

Title	小胞輸送におけるオルガネラ型Na ⁺ /H ⁺ 交換輸送体(NHE6)の役割
Author(s)	婁, 欣瀚
Citation	大阪大学, 2012, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/2701
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

小胞輸送におけるオルガネラ型 Na^+/H^+
交換輸送体(**NHE6**)の役割

生体膜機能学研究室

ロウ シンハン

婁 欣瀚

目次

第 1 章 序論	<u>33</u>
第 2 章 エンドサイトーシスにおける哺乳類 Na ⁺ /H ⁺ 交換輸送体 アイソフォーム 6 (NHE6) の役割	<u>1616</u>
第 3 章 エンドサイトーシスにおける HeLa 細胞の NHE6 の 過剰発現の影響	<u>2626</u>
第 4 章 トランスフェリンエンドサイトーシスの早期ステップに おける Na ⁺ /H ⁺ 交換輸送体 (NHE6) の機能解析	<u>3434</u>
第 5 章 総括と展望	<u>4141</u>
第 6 章 材料と方法	<u>4747</u>
謝辞	<u>5252</u>
文献	<u>5353</u>

略号

NHE: Na⁺/H⁺ exchanger (Na⁺/H⁺交換輸送体)

Nha: Na⁺/H⁺ antiporters (Na⁺/H⁺対向輸送体)

TGN: Trans Golgi Network (トランスゴルジネットワーク)

TfnR: Transferrin Receptor (トランスフェリン受容体)

EEA1: Early endosome antigen1(初期エンドソーム抗原タンパク質1)

LAMP2: Lysosome associated membrane protein 2 (リソソーム結合型膜タンパク質2)

FITC: Fluorescein isothiocyanate (フルオレセインイソチオシアネート)

ROI: Region of interest (解析対象領域)

EGF: Epidermal growth factor (上皮成長因子)

LDL: Low density lipoprotein (低密度リポタンパク質)

pHi: intraorganellar pH (オルガネラ内部pH)

CCP: Clathrin coated pit (クラスリン被覆ピット)

CCV: Clathrin coated vesicle (クラスリン被覆小胞)

PBS: Phosphate buffer saline (リン酸塩緩衝液)

第1章 序論

1-1 細胞内イオン環境と細胞機能

細胞は生物の最小単位として知られている。細胞は細胞膜に包み込まれており、細胞膜により細胞内と細胞外空間に分けられる。細胞の内外は化学物質の水溶液で充満されているが、それぞれが含む物質の種類と濃度は異なることが既に知られている。例えば、イオンの濃度から見ると、細胞外の Na^+ の濃度は約 145 mM に対し、細胞内には 5-15 mM しかない。それとは対照的に、 K^+ の濃度は細胞外では 5 mM であるのに対し、細胞内では 140 mM である。それ以外のイオンも細胞内外でほぼ一定濃度に保たれている。 H^+ の濃度 (pH) は、細胞外は平均的には pH 7.4 であるが、細胞質では 7.2 に維持されている。

これまでの様々な研究より、細胞膜の内外で異なるイオン環境を維持することが細胞の分化 [1] など種々の細胞生理現象に関与することが示されてきた [2-5]。その代表例として、成長と増殖、代謝での重要性が示されている [6,7]。

1-2 オルガネラのイオン環境とオルガネラの機能

前述のように細胞は膜に囲まれているが、さらに、真核生物細胞の内部にはたくさんの小胞状の細胞小器官 (オルガネラ) が存在している。これらの小器官もオルガネラ膜に包まれていて、オルガネラ内空間は、外部とは異なる物質の組成からなる環境になっている。特に、pH は、オルガネラ間で異なった値を示す [8,9] (Fig. 1-1)。小胞体の pH は細胞質とほぼ同じであるが、ゴルジ体は約 pH 6.5 であり、トランスゴルジネットワーク (TGN) や分泌小胞では pH 6 付近にまで低下する。また、エンドソーム系オルガネラでは初期エンドソームからリサイクリングエンドソームは約 pH 6.5、後期エンドソームでは約 pH 6.0 となり、リソソームでは pH 5.5 あるいはより酸性となる。この

ようにオルガネラが固有の pH の値をとることは、オルガネラに特異的な酵素の至適条件を実現するといった役割のほかに、近年では細胞膜やオルガネラ間での物質輸送に重要であることが明らかになりつつある。例えば、オルガネラ酸性化をつかさどるプロトンポンプの **V-ATPase** を阻害すると、様々な細胞内輸送に異常を来すことが知られている。細胞膜やオルガネラ間での物質輸送は細胞外物質の取り込みや、分泌だけでなく、情報伝達にも重要であることが知られており、オルガネラ pH の制御機構は、細胞の生理機能にとって重要である。

1-3 オルガネラ膜を介した物流システム — メンブレントラフィック

前述のように、オルガネラ pH の制御は、細胞内のオルガネラを介した物質輸送に重要である。近年では、これらの輸送はメンブレントラフィックとも呼ばれる。つまり、形質膜とオルガネラの間、あるいはオルガネラ同士の間で、分子が膜に組み込まれた形、あるいは膜でできた袋に詰め込まれた形で移動すること、さらに、その移動を実現するための選別などの細胞内部の物流制御システムを総称して、メンブレントラフィックと呼ぶ[10,11]。

膜タンパク質や分泌タンパク質の輸送は、主に膜で出来た小胞を介することが多いため、小胞輸送(**vesicular transport**)とも呼ばれるが、実際には小胞ではなく筒状の膜構造や不定形の膜ドメインの突出など必ずしも小胞とはいえない構造体が多く関与するため、現在では膜を介した細胞内輸送システムには、メンブレントラフィックという言葉が使われるようになってきている。

1-3-1 合成された物質の細胞外へのメンブレントラフィック

メンブレントラフィックを具体的に見ると、大きく2つの流れが存在する。ひとつは、細胞で新しい合成されたタンパク質などを細胞外(細胞表面の特定場所)に運び出す(分泌)の経路であり、もう一つは外部からの物質の取り込みの経路である (Fig. 1-1)。膜タンパク質や分泌タンパク質は、小胞体で、小胞体膜あるいは内腔に組み込まれる。小胞体膜の一部は突出するように形を変え、ゴルジ体に輸送されるタンパク質を集積した小胞を形成する。その小胞はゴルジ体と融合し、タンパク質はゴルジ体でさらに修飾を受け、成熟型へと変化する。続いて、タンパク質はゴルジ体からトランスゴルジネットワークといわれる膜オルガネラに移行し、最終的には分泌小胞に入る。分泌小胞は細胞膜と融合し、膜上のタンパク質は細胞膜に移行すると同時に、小胞の中身は細胞外部へと放出する。この最後のステップは開口放出(エキソサイトーシス)と呼ばれる。開口放出は、さらに以下の二つに分かれる。ひとつは、細胞で合成されたホルモン、神経伝達物質、消化酵素を分泌小胞内に蓄積し、のちに分泌する調節性分泌経路 (regulated secretory pathway) である。もう一方は、プロテオグリカンや糖タンパク質を細胞外マトリックスに直接分泌する構成的分泌経路 (constitutive secretory pathway) [12, 13]である。これらの経路の異常による多くの疾患が報告されている[14, 15]。

1-3-2 細胞外からの小胞形成による物質・膜タンパク質の取り込み

メンブレントラフィックの、もうひとつの流れは細胞外の物質の取り込みに関与する経路である (Fig. 1-1, C-D)。この経路は寿命を終えた細胞膜タンパク質を細胞内に取り込んで分解する場合にも使用される。また、シグナル伝達にも重要な役割を果たしている。例えば、細胞膜でシグナル分子と結合して活性化された受容体は、細胞内に取り込まれて分解されることでシグナルの発信を停止する仕組みが知られている。

このような、物質取り込み、あるいは膜タンパク質の取り込みのために、真核生物では細胞膜を内側に凹ませ、その内側への突出部の根元のくびれを切ることによって細胞内部側に小胞として取り込む。この小胞形成は、以下のように分類されている(Fig. 1-2)。

1-3-3-A. クラスリン依存的エンドサイトーシス

クラスリン依存的エンドサイトーシスは、細胞質にあるコートタンパク質であるクラスリンが集合して表面を覆った小胞、クラスリン被覆小胞小胞(**clathrin-coated vesicles (CCVs)**) (大きさは約**150-200 nm**)によって行われる。その過程はよく研究されており、次に示す複数のステップがあることが知られている。始めに、受容体などの膜タンパク質に結合するアダプタータンパク質(**adaptor protein**)とクラスリンが相互作用し、膜上にクラスリン被覆を形成する。次に、被覆された細胞膜が細胞質側に陥入する。続いて、陥入部の根元にダイナミンという**GTPase**が集合してくびれを形成し、最後にそのくびれ切断することで小胞が形成される[16] (Fig. 2-A)。ほとんどの細胞でこのプロセスが見られ、低密度リポタンパク質(**low density lipoprotein (LDL)**)[17]、トランスフェリン(**transferrin**) [18,19]、上皮細胞成長因子(**epidermal growth factor (EGF)**)[20]など、よく知られる受容体依存的エンドサイトーシスの多くがクラスリン依存的エンドサイトーシスに属する。また、クラスリン依存性の小胞形成は、物質の取り込みだけではなく、ゴルジ体からの分泌小胞の形成にも関わる[21]。

1-3-3-B. カベオラ依存的エンドサイトーシス

カベオラ依存的エンドサイトーシスでは、クラスリンではなく、コレステロール結合タンパク質であるカベオリン(**caveolin**)に依存して小胞が形成される(大きさ約**120 nm**)。カベオラ依存的エンドサイトーシスも、クラスリンに依存する系と同様に、細胞膜陥入時に生じるくびれの形成と切断にダイナミンが関与している。このカベオラ依存的エンドサイトーシスは、アルブミン(**albumin**) [22]やコレラ毒素(**Cholera toxin**)[23]などの取り込みに関与している(Fig. 2-B)。

1-3-3-C. マクロピノサイトーシスとファゴサイトーシス

マクロピノサイトーシスは飲作用ともよばれ、細胞外液体を含めてより大きなサイズ(約 0.2-10 μm)の高分子物質の取り込みに関与している[24](Fig. 2-C)。ファゴサイトーシスは食作用ともよばれ、死んだ細胞やバクテリアのような、より大きなサイズの物体(約 0.75 μm)を細胞が取り込む過程である。形成した小胞はそのままリソソームと合体し、物質は加水分解酵素により消化される[25](Fig. 2-D)。

1-3-3-D その他のエンドサイトーシス

最近では新たなエンドサイトーシスのプロセスが発見されている。例えば、Arf6 依存的[26]、flotillin 依存的 [27]エンドサイトーシスが挙げられる。これらのエンドサイトーシスは特定のリガンドを輸送していることがわかったが、既知の系と共通点・相違点を含め、不明な点がまだ多く残されている。

1-3-4 -取り込まれた物質のエンドソーム系オルガネラでの輸送

狭義では前述の小胞の形成による取り込みがエンドサイトーシスであるが、一般的には物質取り込みの経路全体をエンドサイトーシス(あるいはエンドサイトーシス経路)と呼ぶことが多い。

1-3-4-A 初期エンドソームとリサイクリングエンドソーム

クラスリンやカベオラ依存のエンドサイトーシスで細胞内に取り込まれた小胞は、初期エンドソームに融合する。初期エンドソームの内部 pH は約 6.5 程度であり、細胞外液に比べて、かなり酸性化されている(Fig. 1-1)。初期エンドソームは別名ソーティング(選別)エンドソームとも呼ばれ、細胞外から取り込まれた物質の行き先が、リサイクリングエンドソームか後期エンドソームへ向かうかに選別される。この選別は、エンドソーム内でリサイクリング、後期エンドソームに向かうタンパク質がそれぞれ集積したドメインを形成する過程で起こる(Fig. 1-1))。続いて、このドメインが分離し、リサ

イクリングあるいは後期エンドソームに成熟すると考えられている。初期エンドソームには低分子量 **GTPase** である **Rab5** やそのエフェクターである **EEA1** が局在するので、これらはマーカートンパク質として用いられている。

リサイクリングエンドソームは別名 **Perinuclear recycling compartment** とも呼ばれ、その名前の通り、核近傍に局在する。リサイクリングエンドソームは、細胞膜に再び輸送されるトランスフェリンや **LDL** (低密度リポタンパク質) の受容体を運搬することが知られている。特にトランスフェリン受容体は、その細胞内総量のうちの大半がこのリサイクリングエンドソームにある。リサイクリングエンドソームは、初期エンドソーム上で **Rab11** が局在するドメインから形成される。このような **Rab11** 陽性の“リサイクリングエンドソーム”のほかに、初期エンドソームから形成される **Rab4** 陽性コンパートメントを介したリサイクル(**rapid recycling**)経路の存在も知られている。

1-3-4-B 後期エンドソームとリソソーム

後期エンドソームでは内部 **pH** はかなり低下し、6ないしそれ以下に達する(**Fig. 1-1**)。また、後期エンドソームでは **Rab7** が特異的に局在している。その構造上の特徴は、膜内に多数の小胞を含んでいることである。そのため別名多胞体(**Multivesicular body**)とも呼ばれる。このようなオルガネラ内小胞は、エンドソーム膜上のタンパク質を分解するための仕組みであり、エンドソーム膜が内側に陥入して形成される。最終的には後期エンドソームはリソソームと融合し、内部の物質をリソソーム側へ放出する。

リソソームは細胞内の物質分解に重要な役割を果たすオルガネラである。その内部は **pH5.5** 以下の強い酸性であり、酸性を至適 **pH** とする多数の加水分解酵素を含んでいる。リソソームはエンドソーム経路の最終点であるが、細胞障害時などには直接細胞膜と融合し、内部の物質を放出することも知られている。また、メラニンを含んだ色素小胞や、免疫細胞でのヒスタミン・セロトニン

などの放出物質を含んだ小胞は、基本的には特殊化したリソソームである。これらは「分泌リソソーム」とも呼ばれている。

1-3-5 そのほかの経路

以上に述べたようにメンブレントラフィックは小胞体から細胞膜への「分泌経路」と、外部からの物質取り込みに関わる「エンドサイトーシス(リサイクリング、分解)経路」に大別されるが、この範疇に入らない経路も存在する。ひとつは「逆行輸送」とよばれるもので、通常の流れとは逆の方向への輸送である。例えば、コレラ毒素は、細胞膜からゴルジ体・小胞体へと輸送される。また、後期エンドソームからトランスゴルジネットワークにタンパク質を戻す輸送経路も知られており、リソソームへの物質輸送を助けるマンノース 6 リン酸受容体などがこの経路で輸送される。また、最近では、小胞体からゴルジ体を經由せずに細胞膜に輸送する経路など、通常と方向は同じだが途中をスキップして輸送する経路の存在も明らかになってきている。

1-4 オルガネラのイオン環境を制御する膜輸送タンパク質

前節で述べたように、オルガネラ間はメンブレントラフィックによって物質のやり取りが行われている。1-2節で述べたように、オルガネラ内部pH (pHi) 維持の破綻は輸送の異常を引き起こす。そのため、特異的なpH環境を維持することがオルガネラの機能維持と細胞内輸送にとって重要である。このような、pHを始めとしたオルガネラ内部のイオン濃度の調節を行うタンパク質がイオン輸送タンパク質である。

1-4-1 イオン輸送タンパク質の分類

イオン輸送タンパク質は生体膜上に局在していて、選択的にイオンを内側に取り込み、あるいは外側に排出することにより、内外のイオン環境を調節する。イオン輸送は受動輸送(**passive transport**)と能動輸送(**active transport**)に分けられる(**Fig.1-3**)。受動輸送は選択的にイオンを電気化学的勾配に沿った方向に輸送する。この種類の輸送を行うのはイオンチャネル(**ion channel**)や促進拡散/輸送 (**facilitated transport**)のトランスポーターである。一方、能動輸送はエネルギーが必要で、低濃度側から高濃度側に輸送できる。能動輸送は、さらにイオンポンプやABC輸送体を含む光や化学エネルギーなどを利用する一次性能動輸送体(**primary transporters**)と電気化学的勾配の差を利用する二次性能動輸送体(**secondary transporters**)に分けられる。二次性能動輸送体はさらに詳細に分類され、二つの異なる基質(イオン)を同方向に輸送する共輸送体(**symporter**)と対向に輸送する交換輸送体(**exchanger**または**antiporter**) がある[28-31]。

1-4-2 オルガネラの酸性化と pH 制御

これまでに述べてきたように、オルガネラの内部は酸性化されている。このような酸性化は、様々な分解酵素の活性化に重要である。また、分泌小胞では、水素イオンの濃度勾配を利用した対向輸送を行って、アミノ酸などの分泌物質を内部に取り込む。こうしたオルガネラ内部の酸性化は、プロトンポンプである**V-ATPase**によって担われている(**Fig. 1-4**)。このことは多くの実験によって証明されており、この**V-ATPase**の阻害によりオルガネラの内部pHが中性化し、またその状態では細胞内輸送も異常になることが示されている。さらに、**V-ATPase**の変異や欠損は、疾病や発生の初期段階での異常を引き起こすことも示されている。

V-ATPaseはプロトンポンプであり、この輸送によってオルガネラの内側が電氣的にプラスになる電位差が膜の内外に生じる。電位差はプロトンの輸送に伴い増大するため、結果としてプロトン輸送が阻害される。そのため、酸性化のためには、電位の解消が必要である。この電位の解消には**Cl-Channel (CLC)**ファミリーに属する塩素イオンチャネルや、**Golgi pH Regulator (GPHR)**

といった陰イオンチャネルが関与している(Fig. 1-4)。

一方、プロトンポンプによる酸性化だけでは、これまでに述べてきたようなオルガネラ特異的なpH維持機構は説明できない。前述したように、V-ATPaseの阻害剤を用いた場合に、オルガネラ内部と細胞質のpH差は速やかに解消されることから、オルガネラからプロトンが流出する経路の存在が予測される。そして、このプロトン流出とV-ATPaseによる内部へのプロトン流入が適切なバランスで制御され、オルガネラ内のpHが維持されていると推測される。

このプロトン流出経路に関与するタンパク質はこれまで不明であった。しかし、2000年ごろに、我々を含む複数のグループによって、オルガネラ型Na⁺/H⁺交換輸送体が同定された。我々はこのオルガネラ型Na⁺/H⁺交換輸送体を、オルガネラのプロトン流出経路を担うタンパク質の候補であるとして着目し研究しており、それについて次節で詳細に説明する。

1-5 Na⁺/H⁺交換輸送体(NHEs)の構造と機能

Na⁺/H⁺ exchanger (NHE) は二次性能動輸送体に属し、H⁺ と Na⁺を対向輸送する。NHE はバクテリア、植物、真菌類と哺乳類のほとんどの細胞・組織に発現し、現在までに 200 種類以上の NHE 遺伝子が発見されている[32]。共通な NHE の基本構造は、H⁺と Na⁺交換輸送を行なう10-12回の膜貫通ドメインを持つことである。

1-5-1 哺乳類の Na⁺/H⁺交換輸送体のアイソフォームと構造

哺乳類ではこれまでに、9種類の保存性の高いNa⁺/H⁺ exchanger (NHE1-9、遺伝子名はSLC9A1-9) [1, 32, 33]が同定された(Fig.1-5)。最近の研究によって、NHE10, 11と命名されたタンパク質も報告されているが、これらはNHE1-9とは配列・二次構造上の相同性が低く、別のサブファミリーに属する(遺伝子名 SLC9B1-2, SLC9C1-2, www.bioparadigms.org/slc/pdf/SLC09_2010-09-06.pdf)。従って本文ではNHE1-9をNHEと呼

称する。すべての哺乳類NHEは、イオン輸送に関与するN末端側の12回膜貫通領域(約500アミノ酸)と、C末端に親水性の領域(200-300アミノ酸残基)を持つ。親水的な部分は多数のタンパク質と結合することが知られており、活性や局在の制御に関わるものと考えられている。哺乳類NHEは、配列の相同性や細胞内局在から形質膜タイプのNHE1-5とオルガネラタイプのNHE6-9に、分類されている[34-36]。

1-5-2 哺乳類の Na^+/H^+ 交換輸送体によるイオン輸送の駆動力と方向性

NHEは二次能動輸送のトランスポーターであり、イオン濃度勾配を駆動力とする。高等動物の形質膜局在性NHEとオルガネラ局在性NHEでは、この駆動力が異なっていると考えられている。形質膜局在性NHEは Na^+/K^+ -ATPase によって形成される Na^+ の勾配(細胞外が高濃度)を駆動力とし、 Na^+ と H^+ の交換輸送を行い、pHと浸透圧と体積などを制御する[33]。一方、オルガネラ局在性NHEは我々のNHE8を用いた実験結果から、V-ATPaseによって取り込まれたオルガネラ内の H^+ と、細胞質の K^+ を交換輸送することで、局在するオルガネラのpHを制御し、特定のpHに維持する働きをしているのではないかと推測される(Fig. 1-5) [37-39]。

哺乳類NHEの12回膜貫通領域はイオン輸送に関わるドメインであるが、イオンの透過経路や結合部位・交換輸送のメカニズムなどについては、まだ詳細な仕組みはよくわかっていない。しかし、これらのアイソフォームである細菌のNhaのイオン輸送はよく研究され、膜貫通の第4, 5, 10, 11番のヘリックスがイオン交換輸送路を形成することや、 Na^+ や H^+ の推定結合部位が明らかにされている[40, 41]。

1-5-3 哺乳類の Na^+/H^+ 交換輸送体の局在とその制御

NHE1~5は形質膜に局在している、この形質膜への局在機構はNHE1でよく研究されている。我々の研究ではNHE1と結合する新たな因子calcineurin B homologous protein1 (CHP1)を発見している。この因子は、NHE1のC末端と結合し、NHE1の形質膜への局在とその活性に関わる

必須な因子であることが明らかになっている[42]。

NHE6-9は、それぞれ特定のオルガネラに局在しているのでオルガネラ型NHEとも呼ばれている。NHE6とNHE9は主に初期・リサイクリングエンドソームに局在し[38, 43]、NHE7とNHE8はそれぞれトランスゴルジネットワーク trans-Golgi network, (TGN)とゴルジ体に局在する[37, 38, 44] (Fig.1-3)。局在化の機構については、NHE6と NHE7が良く研究されている。我々はNHE6 をエンドソーム、NHE7をTGNに局在させる機構には、親水性領域の膜近傍領域が重要であることを示している [45]。また、オルガネラ型NHEは、一部は細胞膜に局在することが示されている。NHE6とNHE7は、複数の細胞種で、細胞膜に局在する[43,46-48]。さらに腎臓と腸管細胞においては、NHE8は、細胞膜の一部である刷子縁膜 (brush border membranes) に局在することが報告されている[49] (Table 1)。以上の事実より、オルガネラ型NHEは、単純にオルガネラに局在するだけでなく、オルガネラと細胞膜を往復していると考えられる。この細胞膜とオルガネラとの間の局在バランスを制御するタンパク質として、我々は receptor of activated C kinase 1 (RACK1) を同定している[47]。RACK1はNHE6、NHE7、NHE9と結合し、細胞膜への局在を促進している。その他、NHE7結合因子のsecretory carrier-associated membrane protein 2 (SCAMP2)はNHE7に結合し、エンドソームからTGN への局在化を促進することも報告されている[50, 51]。

1-5-4 哺乳類の Na⁺/H⁺交換輸送体の個体・細胞における生理機能

形質膜 NHE のうち、NHE1 はほとんどの細胞で発現しているが[33, 52]、NHE2-5 は特定の細胞でしか発現がみられない[35, 53-55] (Table1)。これらの NHE の生理機能は pH 制御以外に、細胞の容積制御や、増殖との関連などの報告がある[52]。また、虚血後の NHE1 の活性化は、虚血再灌流障害の原因であることが示されている[53, 56-58]。一方、オルガネラ型 NHE の機能が、細胞機能あるいは、個体レベルの生理機能とどのようにかかわっているかについての知見は限られている。一例として、カエル中耳前庭毛束細胞の細胞内 pH が NHE6 と NHE9 により制御されていることが報告されている[59]。

1-6 本研究の目的

以上のようにオルガネラ NHE は、オルガネラ pH の維持に関与していることが示唆されているが、その pH 維持が細胞の生理機能にどのような重要性を持っているかについてはほとんど不明である。

しかし、我々の先行研究より、オルガネラ NHE のうち NHE6 に関して、メンブレントラフィックに関与していることを示唆する結果を得ている。前述のように、NHE6 はエンドソームに主に局在しているが、一部は細胞膜にも局在する。我々は、このエンドソームと細胞膜との間の局在バランスの制御に、C 末端領域に結合する receptor of activated C kinase 1 (RACK1) が関与することを発見した。RACK1 の発現抑制時には、細胞膜の NHE6 量が減少しており、エンドソームの NHE6 は逆に増加すると考えられる。この時、エンドソーム pH のアルカリ側へのシフトが認められた。さらに、RACK1 の発現抑制時には、エンドサイトーシスで細胞内に取り込まれる代表的な物質であるトランスフェリンのエンドサイトーシスが阻害されていることが示された。[47]。一方、エンドソーム pH とトランスフェリンの取り込み量との関連性について、いくつかの報告が行われている。例えば、V-ATPase への阻害によりエンドソームの酸性化が阻害され、その結果トランスフェリンの取り込みが抑制されることが報告されている[60]。また、エンドソーム局在する Cl⁻/H⁺ exchanger (CLC-4) の発現抑制によりオルガネラ pH が異常となり、トランスフェリンの取り込みも阻害されるという報告がある[61]。このようにエンドソーム pH はトランスフェリンの細胞内輸送と密接な関係があると考えられる。従って、NHE6 が pH 制御機能を介して細胞のメンブレントラフィックに重要な役割を果たしているのではないかと考えた。

そこで、本研究では、哺乳類細胞の NHE6 が pH 調節機能を通じてメンブレントラフィックに関与することの証明を第一の目的とした。さらに、複雑である哺乳類のエンドサイトーシスのどのプロセスに、どのように NHE6 は関与するのかを解明することに目標を設定した。つまり、この研究課

題を通じて、本研究では、不明な点の多いオルガネラ型 NHE による pH 制御の生理的重要性を明らかにすることを目指した。

第2章 エンドサイトーシスにおける哺乳類 Na⁺/H⁺交換輸送体アイソフォーム6 (NHE6) の役割

2-1 序論

前章で述べたとおり、NHE6の局在を制御するRACK1の発現抑制によりNHE6は細胞膜上の量が半減し、トランスフェリンの取り込みも阻害されることが報告されている[47]。このことからNHE6がトランスフェリンのエンドサイトーシスに関わる可能性が考えられる。そこで、本章では、エンドサイトーシスにおけるNHE6の役割について調べた。その手法として、哺乳類細胞でのNHE6の発現抑制細胞を樹立し、様々な物質の取り込みへの影響を調べた。さらに、NHE6のエンドソームpH制御への寄与について解析するために、蛍光レシオイメージングによるエンドソーム内pH測定を行った。

2-2. 結果

2-2-1.NHE6 ノックダウン HeLa 細胞の樹立

RNA 干渉法により安定的に NHE6 の発現が抑制された HeLa 細胞 (NHE6 ノックダウン細胞) を樹立した (詳しい方法は Materials and methods を参照)。HeLa 細胞は、NHE6 の発現量が様々な細胞株のなかでも高く (当研究室、未発表データ)、細胞の生理的機能への寄与が大きいと推測される。また、HeLa 細胞はエンドサイトーシスが活発であり、エンドサイトーシスの研究のモデル細胞として多くの研究で用いられているので、エンドサイトーシスにおける NHE6 の機能の解析を行う本研究にも適していると考えられる。

NHE6 ノックダウン HeLa 細胞における NHE6 の発現量をウェスタンブロッティング法で解析した。比較対象として、哺乳類では標的遺伝子が存在しない大腸菌の LacZ に対するヘアピンRNA (マイクロRNA) を発現する細胞を樹立し、コントロール細胞とした。コントロール細胞では、NHE6 はそれぞれ約 66KDa のモノマーと、約 100KDa のグリコシル化モノマーと、200KDa のオリゴマーの

