分子内シグナルを明らかにすることを目的とした。そのために、N末端に enhanced green fluorescent protein (EGFP)、4 番目の細胞外ループ(EC4)に FLAG エピトープを付加したマウス AE1 変異体(EGFP-mAE1Flag)を培養細胞に発現させ、共焦点顕微鏡や細胞表面タンパク質ビオチン化法などで、その細胞表面発現と動態の解析を行った。

まず第1章では、野生型マウス AE1 (mAE1)、ならびに mAE1 に EGFP、FLAG を付加した変異体(EGFP-mAE1、mAE1Flag、EGFP-mAE1Flag)の細胞膜発現を検討した。これらを HEK293 細胞に導入したところ、いずれも mAE1 と同様に細胞膜表面への輸送が観察された。興味深いことに、細胞表面の mAE1 と EGFP-mAE1 ではエンドグリコシダーゼ H (endo H)耐性の N-結合型糖鎖をもつ AE1 が 40%以下であったのに対し、mAE1Flag と EGFP-mAE1Flag のその割合は約 70%を占めた。これは、AE1 の膜発現にゴルジ体における糖鎖修飾が必ずしも必要ではないことを示すとともに、EC4 上の N-結合型糖鎖付加部位近傍への FLAG エピトープの導入が、修飾酵素による糖鎖修飾を受け易くする局所的な構造変化を生じたことを示唆している。一方、mAE1Flag と EGFP-mAE1Flag は HEK293、COS-1 各細胞で Cy3 標識抗 FLAG 抗体で細胞外から特異的に標識することができ、標識後のインキュベーションで EGFP-mAE1Flag は初期エンドソームへの取り込みを介してゴルジ体に移行することが示された。現段階では、ゴルジ体への輸送と FLAG 導入による N-結合型糖鎖修飾の促進との関連は不明である。

第2章では、赤血球型 AE1 に特異的な N 末端ストレッチ配列に種間で保存されている YXXΦ モチーフ配列(Y72VEL)に着目し、上記 EGFP-mAE1Flag とその変異体の K562、HEK293 各細胞におけるエンドサイトーシスを解析して、その役割を検討した。K562 細胞の表面に発現した EGFP-mAE1Flag は上記と同様に細胞内に取り込まれ、そのエンドサイトーシス小胞には、細胞に添加したトランスフェリンと K562 細胞に存在する AE1 のシャペロン様タンパク質 グライコフォリン A (GPA)が共存した。一方、EGFP-mAE1Flag に比べ、その Y72F 変異体のエンドサイトーシスには有意の遅延が認められた。したがって、EGFP-mAE1Flag のエンドサイトーシスが Y72VEL 配列の認識によるクラスリン介在性に生じることが示された。ところが、N 末端ストレッチを YXXΦ モチーフを欠く牛 AE1 由来配列に置換した bNt75 変異体は EGFP-mAE1Flag と同程度のエンドサイトーシス動態を呈した。そこで bNt75 の一連の欠失/置換変異体の動態を HEK293 細胞で解析した結果、牛 AE1 では YXXXΦ (Y7EDQL)配列が YXXΦ 配列と同様の役割を果たすことが示された。

これらの結果から、哺乳動物の赤血球型 AE1 は、その N 末端ストレッチ内の YXX(X)Φ 配列の認識によりクラスリン介在性のエンドサイトーシスで細胞表面からゴルジ体に輸送される性質をもつことが明らかになった。この知見は、AE1 の細胞膜構造への安定的組み込みに、アンキリン等、他のタンパク質との相互作用による YXX(X)Φ 配列依存性クラスリン介在性エンドサイトーシスの調節が関与することを示唆するものである。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 稲 葉 睦
副 査 教 授 木 村 和 弘
副 査 教 授 堀 内 基 広
副 査 准教授 佐 藤 耕 太

学位論文題名

Clathrin-mediated Endocytosis of Mammalian Erythroid AE1 Anion Exchanger Regulated by the Tyrosine-based YXX Φ Motif in the N-Terminal Stretch

