

氏 名 奈 良 篤 樹

学位（専攻分野） 博士(理学)

学 位 記 番 号 総研大甲第611号

学位授与の日付 平成14年3月22日

学位授与の要件 生命科学研究科 分子生物機構論専攻

学位規則第4条第1項該当

学 位 論 文 題 目 Regulation of Sorting and Transport in Endosomes:

Studies on SKD1

論 文 審 査 委 員 主 査 教授 西村 幹夫
教授 大隅 良典
助教授 吉森 保
教授 大野 博司 (金沢大学)

Endosomes act as sorting platforms for multiple membrane traffics in eukaryotic cells. Endocytic pathway begins with internalization of extracellular or plasma-membrane proteins. The internalized proteins rapidly enter into endosomes and finally deliver to lysosomes, or recycle back to the plasma membrane. Newly synthesized lysosomal proteins are delivered from the endoplasmic reticulum via Golgi apparatus and endosomes to lysosomes. Furthermore, there is convergence between endocytic pathway and autophagy, a membrane-bound transport process delivering cytoplasmic contents to lysosomes. Thus, complicated sorting transports occur in endosomes and endosomes serve many cellular functions and structure by these transports. However, in contrast to detailed analyses on the process from cell surface to early endosomes, the events in endosomes is still unclear. To attain more understanding of role of endosomes and molecular mechanisms underlying sorting transport in them, he started the analysis of the mouse SKD1 protein at the graduated school. SKD1 is a member of the AAA (an ATPase associated with cellular activities) family whose yeast homologue, Vps4p, is implicated as a molecule regulating endosome-vacuole membrane trafficking in yeast. SKD1, therefore, is a candidate for a new molecule involved in endosomal trafficking in mammalian cells.

To investigate the function of SKD1, he constructed the mutant SKD1 (SKD1^{E235Q}) by exchanging the conserved ATPase hydrolysis site, from glutamic acid to glutamine. The mutation was expected to insert dominant negative effects from studies on other AAA proteins. While green fluorescent protein (GFP)-tagged SKD1 localized over the cytoplasm, GFP-SKD1^{E235Q} showed not only diffused pattern but also punctate pattern in the perinuclear region. These GFP-SKD1^{E235Q}-positive compartments (named E235Q-compartments) accumulated transferrin receptor (TfR) that recycles from endosomes to the surface, endocytic tracers such as dextran, and various endosomal membrane markers. In electron microscopy, the E235Q-compartment was an exaggerated and tubulo-vesicular membrane structure, decorated with SKD1^{E235Q} proteins. These results suggest that overexpression of SKD1^{E235Q} causes a dominant negative effect on structure and transport functions of endosomes.

After internalization into cells, epidermal growth factor (EGF) was delivered to lysosomes via endosomes and degraded. By fluorescence microscopy, he found that the endocytosed EGF was also accumulated in the E235Q-compartments and its degradation was inhibited. This rose a possibility that overexpression of the mutant SKD1 affects the transport to lysosomes from endosomes. To examine this quantitatively, he established high expression system mediated by recombinant adenovirus. Consistent with the result of morphological analysis, [¹²⁵I]-EGF intracellular degradation was severely inhibited in the mutant protein-overexpressing cells. Internalization of [¹²⁵I]-EGF was normal, suggesting that transport of EGF to lysosomes was inhibited or degradation of [¹²⁵I]-EGF delivered to lysosomes was inhibited. To determine which is true, he established the endosome-lysosome transport assay system using HRP-biotin as a marker for lysosomes and streptavidin as an endocytosed cargo marker. Compared with control cells, transport of streptavidin from endosomes to lysosomes was clearly inhibited in cells overexpressing

the mutant SKD1.

These results indicate that SKD1 regulates sorting and/or outgoing transport in endosomes. His several experiments suggest that the overexpressed mutant SKD1 forms a complex with endogenous SKD1 and the complex is tightly associated with endosomal membranes, resulting in the dominant negative effects. Perhaps, oligomers consisting of wild-type SKD1 are transiently associated with endosomes to play a role in the sorting transport.