三本のバンドとして検出された (Fig. 2-1 A)。すべてのバンドはコントロールに比べ NHE6 ノックダウン細胞では減少していることがわかった (Fig. 2-1 A 上図)。バンドの濃さを定量した結果、コントロール細胞に比べて、ノックダウン細胞の NHE6 発現量は約15%にまで減少していることが判明した (Fig. 2-1 B)。なおウェスタンブロッティングによる発現量の定量は、同一メンブレン上に転写された段階希釈サンプルのシグナル強度の測定により、検量線を作成することで行った。また、解析に用いた細胞数が同等であることはアクチンの検出によって示した (Fig. 2-1 A 下図)。

NHE6 は主に初期およびリサイクリングエンドソームに局在している[38]。NHE6 の発現抑制がオルガネラの局在に与える影響を調べるために、これらエンドソームおよび、NHE6 が局在しない後期エンドソーム、リソソームにおける NHE6 の局在を、コントロールとノックダウン細胞で比較した。オルガネラの局在は、特異的局在タンパク質 (初期エンドソームは Early Endosome Antigen 1 protein (EEA1)、リサイクリングエンドソームはトランスフェリン受容体(Transferrin Receptor)、リソソームは Lysosomal-associated membrane protein 2 (LAMP2)) に対する抗体を用いて免疫染色法を行って、観察した。NHE6 の発現量については、NHE6 ノックダウン細胞はコントロールと比べ NHE6 の蛍光が低く、ウェスタンブロッティングによる検出と同様に NHE6 の発現抑制が確認された (Fig. 2-2 A 1 列目)。また、EEA1 (Fig. 2-2 A 2 列目) と LAMP2 (Fig. 2-2 A 4 列目) の局在に影響がみられなかった。しかしトランスフェリンレセプター (Fig. 2-2 A 3 列目) の局在は、細胞全体に比較的分散しているコントロール細胞に比べ、NHE6 ノックダウン細胞ではより中心部に集まっていることが観察された。写真の蛍光強度の定量 (Fig. 2-2 B) では、EEA1 と LAMP2 の強度はほとんど変化していなかった。トランスフェリンレセプターの局在は変化しているが細胞全体の蛍光強度は同じであった。さらに、これらのマーカータンパク質の発現量をウェスタンブロッティング法でも確認した結果 (Fig. 2-2 C)、コントロールと NHE6 ノックダウン細胞での上記マーカータンパク質の発現量は変化しないことがわかった。この結果から、NHE6 のノックダウンではエンドサイトーシス経路上の初期エンドソーム、後期エンドソームには影響をあたえないこと、および、リサイクリングエンドソームに対しては、その量には影響しないものの、局在には影響を与えることが示

唆された。

2-2-2. HeLa 細胞における NHE6 ノックダウンのトランスフェリンのエンドサイトーシスに与える影響

NHE6 は、トランスフェリンの細胞外からエンドソームへの取り込みを担っており、リサイクリングエンドソームと細胞膜を行き来することが既にわかっている。前節でみられた NHE6 ノックダウン細胞でのトランスフェリンレセプターの局在変化から、トランスフェリンレセプターあるいはトランスフェリンの輸送が影響されたのではないかと考えた。そこで、NHE6 ノックダウンによって、トランスフェリン受容体が担うトランスフェリンのエンドサイトーシスにどのような効果があるのかを調べた。

細胞のトランスフェリン取り込みを可視化するために、蛍光物質 Alexa Fluor 546 と結合しているトランスフェリンを用いた。蛍光ラベルしたトランスフェリンを加えた 37°C の培地中で、細胞にトランスフェリンを一定時間 (0 分から 30 分) 取り込ませた後に細胞を固定し、取り込まれたトランスフェリンを蛍光顕微鏡で観察した。各時間点において、各細胞の取り込み量を画像解析で定量した結果、NHE6 ノックダウン細胞のトランスフェリン取り込み量は減少していることがわかった (Fig. 2-3 A-B)。各時間点 (0 分から 30 分) で細胞を回収・破碎し、蛍光トランスフェリンを電気泳動で分離した後に、トランスフェリンの蛍光強度を定量した場合も同様の結果が得られ (Fig. 2-3 C-D)、30 分時点でコントロール細胞に比べて、NHE6 ノックダウン細胞ではトランスフェリン取り込み量は約 50% 減少したことが明らかになった。また、各時間点において、初期エンドソーム、リサイクリングエンドソーム及びリソソームの局在を観察したが、大きな変化は観察されなかった (データ示していない)。以上の結果から NHE6 ノックダウンはトランスフェリンの取り込みに影響を与えることがわかった。

次に、取り込んだトランスフェリンを細胞に排出すること、つまりエキソサイトーシスに対する NHE6 ノックダウンの影響を調べた。トランスフェリンを NHE6 ノックダウン細胞に 1 時間取り込ませた後、培地をトランスフェリンの入っていない培地に交換し、一定時間ごとに細胞内に残ったトラン

スフェリンの量の検出を検出した。NHE6 ノックダウン細胞はコントロール細胞に比べ、エキソサイトーシスや早くなるように観察されたが、統計的には有意でなく (Fig. 2-3 E)、取り込みの結果に比べて、排出には明確な差はみられなかった。従って、ノックダウンの効果は取り込み時に与える影響のほうが大きい。以上の結果をまとめると NHE6 はトランスフェリンのエンドサイトーシスに関与していることが明らかになった。

2-2-3. HeLa 細胞における NHE6 ノックダウンの上皮成長因子 (EGF) 低密度リポタンパク質 (LDL)、コレラ毒素 B サブユニット (CTxB) とデキストラン (Dextran) のエンドサイトーシスに与える影響

受容体依存的トランスフェリンの取り込みの減少が NHE6 ノックダウン細胞でみられたが、次に、トランスフェリン以外の物質の取り込みに NHE6 はどのような影響を与えるかを調べた。ここでは研究対象としてよく取り上げられている上皮成長因子 Epidermal Growth Factor (EGF)、低密度リポタンパク質 Low-Density Lipoprotein (LDL)、コレラ毒素 B サブユニット Cholera Toxin B subunit (CTxB)、デキストラン (Dextran) に着目した。EGF と LDL はそれぞれ受容体を介してクラスリン依存のエンドサイトーシスで取り込まれる点でトランスフェリンと共通している。CTxB はカベオラ依存的エンドサイトーシス、長大な糖鎖である Dextran は、マクロピノサイトーシスの系で取り込まれる。これらの取り込みを解析することで NHE6 のエンドサイトーシスにおける特異的、あるいは共通の役割を明らかに出来ると考えた。

EGF においては低濃度 (1 ng/ml) ではクラスリン依存的に取り込まれるが、高濃度 (50 か 100 ng/ml) ではクラスリン非依存的 (カベオラ依存) な経路も用いて細胞に取り込まれることが報告された [62-63]。低濃度 EGF の取込みを可視化するために、ビオチン化 EGF と蛍光物質 (Alexa Fluor488) ラベルされたstreptavidinの複合体を用いた。この EGF を、トランスフェリンと同様に 37°C で細胞を取り込ませた。さらに一定時間経過後 (0 分から 60 分) に細胞を固定し、取り込まれた EGF を蛍光顕微鏡で観察した。その結果、コントロールと NHE6 ノックダウン細胞での EGF

取り込みに大きな差は見られなかった(Fig. 2-4 A)。同様に EGF を取り込ませた細胞を破碎し、取り込まれた EGF 量を電気泳動後に蛍光検出器で定量した。蛍光物質はストレプトアビジン (60KDa)に結合しているため、そのバンドの蛍光強度を測定した(Fig. 2-4 B)。定量の結果、EGF の取り込みはコントロールと NHE6 ノックダウン細胞では差がないことが示された(Fig. 2-4 C)。

次に LDL の取り込みについて調べた。蛍光物質 BODIPYFL を結合している LDL を細胞に取り込ませ、経過時間(0分から60分)に細胞を固定し、取り込まれた LDL を蛍光顕微鏡で観察した結果(Fig. 2-4 D-E)、EGF と同様に取り込みの差は見られなかった。LDL の蛍光ラベルは LDL の脂質部分に行われているため、タンパク質の電気泳動による定量は行っていない。以上の結果をまとめると、クラスリン依存的取り込みにおいて NHE6 ノックダウンはトランスフェリンだけに影響を与えることが判明した。

続いて、クラスリン非依存的・カベオラ依存的なコレラトキシン B (CTxB) の取り込みについて述べる。前の実験と同様に蛍光物質 Alexa Fluor 488 と結合している CTxB を用い、37°Cに細胞を取り込ませ、一定時間経過後(0分から15分)に細胞を固定し、顕微鏡で取り込み量を検出した(Fig. 2-5 A-B)。その結果、各時間点において取り込みの差は見られなかった。取り込みを行った後に、その細胞抽出液を電気泳動で分離後、CTxB のバンドの強度を定量した結果でも差は見られなかった(Fig. 2-5 C)。これらの結果から、NHE6 のノックダウンはカベオラ依存的 CTxB 取り込みに影響しないことがわかった。

最後に Dextran の取り込みを調べた。蛍光物質(Rhodamine)でラベルされた Dextran を、0分から15分間細胞を取り込ませ観察した結果、各時間点において取り込みの差は見られなかった(Fig. 2-5 D-E)。NHE6 のノックダウンはマイクロピノサイトーシス依存的 Dextran の取り込みにも影響しないことがわかった。

以上のことから NHE6 はクラスリン・受容体依存的エンドサイトーシスのうち、トランスフェリンのエンドサイトーシスに特異的に関与することが明らかになった。

2-2-4. NHE6 ノックダウンによるエンドソーム内 pH および細胞質 pH への影響

NHE6 は、V-ATPase によって酸性化されたオルガネラ内部から、プロトンを外に漏出させ、オルガネラ内部のアルカリ化をすることでエンドソーム pH に関与すると考えられている。しかし、先に述べた NHE6 の発現阻害およびそれに伴うトランスフェリン取り込みの低下と、エンドソーム pH との関連性は不明である。そこで、エンドソーム内 pH の測定を行った。同時にプロトンの流出先である細胞質全体の pH 変化についても測定した。

エンドソーム内部 pH を測定する方法として、pH 感受性の色素である Fluorescein isothiocyanate (FITC) を付加したトランスフェリンと、pH 非感受性色素 Alexa Fluor 546 を付加したトランスフェリンを細胞に同時に取り込ませ、二つの色素の蛍光強度比を測定する方法を採用した (Fig. 2-6A)。まず、実際の pH 測定に先立ち、ラベルされたトランスフェリンがエンドソーム系に局在することの確認を行った。はじめに、蛍光ラベルされたトランスフェリンを十分に取り込ませた (1時間)。このとき、トランスフェリンは、EEA1 およびトランスフェリンレセプターと共局在すること (Fig. 2-6 B 2,3 列目)、及びノックダウン細胞でもその局在に大きな違いが無いことが証明できた。また、コントロール細胞では、NHE6 はトランスフェリンとよく共局在していた (Fig. 2-6B, 左列)。以上の結果から、NHE6 の存在する初期およびリサイクリングエンドソーム内部の pH を、トランスフェリンを利用して測定できると考えられた。続いて、pH 測定を行った。エンドソーム内 pH を測定するために上述のような pH 感受性、および非感受性色素を付加したトランスフェリンを細胞に同時に取り込ませ、二つの色素の蛍光強度比をレシオイメージング法により測定した。まず、検量線を作成するために、ラベルされたトランスフェリンを取り込ませ、細胞を固定した。その後、pH 5.0、5.3、5.8、6.3、6.8 の標準緩衝液 (イオノフォアであるナイジェリシンを含む) 中でさらに 10 分以上インキュベートし、蛍光強度比を測定した。その結果、直線的で良好な検量線が得られた (Fig. 2-6 C)。最後に、生理的な条件の緩衝液 Hanks' Balanced Salt Solutions (HBSS) 中で、生きた細胞に取り込まれたトランスフェリンの蛍光強度を測定し、検量線からエンドソーム内 pH を算出した (Fig. 2-6 D)。その結果、コントロール細胞の pH は約 6.5 であった。これは過去に行われたエンドソーム

ムの pH の報告とほぼ一致している。それに比べ、NHE6 ノックダウン細胞では pH は約 5.7 まで下がるのが判明した。エンドソームの pH 調節機能が低下し、V-ATPase によりエンドソーム内に取り込まれた H⁺を NHE6 によりエンドソーム外にリークできなくなり、pH が下がったと考えられる。

次に、pH 感受性色素 BCECF を用いて細胞質 pH の測定を行った。BCECF は、励起波長 500 nm と 440 nm で測定した 530 nm の蛍光強度比が pH に対応して変化することが知られている。そこで、pH 感受性 BCECF-AM を細胞に 30 分間取り込ませ、6.6、7.0、7.4 の pH 緩衝液(イオノフォアを含む)中で、蛍光強度比を測定して検量線を作成した(Fig. 2-7A) [64, 65]。さらに、生理的条件下の緩衝液中で蛍光強度比を測定した結果、コントロール細胞と NHE6 ノックダウン細胞の細胞質 pH は、両者ともとも約 7.1 であった。従って、NHE6 ノックダウン細胞は細胞質 pH には影響を与えないと考えられる。

2-3. 考察

NHE6 はクラスリン依存的トランスフェリンのエンドサイトーシスに特異的に関与する

本研究の対象である NHE6 はオルガネラ型の Na⁺/H⁺交換輸送体として知られていたが、私の所属する研究室によるこれまでの研究によって、細胞内輸送に関与することが示唆された[47,66]。しかし、NHE6 の直接阻害実験等を用いた直接的な証拠がなかった。そのため、本章では主に NHE6 の発現抑制により前章で述べた哺乳類の典型的なエンドサイトーシスに与える影響を調べた。

本章では RNA 干渉法を用い、HeLa 細胞の NHE6 発現を 15%まで抑えた細胞株を樹立した (Fig. 2-1)。この細胞を用い、様々な物質の取り込みを調べた結果、トランスフェリンのエンドサイトーシスだけに顕著な影響をあたえ (Fig. 2-3)、取り込みを低下させた。トランスフェリンと同じく、クラスリン依存的なエンドサイトーシスによって取り込まれる EGF と LDL には影響しなかった (Fig. 2-4)。なぜこうした違いが現れるのであろうか？ 鉄イオンと結合したトランスフェリンは細胞膜上の受容

体と結合し、小胞に乗って、細胞に取り込まれる。続いて、その小胞は初期エンドソームと融合する。トランスフェリンは、そのエンドソーム内部の酸性環境により鉄イオンを解離した後、受容体と結合したままでリサイクリングエンドソームに運ばれる。その後トランスフェリンと受容体は結合した状態で細胞膜に戻り、トランスフェリンは受容体から解離する。する(Fig. 2-8)。一方、EGF(低濃度の場合)の取り込みでは EGF は細胞膜上の受容体と結合し、クラスリン依存的にとりこまれ、初期エンドソームと融合し、その後は後期エンドソームに運ばれ、リソソームで分解されることが知られている(Fig. 2-8)。また、LDL は膜上の受容体と結合し、クラスリン小胞によって取り込まれる。続いて、初期エンドソームで LDL が受容体から解離され、LDL はリソソームで分解されるが、受容体はリサイクリングエンドソームに運ばれ、さらに膜に戻り、次の取り込みに備える(Fig. 2-8)。このように、トランスフェリン・EGF・LDL の取り込みは共通している部分もあるが異なる部分もある。また、クラスリン小胞に取り込まれる点は共通であるものの、すべてが同じクラスリン小胞で取り込まれているかどうかは不明であり、それぞれが特異的な小胞でエンドサイトーシスされている可能性もある。クラスリンを小胞にリクルートするアダプタータンパク質についても、すべてにおいて AP-2 の関与は示唆されているものの、EGF では Epsin-1、LDL には ARH1/Dab2 など特異的なタンパク質の関与も示されている(Fig. 2-8)[17, 20, 67, 68]。NHE6 がトランスフェリン特異的な関連タンパク質に影響を与える可能性や、あるいは、NHE6 がトランスフェリンの輸送される経路に特異的に局在している可能性も考えられる。

本章では、クラスリン依存的エンドサイトーシスに加え、クラスリン非依存的エンドサイトーシスも調べた。このようなエンドサイトーシスに分類されるものとして、カベオラ依存的エンドサイトーシスやマイクロピノサイトーシスやファゴサイトーシスなどが知られているが、近年では新たな経路も発見されている[69]。しかし、これらの経路に依存する物質取り込み機構はクラスリン依存的な機構に比べ、詳細は知られてない。本研究では、そのうちよく研究されているカベオラ依存的エンドサイトーシスの代表であるコレラトキシン B(cholera toxin B(CTxB))やマイクロピノサイトーシス依存的エンドサイトーシスの代表であるデキストラン(Dextran)を用い、NHE6 ノックダウンはこれらのエ

ンドサイトーシスにどんな影響を与えるかについて調べた。その結果、両方の取り込みに影響が見られなかった。CTxB はコレラ菌 (*Vibrio cholerae*) 由来の毒素タンパク質のサブユニットであり、細胞にカベオラ依存的エンドサイトーシスより取り込まれると、エンドソームとゴルジ体に經由し、一旦 ER まで輸送され、その後再びにゴルジ体に戻り、最後には分泌小胞に入る (Fig. 2-6)。この複雑な過程において、CTxB はエンドソームまで一旦運ばれるが、NHE6 ノックダウンの影響は受けなかった (Fig. 2-5、2-9)。同じく高濃度の EGF もカベオラ依存的エンドサイトーシスより取り込まれるが (Fig. 2-9)、NHE ノックダウンの影響は無かった (結果は示してない)。カベオラ依存的エンドサイトーシスとクラスリン依存的エンドサイトーシスでは、細胞膜上から輸送小胞が形成する時に異なるタンパク質が関与する。細胞に取り込まれたあとにはクラスリンと同じくエンドソームを通ることが多い。その他、多糖類デキストランはマイクロピノサイトーシスより取り込まれ、初期と後期 エンドソームに經由し、リソソームまで運ばれる (Fig. 2-9)。この過程も、NHE6 ノックダウンの影響は受けなかったことから (Fig. 2-5)、NHE6 は限られた特定のエンドサイトーシスに関与していると考えられる。NHE6 がどのステップでエンドサイトーシスに関与するかについては、第4章でさらに追求する。

NHE6 ノックダウンはエンドソーム pH に影響を与えるが、細胞質 pH には影響しない

前述の通り、NHE6 の直接的な機能はオルガネラ pH を調節することであると示唆されている。具体的には、V-ATPase によって酸性化されたオルガネラ内から、プロトンを外にリークすることでアルカリ化に関与していると考えられている。NHE6 のノックダウン実験によってエンドソームの pH が低下した結果 (Fig. 2-6) は、この説を支持しており、NHE6 が減少したことにより、V-ATPase によりエンドソーム内に取り込まれた H^+ をエンドソーム外に十分リークできなくなり、pH が下がった結果であると説明できる。この NHE6 の pH 調節における役割について、次章で変異体の発現細胞等を使って解析し、議論する。

また、細胞質 pH については、ノックダウンしても大きな影響は無かった。NHE6 が失われてエンドソームからプロトン流出が減少しても、エンドソームのような細胞小器官は細胞質全体と比べると

非常に小さく、普段から流出しているプロトン量も小さいので、細胞質 pH の変化が現れるほどの影響はないと考えている。さらに、過去の知見から、NHE6 の一部が形質膜に局在していることが示されているため、NHE6 は細胞膜上で pH 調節機能を担っている可能性も考えられた。しかし、細胞質の pH に影響はないことから、すくなくとも通常状態では、形質膜上の NHE6 は細胞質全体に対する pH の調節機能にはほとんど関与していないと考えられる。

第3章 エンドサイトーシスにおける HeLa 細胞の NHE6 の過剰発現の影響

3-1. 序論

前章では HeLa 細胞における NHE6 の発現抑制によりトランスフェリンの取り込みが特異的に阻害されることを述べた。しかし、多くの疑問が依然として残されている。そのうち最も大きな疑問は、NHE6 のイオン輸送による pH 制御がエンドサイトーシスに必要であるのかどうか、である。その他には、NHE6 は、そのイオン輸送が重要なのではなく、トランスフェリンの取り込み時の足場タンパク質などとして、トランスフェリンとレセプターの結合に必要な場を提供することによって、トランスフェリン取り込みに寄与している可能性も考えられる。この点を明らかにするために、本章では野生型の NHE6 とイオン輸送機能を有しない変異体 NHE6 を HeLa 細胞に過剰発現させて、エンドサイトーシスにおける NHE6 の pH 調節機能の寄与について調べた。

3-2. 結果

3-2-1. 野生型 NHE6 とイオン輸送機能のない変異型 NHE6 の過剰発現株の樹立

NHE6 を過剰発現するための発現プラスミドベクターを HeLa 細胞に導入し、NHE6 過剰発現細胞株を樹立した (NHE6OE 細胞株、詳しい方法は第 6 章:材料と方法を参照)。さらに、イオン輸送機能のない変異体の過剰発現細胞も樹立した(NHE6OE(Mut)細胞株)。変異体では NHE6 のイオン輸送に関わると思われる 12 回膜貫通部分の7番目にある第 287 アミノ酸(グルタミン酸)をグルタミンに、第 292 アミノ酸 (アスパラギン酸)をアスパラギンに置換したものである (Fig. 3-1 A)。以降の実験のコントロール細胞としては親株である HeLa 細胞を用いた。

これらの過剰発現細胞の NHE6 の発現量をウェスタンブロッティングで確認した (Fig. 3-1)。コントロール細胞では、前節で述べたように、NHE6 は糖鎖と多量体化の状態の違いを反映した三本のバンドとして検出された (約 66 kDa のモノマーと約 100 kDa のグリコシル化モノマーと 200kDa

のオリゴマー) (Fig. 3-1 B)。NHE6OE と NHE6OE(Mut)細胞ではコントロールに比べ、特に100KDaのグリコシル化モノマーが多く発現していることがわかった (Fig. 3-1 B)。NHE6 のバンドの濃さから定量を行った結果、コントロール細胞に比べ、NHE6OE と NHE6OE(Mut)細胞の NHE6 発現量は、それぞれ約 58 倍と 93 倍まで増加していることが判明した (Fig. 3-1 C)。この際、内部標準としてアクチンを検出し、各サンプルの量が大きく変わらないことを確認している。正確に NHE6 のエンドサイトーシスにおける役割を調べるためには、NHE6OE と NHE6OE(Mut)細胞の間で発現量がそろった株を得ることが理想的であるが、ほぼ同じ発現量である株を得ることが出来なかったため、発現量が多くかつ近い株を解析に用いた。

前章と同じく、この二株における様々な物質のエンドサイトーシスを調べる前に、NHE6 の局在するエンドサイトーシス経路上のオルガネラの局在とマーカートンパク質の量について調査した。ウェスタンブロッティングの結果から予測されるように、NHE6OE と NHE6OE(Mut)細胞ではコントロールと比べ NHE6 の蛍光が強くなった (Fig. 3-2 A 1 行目)。写真からの細胞1個あたりの NHE6 のシグナル強度(蛍光強度)を定量した結果、NHE6OE と NHE6OE(Mut)はコントロール細胞に比べ、それぞれ約 60 と 90 倍に増加していた (Fig. 3-2 B)。従って、過剰発現細胞では NHE6 の量が増加したことを確認できた。さらに、EEA1 (Fig. 3-2 A 2 行目)、TfnR (Fig. 3-2 A 3 行目)と LAMP2 (Fig. 3-2 A 4 行目)の局在を観察した結果、NHE6 の過剰発現はこれらのタンパク質の局在に影響を与えないことがわかった。写真から定量した、細胞1個あたりのこれらマーカートンパク質のシグナルの強度もほとんど変化していなかった (Fig. 3-2 C)。また、ノックダウン細胞でみられたようなトランスフェリン受容体の局在変化は、NHE6OE 細胞と NHE6OE(Mut) 細胞では観察されなかった。これらの結果から、通常の培養状態では、NHE6 の過剰発現は、エンドサイトーシス経路のオルガネラの局在等に影響を与えないことが明らかになった。

3-2-2. NHE6 過剰発現のエンドサイトーシスへの影響

前章では、NHE6 ノックダウン細胞ではトランスフェリンの取り込みが特異的に阻害されることを

報告した。本節では、同様の方法を用いて、NHE6OEとNHE6OE(Mut)細胞株における物質取り込みを検討した。

まずトランスフェリンの取り込みについては、蛍光物質を結合したトランスフェリンを細胞に取り込ませ、取り込みの程度を顕微鏡及び生化学的方法で検討した。まず、30分間トランスフェリンを取り込ませ顕微鏡で観察したところ、コントロールに対し、NHE6OE細胞のみで顕著に取り込み量が増加しているように観察された (Fig. 3-3 A)。さらに、定量的な解析のために各時間(0分から30分)で細胞を回収・破碎し、電気泳動で分離した後にトランスフェリンの蛍光強度を定量した (Fig. 3-3 B-C)。その結果、NHE6OE細胞ではコントロールより約25%多くのトランスフェリンが取り込まれたことが明らかになった。それに対し、NHE6OE(Mut)細胞ではこのような増加はみられず、各時間点でコントロールと同程度の取り込みを示していた (Fig. 3-3 C)。

次に、EGFとLDLの取り込みを調べた。37°Cで低濃度(1 ng / ml)のAlexa Fluor 488-EGF細胞を取り込ませ、30分後に細胞を固定し、取り込まれたEGFを蛍光顕微鏡で観察した (Fig. 3-3 D)。30分の時点では、コントロール、NHEOEとNHE6OE(Mut)細胞の間でのEGF取り込みはほとんど差がなかった (Fig. 3-3 D)。取り込まれたEGFの定量を行うために、トランスフェリンと同様に碎し、その取り込み量を電気泳動後に蛍光検出器で定量した。蛍光物質はストレプトアビジン (60kDa)に結合しているため、そのバンドの蛍光強度を測定した (Fig. 3-3 E)。その結果、EGFの取り込みはコントロール、NHEOEとNHE6OE(Mut)細胞の間で差が見られなかった (Fig. 3-3 F)。同様にLDLの取り込み実験も行なった。具体的には、蛍光物質BODIPYFLを結合しているLDLを0分から30分間細胞に取り込ませた後に細胞を固定し、取り込まれたLDLを蛍光顕微鏡で観察・定量した。その結果 (Fig. 3-4 A, B)、EGFと同様に取り込みの差は見られなかった。クラスリン依存的エンドサイトーシスについては、ノックダウンと同様に、トランスフェリンの取り込みだけに影響を与えることがわかった。

次に、クラスリン非依存的(カベオラ依存的)エンドサイトーシスによって取り込まれるコレラ毒素Bサブユニット(CTxB)の取り込みを測定した。蛍光物質Alexa Fluor488と結合しているCTxBを、

37°Cで細胞に取り込ませ、顕微鏡で観察した結果 (Fig. 3-4 C)、各時間点において取り込みの大きな差は見られなかった。定量的に、取り込まれた CTxB のバンドの蛍光強度を測定した結果も大きな差は見られなかった (Fig. 3-4 D,E)。従って、NHE6 の過剰発現はカベオラ依存的 CTxB 取り込みに影響しないことがわかった。

以上の結果をまとめると、NHE6 過剰発現はクラスリン依存的のうち、トランスフェリンのとり込みのみに影響を与え、EGF と LDL 及びクラスリン非依存的 CTxB の取り込みには影響がないことが判明した。また、NHE6 過剰発現細胞のトランスフェリンの取り込みが増加したが、イオン輸送機能のない変異体の過剰発現細胞ではその取り込みの増加は見られなかった。従って、トランスフェリンの取り込みには、NHE6 分子自身の足場的機能ではなく、NHE6 のイオン輸送活性 (pH 調節機能) が関連していることを強く示唆している。

3-2-3. NHE6 過剰発現細胞のエンドソーム pH の変化

前章では、NHE6 のノックダウン細胞でのエンドソーム (トランスフェリン局在する場所) 内部の pH が酸性化されたが、細胞質 pH は変化しないことを報告した。この結果から HeLa 細胞において、エンドソームからのプロトン流出に NHE6 が関与することが示唆された。従って、本章で解析している野生型過剰発現細胞ではエンドソームはアルカリ化することが予測される。また、変異型過剰発現はトランスフェリン取り込みに大きな影響を与えておらず、エンドソーム pH は正常であると考えられる。この点を検証するために、本節では NHE6 の過剰発現細胞におけるエンドソーム pH を調べた。

