



Regulation of clathrin dependent endocytosis by diacylglycerolkinase δ - importance of kinase activity and binding to AP2 α .

川崎, 拓実

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2008-03-25

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲4297

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1004297>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



氏 名	川崎 拓実
博士の専攻分野の名称	博士（医学）
学 位 記 番 号	博い第 1897 号
学位授与の 要 件	学位規則第 5 条第 1 項該当
学位授与の 日 付	平成 20 年 3 月 25 日

【 学位論文題目 】

Regulation of clathrin dependent endocytosis by diacylglycerolkinase δ - importance of kinase activity and binding to AP2 α .(ジアシルグリセロールキナーゼ δ によるクラスリン依存性エンドサイトーシスの制御機構の解明ーキナーゼ化活性と AP 2 α との結合の重要性について)

審 査 委 員

主 査	教 授	中村 俊一
	教 授	伊藤 俊樹
	教 授	古瀬 幹夫

【序論】

エンドサイトーシスとは、ホルモン、受容体など様々なシグナル伝達に関わる物質を細胞内に取り込むための、経路である。エンドサイトーシスがおきるためには、シート状の細胞膜が管入し、脂質の管ができ、管が切断され、最終的に小胞となって細胞内に運ばれる必要がある。エンドサイトーシスの進行には、個々の過程において、特異的なタンパク質が集合し役割を果たすことが必要であることがあきらかになってきた。いくつもある細胞内に取り込む経路のうち、クラスリンタンパク質により脂質膜が被覆され、過程が進行するものをクラスリン依存性エンドサイトーシスと呼ぶ。

このエンドサイトーシスの進行に関わるタンパク質を集めたり、膜の形を変化させるためには、膜の構成成分である脂質自体も非常に重要な役割を果たしている。さらに、脂質を代謝させるタンパク質群も、適切にエンドサイトーシスを進行させるために重要な役割をはたしている。

ジアシルグリセロールキナーゼ(DGK)は細胞膜上にあるジアシルグリセロール(DG)をフォスファチジン酸(PA)に変換するリン酸化酵素である。DGK は多くの組織で発現しており、進化上、保存性も高く、まだ多くの未知の生理的役割があると考えられる。近年の RNAi を利用した網羅的な解析からエンドサイトーシスに関わるタンパク質が探索され、これまで報告されてこなかった DGK がクラスリン依存性エンドサイトーシスに関与することが示唆された。そこでエンドサイトーシスにおける DGK の役割とその作用メカニズムを明らかにするために本研究を行った。

【結果】

DGK はこれまで 11 のサブタイプが存在することが知られているが、そのサブタイプのうち DGK δ が特異的にクラスリン依存性エンドサイトーシスに関与することが報告された。まず、エンドサイトーシスの定量的ために、Alexa488 標識したトランスフェリンを細胞 (HeLa, HEK 293) に取り込みませ、洗浄後、蛍光プレートリーダーにより細胞が取り込んだ蛍光強度を定量することにより行った。その結果、DGK δ の RNAi を用いたノックダウンにより特異的にトランスフェリン取り込みの抑制が認められた。

さらに DGK δ による制御機構を明らかにするために、DGK δ を発現させクラスリン被覆小胞との共局在を調べたところ、一部で共局在することがわかった。そこで、クラスリン依存性エンドサイトーシスに関わるタンパク質との結合モチーフを検索したところ、DGK δ の配列内に、AP2 α との結合モチーフが存在していることがわかった。AP2 α は主に受容体とクラスリンタンパク質間の結合を仲介する役割を果たしている。また、クラスリンだけでなく、エンドサイトーシスの進行に関わる多くのタンパク質をレセプターと結びつなげる重要なタンパク質として知られている。

実際に強制発現系を用いた免疫沈降と精製した AP2 α の結合ドメインを用いた pull-down assay により、確かに DGK δ が AP2 α と結合することがわかった。また、内因性の DGK δ と AP2 α の結合は DGK δ の特異的抗体を用いた免疫沈降により確認することができた。さらに、この結合は AP2 α 内にある結合ポケットに変異を加えることにより結合が消失したことから、特異的な結合を介していることがわかった。反対に、DGK δ 内にある予想される結合モチーフに変異をくわると、確かに AP2 α との結合が優位に弱くなることがわかった。以上の結果から DGK δ が特異的に AP2 α と結合すること、DGK δ 内の結合モチーフが確かに

結合に寄与していることがわかった。

しかし、これまでの結果では **DGK δ** の **AP2 α** との結合がエンドサイトーシスにどのような役割をはたしているかは不明である。そこで、**AP2 α** との結合が弱くなった **DGK δ** が、ノックダウンした細胞のエンドサイトーシスが復帰できるかを検討した。その結果、**DGK δ** をノックダウンするとトランスフェリンの取り込みが抑制されるが、**Wild type** の発現により取り込みが復帰し、結合が現弱するいずれの変異体も復帰できなかった。さらにリン酸化活性を欠失している変異体でも取り込みを復帰することができなかった。また、同様の結果は **EGF** を用いて取り込み量を定量した場合でも得られた。以上の結果をまとめると、クラスリン依存的なエンドサイトーシスには **DGK δ** のリン酸化活性と **AP2 α** への結合が重要であることがわかった。