He next discovered inhibition of autophagic degradation in cells overexpressing the GFP-SKD1^{E235Q}. In autophagy, autophagosomes transiently emerge and surround a portion of the cytoplasm and organelles, and then autophagosomes fuse with lysosomes to degrade the contents. Accumulation of autophagosomes in cells overexpressing GFP-SKD1^{E235Q} was observed by electron microscopy, whereas few autolysosomes were formed. These results suggest that fusion of autophagosomes with lysosomes is inhibited in cells overexpressing the mutant SKD1. Since distribution of the mutant SKD1 was distinct from that of autophagosomes, it is unlikely that SKD1 directly act on autophagosomes. One possibility for inhibition of autolysosome formation is that overexpression of the mutant SKD1 causes blockade of the endosome-autophagosome transport, which supplies some component essential for autophagosome-lysosome fusion. To investigate this possibility, he examined localization of the lysobisphosphatidic acid (LBPA), which is mainly distributed in late endosomes and becomes associated with autophagosomes if autophagy was induced. In cells overexpressing the mutant SKD1, LBPA was not colocalized with autophagosomes but accumulated in the E235Q compartments. This suggests that LBPA is delivered to autophagosomes depending on SKD1 function. The effect of the mutant SKD1 on endosomal transport was detected at 1.5 hours prior to autophagosome accumulation, supporting that inhibition of autophagy is due to impairment of endosomal functions.

Altogether, he concluded that SKD1 is a novel regulatory protein in endosomal sorting transport of various cargoes. Moreover, he produced a first functional evidence that that transport from endosomes to autophagosomes is required for the autophagic process.

論文の審査結果の要旨

真核細胞のエンドソームは、細胞内膜輸送系の中継基地として、輸送されてきた様々な分子を選別し各目的地に向け送り出すことで細胞の基本的活動を維持すると同時に、生体高次機能の発揮にも貢献している。しかし、エンドソームにおける選別と輸送の分子メカニズムについては今だ不明の点が多い。申請者の共同研究者らは、AAA ATPase ファミリーに属するマウス蛋白質 SKD1 に点突然変異を導入した SKD1^{E235Q} を培養細胞に発現させると、エンドソームが異常に肥大しそこに被輸送分子が蓄積することを示した。申請者は、SKD1 がエンドソームの輸送機能を制御している可能性を検討すべく更に解析を進めた。

まず、定量的な解析を可能にするため、変異 SKD1 を全細胞で発現させるシステムをアデノウイルスを用いて構築した。この発現系を用いた解析から、変異 SKD1 発現細胞では、リソソームが存在するにもかかわらず上皮成長因子 (EGF) やカテプシン D のエンドソームからリソソームへの輸送が阻害されていることを強く示唆する結果を得た。そこでさらに、ビオチン化 HRP とアビジンを用いてこの輸送を直接評価するアッセイ系を確立し、変異 SKD1 発現によりエンドソーム〜リソソーム輸送が阻害されることを立証した。以上の結果は、SKD1 がエンドソーム〜リソソーム輸送を制御する因子であることを初めて示すものである。

次に申請者は、変異 SKD1 がオートファジーによる蛋白質分解を強く阻害することを初めて見出した。オートファジーとは、細胞質の一部がオートファゴソームに取り囲まれ、その後オートファゴソームとリソソームが融合してオートリソソームとなって内容が分解される現象である。変異 SKD1 発現細胞では、オートリソソーム形成が低下しオートファゴソームが蓄積しており、SKD1 がオートファゴソームとリソソームの融合に関わることが示唆された。さらには、エンドソームからオートファゴソームへの輸送が阻害されていることも明らかにし、その輸送により融合に必要な因子が供給されている可能性を示した。

以上のように本研究は、SKD1 がエンドソーム輸送の分子機構解明の鍵となると思われる制御蛋白質であることを世界に先駆け示したものであり、とりわけオートファジーへの関与を初めて示した点は評価される。これらの成果の一部は、Cell Struct. Funct. 誌に掲載が予定されている。本研究は、エンドソーム機能の理解を大きく前進せしめる重要なものであり学位論文として十分な内容を持つと判定された。

論文に関連する事項及び細胞内膜輸送の関する質疑がなされ、本研究に対し十分な考察がなされ、当該分野全般を良く理解していることが確認された。本論文が適正な英文で記述されており、また本研究内容の掲載論文が国際誌に受理されていることから、申請者の英語能力は博士に相応しいと判断された。以上、審査委員は一致して、申請者・奈良篤樹氏が学位授与に足る学識と能力を持つと結論した。