エンドソーム内 pH については前章の実験方法と同様に、37°C でコントロール細胞、NHE6OE と NHE6OE (Mut) 細胞に pH 感受性の FITC-トランスフェリンと非感受性の Alexa546-トランスフェリンを、両方同時に1時間取り込ませた。はじめにこれらの細胞の取り込んだトランスフェリンが同じ場所 (エンドソーム) にあるかどうかを調べるために、NHE6 および初期エンドソームのマーカーである EEA1 とリサイクリングエンドソームのマーカーであるトランスフェリン受容体によって取り込ま

れたトランスフェリンの局在を調べた。その結果、トランスフェリンは NHE6 とほぼ同じ場所にあることがわかった (Fig. 3-5 A 1行目)。さらに、取り込んだトランスフェリンは EEA1 とトランスフェリン受容体は共局在すること (Fig. 3-5 A 2, 3 行目) からトランスフェリンは、初期エンドソームとリサイクリングエンドソームにあることが判明した。次に、前章で述べた方法に従って pH の測定を行った。得られたデータから検量線を作成し (Fig. 3-5 B)、エンドソーム pH を算出した (Fig. 3-5 C)。その結果、コントロール細胞が pH 約 6.5 であるのに対し、NHE6OE 細胞では pH は約 6.8 まで上がっていることが判った。一方、NHE6OE(Mut)細胞のエンドソームの pH は、コントロールとほぼ同じ程度であった。この結果から NHE6OE 細胞では NHE6 の量が増加し、エンドソームに局在する量も増加した結果、V-ATPase によりエンドソーム内に取り込まれた H⁺ が通常よりも多く流出し、その結果、pH がよりアルカリ化したと考えられる。一方、NHE6OE(Mut)細胞で過剰発現した NHE6 は、変異によりほとんどプロトン輸送能力を持ってないため、NHE6 のエンドソームに局在する量が増えても、内在性の NHE6 だけが pH 調整を行っているため、エンドソーム pH はコントロールと同じ程度になったと考えられる。

3-2-4. NHE6 過剰発現のトランスフェリンレセプターの変化

NHE6OE 細胞ではトランスフェリンの取り込みが増加したが、NHE6OE(Mut)では増加しなかったことを受け、細胞内でトランスフェリンの取り込み経路にどのような影響が出ているのかを調べる必要があると考えた。NHE ノックダウン細胞では、前章で報告したようにトランスフェリン受容体の局在が変化したこと (Fig. 2-2A)、受容体の局在変化は取り込みに関連していると考えられる。しかし NHE6 過剰発現細胞のトランスフェリン受容体の局在は大きく変化しなかったことを 3-2-1 節で報告した (Fig. 3-2A)。ただし、局在を観察した状態はトランスフェリンを添加しておらず、トランスフェリンの刺激で過剰発現細胞のトランスフェリン受容体の挙動が変化する可能性も考えられる。そこで、トランスフェリンの添加の有無によるトランスフェリン受容体の局在と量の変化を観察した。トランスフェリンを添加しない場合、コントロール、NHE6OE と NHE6OE(Mut)細胞のいずれに

においても、トランスフェリン受容体の大きな局在変化は見られなかった (Fig. 3-6 A 1 行目)。トランスフェリンを添加した場合、コントロール細胞ではトランスフェリン受容体の局在変化が見られなかった。しかし、NHE6OE 細胞では細胞全体に明るいトランスフェリン受容体のスポットが観察された (Fig. 3-6 A colum 2 および右側拡大図)。NHE6OE(Mut)細胞ではトランスフェリン受容体のスポットが観察されたが、その数は NHE6OE 細胞よりは少なかった。(Fig. 3-6 A 2 列目、拡大図 3 列目)。このスポットについては 3-3 節で考察する。

次に、トランスフェリン受容体の発現量を測定した。ウェスタンブロッティング法によりコントロール、NHE6OE と NHE6OE(Mut)細胞でのトランスフェリン受容体の発現を測定した結果 (Fig. 3-6 B)、トランスフェリンの刺激の有無に関わらず、すべての細胞株でトランスフェリン受容体の発現量に変化はなかった。NHE6OE 細胞ではトランスフェリンの添加に応答して受容体の細胞内局在が変化することが、取り込み量の増大と関連していることが示唆された。

3-2-5. NHE6 過剰発現細胞の形質膜の NHE6 とトランスフェリンレセプターの量の解析

過剰発現細胞では、細胞全体ではトランスフェリン受容体の発現量は増加しないにもかかわらず、トランスフェリンの取り込みが増加していた。このとき、トランスフェリン受容体の局在している明るいスポットが増加することから、トランスフェリン受容体の局在・動態に変化が生じていると考えられる。トランスフェリン受容体は細胞膜とエンドソームを行き来しているため、細胞膜表面の受容体量が増加して、取り込み能力が増強される可能性が考えられるが、蛍光抗体法では細胞膜に存在する受容体を十分に検出することが出来ない。そこで、細胞膜表面の受容体量への過剰発現の影響を、表面ビオチンラベル法によって検討した。

コントロール、NHE6OE と NHE6OE(Mut)の各細胞に、37°C でホロトランスフェリンを 30 分間添加した。比較対象としてトランスフェリンを添加しない細胞も用意した。各細胞に、膜タンパク質と結合する反応基を有するビオチン誘導体 (EZ-Link Sulfo-NHS-SS-Biotin) を加え、細胞膜に局在するタンパク質をビオチンで標識した。その後、細胞を破碎し、ビオチンと結合するアビジンの一

種を固定化したアガロースビーズを用いてビオチン化されたタンパク質を分離し、ビオチン化された NHE6 とトランスフェリンレセプターの量を分析した。NHE6 の細胞表面の発現量は、親株(コントロール細胞)と比較して、NHE6OE と NHE6OE(Mut)細胞での形質膜 NHE6 量は、細胞全体の発現量の増加と比例して増加していた。形質膜量の NHE6 量は全体量の約 20%を占めている (Fig. 3-7 B)。また、トランスフェリンを添加しても形質膜の NHE6 量に大きな変化は無かった。一方、トランスフェリン受容体の形質膜の量は、トランスフェリンを添加の有無に関わらず、トランスフェリン受容体の総量は、野生型・変異型ともに、統計的に有意であるほどの変化は見られなかった (Fig. 3-7 D)。これらの結果から、少なくとも細胞膜表面のトランスフェリン受容体量の増加が、トランスフェリン取り込み量の増加をもたらすわけではないことがわかった。

3-3. 考察

NHE6 の過剰発現はトランスフェリンのエンドサイトーシスに特異的に影響する

クラスリン依存的エンドサイトーシスによって取り込まれる、トランスフェリン、EGF、LDL の取り込みを測定した結果、NHE6 の過剰発現の影響はトランスフェリンの取り込みのみに特異的な影響がみられた。一方、イオン輸送機能がないと考えられる NHE6 変異体の過剰発現細胞では、ほとんどこのような影響が見られなかった。この野生型と変異型での違いから、NHE6 分子自体の細胞内での存在量ではなく、NHE6 による pH 調節機能がトランスフェリンの取り込みに関与することがわかった。NHE6 の量と pH 調節及びトランスフェリンの取り込みの関係をまとめると、NHE6 の発現抑制細胞では NHE6 の量が減少し、エンドソーム(トランスフェリンがある場所)の pH が酸性化され、トランスフェリンの取り込みは減少した。逆に、NHE6 の過剰発現(野生型)細胞では NHE6 の量が増加し、エンドソーム(トランスフェリンがある場所) pH がアルカリ性になり、トランスフェリンの取り込みは増加していた。今までにトランスフェリンの取り込みはエンドソーム pH の変化により変化するという報告があったが[60, 61]、エンドソームのアルカリ化によりトランスフェリンの取り込み

が増加するという報告はなかった。**NHE6** の減少と増加がどのようにトランスフェリン取り込みの増減と関連付けられるのか、言い換えれば、トランスフェリンの取り込み過程のどのステップにどのような影響を与えているのかについては、後の章で議論する。

トランスフェリン添加時の **NHE6** 過剰発現細胞でのトランスフェリン受容体の局在変化

本章では、**NHE6** 過剰発現細胞において、トランスフェリン受容体の細胞内局在を蛍光抗体法と表面ビオチンラベル法によって調べた。その結果、細胞膜の受容体量は増加していなかったこと(**Fig. 3-7**)、トランスフェリン添加時にトランスフェリンレセプターで強く染色されるオルガネラが多くなっていたこと(**Fig. 3-6**)を考えると、過剰発現細胞でトランスフェリンの取り込みが増加するメカニズムとして、以下の2つの可能性が考えられる。1:**NHE6** 過剰発現細胞ではトランスフェリンのエンドサイトーシス由来の(輸送)小胞の数が増加した、2:トランスフェリンの輸送小胞のサイズが大きくなって、中には入るトランスフェリンレセプターも増えた、の二つである (**Fig.3-8**)。どちらにせよ、全体および細胞表面の受容体発現量に変化が無いことから、スポットの出現は、エンドソームにトランスフェリン受容体が集積していることを示している。**NHE6** の野生型の過剰発現細胞では、イオン輸送の増加で周辺 pH 環境が変化し、その結果トランスフェリン受容体とリガンドの親和性が増加して、高い取り込みにつながっているのかもしれない。一方、**NHE6** 変異体細胞も、野生型発現細胞ほどではないもののトランスフェリン受容体の比較的明るいスポットの増加が観察された。つまり、トランスフェリン受容体の明るいスポットの出現には大きな pH 変化がおこるような高いイオン輸送は必須ではないとも考えられる。具体的に過剰発現がなぜトランスフェリンの取り込み増加につながるのかに関しては不明な点が多く、より詳細な解析が必要であると考えられる。

前章と本章では、**NHE6** がイオン輸送機能・pH 制御を介して、トランスフェリンの取り込みに関与することを、関係づけた。しかし、**NHE6** の pH 制御機能がトランスフェリンの取り込みのどの機構にどのような影響を与えるのがまだ不明である。次章では、この点について追求している。

第 4 章 トランスフェリンエンドサイトーシスの早期ステップにおける Na^+/H^+ 交換輸送体 (NHE6) の機能解析

4-1. 序論

前章では NHE6 の発現抑制や過剰発現が、トランスフェリンのエンドサイトーシスに影響を与えることを報告した。輸送機能のない変異体の過剰発現ではトランスフェリンの取り込みの変化は見られなかったことから、トランスフェリンの取り込みへの影響は NHE6 の pH 調節機能に依存することが明らかになった。また、トランスフェリンと同じようにクラスリン依存的にエンドサイトーシスされる EGF と LDL、カベオラ依存的にエンドサイトーシスされる CTxB の取り込みへの影響は見られなかった。さらに、NHE6 の発現抑制はマイクロピノサイトーシス依存的なデキストランの取り込みにも影響しなかった。これらの結果から、NHE6 の発現抑制はトランスフェリンのエンドサイトーシスに特異的に影響することが判明した。また、エンドソームの pH に与える影響については、NHE6 の発現抑制細胞のエンドソーム pH が酸性化され、過剰発現細胞のエンドソーム pH がアルカリ化した。このことから、NHE6 は、エンドソーム内部から外側にプロトンを輸送している (小胞型 V-ATPase によってエンドソーム内に取り込まれた H^+ をリークする) ことが検証できた。しかし、NHE6 による pH 調節は具体的にどのようにトランスフェリンのエンドサイトーシスと関連しているのかについては不明である。

本章では、NHE6 がエンドサイトーシスのどの段階に寄与しているかを調べるために、主に NHE6 発現抑制細胞を用いて、トランスフェリンの細胞表面への結合からエンドソームへの輸送過程の各ステップを詳細に解析した。

4-2. 結果

4-2-1. NHE6 ノックダウン細胞におけるトランスフェリン受容体の細胞膜上の量、およびトランスフ

エリンの形質膜への結合量

トランスフェリンの取り込みの最もはじめに起こることは、細胞膜上で受容体と結合することである。NHE6 がトランスフェリン受容体の細胞膜上へのリサイクルに関与するならば、発現抑制によって膜上にあるトランスフェリン受容体の数が減少し、その結果、トランスフェリンの取り込み量が減少した可能性がある。あるいは、NHE6 は一部細胞膜にも発現しているため、発現抑制によって細胞膜内外のイオン輸送に異常が生じ、トランスフェリンと受容体の結合に影響した可能性がある。本節ではこの二つの可能性を考え、トランスフェリンの結合量と、トランスフェリン受容体の細胞膜上の量について調べた。

まず、NHE6 の発現抑制細胞でのトランスフェリン受容体細胞膜上の量について、第3章(3-2-5)と同様に表面ラベル法を用いて検討した。その結果、トランスフェリン受容体の形質膜に存在する量は、コントロールとNHE6 ノックダウン細胞の間で大きな差は無かった(Fig. 4-1A)。トランスフェリン受容体の細胞全体での総量は、実験ごとによって誤差が大きかったが、コントロール細胞とノックダウン細胞の間で、統計的に有意であるほどの差は見られなかった。この実験から形質膜のトランスフェリン受容体量を計算すると全量の30%であった(Fig. 4-1 B)。以上の結果から、発現抑制細胞では、トランスフェリン受容体の減少が原因でトランスフェリンの取り込みが減少しているわけではないと考えられる。

次に、トランスフェリンが細胞表面に結合する量について調べた。実験はエンドサイトーシスが起らない4°Cで行った。コントロールとNHE6 ノックダウン細胞をFITC(フルオレセインイソチオシアネート)ラベルしたトランスフェリンを含んだ培地中で30、60、90分間結合させた後に4°Cで細胞と結合していないトランスフェリンを十分に洗浄し、細胞を回収した。細胞破碎後にSDS-PAGEで分離したトランスフェリンのバンドを蛍光検出器で検出した(Fig. 4-2 A, B)。その結果、いずれの時間点でも、細胞に結合しているトランスフェリンの量にはほとんど差がなかった。この結果からNHE6 の発現抑制はトランスフェリンと受容体の結合に影響しないことがわかった。以上の結果を総合すると、NHE6 は細胞膜におけるトランスフェリンの結合自体には関与していないことが示唆

された。

4-2-2. NHE6 ノックダウン細胞でのトランスフェリン取り込みの追跡

前節で述べたように、NHE6 発現抑制は、膜上のトランスフェリン受容体量や、細胞あたりのトランスフェリン結合量に影響を与えないことから、次の段階以降に焦点を当てて解析することにした。トランスフェリンのエンドサイトーシスは以下に示すように、多数のステップからなる。最初にトランスフェリンは膜上のトランスフェリン受容体と結合する。次にアダプタータンパク質と受容体が結合することにより、膜のコレステロールに富んだ領域に集積(クラスタリング)する。続いてクラスリンが膜に集積され、クラスリンで覆われた部分が細胞内に陥入し、陥入部分がくびり切られる。こうしてクラスリン被覆小胞が形成される(約1~2分)。その後、小胞は初期エンドソームと融合する(約5分前後)(Fig. 4-3)。初期エンドソームでは、内部の酸性化によりトランスフェリンと Fe^{3+} が解離後、受容体とトランスフェリンはリサイクリングエンドソームに運ばれる。最後に、小胞により細胞膜に戻る(10-15分)[67, 70-73]。このようなトランスフェリンの取り込み時に起こる各ステップを詳細に調べるため、パルス・チェイス(pulse-chase)法を導入した。この方法では、トランスフェリンは低温条件(4°C)ではレセプターと結合するが細胞には取り込まれない特性を利用し、低温条件でトランスフェリンとレセプターと結合させた後、37°Cで取り込みを開始させ、トランスフェリンを時間的に、追跡することができる(詳しい方法は第6章を参照)。

この方法を用い、まずトランスフェリンが膜上トランスフェリンレセプターと結合するステップを調べた。4°Cで細胞に蛍光 Alexa トランスフェリンを添加し、1時間後に外余分のトランスフェリンを除去した細胞を破碎し、蛍光測定器により膜に結合したトランスフェリンを検出した。コントロール細胞と NHE6 ノックダウン細胞では膜上に結合したトランスフェリン量にはほとんど差がなかった(Fig. 4-4 A, B)。この結果は前節の結合実験の結果と同じである。

次に、4°Cでラベルした細胞を37°Cの培地に移し、取り込みを開始させた。1~2分後に、その取り込み量を蛍光検出器で定量した(Fig. 4-4 C-D)。このとき、取り込まれずに細胞表面に結合

したままのトランスフェリンを除くために、酸性緩衝液(pH 4.2)で三回洗浄した後に細胞を回収し、定量を行った。0分でも少量検出されている分をバックグラウンドとして差し引き、グラフ(Fig. 4-4D)にしている。この結果、コントロール細胞に比べ、NHE6 ノックダウン細胞では、取り込み量は約3割減少していることが示された。

次に、蛍光顕微鏡により取り込み初期の様子を観察した(Fig. 4-4 E)。0分(Fig. 4-4 E 1行目)は4°Cでトランスフェリンを1時間ラベルした直後を意味している。このとき、点状の蛍光シグナルはほとんど検出されなかった。これは、トランスフェリンは膜上に分散した状態でトランスフェリンレセプターと結合するため、検出できる限界以下のシグナル強度であるためと考えられる。37°Cにシフトしてから1~3分後にはトランスフェリンのスポットが観察される(Fig. 4-4 E 2行目左)。このスポットは膜上のトランスフェリンのクラスターか、取り込まれた小胞であると考えられる。また、1分の時点で既にNHE6 ノックダウン細胞では、コントロール細胞に比べての取り込み量が減少した様子も観察された。この結果はFig. 4-4-Dの結果と一致している。以上の実験結果からNHE6 ノックダウン細胞では、トランスフェリンが膜上の受容体と結合する量はコントロール細胞と同じであるが、その後の取り込み初期段階において取り込みの減少が起こっていることがわかった。

4-2-3. NHE6 ノックダウン細胞でのトランスフェリンと初期エンドソームの融合

次に、前節で解析した時間帯に引き続いて起こるステップである、取り込まれたトランスフェリンの入った小胞が初期エンドソームと融合するステップについて調べた。前節と同様に追跡法を用い、トランスフェリンと、初期エンドソームのマーカーである EEA1 との共局在の様子を観察した(Fig. 4-5)。コントロール細胞では3分で両者の共局在が初めて観察されたが、この時点ではNHE6 ノックダウン細胞の共局在が観察されなかった(Fig. 4-5, 3分)。さらに時間が経過するとコントロール細胞では両者の共局在するスポットが増えた(Fig. 4-5, 4-7分)。NHE6 ノックダウン細胞では、コントロール細胞に比べて2分ほど遅れて、5分以降で EEA1 との共局在が観察された(Fig. 4-5, 5-7分)。しかし、トランスフェリンのスポットはコントロール細胞に比べて少なかった。従

って、NHE6 ノックダウン細胞では、トランスフェリン小胞と初期エンドソームの融合が遅くなることが示唆された。また NHE6 ノックダウン細胞でのトランスフェリンのスポットが少ないことから初期エンドソームに融合するトランスフェリン小胞の数が減少していることが示唆される。

4-2-4.NHE6 のクラスリン小胞局在

前述の追跡実験(4-2-2 および4-2-3 節)で示されるように、初期エンドソームに融合する以前の段階で NHE6 のノックダウンの影響が見られる。この段階ではクラスリン被覆小胞の形成が起こる。もし NHE6 が、従来示されているようにエンドソームだけでなく、トランスフェリンのエンドサイトーシス時に形成されるクラスリン小胞にも局在するならば、NHE6 はその段階で機能できることを示唆する。そこで、トランスフェリンの取り込まれたクラスリン被覆小胞に NHE6 が局在するのかどうかを検討した。前節と同様に追跡法を用い、トランスフェリンの取り込み初期(1~4分)のトランスフェリンとクラスリンの共局在をレーザー共焦点顕微鏡で観察した。その結果、コントロール細胞では、2分後からトランスフェリンのスポットが多く観察された(Fig. 4-6, 4-7)。さらに、この時点で拡大してみると(Fig. 4-6)、細胞の周辺部にトランスフェリン(赤)とクラスリン(緑)の共局在(黄色)が多く観察された(Fig. 4-6, 2行目 3列)。クラスリンはエンドサイトーシスだけでなくほかの輸送過程にも関与しているが、この共局在しているスポットが、トランスフェリンが取り込まれたクラスリン小胞あるいはピット(小胞がくびれきれぬ前のくぼみ)であると考えられる。図中に白矢印で示したように、この場所には、NHE6 が局在していることが判明した(Fig. 4-6, 2分 第5列目。NHE6、クラスリン、トランスフェリンの3者共局在は白色であらわされる)。3分後以降では(Fig. 4-7)、NHE6、クラスリン、トランスフェリンの3者共局在(白)が減少し、NHE6 とトランスフェリンの2者共局在(マゼンタ)が増えた。この時点では、トランスフェリンのほとんどはクラスリン小胞を通過したと考えられる。

なお、ノックダウン細胞では、トランスフェリンの取り込み量が低く、レーザー共焦点顕微鏡で詳細な局在解析を行うことが出来るレベルのシグナルは得られなかった(Fig. 4-8)。以上の結果より、以前の研究で明確に示されていなかったクラスリン小胞への NHE6 の局在が示された。従って、

NHE6 はクラスリン小胞の pH 環境を制御しうると考えられる。

4-2-5.トランスフェリン取り込み初期に起こるクラスリンのリクルートに対する NHE6 ノックダウンの影響

NHE6 はエンドサイトーシス初期のクラスリン小胞形成期に機能すること(4-2-2.節)から、クラスリンの膜へのリクルートに関与する可能性が考えられる。より正確にトランスフェリン取り込み初期に起こるクラスリンのリクルートの量を把握し、NHE6 発現抑制の影響を調べるために、生化学的手法を用いて解析した。上述の追跡実験と同様に細胞にトランスフェリンの取り込みを開始させ、0~5分後に細胞を回収後破碎し、その膜画分を超遠心で分離した。この膜各分に含まれるクラスリンの量を免疫ブロット法により調べた。その結果 2 分の時間点でコントロール細胞では膜上のクラスリンが増加したが NHE6 ノックダウン細胞ではこの増加が見られなかった(Fig. 4-9 A, B)。クラスリンには分泌小胞の形成にも関与するので、この実験では形質膜だけではなく、オルガネラ膜上のクラスリンも同時に検出される。Fig. 4-9 B で 100 程度を示した量は、おそらくオルガネラ膜に結合しているクラスリンの量とトランスフェリンに応答しない構成的なエンドサイトーシスに依存する量の合計を示していると考えられる。なお、分離された膜画分量がほぼ一定であることは Na^+/K^+ ATPase の検出により確認した(Fig. 4-9B)。以上の結果から NHE6 ノックダウン細胞におけるトランスフェリンの取り込みの減少は、初期段階のクラスリンの膜へのリクルートが阻害されたことにより生じることが示唆された。

4-3. 考察

4-3-1 NHE6 ノックダウン細胞のトランスフェリン取り込みの阻害は初期段階で見られた。

本章では、トランスフェリンの取り込みの各ステップを、取り込み開始からエンドソームへの融合まで、詳細に解析した。まず、取り込み時の形質膜上トランスフェリン受容体の量がノックダウンの

影響を受けないことから、トランスフェリン受容体の細胞膜への移行は阻害されていないと考えられる。トランスフェリンと受容体の結合量の結果から、細胞表面への結合量が取り込みの差を生み出す要因でもない (4-2-1 節)。しかし、追跡実験ではトランスフェリンの取り込み後 1~2 分でノックダウンの影響が見られること(4-2-2 節)、初期エンドソームへのトランスフェリンの移行が遅れていること(4-2-3 節)から、トランスフェリン取り込み低下はトランスフェリンが膜上レセプターと結合後から初期エンドソームとの融合までの間に生じるものと推定された。

4-3-2 NHE6 はトランスフェリン取り込み時のクラスリン小胞形成に関与する

トランスフェリンの取り込み後 1~2 分の段階では、NHE6 がクラスリンと共局在し、クラスリン小胞 (あるいはピット) 形成時期に機能していることが予測される。NHE6 ノックダウン細胞ではこの時期にトランスフェリンとクラスリンの共局在はほとんどみられないため、NHE6 の欠損によりクラスリン小胞の形成が阻害されている可能性がある。

より正確にトランスフェリン取り込み時のクラスリンが膜にリクルートされる量を把握するために、クラスリンの膜結合量を測定した結果では、取り込み開始後 2 分頃に起こるクラスリンの膜結合量の増加が、ノックダウン細胞では見られなかった(4-2-5 節)。以上の結果をまとめると、NHE6 ノックダウン細胞では、トランスフェリン依存的に起こるエンドサイトーシスの際に、クラスリンの形質膜へのリクルートが阻害されることにより、トランスフェリンの取り込み量の低下が起こっていることが示唆される。NHE6 による pH 調節機能の破綻により、クラスリンの膜への結合量が減少することが原因と考えるが、詳しい機構については次章で討論する。

第5章 総括と展望

5-1. 本研究で得られた実験結果

これまでに、NHE6 は、細胞の生理機能において多くの重要な働きを持つエンドサイトーシス経路上に局在することが報告されてきた[38, 66]。さらに、NHE6 はエンドソームと形質膜を行き来しており、そのエンドソームと形質膜局在の間での存在量比を制御する RACK1 の発現抑制は、エンドソーム pH 及び トランスフェリンのエンドサイトーシスに影響することが報告された[47]。これらのことから、NHE6 がエンドサイトーシスに関与することを推測したが、具体的な証拠を欠いていた。そこで、私は本研究において、NHE6 がエンドサイトーシスに具体的にどのように関与するのかについて注目し、以下の結果を得た。

(1) NHE6 の発現量を約 15%までに抑制した HeLa 細胞 (NHE6 ノックダウン細胞) を樹立した (Fig. 2-1)。この細胞ではトランスフェリンの取り込みは約 40%阻害された (Fig. 2-3)。しかし、同じクラスリン依存的なエンドサイトーシスによって取り込まれる EGF (低濃度条件) と LDL (Fig. 2-4) や、クラスリン非依存的エンドサイトーシスで取り込まれる CTxB とデキストラン (Fig. 2-5) の取り込みは影響を受けなかった。

(2) NHE6 の過剰発現細胞を樹立した (Fig. 3-1)。この細胞ではトランスフェリンの取り込みの増加が見られた。一方、イオン輸送活性をもたないと考えられる変異型を過剰発現した細胞 (Fig. 3-1) では、トランスフェリンの取り込みの増加は観察されなかった (Fig. 3-3)。EGF (Fig. 3-3)、LDL (Fig. 3-4)、CTxB (Fig. 3-4) の取り込みに関しては、野生型・変異型発現細胞の両方で、過剰発現の影響は見られなかった。

(3) NHE6 発現抑制細胞ではエンドソーム pH が通常より酸性化されていた (Fig. 2-9)。逆に NHE6 野生型の過剰発現細胞ではエンドソーム pH が通常よりもアルカリ化していた (Fig. 3-4)。このアルカリ化は変異型の過剰発現では見られなかった。

(4) NHE6 発現抑制細胞でのトランスフェリンの取り込みは初期段階に阻害された (Fig. 4-4,

4-5)。NHE6 は取り込み初期にクラスリンと共局在した (Fig.. 4-6)。さらに、NHE6 発現抑制細胞でのクラスリンのリクルートが阻害された (Fig.. 4-7)。

5-2 エンドサイトーシスにおける NHE6 の特異的な役割

5-1 に述べた実験結果より、NHE6 はクラスリン依存的なトランスフェリンの取り込みに関与すると推測している。では、なぜほかの因子が NHE6 の発現量の増減の影響を受けないのか？ CTxB はクラスリン非依存的なエンドサイトーシスによって取り込まれるので、NHE6 がクラスリン依存の系のみに関与するのならば、影響を受けないことの説明がつく。しかし、なぜ同じクラスリン依存的 EGF と LDL は影響を受けないかについては説明できない。