【結論】

トランスフェリンを指標としたクラスリン依存性エンドサイトーシスの取り込み量は、**DGK δ** のノックダウンにより確かに抑制された。**DGK δ** による制御機構を明らかにするため、まず細胞染色により **DGK δ** とクラスリン被覆小胞との局在を調べたところ、一部で共局在を観察できた。このことはクラスリン小胞形成たんぱく質と **DGK δ** との結合を示唆しており、結合モチーフを探索したところ **AP2 α** との結合モチーフが存在することがわかった。実際、免疫沈降と pull down 実験により **DGK δ** と **AP2 α** と結合していることがわかった。また、この **DGK δ** の **AP2 α** との結合はクラスリン依存性エンドサイトーシスに必要であることを復帰実験によって明らかにした。さらに、**AP2 α** との結合だけでなくそのキナーゼ活性も必要であることを証明した。

以上のことは、**DGK δ** が **AP2 α** を介してクラスリン被覆小胞に局在することが、クラスリン依存的エンドサイトーシスの制御に重要な役割を果たしていることを示している。さらに、**AP2 α** を介してクラスリン被覆小胞にリクルートした **DGK δ** は、そこでジアシルグリセロールをフォスファチジン酸に変換することで取り込みを制御していると考えられる。

論文審査の結果の要旨			
受付番号	甲 第1894 号	氏 名	川崎拓実
論文題目 Title of Dissertation	Regulation of clathrin dependent endocytosis by diacylglycerol kinase δ -importance of kinase activity and binding to AP2 α ジアシルグリセロールキナーゼ δ によるクラスリン依存性エンド サイトーシスの制御機構の解明ーキナーゼ活性と AP2 α との結合 の重要性について		
審査委員 Examiner	主 査 中村 俊一 Chief Examiner 副 査 古瀬 幹夫 Vice-examiner 副 査 伊藤 俊樹 Vice-examiner		
審査終了日	平成 20 年 2 月 7 日		

(要旨は1,000字～2,000字程度)

エンドサイトーシスとは、ホルモン、受容体など様々なシグナル伝達に関わる物質を細胞内に取り込むための、経路である。エンドサイトーシスの進行には、個々の過程において、特異的なたんぱく質が集合し役割を果たすことが必要であることがあきらかになってきた。また、このエンドサイトーシスの進行に関わるタンパク質を集めたり、膜の形を変化させるためには、膜の構成成分である脂質自体も非常に重要な役割を果たしている。さらに、脂質を代謝させるたんぱく質群も、適切にエンドサイトーシスを進行させるために重要な役割を果たしている。

ジアシルグリセロールキナーゼ(DGK)は細胞膜上にあるジアシルグリセロール(DG)をフォスファチジン酸(PA)に変換するリン酸化酵素である。DGKは多くの組織で発現しており、進化上、保存性も高く、まだ多くの未知の生理的役割があると考えられる。近年のRNAiを利用した網羅的な解析からエンドサイトーシスに関わるたんぱく質が探索され、これまで報告されてこなかったDGKがクラスリン依存性エンドサイトーシスに関与することが示唆された。そこでエンドサイトーシスにおけるDGKの役割とその作用メカニズムを明らかにするために本研究を行った。

DGKはこれまで1.1のサブタイプが存在することが知られているが、そのサブタイプのうちDGK δ が特異的にクラスリン依存性エンドサイトーシスに関わることが報告された。まず、エンドサイトーシスの定量のために、蛍光標識したトランスフェリンを細胞(HeLa, HEK 293)に取り込みませ、洗浄後、細胞が取り込んだ蛍光強度を定量することにより行った。その結果、DGK δ のノックダウンにより特異的にトランスフェリン取り込みの抑制が認められた。さらにDGK δ を発現させクラスリン被覆小胞との共局在を調べたところ、一部で共局在することがわかった。そこで、実際に強制発現系を用いた免疫沈降と精製したAP2 α の結合ドメインを用いたpull-down assayにより、確かにDGK δ がAP2 α と結合することがわかった。また、内因性のDGK δ とAP2 α の結合はDGK δ の特異的抗体を用いた

免疫沈降により確認することができた。さらに、この結合は AP2 α 内にある結合ポケットに変異を加えることにより結合が消失したことから、特異的な結合を介していることがわかった。反対に、DGK δ 内にある予想される結合モチーフに変異を加えると、確かに AP2 α との結合が優位に弱くなることがわかった。以上の結果から DGK δ が特異的に AP2 α と結合すること、DGK δ 内の結合モチーフが確かに結合に寄与していることがわかった。

しかし、これまでの結果では DGK δ の AP2 α との結合がエンドサイトーシスにどのような役割をはたしているかは不明である。そこで、AP2 α との結合が弱くなった DGK δ が、ノックダウンした細胞のエンドサイトーシスが復帰できるかを検討した。その結果、DGK δ をノックダウンするとトランスフェリンの取り込みが抑制されるが、Wild type の発現により取り込みが復帰し、結合が減弱したいずれの変異体も復帰できなかった。さらにリン酸化活性を欠失している変異体でも取り込みを復帰することができなかった。また、同様の結果は EGF を用いて取り込み量を定量した場合でも得られた。

以上の結果から、DGK δ が AP2 α を介してクラスリン被覆小胞に局在することが、クラスリン依存的エンドサイトーシスの制御に重要な役割を果たしていることが明らかになった。さらに、AP2 α を介してクラスリン被覆小胞にリクルートされた DGK δ は、そこでジアシルグリセロールをフォスファチジン酸に変換することで取り込みを制御していると考えられた。

本研究は、エンドサイトーシスに於ける DGK δ の重要性を初めて明らかにしたものであり、細胞内顆粒輸送を理解する上で重要な知見を得たものとして価値ある集積と認める。よって、本研究者は、博士（医学）の学位を得る資格があると認める。