(N末端ストレッチ内YXX Φ モチーフに依存する哺乳動物赤血球型
アニオン交換輸送体AE1のクラスリン介在性エンドサイトーシス)

赤血球の主要膜内在性タンパク質であるアニオン交換輸送体 1 (AE1、赤血球型 AE1 = band 3) は、アンキリン等のアンカータンパク質を介してスペクトリン-アクチン膜骨格を脂質二重層に連結し、赤血球膜が物理的安定性を維持するうえで不可欠の役割を果たしている。赤血球膜構造は好塩基性赤芽球以降の赤芽球成熟過程で形成される。AE1 の膜構造への組み込みの仕組みは不明であるが、時期特異的な AE1 の膜への輸送、あるいは膜から細胞内小胞へのエンドサイトーシスが生じるとされる。本研究は、特に AE1 のエンドサイトーシスに関わる分子内シグナルを明らかにすることを目的に、マウス AE1 組換えタンパク質を培養細胞に発現させ、その細胞表面発現と動態の解析を行ったものである。

まず第 1 章で、野生型マウス AE1 (mAE1)、ならびに mAE1 に enhanced green fluorescent protein (EGFP)、あるいは FLAG タグを付加した変異体(EGFP-mAE1、mAE1Flag、EGFP-mAE1Flag)を HEK293、COS-1 各細胞に導入して基礎的検討を行った。その結果、これらはいずれも細胞膜表面に発現すること、mAE1Flag と EGFP-mAE1Flag は Cy3 標識抗 FLAG 抗体で細胞外から特異的に標識できること、標識した EGFP-mAE1Flag が初期エンドソームへの取り込みを介してゴルジ体に移行することを示した。

さらに、細胞表面に分布する各 AE1 組換え体をもつ N-結合型糖鎖のエンドグリコシダーゼ H 感受性を検討して、ゴルジ体における糖鎖修飾が AE1 の膜発現には必ずしも必要ではないことを示すとともに、N-結合型糖鎖付加部位近傍への FLAG 配列の導入が、修飾酵素の作用を受け易くする局所的な構造変化を生じることが示唆された。この N-結合型糖鎖修飾の促進と、上記の細胞膜からゴルジ体への輸送との関連は残念ながら不明である。

第 2 章では、赤血球型 AE1 の N 末端配列にある YXX Φ モチーフ配列(Y72VEL)に着目し、K562 細胞、あるいは HEK293 細胞を用いて、EGFP-mAE1Flag とその変異体のエンドサイトーシスを検討した。K562 細胞の表面に発現した EGFP-mAE1Flag は上記と同様に細胞内に取り込まれた。そのエンドサイトーシス小胞には、培養液に加えた標識トランスフェリン、ならびに AE1 のシャペロン様タンパク質グライコフォリン A が共存した。また、EGFP-mAE1Flag の Y72F 変異体のエンドサイトーシスは EGFP-mAE1Flag のそれに比べて明らかな遅延を呈した。これらの知見から、EGFP-mAE1Flag のエンドサイトーシスが Y72VEL 配列に依存し、クラスリン介在性に生じることを明らかにした。さらに、Y72VEL に相当する YXX Φ モチーフをもたない牛 AE1 では、YXXX Φ (Y7EDQL)配列が YXX Φ 配列と同様の役割を果たすことを示した。

本研究の結果は、哺乳動物の赤血球型 AE1 が、その N 末端配列内の YXX(X) Φ 配列の認識によるクラスリン介在性のエンドサイトーシスを受ける性質をもつことを明らかにしたものである。この知見は、エンドサイトーシスの調節が赤血球型 AE1 の細胞膜構造への安定的組み込みに関与することを示唆したものであり、成熟赤血球の形成や赤血球膜物性変化をとまなう様々な疾患病態の解明に寄与することが期待される。したがって、審査員一同は、上記博士論文提出者王振吉の博士論文が北海道大学大学院獣医学研究科規程第 6 条の規定による本研究科博士論文審査等に合格と認めた。