クラスリン依存的エンドサイトーシスでは、取り込み開始後に数十秒から数分以内に (初期) クラスリンは形質膜にリクルートされる。続いてクラスリン被覆ピット (clathrin-coated pits (CCP)) が形成され、引き続いてクラスリン被覆小胞 (clathrin-coated vesicles (CCV)) が形成される [74]。このクラスリンのリクルートはアダプタータンパク質に依存する。トランスフェリンのエンドサイトーシスは AP-2 だけに依存しているが、EGF と LDL のエンドサイトーシスはそれぞれ AP-2、Epsin-1 (EGF) と AP-2、ARH1 と Dab2 (LDL) [17, 20, 67, 68, 75] が関与している。我々は NHE6 の発現抑制は AP-2 だけに影響する可能性があると考えている。一方、EGF と LDL は AP-2 が影響されても、それぞれ別のアダプタータンパク質の働きによりクラスリンはリクルートされ、取り込みは影響されないと考えられる。

他の可能性として NHE6 の発現抑制細胞では、EGF と LDL はクラスリン非依存的の経路により細胞に取り込まれることが考えられる。実際に、EGF ではクラスリン非依存的取り込みが報告されている [35, 62, 76]。LDL も同様に未知の経路より取り込まれることで、発現抑制の影響を受けていないのかもしれない。

5-3. NHE6 による pH 制御は、細胞内のどこでどのように機能しているか

5-1 節 (結果2と結果3) に述べたように、過剰発現細胞ではトランスフェリンの取り込みを増加さ

せるが、イオン輸送活性を持たない変異 **NHE6** の過剰発現では取り込みの増加は観察されなかった。この結果から、我々は **NHE6** の pH 調節機能がトランスフェリンの取り込みに重要であると結論した。しかし、一体 **NHE6** による pH 調節はトランスフェリンのエンドサイトーシスと、どのように関連しているのでしょうか？

我々研究室による以前の研究では、**NHE6** の局在に關与する **RACK1** の発現抑制により **NHE6** の形質膜量が 50%に減少した。このとき、細胞膜からエンドソームへと **NHE6** は移動したと考えられ、エンドソームの pH は通常よりアルカリ化していた。また、トランスフェリンの取り込みに関しては減少していた[47]。一方、本研究では、**NHE6** の発現抑制によってトランスフェリン取り込みの減少が見られた。**RACK1** 発現抑制時と **NHE6** 発現抑制時に起こっている現象の共通点は、アダプタータンパク質やクラスリンのリクルートが始まる場所としての細胞膜における **NHE6** 量の減少である。このことから、トランスフェリンの取り込みにとって本質的に重要なことは、細胞膜での pH 調節であると考えることが出来る。

エンドサイトーシスを進行させるには、アダプタータンパク質 (**AP-2**) やコートタンパク質 (クラスリン) の相互作用が重要である。また、これらの相互作用にはリン酸化が必須であることが報告されており[77]、キナーゼとの相互作用も必要である。**NHE6** はこれらのタンパク質の相互作用時に近くに存在し、これらのタンパク質の相互作用に適切な pH 環境を提供していると考えられる。言い換えれば、**NHE6** はトランスフェリンの取り込み時に、タンパク質相互作用の起こる細胞膜直下の pH を維持する働きをしていると考えられる。つまり、**NHE6** 発現抑制細胞では **NHE6** の欠損によりトランスフェリンの取り込み初期において、膜直下の pH を正常に維持できなくなり、その結果として、アダプタータンパク質とコートタンパク質の相互作用等が影響される。そして、トランスフェリン輸送小胞が形成できず、トランスフェリンの取り込みが減少したのではないかと考えられる。

この仮説についてはまだ直接の証拠がない。しかし、最近我々の研究室では出芽酵母のオルガネラ型 **NHE** であり、**NHE6** の相同性の高い **NHX1p** は、エンドソーム表面の pH 環境維持を介して、**MVB** (multivesicular body) 形成に關与していることを報告した[78]。さらに、エンドソーム表

面の pH 環境の維持は、MVB 形成に必要な Vps27p タンパク質のエンドソーム膜へのリクルートに必要であることを示した。また、他グループの報告によれば、NHE1 はマイクロピノサイトーシスの膜直下の pH を制御する[79]。これらの結果から、NHE6 も膜直下の pH 制御を介してエンドサイトーシスに関与している可能性が高いと考えられる。また、肝細胞 HepG2 では NHE6 の発現抑制と過剰発現はエンドソーム pH を異常にし、アピカル面で囲まれた毛細輸胆管空間の形成を阻害する。このとき、脂質やタンパク質の極性輸送が阻害されるため、正常なアピカルドメイン形成には NHE6 によるエンドソーム pH 制御が重要であることが示されている[66]。この結果も合わせると、エンドサイトーシスの初期や、エンドソームでの仕分け処理(sorting)など、メンブレントラフィックの多くのステップに NHE6 が関与していることを示している。

5-4. 神経疾患と NHE6

最近、NHE6 は、遺伝性の精神遅滞との関連していることが報告された[80]の報告では、NHE6 単独、あるいは NHE6 と NHE9 を同時に一過的発現抑制した HeLa 細胞を使って実験が行われている。その結果、本実験の結果と同じく、EGF の取り込みには差が無いことを示している。さらに、好酸性染料 LysoTracker Red を用いたアッセイによって、NHE6 の単独発現抑制では、酸性オルガネラのアルカリ化は起こらないことを報告している。これは発現抑制でエンドソームがアルカリ化するという本論文の結果と一見反する。しかし、LysoTracker はすべての強く酸性化されたオルガネラを染色する色素であり、リソソームや後期末期エンドソームを主に染色する。私は NHE6 と非常によく共局在しているトランスフェリンに pH 感受性色素を付加したものをプローブとして用いたため、より正確に NHE6 が局在しているオルガネラを特異的に測定できたと考えられる。また、今回、我々は、NHE6 発現抑制がトランスフェリンの取り込み阻害を起こすことを示した。つまり、本研究によって初めて NHE6 はクラスリン依存的トランスフェリンに関与していることを証明できた。最近の研究から NHE6 と NHE9 の変異は、それぞれアンジェルマン症候群様の X 連鎖精神遅滞と、注意欠陥多動性障害と関連があると報告されている[81-83]。本研究の結果を考えると、神経細胞で

は NHE6 や NHE9 の変異により pH 制御機能を失い pH 環境が異常となり、その結果、神経細胞におけるメンブレントラフィックが阻害され、神経細胞の機能障害が生じるという可能性が考えられる。

5-5. 展望

本研究では NHE6 のメンブレントラフィックでの機能を解析し、報告したが、他のオルガネラ型のメンブレントラフィックにおける機能は未知の点が多い。これらを解析することで、さらにオルガネラ NHE ファミリー全体の細胞における生理的機能を理解することが出来るであろう。特に、NHE9 と NHE6 は、初期〜リサイクリングエンドソームに局在しており局在の点では類似している。NHE9 の特異的機能解析を行い、NHE6 との役割分担なども明らかにする必要がある。また、本研究で示したエンドサイトーシスにおける NHE6 の機能的な重要性と HepG2 の毛細胆管形成における具体的機能や神経疾患との関連性は依然として不明である。エンドサイトーシスの破綻が上記生理的機能の異常を引き起こすのか、あるいはエンドサイトーシス以外のメンブレントラフィックのステップにおける異常が関連するのかを明らかにしていく必要がある。

最後にオルガネラ NHE について、アイソフォーム間での機能分化・進化について考察する。最近、NHE8 は後期エンドソームの形態と機能の維持に関与するとの報告があった[84]。Lawrence らによれば、HeLa-M 細胞において NHE8 は蛍光抗体染色ではゴルジ体様のパターンで染色されるが、電子顕微鏡レベルで詳細に観察すると TGN および一部 MVB(後期エンドソーム)が観察される。また、NHE8 の発現阻害によって、MVB を経由する EGF の分解が阻害される。さらに MVB が細胞内に増加・凝集することが報告された。これは上述の酵母における MVB 形成での機能と類似している。しかし、NHE8 と酵母のオルガネラ型 NHE(Nhx1p)は配列上の相同性は低く、配列上は NHE6 のほうが近縁である。オルガネラ型 NHE が進化的にエンドサイトーシスにおける役割のような新たな機能を獲得し、それぞれのアイソフォームが異なった機能を担うようになっていった可能性も考えられる。線虫・昆虫など他生物でのオルガネラ型 NHE の働きが明らかになって

くと、オルガネラ型 NHE のアイソフォーム間の機能の統一性と多様性、あるいは機能分化についてより詳しく考察することが出来るであろう。

第 6 章 材料と方法

プラスミドの構築

野生型と変異体 NHE6.1 の過剰発現用プラスミド(pCMV-NHE6.1-HA) と (pCMV-NHE6.1 [E287Q/D292N]-HA)は当研究室で以前に作製したものである[47,66]。発現抑制用プラスミドベクターは遺伝子発現抑制型マイクロ RNA である BIC (B-cell integration cluster)をコードする miR-155[85]を由来とする カセット(SIBR)をベクターpEGFP-C1 (Clontech, Mountain View, CA, USA)に組み込んだものである。この SIBR カセットは上流下流に Eco RI と Kpn I をもち、内部に二つの Bbs I サイトが含まれている(Fig. 6-1)[85]。SIBR は以下の合成 DNA をアニーリングして作製した:TAA GAA TTC ATA AGT CGA CCT GGA GGC TTG CTG AAG GCT GTA TGC TTT GTC TTC AAG ATC TGG AAG ACA CCA GGA CAC AA and CTA GGT ACC AAG CTT CTC GAG GGC CAT TTG TTC CAT GTG AGT GCT AGT AAC AGG CCT TGT GTC CTG GTG TCT TCC AGA TC。Bbs I サイト間に、Invitrogen (Carlsbad, CA)の Web サイトを利用してデザインされた NHE6 発現抑制用(3 セット)と LacZ(コントロール)へアピン RNA をコードする DNA 配列を組み込んだ。それぞれの配列は以下の通りである。NHE6 #1: TGC TGA ACT GTT TCC CAT AAA TCT CCG TTT TGG CCA CTG ACT GAC GGA GAT TTG GGA AAC AGT T と CCT GAA CTG TTT CCC AAA TCT CCG TCA GTC AGT GGC CAA AAC GGA GAT TTA TGG GAA ACA GTT C (NHE6 の ORF nt 1853 をターゲット); NHE6 #2: TGC TGA TCA GTT GCT GAT ACA ATG GCG TTT TGG CCA CTG ACT GAC GCC ATT GTC AGC AAC TGA T と CCT GAT CAG TTG CTG ACA ATG GCG TCA GTC AGT GGC CAA AAC GCC ATT GTA TCA GCA ACT GAT C, (NHE6 の ORF nt 673 をターゲット); NHE6 #3: TGC TGT TCA ACA TCA ACT TGA AGC TCG TTT TGG CCA CTG ACT GAC GAG CTT CAT TGA TGT TGA A と CCT GTT CAA CAT CAA TGA AGC TCG TCA GTC AGT GGC CAA AAC GAG CTT CAA GTT GAT GTT GAA C, (NHE6 の ORF nt 721 をターゲット); LacZ: TGC TGA AAT CGC TGA

TTT GTG TAG TCG TTT TGG CCA CTG ACT GAC GAC TAC ACA TCA GCG ATT T と CCT
GAA ATC GCT GAT GTG TAG TCG TCA GTC AGT GGC CAA AAC GAC TAC ACA AAT
CAG CGA TTT C。組み込み操作はメーカー (Invitrogen) の指示書どおりに、一本鎖 DNA をア
ニールングし、発現ベクター SIBR カセットの二つの Bbs I サイトの間に組み込んだ (Fig. 6-1)。組み
込んだフラグメントのヌクレオチド配列は DNA シークエンスより検証した。

細胞培養と NHE6 発現抑制と過剰発現細胞株の樹立

HeLa 細胞は Eagle's minimal essential 培地 (MEM) に 10% 牛の血清を入れ、37 度で 5%
の CO₂ の条件で培養した。NHE6 発現抑制と過剰発現細胞株を樹立するため、野生型 NHE6 と
変異体 (E287Q/D292N) の過剰発現用プラスミド、NHE6 発現抑制用 (3 セット) と LacZ (コントロー
ル) プラスミドを Lipofectamine 2000 (Invitrogen) によって HeLa 細胞にトランスフェクションした
(60-mm 培養皿に細胞約 1.6×10^5 個)。G418 (400 mg/ml または 600 mg/ml) (和光純薬) 添
加 MEM 培地によりセレクションを行い、G418 耐性のコロニーを分離後、G418 (200 μ g/ml) 添
加 MEM 培地でさらに培養した。3 セットの NHE6 発現抑制のプラスミドの中から最も発現抑制が
見られた 3 番のプラスミドを用いて分離されたコロニーを実験で使用した。

抗体

ウサギポリクローナル 抗-NHE6 抗体は以前に当研究室で作製された [47]。抗-transferrin
receptor (clone H68.4, Zymed/Invitrogen CA, USA), 抗-EEA1 (Early endosome antigen 1)
(clone 14, BD Transduction Laboratories NJ, USA), 抗-clathrin heavy chain (clone x22,
Calbiochem Darmstadt, Germany), と 抗-actin (clone MAB1501, Millipore) 抗体は、それぞ
れ会社から購入した。抗-LAMP2 (Lysosomal-associated membrane protein 2) (clone H4B4)
は Developmental Studies Hybridoma Bank (The University of Iowa) から分譲された。ペルオ
キシダーゼ結合二次抗ウサギとマウス抗体は Jackson ImmunoResearch Laboratories と Vector

Laboratories から購入した。Alexa Fluor 488-, Alexa Fluor 546- と Alexa Fluor 633 結合二次抗体は Invitrogen から購入した。

トランスフェリン(Transferrin), 上皮成長因子(EGF), 低密度ポリタンパク質(LDL), コレラトキシン B(CTxB)、デキストラン(dextran) の取り込み解析

細胞は 60mm 培養皿で約 90–95%の密集度まで培養し、無血清 MEM (SF-MEM)で二回洗浄した。37°C で 0.1%の牛血清(BSA)を含む SF-MEM に 25 µg/ml Alexa Fluor 546 結合 トランスフェリン(Transferrin) (Invitrogen, T-23364)、1 ng/ml Alexa Fluor 488 結合上皮成長因子 epidermal growth factor (ビオチン化 epidermal growth factor と、Alexa Fluor 488 結合ストレプトアビジン混合物, Invitrogen, E-13345) 、1 µg/ml の BODIPYFL 結合 Low-Density Lipoprotein (BODIPYFL-LDL Invitrogen, L-3485)、1 µg/ml Alexa Fluor 488 結合 cholera toxin B (CTxB, Invitrogen, C-34775)または 200 µg/ml の Rhodamine-Dextran (Sigma-Aldrich, R9379)を加え、細胞に添加した。

トランスフェリン、EGF と CTxB の取り込みにおいては、細胞を集めて、氷冷した無血清 MEM で二回洗浄した後、100 µL の溶解緩衝液(リン酸塩緩衝液: 1% Nonidet P-40, 1% Triton X-100, 1 mM、フッ化フェニルメチルスルホニル(phenylmethylsulfonyl fluoride)と、プロテアーゼ阻害剤混合物 [1 µg/ml ロイペプチン(leupeptin), ペプスタチン A(pepstatin A)とアプロチニン(aprotinin)])に溶かした。ソニケーション後、細胞抽出液中のタンパク質は SDS-PAGE ゲル(トランスフェリンと EGF: 10%、CTxB: 15%)により分離した。ターゲットになるバンドの蛍光強度はレーザー蛍光スキャナー(Typhoon FLA 9000, GE Healthcare)により検出した。

追跡実験(パルスーチェイス)においては、細胞は氷冷した無血清 MEM 培地(SF-MEM)で二回洗浄し、25 µg/ml Alexa Fluor 546-結合トランスフェリンと 0.1% BSA を含む SF-MEM を1時間細胞に添加した。細胞に結合していないトランスフェリンは SF-MEM で洗浄して除去した後に、細胞に 37°Cの培地を加えてトランスフェリンを取り込ませた。各取り込み時間において、細胞を氷

冷した SF-MEM で洗浄し、さらに、細胞表面の未取り込みトランスフェリンは氷冷した酸性緩衝液 (pH 4.2) で三回洗浄して除去した。その後、リン酸緩衝液で洗浄し、固定した。

免疫蛍光顕微鏡観察

細胞(トランスフェリン、EGF、LDL、CTxB、デキストランを取り込みの各時間点のものも含む)は、以前記述したように標準的方法で固定と染色を行った[47]。細胞は ORCA-ER1394 デジタルカメラを装備した BX-51 顕微鏡と FLUOVIEW FV1000-D 共焦点レーザー顕微鏡 (Olympus) で撮影した。蛍光強度の測定は、蛍光写真を画像解析ソフトウェア ImageJ (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>) で解析した。解析対象領域(ROI: region of interest)は、細胞の形と一致させ、ROI の平均蛍光強度を以後の計算に用いた。

エンドソームと細胞質 pH の測定

pH感受性と非感受性蛍光物質ラベルしたトランスフェリンの比を測定(レシオ測定)してpH測定する方法の詳細は、以前に文献中に記述されているが[66]、以下に概要を示す。細胞はガラスボトム培養皿(松浪硝子工業)で培養し、0.1% BSA含むHanks' balanced salt solution (HBSS) で二回洗浄した。pH感受性フルオレセインでラベルしたトランスフェリン(50 μ g/ml)と非感受性 Alexa Fluor 546でラベルしたトランスフェリン(25 μ g/ml)を含む培養液(37 $^{\circ}$ C)で1時間細胞をインキュベートした後、細胞を洗浄した。続いてFLUOVIEW FV1000D共焦点レーザー顕微鏡 (Olympus) により二種類の蛍光色素の蛍光を測定した。pHの検量線作成には、緩衝液 (125 mM KCl, 25 mM NaCl, 10 μ M nigericin, 10 μ M monensinと25 mM 2-モルフォリノエタンスルホン酸[2-(N-Morpholino) ethanesulfonic acid (MES)], それぞれpH 6.8, 6.3, 5.8, 5.3と5.0に調整)中の細胞で測定した蛍光の値を用いた。レシオ測定画像は、MetaMorph software (Molecular Devices)により解析を行った。ソフトは自動的にpH非感受性色素の局在する部分を解析対象領域Region of interest (ROI) として認識し、そのROIにおけるpH感受性色素の蛍光

量を測定するよう設定、使用した。その後各ROIについて二種類の蛍光色素の蛍光強度比を計算した。毎回の実験は30細胞の蛍光を解析した。

細胞質pHの測定の場合には、細胞は丸いカバーガラス(直径13.2 mm) (松浪硝子工業)上に培養した。測定前に、カバーガラスを、2',7'-bis-(2-carboxyethyl)-5-(and-6)-carboxyfluorescein, acetoxymethyl ester (BCECF-AM, B1150, Invitrogen) (5 μ M)を含むHBSSに移し、30分間インキュベートした。BCECFの蛍光(励起波長:440 nm と 500 nm、蛍光波長:530 nm)は、細胞内イオン分析器CAF-110 (JASCO)で20分間測定した。レシオ強度は励起500 nmと440 nmのときの蛍光強度の比より計算し、pH検量線はpH緩衝液(pH 6.6, 7.0, 7.4と8)より計算した[86]。

細胞表面 NHE6 とトランスフェリンレセプター量の測定

細胞は60mm培養皿で約90–95%の密集度まで培養し、無血清のMEM (SF-MEM)で二回洗浄した。次に0.1%の牛血清(BSA)含むSF-MEMにホロトランスフェリン(25 μ g/ml) (Invitrogen)を添加し、37°Cで30分間インキュベートした後に、反応性ビオチン化修飾剤(EZ-link Sulfo-NHS-SS-biotin, 5 mg/ml, Thermo Scientific)を含むPBS中に4°Cで30分間反応させた。次はリン酸塩緩衝液(PBS)で二回洗浄後に細胞を破碎し、遠心分離により未破碎画分を取り除いた。この上清を、50 mlを細胞全量サンプルとして保留し、残りに、50 ml アビジンビーズ (NeutrAvidin Agarose and Ultralink Resins, Thermo Scientific)を加えて、4°Cで1時間、回転混合した。その後、ビーズを遠心分離により回収した。細胞全量サンプルおよびビーズに結合した画分はSDS-PAGEにより分離後、それぞれに含まれるNHE6とトランスフェリン受容体を抗体により検出した。

謝辞

本研究は文部科学省の科学研究費補助金とNISF 公益財団法人西村奨学財団より支援されました。大阪大学大学院医学系研究科薬理学講座、生体システム薬理学教室の金井 好克教授、永森 收志博士、大垣 隆一博士には、研究上の様々なお助言に感謝致します。

文献

1. Lee SH, et al, *NHE10, an osteoclast-specific member of the Na⁺/H⁺ exchanger family, regulates osteoclast differentiation and survival [corrected]*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2008. **369**(2): p. 320-6.
2. Naruse K, SM, *Involvement of stretch activated (SA) ion channels in cardiovascular responses to mechanical stimuli*. *Nihon Rinsho*. 1993 Jul;51(7):1891-8.
3. Hernando N, K JZ, Biber J, Murer H, *Molecular determinants for apical expression and regulatory membrane retrieval of the type IIa Na/Pi cotransporter*. *Kidney*, 2001. **60**(2): p. 431-5.
4. JP, U, *The role of the physicochemical environment in determining disc cell behaviour*. *Biochem Soc Trans*, 2002. **30**(Pt 6): p. 858-64.
5. Lange K, *Regulation of cell volume via microvillar ion channels*. *J Cell Physiol* , 2000. **185**(1): p. 21-35.
6. Aharonovitz O, Zaun HC, Balla T, York JD, Orlowski J, and Grinstein S, *Evidence for operation of the direct zinc ligand exchange mechanism for trafficking, transport, and reactivity of zinc in mammalian cells*. *J Inorg Biochem*, 2011. **105**(5): p. 589-99.
7. Lang F, Shumilina E, Ritter M, Gulbins E, Vereninov A, Huber SM, *Ion channels and cell volume in regulation of cell proliferation and apoptotic cell death*. *Contrib Nephrol*, 2006. 152:142-60
8. Annibaldi A, Widmann C, *Glucose metabolism in cancer cells*. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, 2011. 13(4): P 466-70
9. Michard E, AF, Feijó JA, *The role of ion fluxes in polarized cell growth and morphogenesis: the pollen tube as an experimental paradigm*. *Int J Dev Biol*, 2009. **53**(8-10)(: p. 1609-22.
10. Demaurex N, *pH Homeostasis of cellular organelles*. *News Physiol Sci*, 2002. **17**: p. 1-5.

11. Paroutis P, Touret N, and Grinstein S, *The pH of the secretory pathway: measurement, determinants, and regulation*. Physiology (Bethesda), 2004. **19**: p. 207-15.
12. Hughson FM, Reinisch KM, *Structure and mechanism in membrane trafficking*. Curr Opin Cell Biol, 2010. **22(4)**: p. 454-60.
13. Crawford JM, *Role of vesicle-mediated transport pathways in hepatocellular bile secretion*. Semin Liver Dis, 1996. **16(2)**: p. 169-89.
14. Burgess TL, Kelly RB, *Constitutive and regulated secretion of proteins*. Annu Rev Cell Biol, 1987. **3**(: p. 243-93.
15. Ponnambalam S, Baldwin SA, *Constitutive protein secretion from the trans-Golgi network to the plasma membrane*. Mol Membr Biol, 2003. **20(2)**:129-39
16. Shull GE, Miller ML, Prasad V, *Secretory pathway stress responses as possible mechanisms of disease involving Golgi Ca²⁺ pump dysfunction*. Biofactors, 2011. **37(3)** : p. 150-8.
17. Dejica, D, *Gastrointestinal secretory immunologic system in health and disease*. Rev Roum Med Intern, 1973. **10(1)**: p.3-12.
18. Ramachandran, R, *Vesicle scission: dynamin*. Semin Cell Dev Biol, 2011. **22(10-7)**.
19. Mettlen M, et al, *Cargo- and adaptor-specific mechanisms regulate clathrin-mediated endocytosis*. J Cell Biol. **188(6)**: p. 919-33.
20. Dautry-Varsat A, *Receptor-mediated endocytosis: the intracellular journey of transferrin and its receptor*. Biochimie, 1986. **68(3)**: p. 375-81.
21. Harding C, Heuser J, and Stahl P, *Receptor-mediated endocytosis of transferrin and recycling of the transferrin receptor in rat reticulocytes*. J Cell Biol, 1983. **97(2)**: p. 329-39.
22. Kazazic M, et al, *Epsin 1 is involved in recruitment of ubiquitinated EGF receptors into clathrin-coated pits*. Traffic, 2009. **10(2)**: p. 235-45.
23. Nakatsu F, Ohno H, *Adaptor protein complexes as the key regulators of protein*

- sorting in the post-Golgi network*. Cell Struct Funct, 2003. **28**(5): p. 419-29.
24. Vandoorne K, Addadi Y, Neeman M, *Visualizing vascular permeability and lymphatic drainage using labeled serum albumin*. Angiogenesis, 2010 **13**(75): p. 85.
25. Laniosz V, Holthusen KA, and Meneses P.I, *Bovine papillomavirus type 1: from clathrin to caveolin*. J Virol, 2008. **82**(13): p. 6288-98.
26. Falcone S, et al, *Macropinocytosis: regulated coordination of endocytic and exocytic membrane traffic events*. J Cell Sci, 2006. **119**(Pt 22): p. 4758-69.
27. Silva MT, *Macrophage phagocytosis of neutrophils at inflammatory/infectious foci: a cooperative mechanism in the control of infection and infectious inflammation*. J Leukoc Biol. , 2011 **89**(5): p.675-83.
28. Vidal-Quadras M, Gelabert-Baldrich MG-BM, Soriano-Castell D, Lladó A, Rentero C, Calvo M, Pol A, Enrich C, Tebar F, *Rac1 and calmodulin interactions modulate dynamics of Arf6-dependent endocytosis*. Traffic, 2011. **12**(12):1879-96.
29. Stuermer CA, *Reggie/flotillin and the targeted delivery of cargo*. J Neurochem, 2011 **116**(5): p. 708-13.
30. アレクサンダー・ボーモント・ホープ著、柴岡孝雄訳、イオン輸送と生体膜. 1972.
31. 花井哲也, 膜とイオン——物質移動の理論と計算. 化学同人, 1978.
32. Bruce Alberts, E.A.著, 中村 桂子 (翻訳), 松原 謙一 (翻訳) Molecular Biology of the Cell 4th Revised. 2001.
33. 中島恵美, 薬の生体内運命. ネオメディカル, 2004.
34. Brett CL, M. Donowitz, and R Rao, *Evolutionary origins of eukaryotic sodium/proton exchangers*. Am J Physiol Cell Physiol, 2005. **288**(2): p. C223-39.
35. Ohgaki R, et al, *Organellar Na⁺/H⁺ exchangers: novel players in organelle pH regulation and their emerging functions*. Biochemistry, 2011. **50**(4): p. 443-50.
36. Attaphitaya S, Park K, and JE Melvin, *Molecular cloning and functional expression of a rat Na⁺/H⁺ exchanger (NHE5) highly expressed in brain*. J Biol Chem, 1999.

- 274(7)**: p. 4383-8.
37. Baird NR, et al, *Molecular cloning, genomic organization, and functional expression of Na⁺/H⁺ exchanger isoform 5 (NHE5) from human brain*. J Biol Chem, 1999. **274(7)**: p. 4377-82.
38. Orłowski J, Kandasamy RA, and GE Shull, *Molecular cloning of putative members of the Na/H exchanger gene family. cDNA cloning, deduced amino acid sequence, and mRNA tissue expression of the rat Na/H exchanger NHE-1 and two structurally related proteins*. J Biol Chem, 1992. **267(13)**: p. 9331-9.
39. Numata M, and J Orłowski, *Molecular cloning and characterization of a novel (Na⁺,K⁺)/H⁺ exchanger localized to the trans-Golgi network*. J Biol Chem, 2001. **276(20)**: p. 17387-94.
40. Nakamura N, et al, *Four Na⁺/H⁺ exchanger isoforms are distributed to Golgi and post-Golgi compartments and are involved in organelle pH regulation*. J Biol Chem, 2005. **280(2)**: p. 1561-72.
41. Hill JK, et al, *Vestibular hair bundles control pH with (Na⁺, K⁺)/H⁺ exchangers NHE6 and NHE9*. J Neurosci, 2006. **26(39)**: p. 9944-55.
42. Padan E, Venturi M, Gerchman Y, Dover N, *Na⁽⁺⁾/H⁽⁺⁾ antiporters*. Biochim Biophys Acta, 2001 **1505(1)**: p. 144-57.
43. Tsuboi Y, Inoue H, Nakamura N, and Kanazawa H, *Identification of membrane domains of the Na⁺/H⁺ antiporter (NhaA) protein from Helicobacter pylori required for ion transport and pH sensing*. J Biol Chem, 2003. **278(24)**: p. 21467-73.
44. Matsushita M, Sano Y, Yokoyama S, Takai T, Inoue H, Mitsui K, Todo K, Ohmori H, and Kanazawa H, *Loss of Calcineurin Homologous Protein 1 (CHP1) in chicken B lymphoma DT40 cells destabilizes Na⁺/H⁺ exchanger isoform1 (NHE1) protein*. Am J Physiol Cell Physiol, 2007. **293(1)**:C246-54
45. Brett CL, et al, *Human Na⁽⁺⁾/H⁽⁺⁾ exchanger isoform 6 is found in recycling endosomes of cells, not in mitochondria*. Am J Physiol Cell Physiol, 2002. **282(5)**: p.

C1031-41.

46. Goyal S, G Vanden Heuvel, and Aronson PS, *Renal expression of novel Na⁺/H⁺ exchanger isoform NHE8*. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2003. **284**(3): p. F467-73.
47. Fukura N, et al, *A Membrane-Proximal Region in the C-Terminal Tail of NHE7 Is Required for Its Distribution in the Trans-Golgi Network, Distinct from NHE6 Localization at Endosomes*. *Journal Of Membrane Biology*, 2010. **234**(3): p. 149-158.
48. Lin PJ, et al, *Caveolins bind to (Na⁺, K⁺)/H⁺ exchanger NHE7 by a novel binding module*. *Cell Signal*, 2007. **19**(5): p. 978-88.
49. Ohgaki R, et al, *Cell surface levels of organellar Na⁺/H⁺ exchanger isoform 6 are regulated by interaction with RACK1*. *Journal Of Biological Chemistry*, 2008. **283**(7): p. 4417-4429.
50. Kagami T, et al, *Identification and biochemical characterization of the SLC9A7 interactome*. *Mol Membr Biol*, 2008. **25**(5): p. 436-47.
51. Xu H, R Chen, and Ghishan FK, *Subcloning, localization, and expression of the rat intestinal sodium-hydrogen exchanger isoform 8*. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2005. **289**(1): p. G36-41.
52. Lin PJ, Williams, WP, Luu Y, Molday RS, Orlowski J, and Numata M, *Secretory carrier membrane proteins interact and regulate trafficking of the organellar (Na⁺, K⁺)/H⁺ exchanger NHE7*. *J Cell Sci*, 2005. **118**(Pt 9): p. 1885-97.
53. Lin PJ, Williams WP, Kobiljski J, and Numata M, *Cavelins binds to (Na(+),K(+))/H(+)* exchanger NHE7 by a novel binding module. *Cell Signal*, 2006. **19**(5): p. 978-88.
54. Putney LK, Denker SP, and Barber DL, *The changing face of the Na⁺/H⁺ exchanger, NHE1: structure, regulation, and cellular actions*. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 2002. **42**: p. 527-52.
55. Schultheis PJ, Clarke LL, Meneton P, Miller ML, Soleimani M, Gawenis LR, Riddle T M, Duffy JJ, Doetschman T, Wang T, Giebisch G, Aronson PS, Lorenz JN, and Shull

- GE, *Renal and intestinal absorptive defects in mice lacking the NHE3 Na⁺/H⁺ exchanger*. Nat Genet, 1998. **19**(3): p. 282-5.
56. Riquier AD, Lee DH, and McDonough AA, *Renal NHE3 and NaPi2 partition into distinct membrane domains*. Am J Physiol Cell Physiol, 2009. **296**(4): p. C900-10.
57. Gens JS, et al, *Different ionic conditions prompt NHE2 and NHE3 translocation to the plasma membrane*. Biochim Biophys Acta, 2007. **1768**(5): p. 1023-35.
58. Gu XQ, Yao H, and Haddad GG, *Increased neuronal excitability and seizures in the Na⁽⁺⁾/H⁽⁺⁾ exchanger null mutant mouse*. Am J Physiol Cell Physiol, 2001. **281**(2): p. C496-503.
59. Cox GA, LutzCM, Yang CL, Biemesderfer D, Bronson RT, Fu A, Aronson PS, Noebels JL, and Frankel WN, *Sodium/hydrogen exchanger gene defect in slow-wave epilepsy mutant mice*. Cell, 1997. **91**(1): p. 139-48.
60. Roskopf D, Fromter E, and Siffert W, *Hypertensive sodium-proton exchanger phenotype persists in immortalized lymphoblasts from essential hypertensive patients. A cell culture model for human hypertension*. J Clin Invest, 1993. **92**(5): p. 2553-9.
61. Hill JK, BC, Chyou A, Kallay LM, Sakaguchi M, Rao R, Gillespie PG, *Vestibular hair bundles control pH with (Na⁺, K⁺)/H⁺ exchangers NHE6 and NHE9*. J Neurosci., 2006. **26**(39) : p. 9944-55.
62. Johnson LS, et al, *Endosome acidification and receptor trafficking: bafilomycin A1 slows receptor externalization by a mechanism involving the receptor's internalization motif*. Mol Biol Cell, 1993. **4**(12): p. 1251-66.
63. Mohammad-Panah R, et al, *An essential role for CIC-4 in transferrin receptor function revealed in studies of fibroblasts derived from Clcn4-null mice*. J Cell Sci, 2009. **122**(Pt 8): p. 1229-37.
64. Sigismund S, et al, *Clathrin-mediated internalization is essential for sustained EGFR signaling but dispensable for degradation*. Dev Cell, 2008. **15**(2): p. 209-19.

65. Goh LK, et al, *Multiple mechanisms collectively regulate clathrin-mediated endocytosis of the epidermal growth factor receptor*. J Cell Biol. **189**(5): p. 871-83.
66. Grieshaber S, Swanson JA, and T Hackstadt, *Determination of the physical environment within the Chlamydia trachomatis inclusion using ion-selective ratiometric probes*. Cell Microbiol, 2002. **4**(5): p. 273-83.
67. Bankers-Fulbright JL, et al, *Platelet-activating factor stimulates cytoplasmic alkalinization and granule acidification in human eosinophils*. J Cell Sci, 2004. **117**(Pt 24): p. 5749-57.
68. Ohgaki R, et al, *The Na⁺/H⁺ Exchanger NHE6 in the Endosomal Recycling System Is Involved in the Development of Apical Bile Canalicular Surface Domains in HepG2 Cells*. Molecular Biology Of The Cell, 2010. **21**(7): p. 1293-1304.
69. Motley A, et al, *Clathrin-mediated endocytosis in AP-2-depleted cells*. J Cell Biol, 2003. **162**(5): p. 909-18.
70. Madshus IH, and E Stang, *Internalization and intracellular sorting of the EGF receptor: a model for understanding the mechanisms of receptor trafficking*. J Cell Sci, 2009. **122**(Pt 19): p. 3433-9.
71. Kumari S, Mg S, and Mayor S, *Endocytosis unplugged: multiple ways to enter the cell*. Cell Res. **20**(3): p. 256-75.
72. Tosoni D, et al, *TTP specifically regulates the internalization of the transferrin receptor*. Cell, 2005. **123**(5): p. 875-88.
73. Horonchik L, and Wessling-Resnick M, *The small-molecule iron transport inhibitor ferristatin/NSC306711 promotes degradation of the transferrin receptor*. Chem Biol, 2008. **15**(7): p. 647-53.
74. Hopkins CR, K Miller, and JM Beardmore, *Receptor-mediated endocytosis of transferrin and epidermal growth factor receptors: a comparison of constitutive and ligand-induced uptake*. J Cell Sci Suppl, 1985. **3**: p. 173-86.
75. Leonard D, et al, *Sorting of EGF and transferrin at the plasma membrane and by*

- cargo-specific signaling to EEA1-enriched endosomes.* J Cell Sci, 2008. **121**(Pt 20): p. 3445-58.
76. Ehrlich M, et al, *Endocytosis by random initiation and stabilization of clathrin-coated pits.* Cell, 2004. **118**(5): p. 591-605.
77. Huang F, et al, *Analysis of clathrin-mediated endocytosis of epidermal growth factor receptor by RNA interference.* J Biol Chem, 2004. **279**(16): p. 16657-61.
78. Orth JD, et al, *A novel endocytic mechanism of epidermal growth factor receptor sequestration and internalization.* Cancer Res, 2006. **66**(7): p. 3603-10.
79. Smythe E, *Regulating the clathrin-coated vesicle cycle by AP2 subunit phosphorylation.* Trends Cell Biol, 2002. **12**(8): p. 352-4.
80. Mitsui K, Koshimura Y, Yoshikawa Y, Matsushita M, Kanazawa H, *The endosomal Na⁺/H⁺ exchanger contributes to multivesicular body formation by regulating the recruitment of ESCRT-0 Vps27p to the endosomal membrane.* J Biol Chem, 2011. **286**(43):37625-38
81. Koivusalo M, et al, *Amiloride inhibits macropinocytosis by lowering submembranous pH and preventing Rac1 and Cdc42 signaling.* J Cell Biol, 2010. **188**(4): p. 547-63.
82. Roxrud I, et al, *Dual degradation mechanisms ensure disposal of NHE6 mutant protein associated with neurological disease.* Experimental Cell Research, 2009. **315**(17): p. 3014-3027.
83. Gilfillan GD, et al, *SLC9A6 mutations cause X-linked mental retardation, microcephaly, epilepsy, and ataxia, a phenotype mimicking Angelman syndrome.* American Journal Of Human Genetics, 2008. **82**(4): p. 1003-1010.
84. Morrow EM, et al, *Identifying autism loci and genes by tracing recent shared ancestry.* Science, 2008. **321**(5886): p. 218-23.
85. Takahashi Y, HK, Matsushita M, Funatsuka M, Saito K, Kanazawa H, Goto Y, Saitoh S, *A loss-of-function mutation in the SLC9A6 gene causes X-linked mental retardation resembling Angelman syndrome.* Am J Med Genet B Neuropsychiatr

Genet., 2011 **156(7)** : p. 799-807.

86. Lawrence SP, BN, Luzio JP, Bowers K, *The sodium/proton exchanger NHE8 regulates late endosomal morphology and function.* Mol Biol Cell, 2010. **21(20)** : p. 3540-51.
87. Chung KH, et al., *Polycistronic RNA polymerase II expression vectors for RNA interference based on BIC/miR-155.* Nucleic Acids Res, 2006. **34(7)**: p. e53.
88. Paradiso AM, Tsien RY, and Machen TE, *Na⁺-H⁺ exchange in gastric glands as measured with a cytoplasmic-trapped, fluorescent pH indicator.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1984. **81(23)**: p. 7436-40.

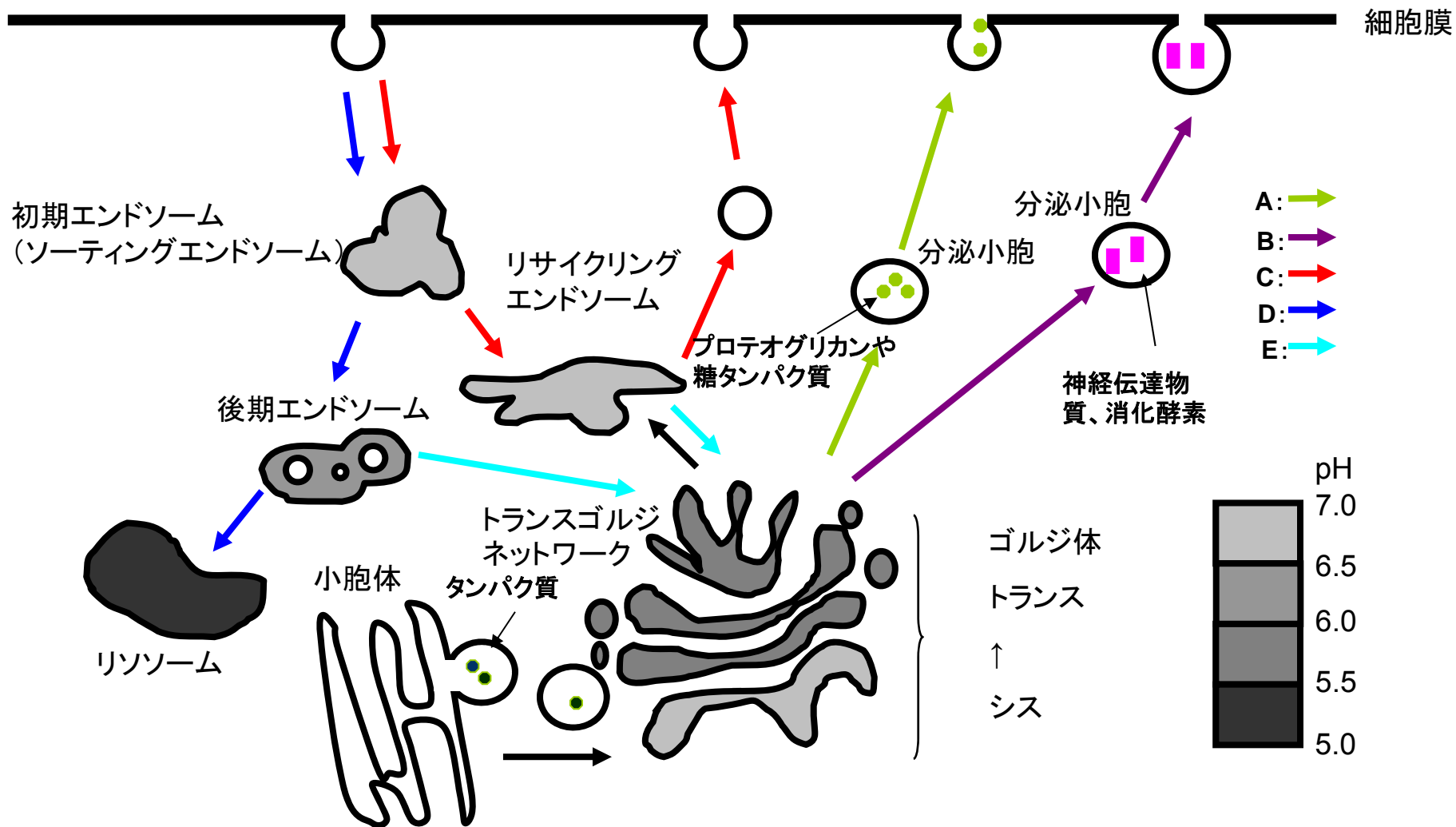


Fig 1-1. 細胞内小器官のpHとメンブレントラフィックの流れ

オルガネラ内のpHの違いは、左側に示す色の濃淡で表示している。メンブレントラフィックの流れについて、構成的分泌(A)、調節性分泌(B)、エンドサイトーシス・リサイクリング(C)、エンドサイトーシス・分解(D)、トランスゴルジネットワークへの逆行輸送(D)の各経路を示した。

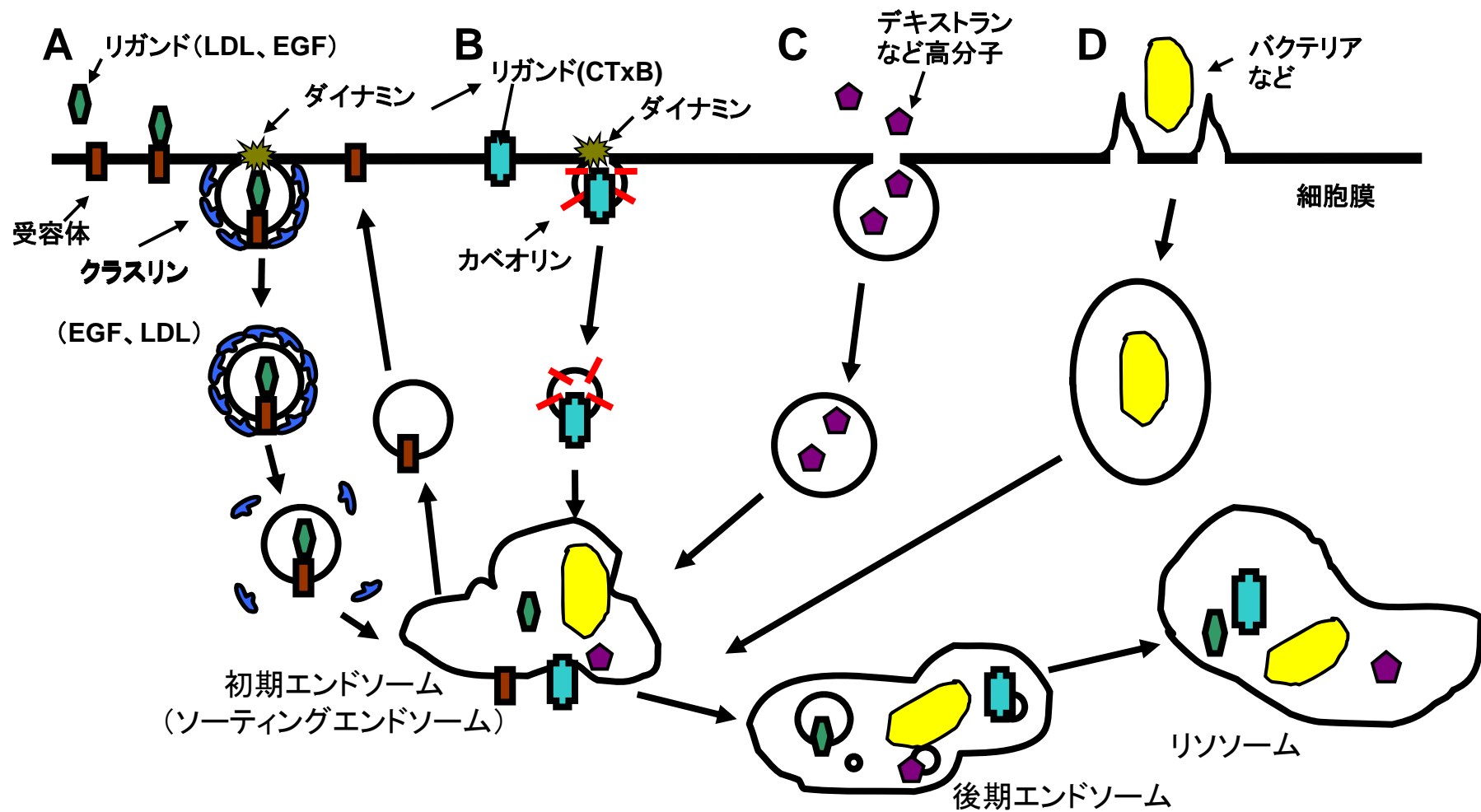
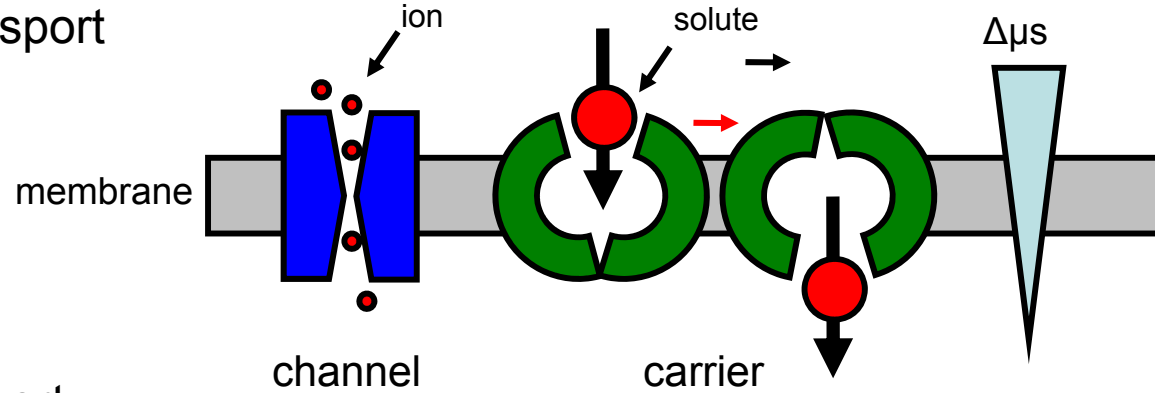


Fig.1-2 哺乳類の主なエンドサイトーシス

- (A) クラスリン依存的エンドサイトーシス。細胞表面で受容体とリガンドが結合した後に、クラスリン被覆小胞が形成し、細胞に取り込まれる。次に、初期エンドソームと融合する。低密度リポ蛋白質の例では、受容体は細胞表面に戻り(リサイクリング)、リガンドはリソソームで分解される。
- (B) カベオラ依存的 エンドサイトーシスでは、カベオリン(Caveolin)の結合した小胞が形成される。
- (C) マクロピノサイトーシス(飲作用)は細胞外の高分子と液体をそのまま細胞内に飲み込む。
- (D) ファゴサイトーシス(食作用)は死んだ細胞やバクテリアなど大型の物体を細胞内に取り込む機構である。

A. Passive transport



B. Active transport

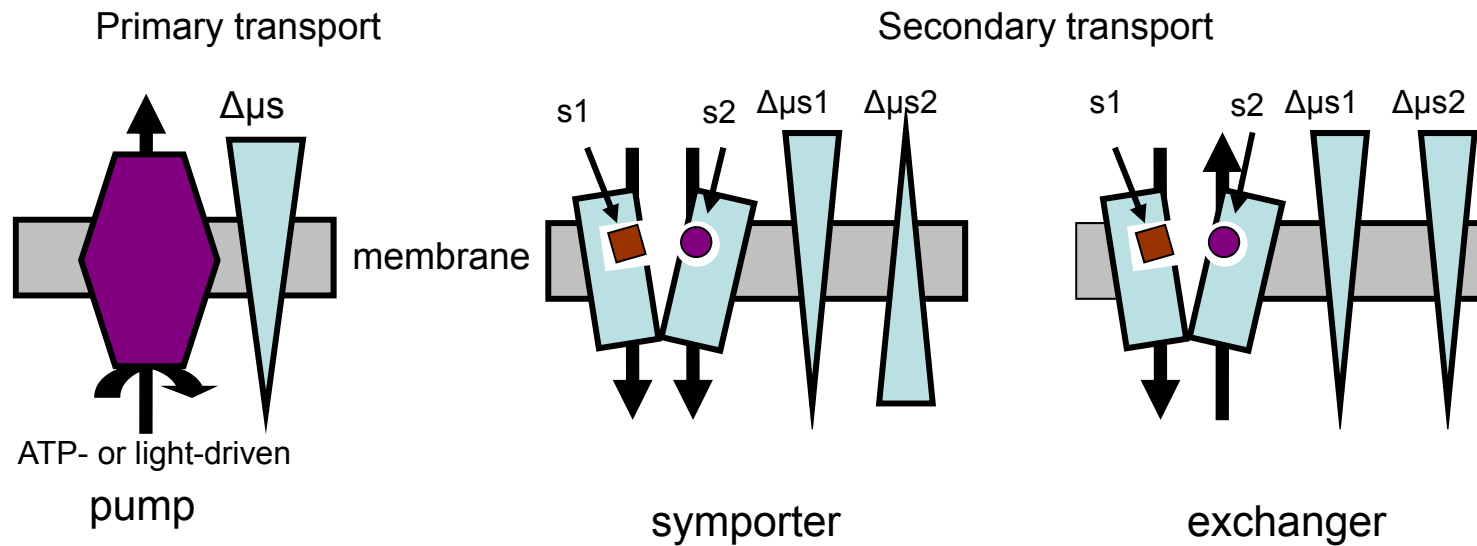


Fig.1-3 受動輸送と能動輸送

輸送体タンパクは基質(S)を膜を通して輸送する。輸送体は「A. 受動輸送」と「B. 能動輸送」に分けられる。受動輸送は電気化学的勾配($\Delta\mu_s$)を利用して輸送を行う。イオンチャネルとキャリア(トランスポーター)はこれに含まれる。能動輸送は $\Delta\mu_s$ に反して輸送できる。一次能動輸送はATPや光のエネルギーを利用するポンプである。二次能動輸送は二つの基質(S1,S2)をこれらの濃度に反して輸送することが出来る、共輸送は二つの基質を同じ方向に、対向輸送は反対方向に輸送する。

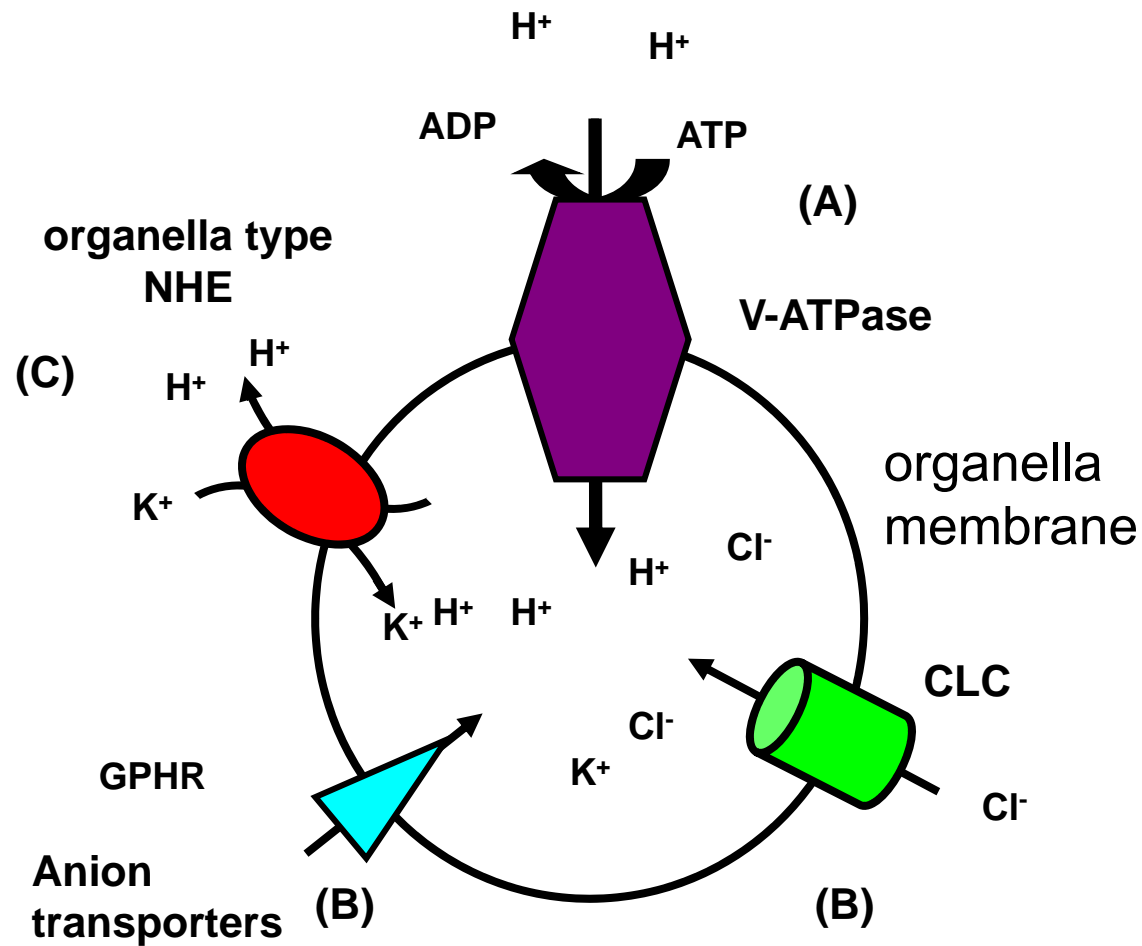


Fig.1-4 V-ATPaseによるオルガネラ酸性化とオルガネラ上の二次輸送系の機能
 プロトンポンプであるV-ATPase (A)によってオルガネラ内は酸性化される。このプロトン輸送に伴って内側が正となる電位が発生するため更なる酸性化は阻害される。この電位を解消し酸性化に寄与するのが陰イオンの輸送体(B)である。また、 Na^+/H^+ 交換輸送体(C)によるプロトン流出によって内部の過剰な酸性化が防がれている。

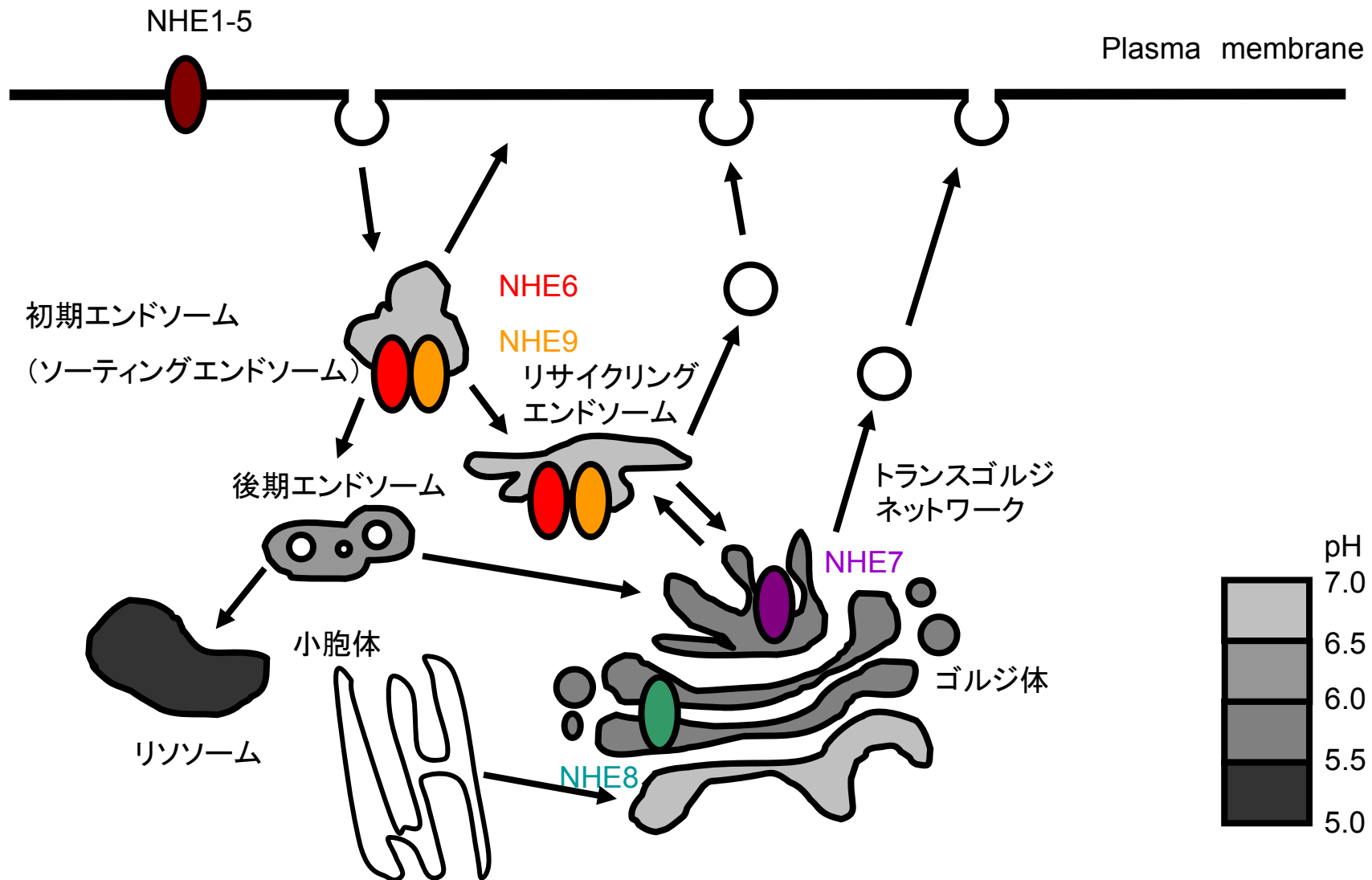


Fig.1-5 哺乳類のNa⁺/H⁺ 交換輸送体の細胞内局在

哺乳類細胞では、9種のNa⁺/H⁺ 交換輸送体 (NHE)が発現している。NHE1-5は細胞膜に局在し、一方、NHE6-9は特定のオルガネラに局在している。NHE6とNHE9主に初期エンドソームとリサイクリングエンドソームに局在する。NHE7とNHE8はそれぞれトランスゴルジネットワーク(TGN)とゴルジ体に局在する。

Table1.哺乳類NHEの細胞発現特異性、細胞内局在と生理機能

	主な発現される臓器	主な細胞内局在	生理機能
NHE1	殆どの臓器細胞	細胞膜、バソラテラル膜	細胞質pH制御、細胞容積調節、細胞増殖、細胞接着、細胞遊走、疾患に関連(虚血再灌流障害、高血圧、下痢、てんかん)
NHE2	胃、小腸、骨格筋、腎臓など	細胞膜、アピカル膜	
NHE3	胃小腸、腎臓、など	細胞膜、アピカル膜	
NHE4	胃、腎臓、脳	細胞膜、バソラテラル膜	
NHE5	脳	細胞膜、シナプス小胞	
NHE6	殆どの臓器細胞	エンドソーム	オルガネラpH制御 疾患に関連 (アンジェルマン症候群様X連鎖精神遅滞)
NHE7	殆どの臓器細胞	TGN	
NHE8	殆どの臓器細胞	ゴルジ体、 腎臓・腸管上皮細胞の 刷系縁膜	
NHE9	殆どの臓器細胞	エンドソーム	

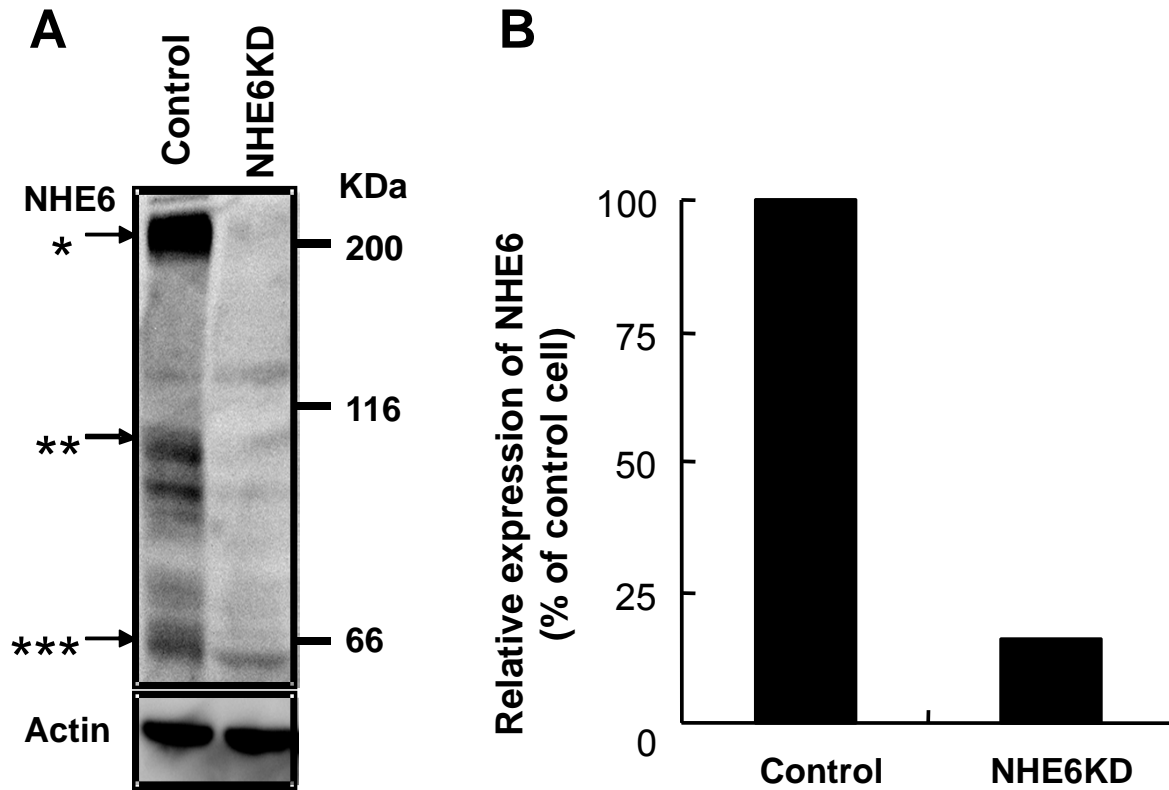


Fig.2-1 NHE6ノックダウンHeLa細胞の樹立

LacZ(コントロール)、またはNHE6の発現阻害を行うために、マイクロRNA発現用ベクターをHeLa細胞に導入し、NHE6ノックダウン(NHE6KD)細胞を樹立した(詳しい方法は6章)。

(A) ウェスタンブロットを用い、抗NHE6(上)と抗アクチン(下)抗体により発現量を分析した(矢印:*,オリゴマー; **,グリコシル化モノマー; ***,モノマー)。

(B) ImageJによるNHE6の発現量の定量。このデータは2回の実験結果の平均を示している。

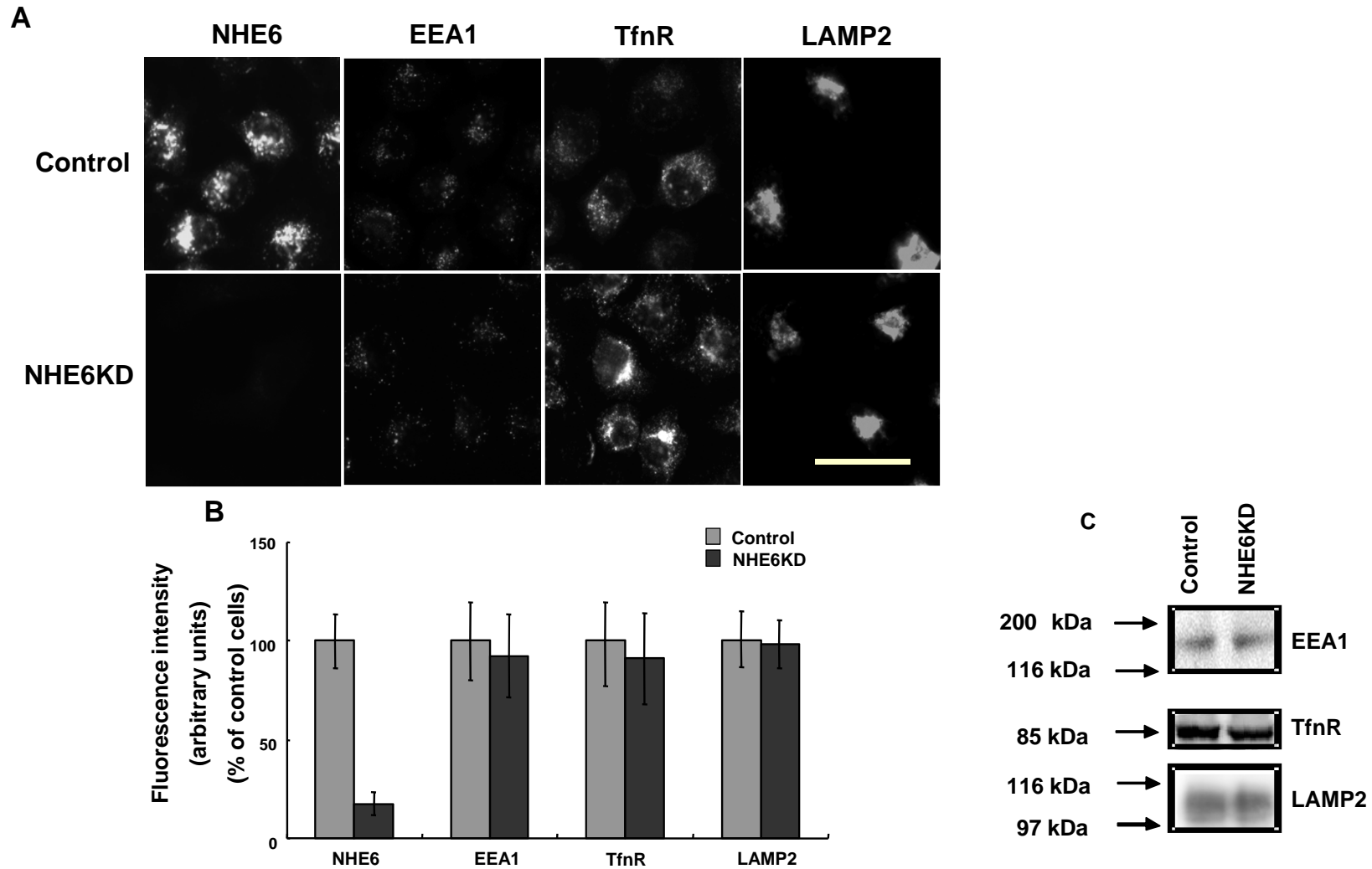


Fig.2-2 NHE6 ノックダウン細胞におけるエンドサイトーシス関連蛋白質の発現

- (A) コントロールとNHE6 ノックダウン細胞各々における、NHE6、エンドサイトーシスマーカーであるEEA1(初期エンドソーム), TfnR(リサイクリングエンドソーム), LAMP2(後期エンドソームとリソソーム)の免疫蛍光写真。(スケールバー:50 μ m)
- (B) (A)の写真から解析したNHE6と各マーカーの発現量(各30細胞の平均値 \pm 標準偏差)。
- (C) ウェスタンブロットによる、NHE6と各マーカータンパクの発現量の比較。それぞれ、EEA1(上)、トランスフェリン受容体(中)、LAMP2(下)に対する抗体で検出した。

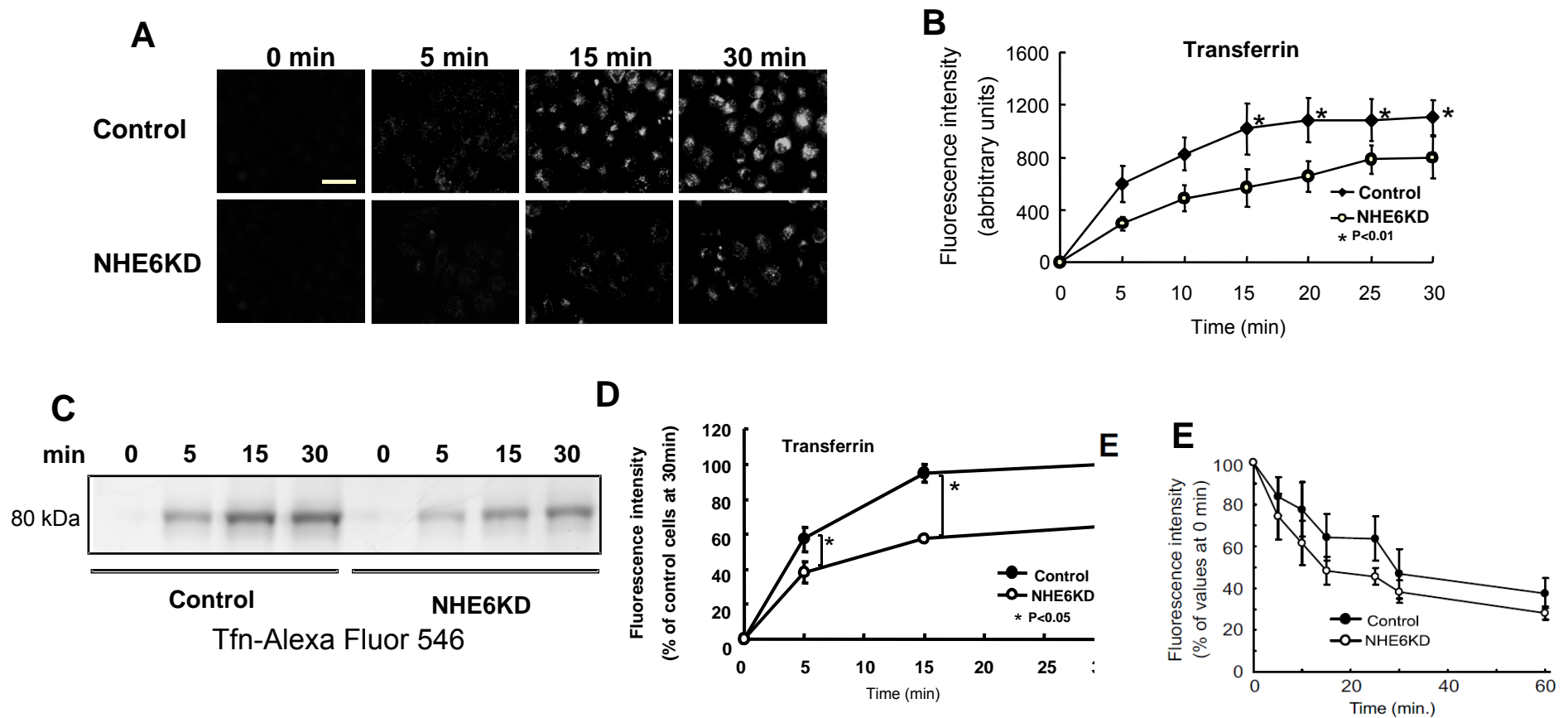


Fig.2-3 NHE6 ノックダウンはトランスフェリンのエンドサイトーシスに影響を与える

(A) コントロールとNHE6 ノックダウン細胞に25 $\mu\text{g/ml}$ のAlexa546-トランスフェリンを37°Cで取り込ませ、各時間に細胞を固定し、

顕微鏡とCCDカメラで撮影した。(スケールバー:50 μm)

(B) (A)の各時間点の細胞あたりの蛍光強度を定量した(各30細胞の平均値 \pm 標準偏差)

(C) 25 $\mu\text{g/ml}$ のAlexa546-トランスフェリンを37°Cで一定時間取り込ませ、細胞破碎した。破碎液をSDS-PAGEで展開し、取り込まれたトランスフェリンのバンドを蛍光検出器より検出した。

(D) (C)のバンドの蛍光強度。

(E) 蛍光ラベルしたトランスフェリンを1時間取り込ませた後に、蛍光トランスフェリンを含まない培地中でインキュベートし、細胞内に残った蛍光トランスフェリンの量を検出した。これらのデータは3回の実験結果の平均である。

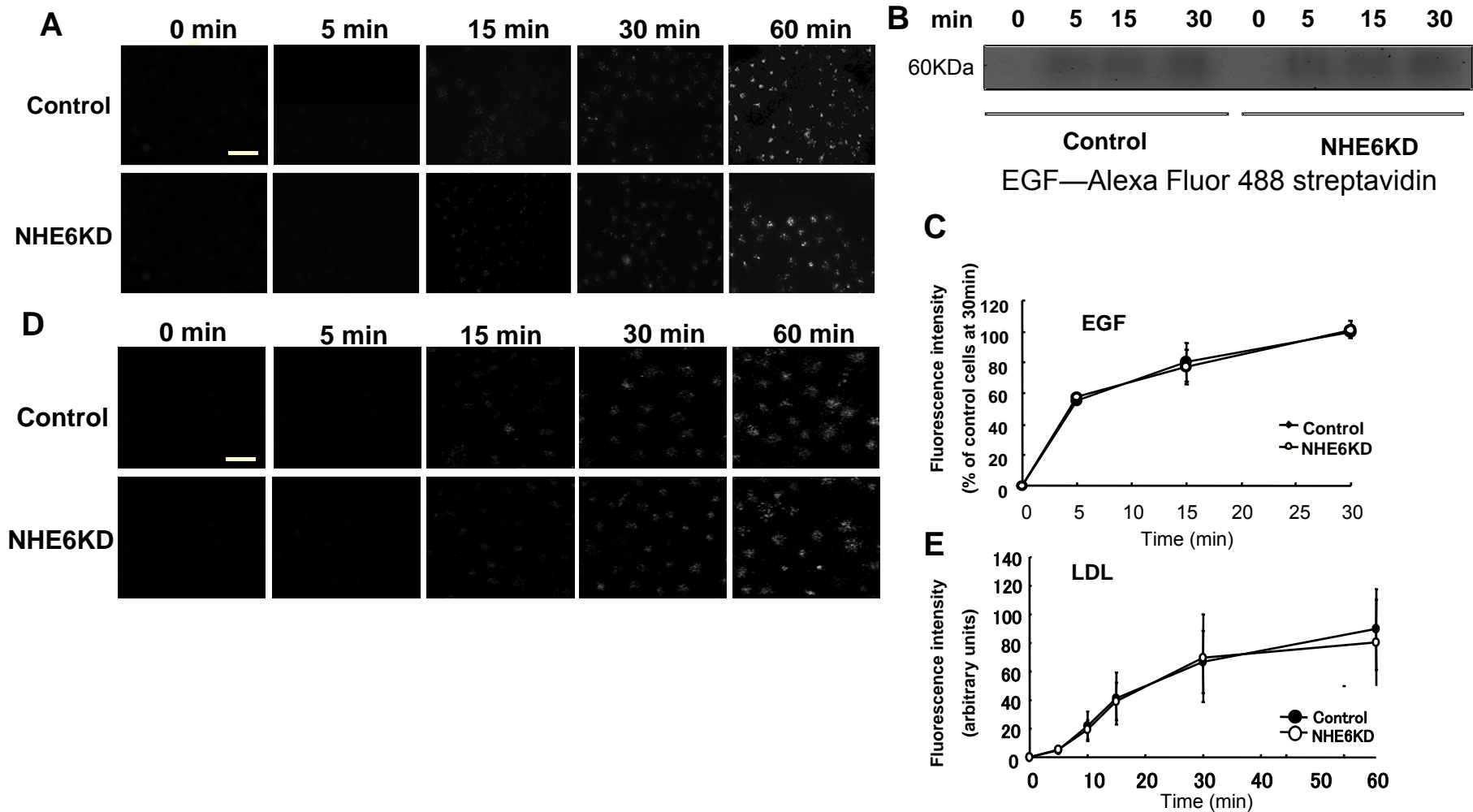


Fig.2-4 NHE6 ノックダウンはEGFとLDLのエンドサイトーシスに影響を与えない

- (A) 1 ng / mlのEGF(ビオチン化EGFと蛍光ラベルされたストレプトアビジンの混合物)を37°Cで取り込ませ、各時間点で細胞を固定し、顕微鏡で観察した。(スケールバー:50 μ m)
- (B) 1 ng/mlのAlexa488-EGFを37°Cで一定時間取り込ませた。細胞を回収し、破碎した後にSDS-PAGEで展開し、取り込まれたEGFと結合している蛍光ラベル化ストレプトアビジンのバンドを蛍光検出器により検出した。
- (C) (B)の各バンドを定量化したもの。
- (D) 1 μ g/mlのBODIPY FL-LDLを37°Cで取り込ませ、各時間に細胞を固定し、顕微鏡で観察したもの。(スケールバー:50 μ m)
- (E) (D)の細胞あたりの蛍光量を定量化したもの(各30細胞の平均値 \pm 標準偏差)。3回実験の平均を示している。

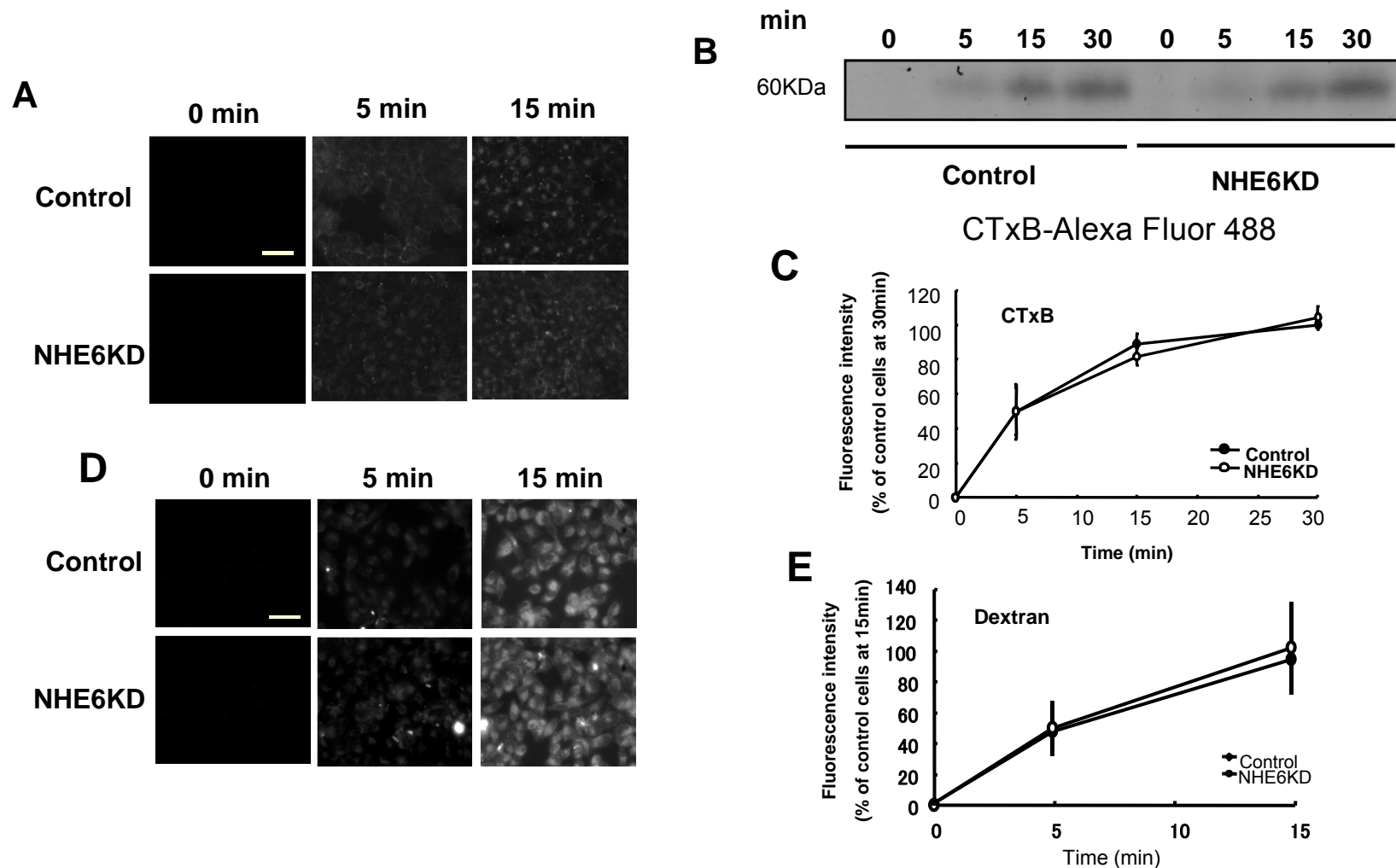


Fig.2-5 NHE6 ノックダウンはコレラ毒素Bサブユニット(CTxB)とデキストランのエンドサイトーシスに影響を与えない

- (A) 1 μ g/mlのAlexa488-CTxBを37°Cで取り込ませ、各時間点で細胞を固定し、顕微鏡で観察した。(スケールバー:50 μ m)
- (B) Alexa488-CTxBを37°Cで一定時間取り込ませた後、細胞を回収、破碎した。破碎液をSDS-PAGEで展開し、取り込まれたCTxBのバンドを蛍光検出器より検出した。
- (C) (B)のバンドの蛍光強度を定量化したもの。
- (D) ローダミンラベルされたデキストラン(200 μ g/ml)を37°Cで取り込ませ、顕微鏡で観察した。(スケールバー:50 μ m)
- (E) (D)の各時間点における細胞あたりの蛍光強度を定量化したもの(各30細胞の平均値 \pm 標準偏差)。データは3回実験の平均である。

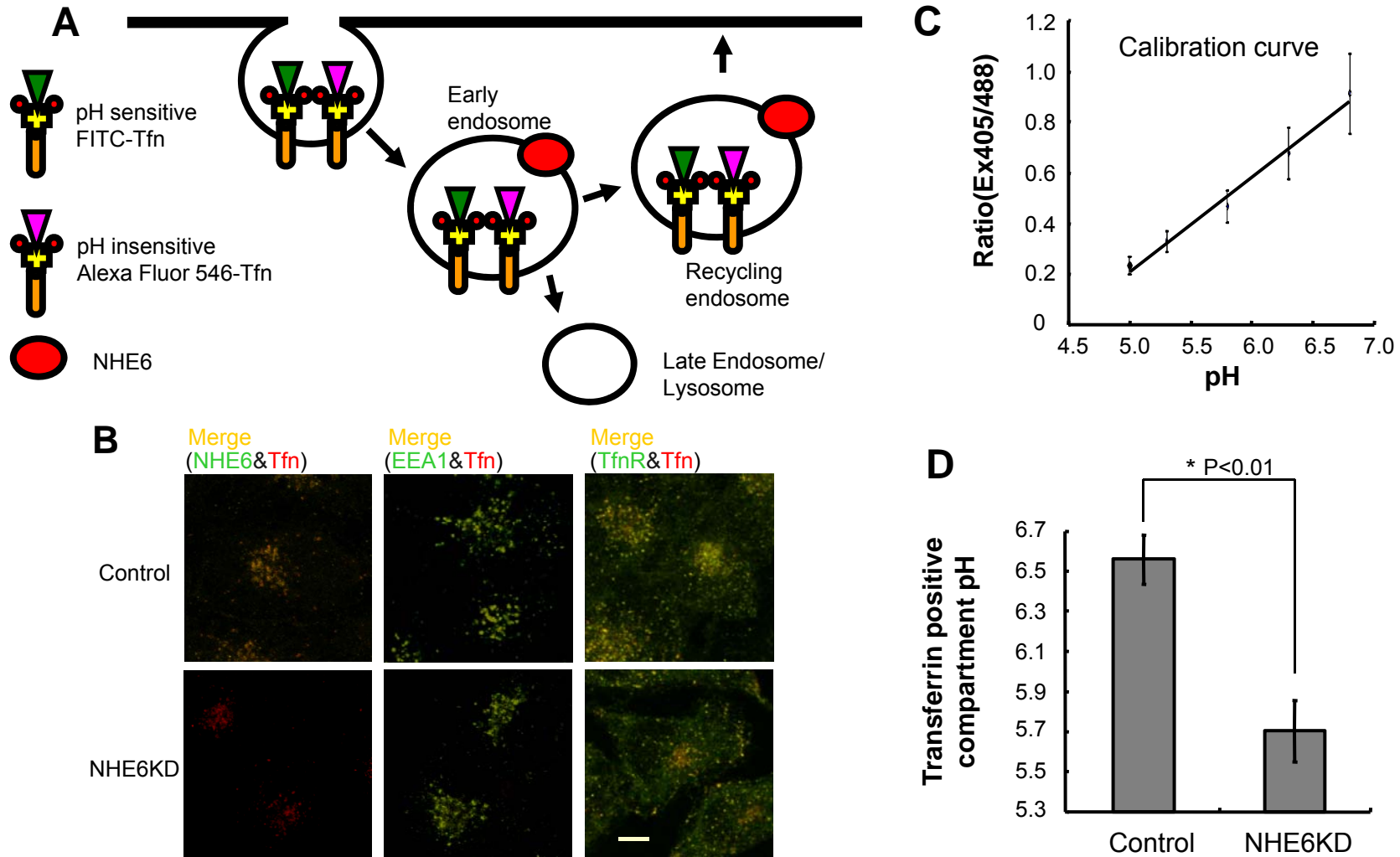


Fig.2-6ノックダウン細胞におけるエンドソームpHの測定

- (A) pH測定の方法。pH感受性のFITCでラベルされたトランスフェリン(FITC-Tfn, 50 $\mu\text{g/ml}$)と非感受性のAlexa Fluor 546でラベルされたトランスフェリン(Alexa546-Tfn, 25 $\mu\text{g/ml}$)を両方取り込ませ、蛍光強度比からTfn取り込み経路のpHを測定した。
- (B) Alexa546-TfnとFITC-Tfnを37°Cで30分取り込ませ、固定後にNHE6、EEA1(初期エンドソームマーカー)、トランスフェリン受容体(リサイクリングエンドソームマーカー)の抗体を用いて染色した。緑色は抗体染色、赤色はAlexa546-Tfnの局在を示し、共局在すると黄色となる。(スケールバー:50 μm)
- (C) pH5.0-6.8でのFITC-TfnとAlexa546-Tfnの蛍光強度比(励起波長はそれぞれ488 nmと543 nm)と、pH測定に用いた検量線。
- (D) 検量線を使って計算したコントロールとNHE6ノックダウン細胞のエンドソームのpH。3回実験の平均を示している。

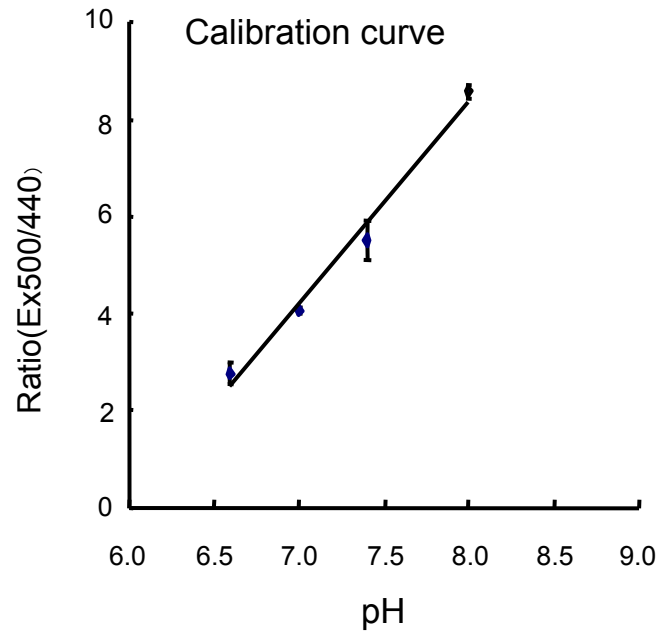
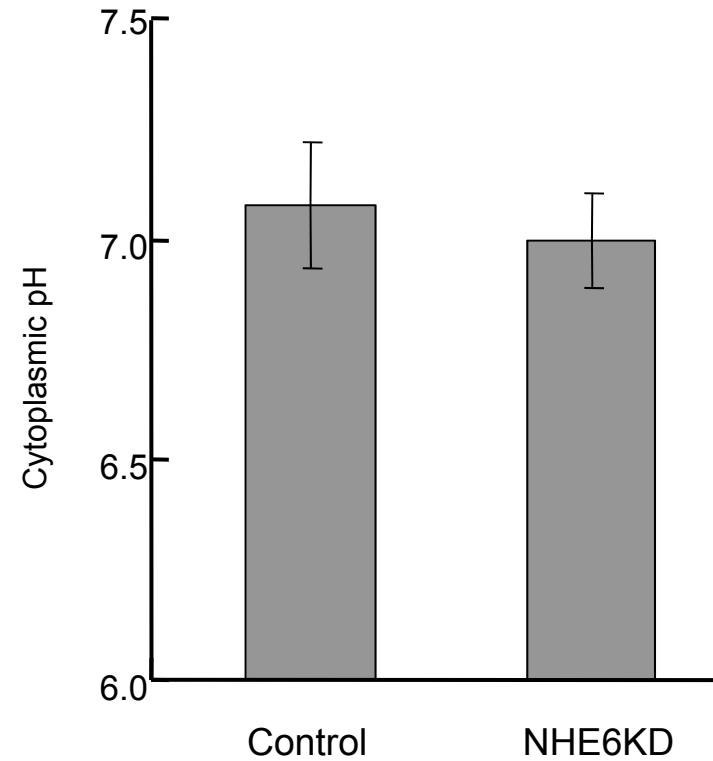
A**B**

Fig.2-7 ノックダウン細胞における細胞質pH測定

pH感受性蛍光色素であるBCECF-AMを細胞に取り込ませ、細胞質のpHを測定した。

(A) BCECF-AM(5 mM)を30分間細胞に取り込ませた後に、pH 6.6、7.0、7.4の緩衝液中での蛍光強度比をイオン濃度測定器(細胞用蛍光光度計)で測定し検量線を作成した。

(B) 検量線を使って計算したコントロールとNHE6 ノックダウン細胞の細胞質のpH。3回実験の平均を示している。

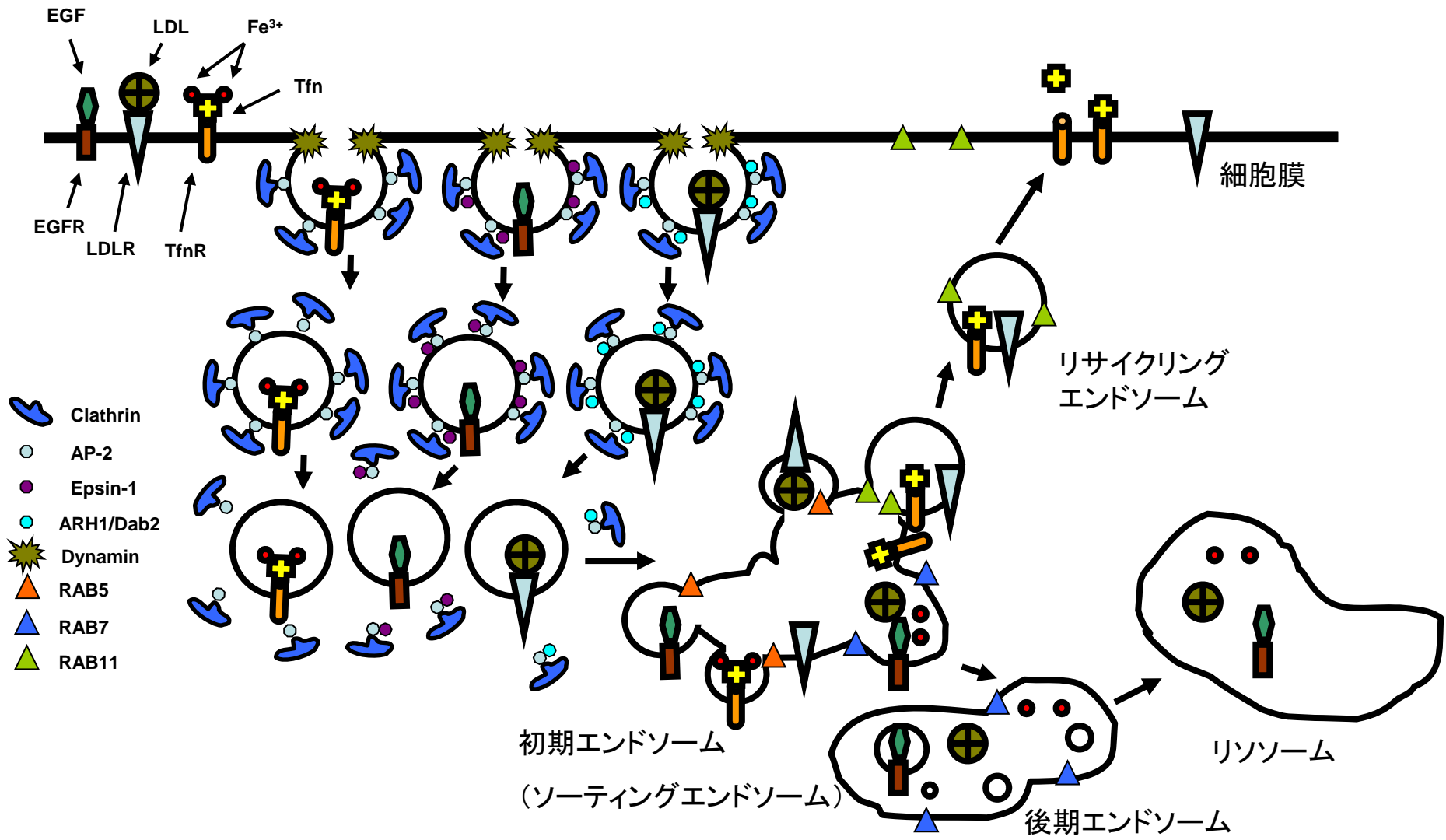


Fig.2-8 クラスリン依存的エンドサイトーシスの特 と分類

トランスフェリン、EGFとLDLはクラスリン依存的エンドサイトーシスで取り込まれる。この三 はクラスリン被覆小胞により取り込まれた後、初期エンドソームと融合する。トランスフェリンは、結合している イオンとエンドソームの酸性 下で解 する。 イオンはリソソームまで れるがトランスフェリンは受容体と結合したままでリサイクリングエンドソームを経 して細胞膜に戻る。細胞膜上では、 を結合していないトランスフェリンは受容体より解 する。EGFは初期 後期エンドソームを経 し、受容体と結合したままでリソソーム内で分解される。LDLはエンドソームで受容体から解 し、受容体は膜に戻るが、LDL はリソソームで分解される。

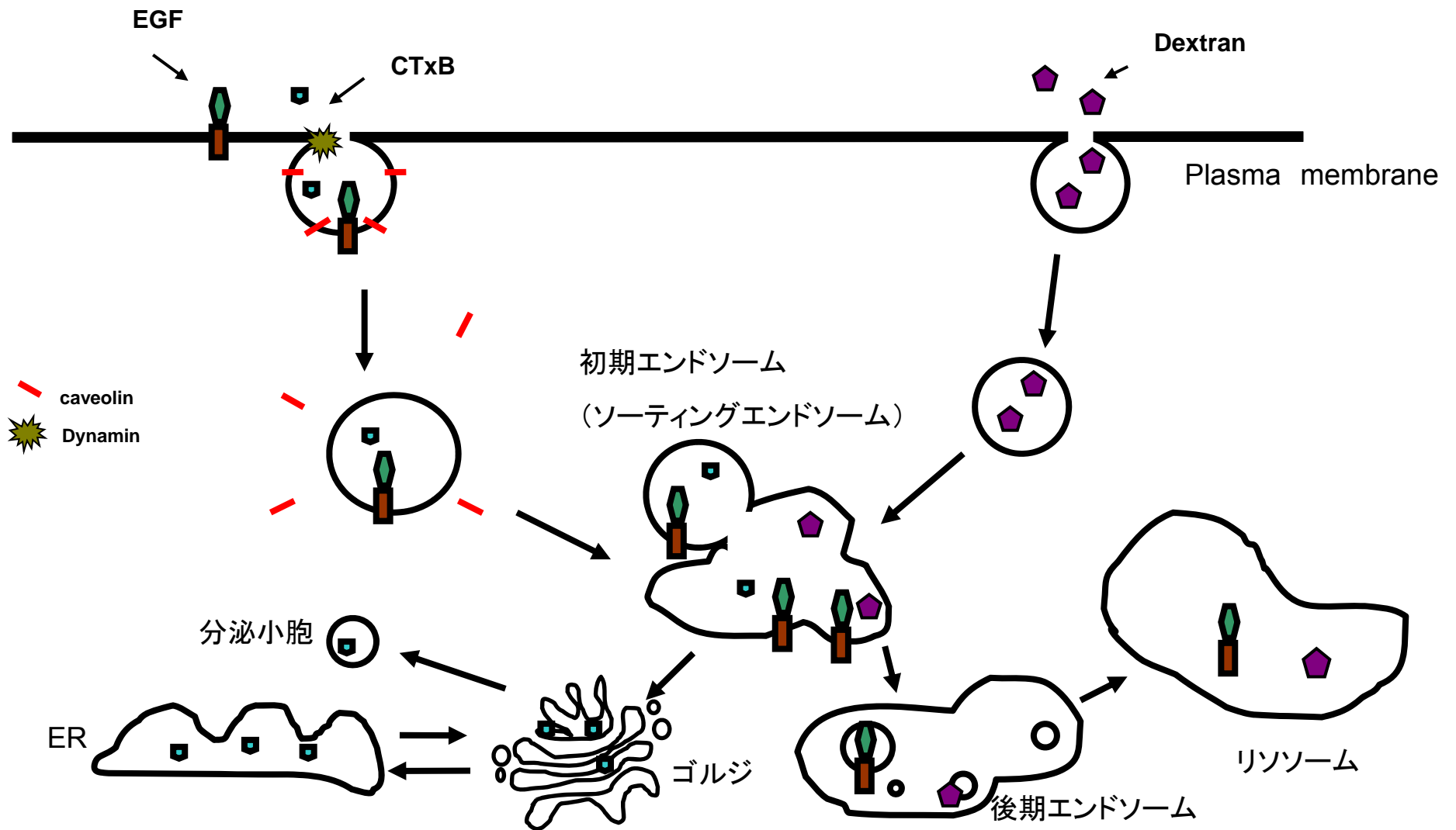


Fig.2-9 クラスリン非依存のエンドサイトーシス

生理的濃度である1 ng/ml よりも大 に濃い濃度におけるEGFの取り込みや、コレラ毒素(CTxB)の取り込みは、カベオラ依存的エンドサイトーシスによるものである。CTxBはエンドソームとゴルジを経 する逆行輸送経路をたどる。EGFは高濃度 で初期 後期エンドソームを経 し、受容体と結合したままリソソームで分解される。デキストランはマクロピノサイトーシスによって後期エンドソームを経 し、リソソームへと れる。高 動物はデキストランを分解できないので、デキストランはリソソームに 積する。

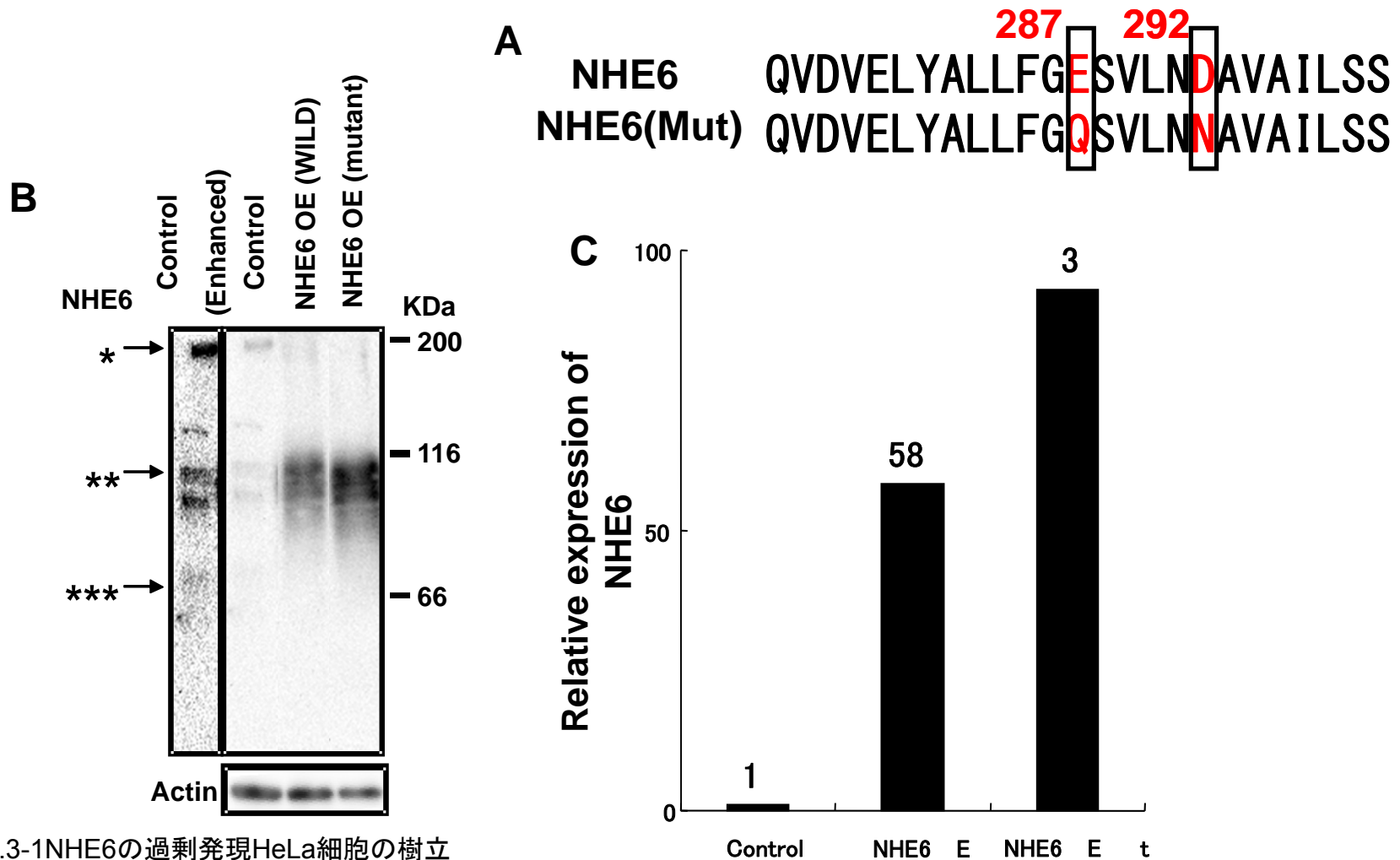


Fig.3-1NHE6の過剰発現HeLa細胞の樹立

生型[NHE6OE]と、イオン輸送性に重なるアミノ酸残基の異なるNHE6[NHE6OE(mut)]の過剰発現を樹立した(方法は第6章を参照)。

(A) NHE6 異体ではNHE6のイオン輸送に関わるとされる12回膜通部分の7目にある第287アミノ酸(グルタミン酸)をグルタミンに、第292アミノ酸(アスパラギン酸)をアスパラギンに換したものを示している。

(B) ウェスタンブロッティングによるコントロール、生型過剰発現細胞(NHE6OE)と異型NHE6過剰発現細胞(NHE6OE(Mut))におけるNHE6の検出。内在性のNHE6のバンドとの位を比較するため、左列にコントロールの像を強調したものを示している(矢印:*,オリゴマー;**,グリコシル化モノマー;***,モノマー)。

(C) 各細胞におけるNHE6の発現量。定量はImage Jによる。このデータは2回の実験結果の平均である。

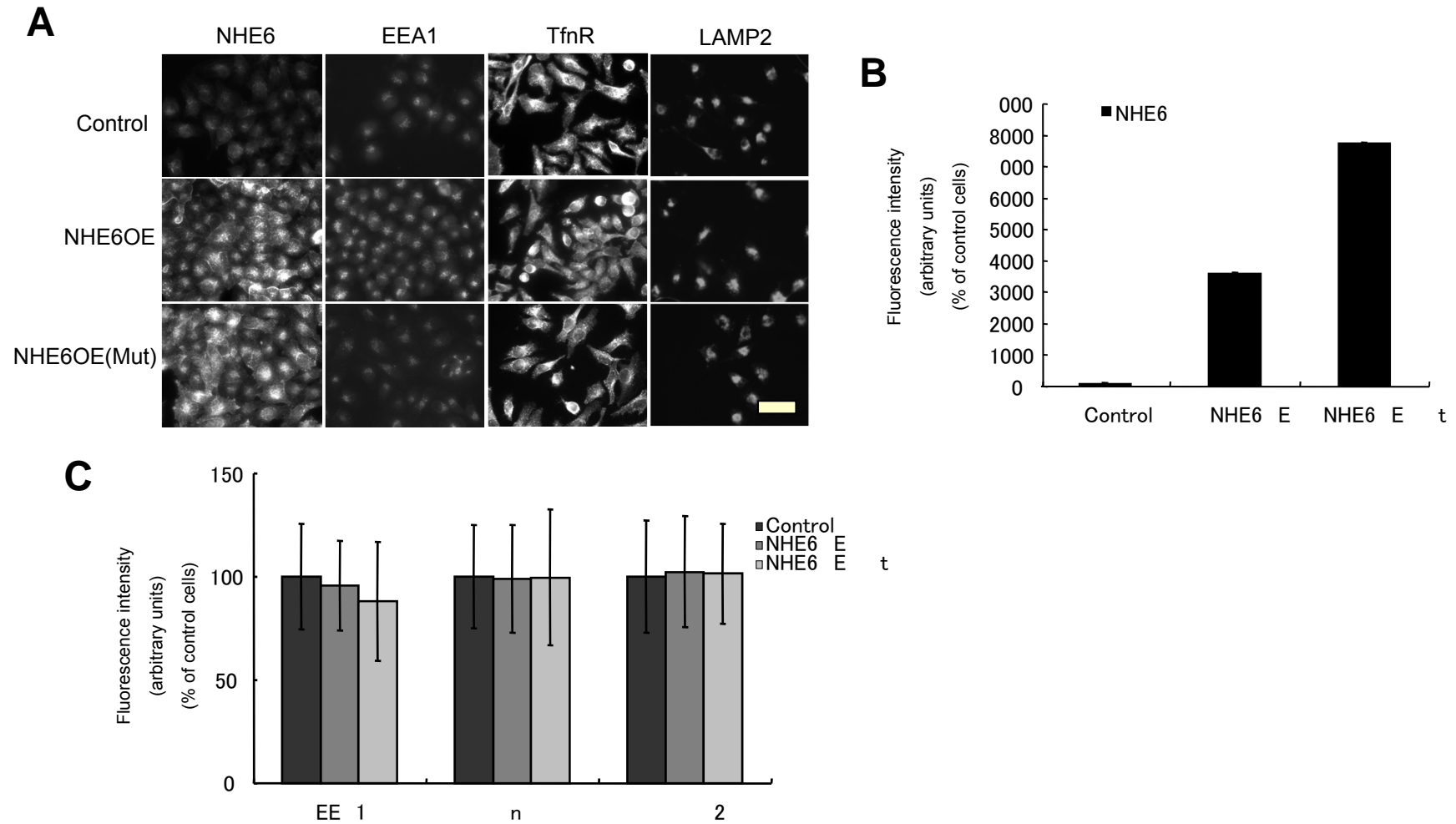


Fig.3-2 NHE6過剰発現細胞におけるエンドソーム・リソソーム局在蛋白質の局在と発現量

- (A) NHE6およびエンドサイトーシス経路に局在する蛋白質EEA1(初期エンドソームのマーカ-)、TfnR(リサイクリングエンドソームのマーカ-)、LAMP2(リソソームのマーカ-)の免疫蛍光写真。(スケールバー:50 μ m)
- (B) 蛍光写真データから定量したNHE6の発現量。
- (C) 各マーカ-の発現量。(細胞あたりの蛍光強度。各30細胞の平均値 \pm 標準偏差)。このデータは、3回の実験結果の平均である。

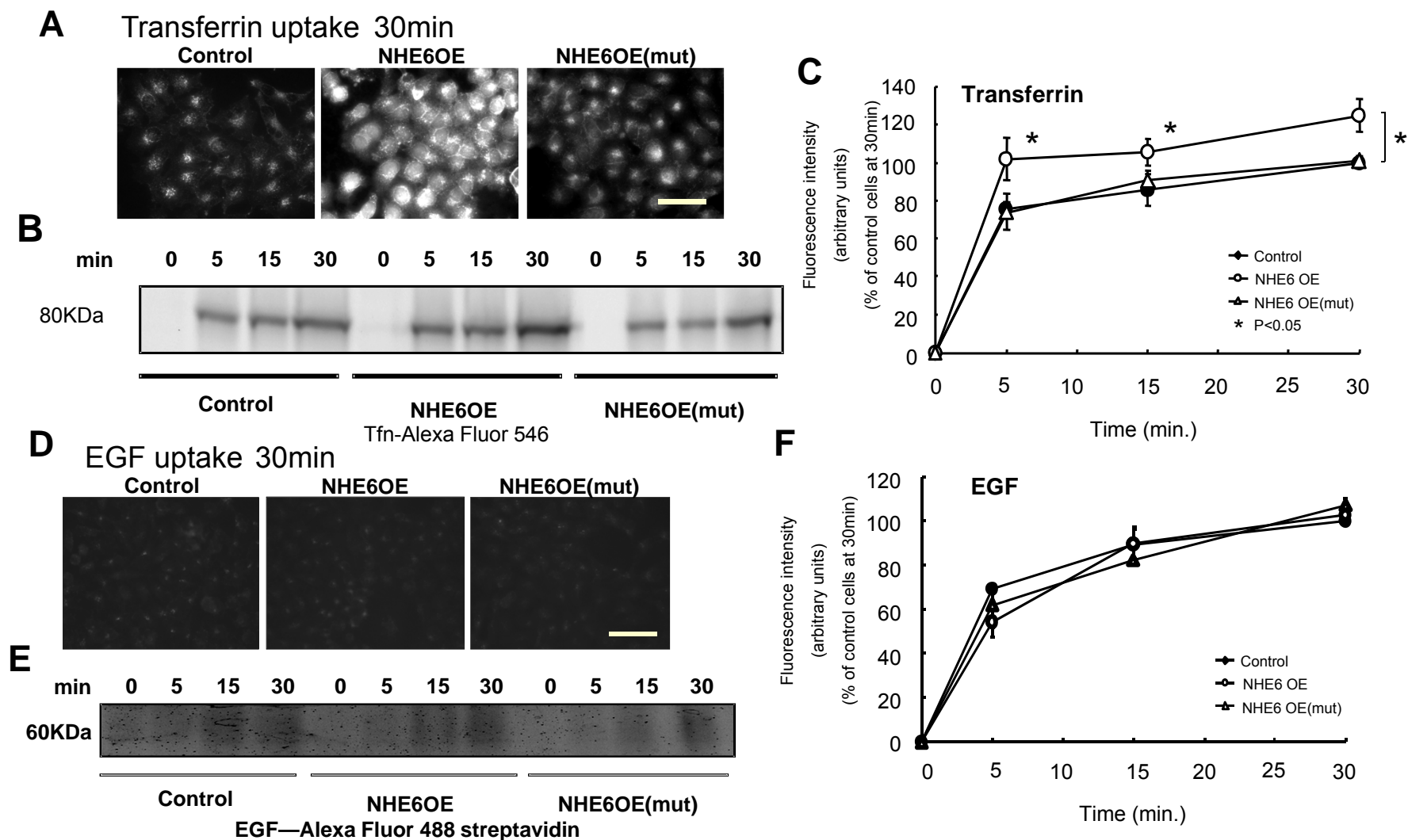


Fig.3-3 NHE6の過剰発現がトランスフェリンとEGFのエンドサイトーシスに与える影響

(A) Alexa546-トランスフェリンを一定時間取り込ませた後に細胞を固定し、顕微鏡で観察した。(スケールバー: 50 μ m)

(B) 取り込み後、細胞を破碎し、蛍光検出器により取り込まれたトランスフェリンのバンドを検出した。

(C) (B)のバンドの蛍光強度を定量したもの。

(D) (D)、各細胞にAlexa488-EGFを取り込ませ、一定時間後に細胞を固定し、顕微鏡で観察した。(スケールバー: 50 μ m)

(E) EGFの取り込み後、細胞を回収し、EGFと結合している蛍光ストレプトアビジンのバンドを蛍光検出器により検出した。

(F) (E)のバンドの蛍光強度。データは、それぞれ3回の実験結果の平均である。

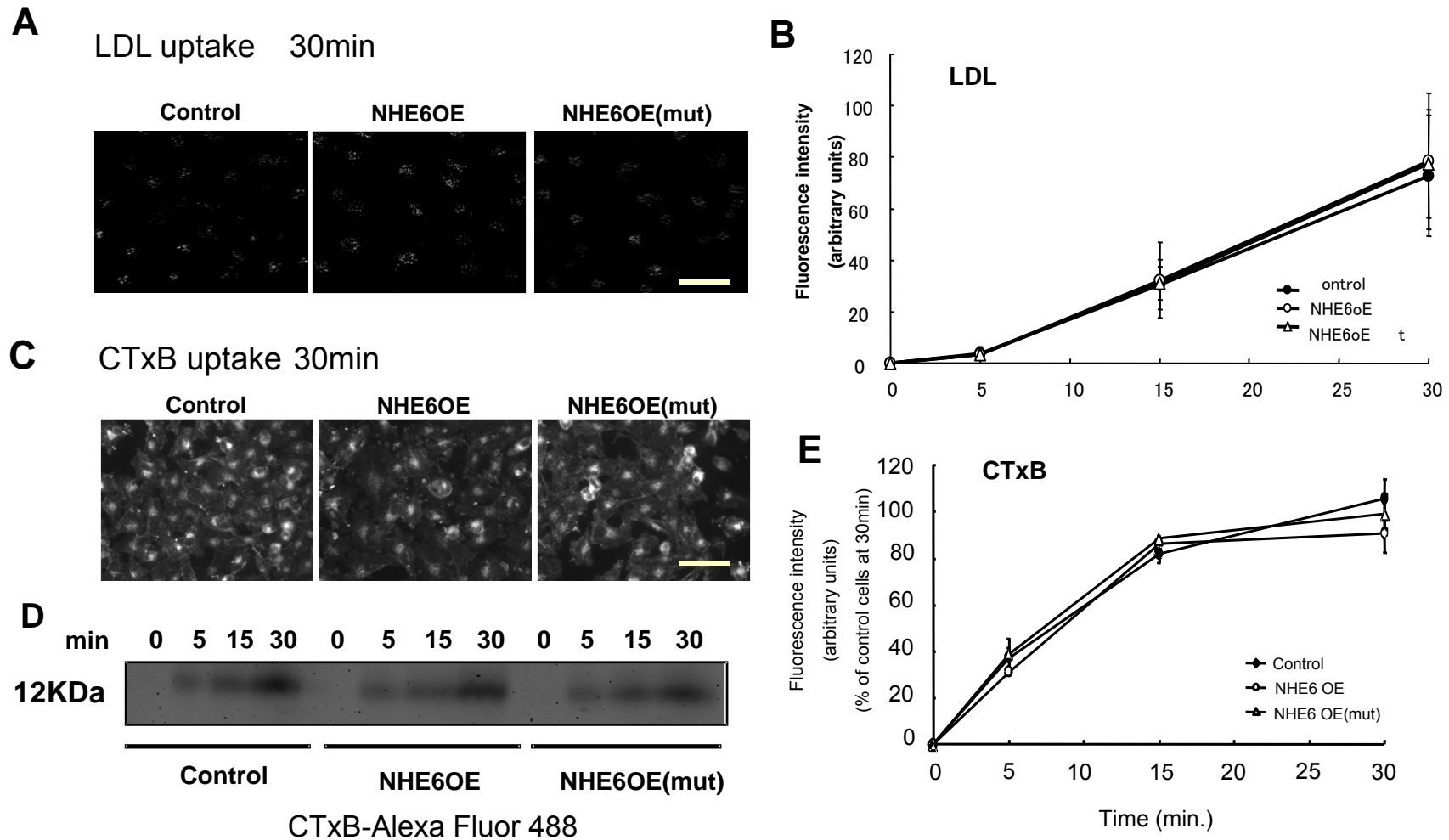


Fig.3-4 NHE6の過剰発現がLDLとCTxBのエンドサイトーシスに与える影響

- (A) BODIPY FL-LDLを取り込ませ、各時間点で細胞を固定し、顕微鏡で観察した。(スケールバー: 50 μ m)
- (B) 顕微鏡像から各時間における細胞あたりの蛍光強度を定量したもの(各30細胞の平均値 \pm 標準偏差)。
- (C) コントロール、NHE6OEとNHEOE(Mut)細胞にAlexa488-CTxBを取り込ませ、各時間点で細胞を固定し、顕微鏡で観察した。(スケールバー:50 μ m)
- (D) 取り込み後、細胞を破碎し、蛍光検出器により取り込まれたLDLのバンドを検出した。
- (E) (B)の各時間点のバンドの蛍光強度を定量したもの。データは、それぞれ3回の実験結果の平均である。

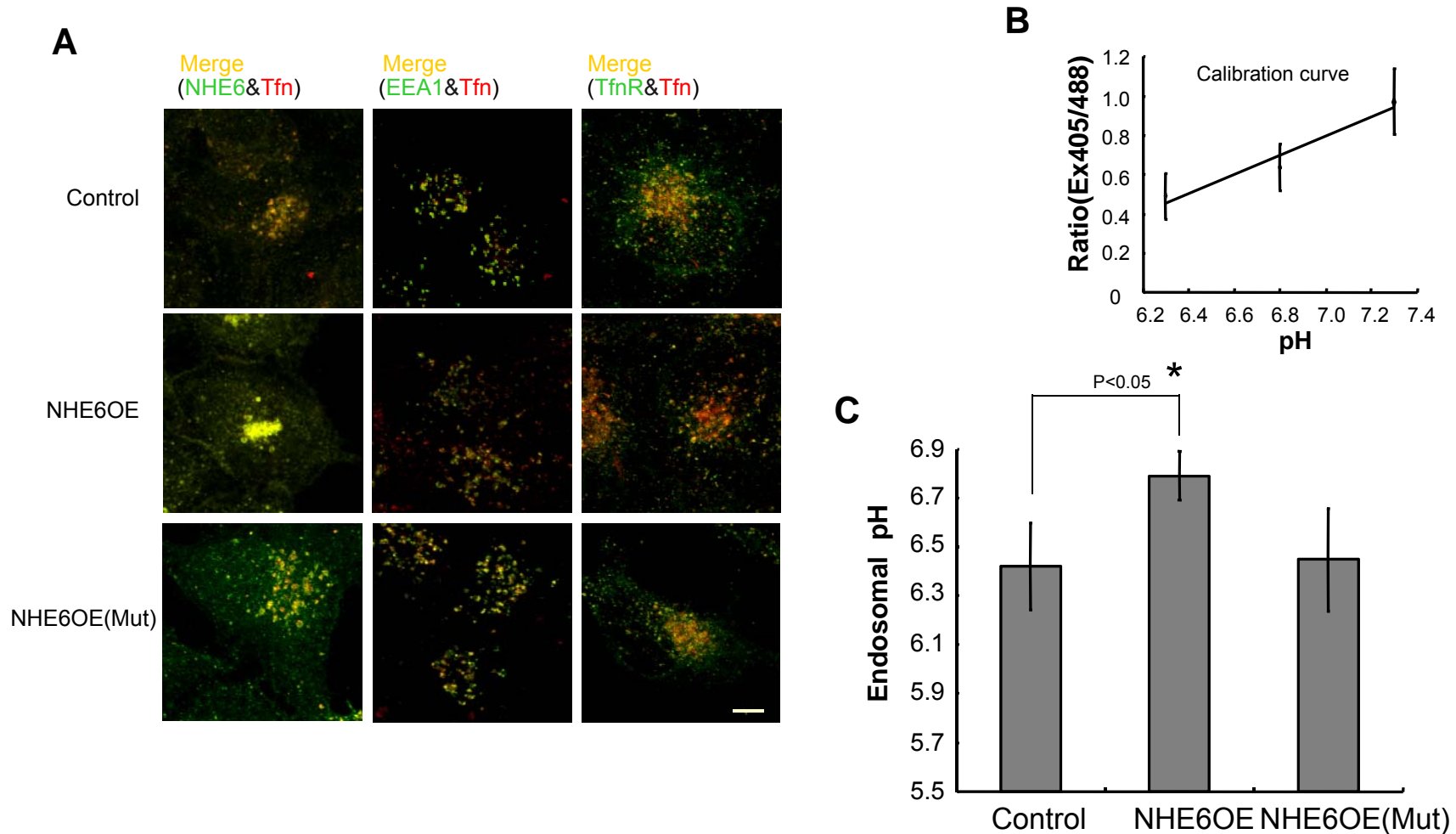


Fig.3-5 NHE6過剰発現細胞におけるエンドソームのpH

- (A) Alexa546-トランスフェリンを37°Cで30分間取り込ませ、固定後にNHE6およびEEA1（初期エンドソームマーカー）、トランスフェリン受容体（リサイクリングエンドソーム）の抗体を用いて染色し観察した。緑色は抗体染色、赤色はAlexa546-トランスフェリンの局在を示し、共局在すると黄色となる。（スケールバー:50 μ m）
- (B) pH 5.0-6.8の緩衝液中で測定したFITC-TfnとAlexa546-Tfnの蛍光強度比(励起波長はそれぞれ488 nmと543 nm)と、pH測定に用いた検量線。
- (C) 検量線を使って計算したエンドソームのpH。3回実験した平均値を示している。

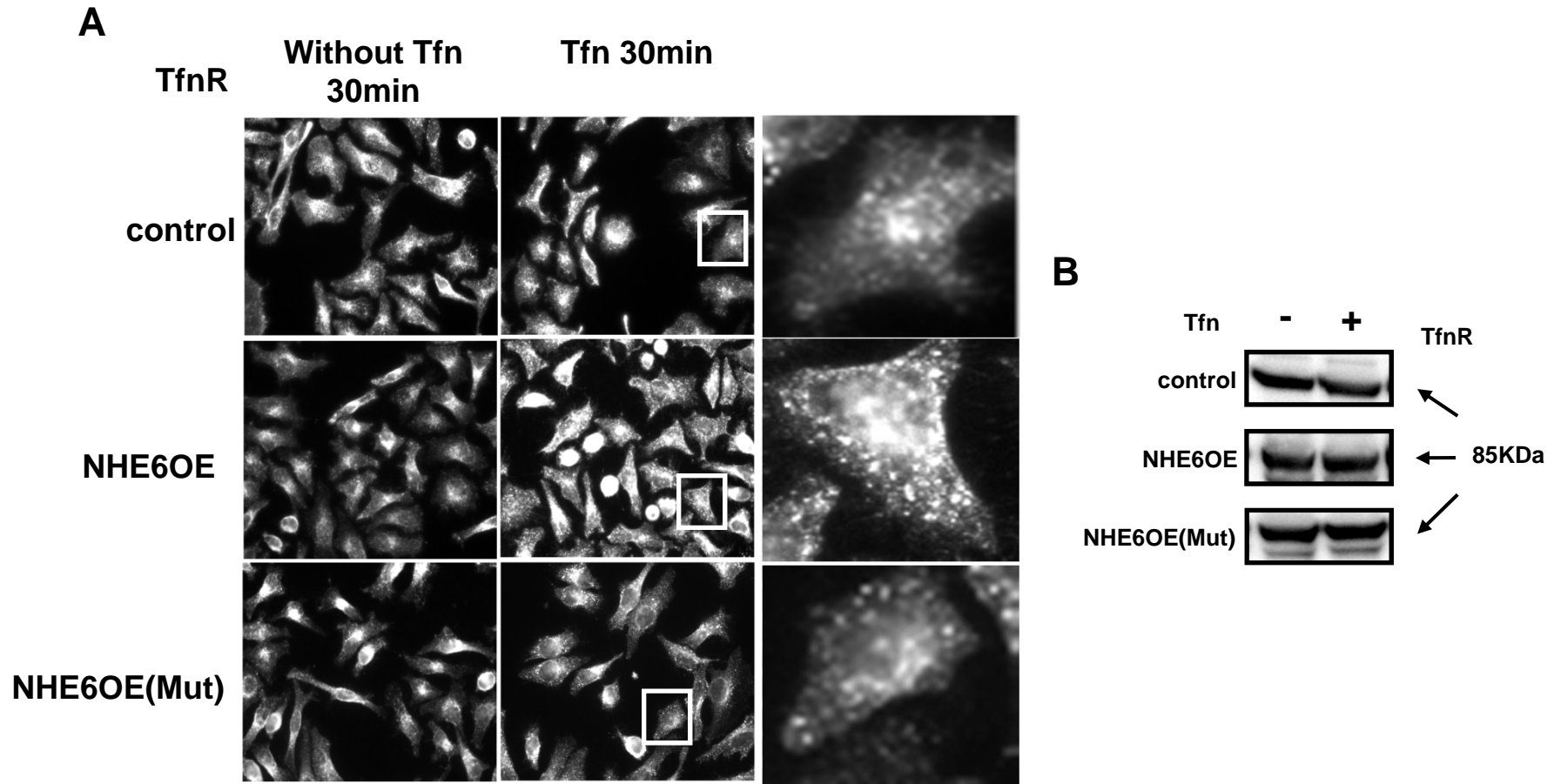


Fig.3-6 トランスフェリン受容体の局在・発現量へのトランスフェリン の影響

(A) コントロール、NHE6OEとNHEOE(Mut)細胞に25 μg/mlトランスフェリンを 後30分、あるいは非 時のトランスフェリン受容体の細胞内局在。右列は、中列の枠で まれた細胞の拡大図。

(B) 各細胞 について、トランスフェリン 後30分、あるいは非 時のトランスフェリン受容体の発現。抗トランスフェリン受容体抗体を用いたウェスタンブロッティングによって解析した。

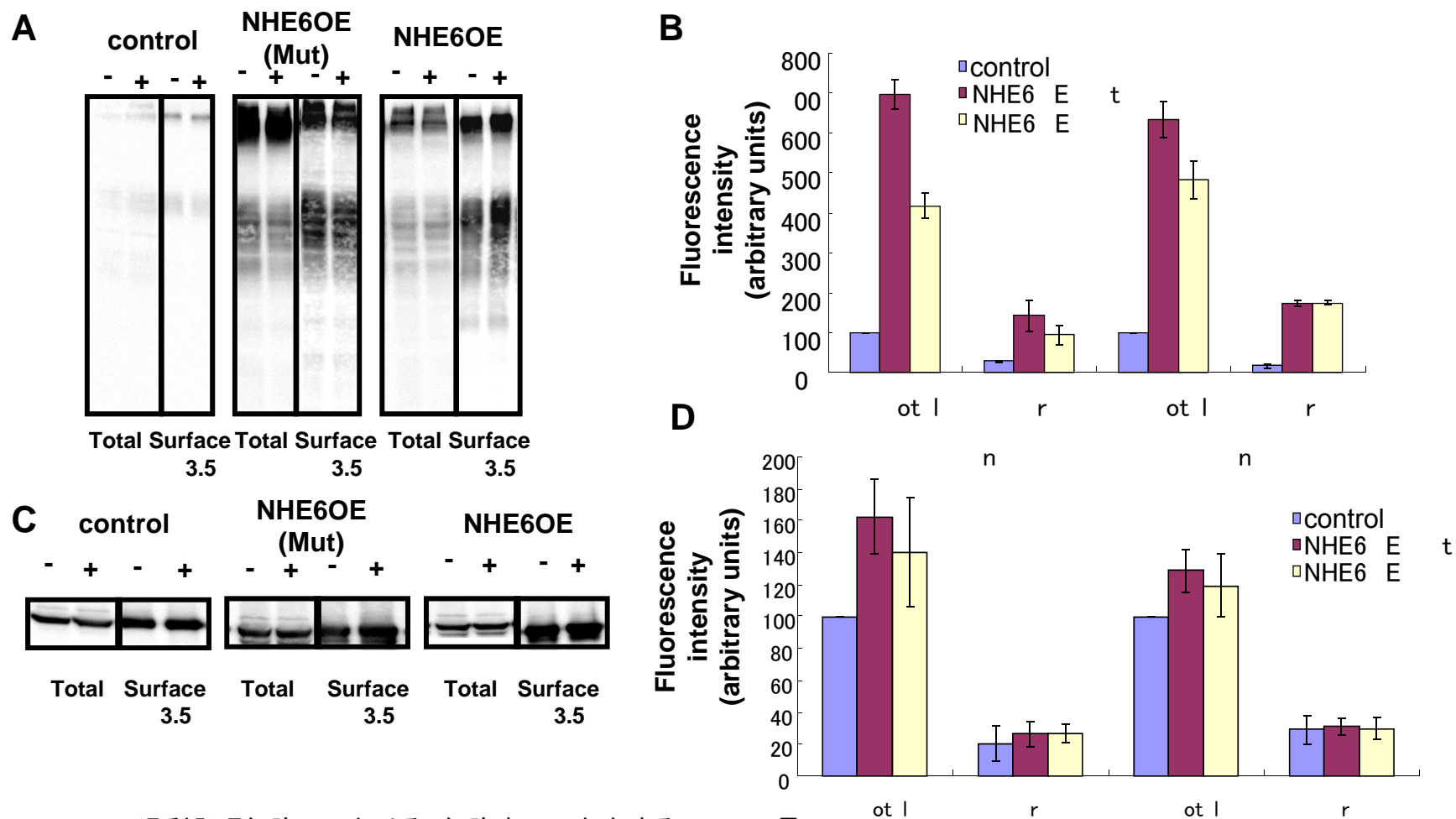


Fig.3-7 NHE6過剰発現細胞 における、細胞表面に存在するNHE6の量
 トランスフェリンを 後30分あるいは非 の各細胞 に、アミノ基に結合する反 基(NHS)を したビオチン(EZ-link Sulfo-NHS-SS-biotin)を4°Cで30分 した。ビオチン を 後に細胞を破碎し、アビジンビー でラベルされた細胞表面局在タンパク質を回収し、解析した。

- (A) SDS-PAGEより分 後、NHE6抗体によりNHE6の細胞 量と形質膜存在量を検出した。形質膜は 量の3.5 濃 したサンプルを解析している。
- (B) (A)のバンドの強度から、NHE6の 対量を めた。
- (C) SDS-PAGEより分 後、ウェスタンブロッティングによりトランスフェリン受容体細胞 量と形質膜存在量を定量した。形質膜は 量の3.5 濃 したサンプルを解析している。
- (D) (C)のバンドの強度から、トランスフェリン受容体の 対量を めた。定量は、3回実験した平均値である。

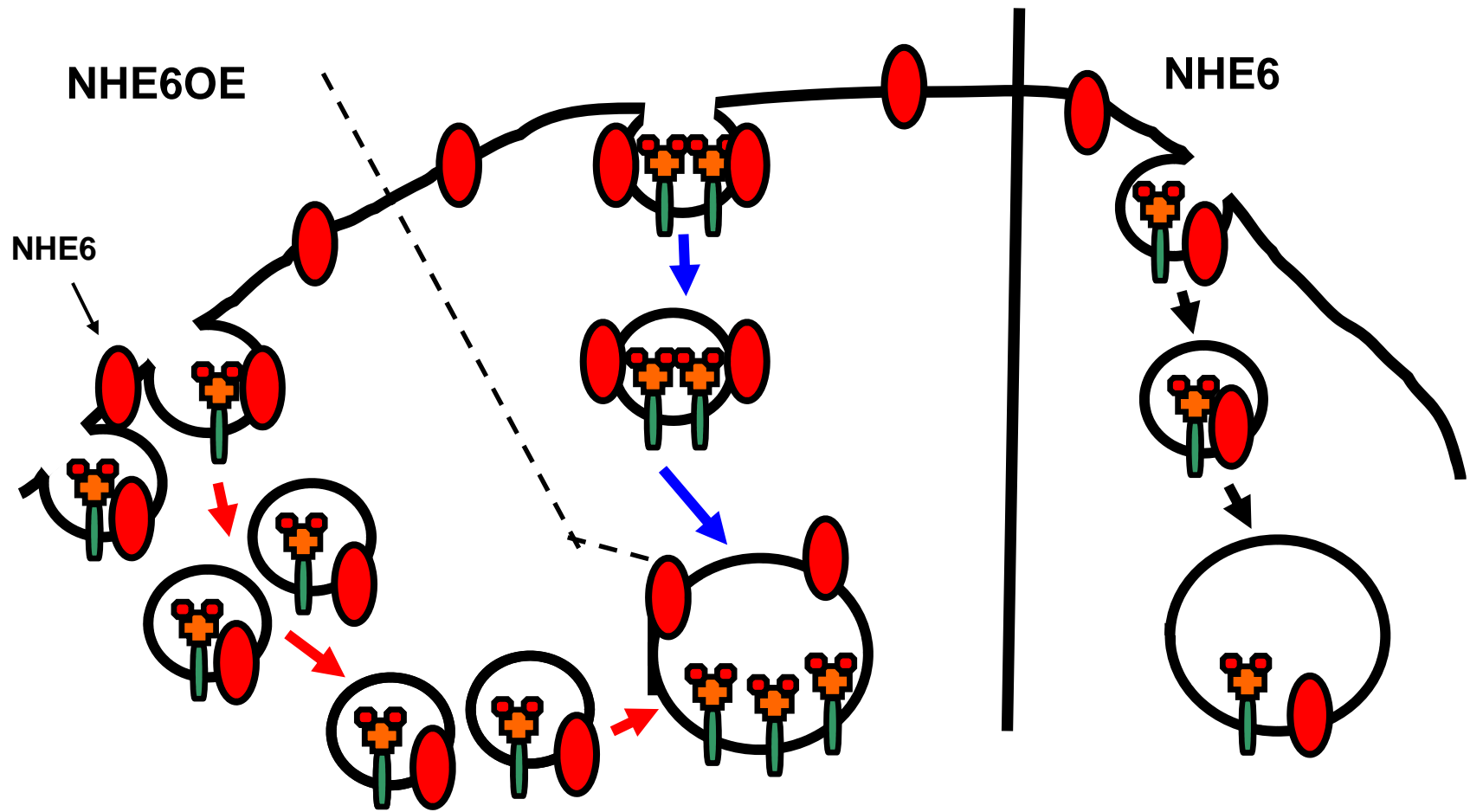


Fig.3-8 NHE6過剰発現でのトランスフェリンの取り込み増の機構
 NHE6過剰発現細胞ではトランスフェリンを輸送する小胞のが増えたか(左)、小胞のサイが大きくなって、中には入るトランスフェリンも増えたため(中)、通(右)よりも取り込み量が増したとえられる。

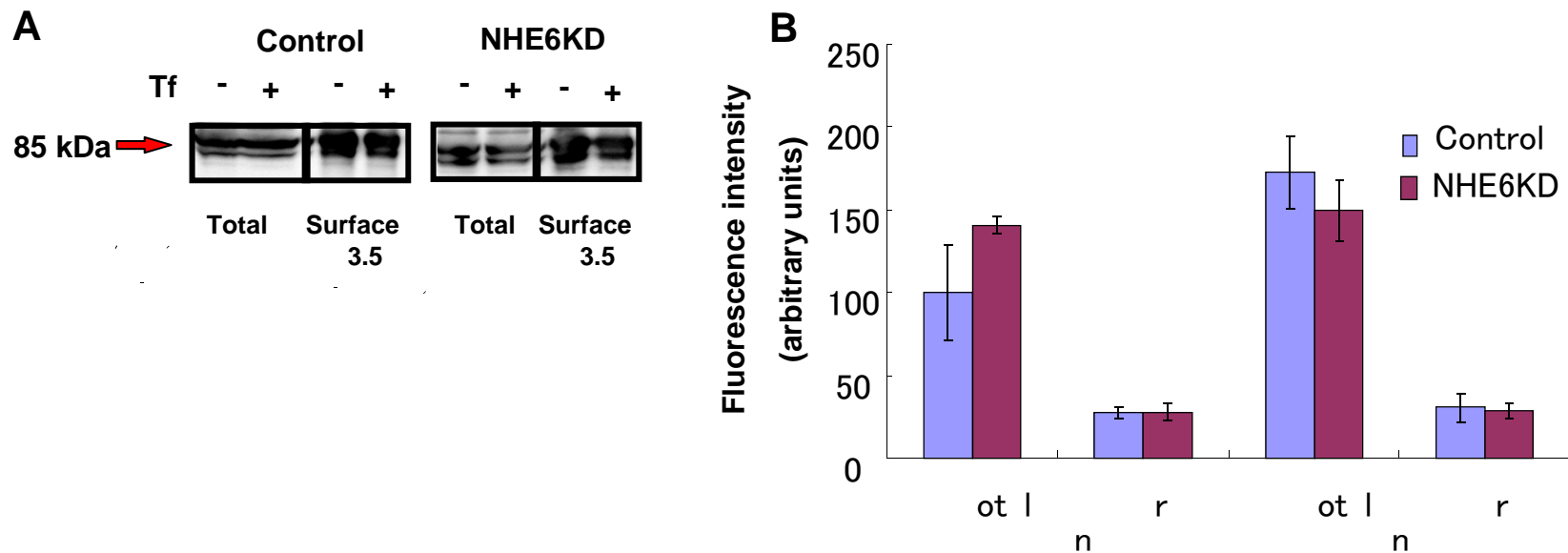


Fig.4-1 NHE6ノックダウン細胞 における細胞表面に存在するトランスフェリン受容体の量
トランスフェリンを30分 、あるいは非 の、コントロール とNHE6ノックダウン細胞 に、アミノ基に結合する反 基(NHS)を した
ビオチン(EZ-link Sulfo-NHS-SS-biotin)を4°Cで30分反 させた。細胞を 後に破碎し、ラベルされた細胞表面局在タンパク質をアビジ
ンビー により回収し、解析した。

- (A) トランスフェリン受容体の抗体を用いたウェスタンブロッティングにより細胞 量と細胞膜存在する量を検出した。形質膜は 量 (total)の3.5 濃 したサンプルを解析した。
- (B) (A)のバンドの強度からトランスフェリン受容体の 対量を めた。定量は、3回実験した平均値である。

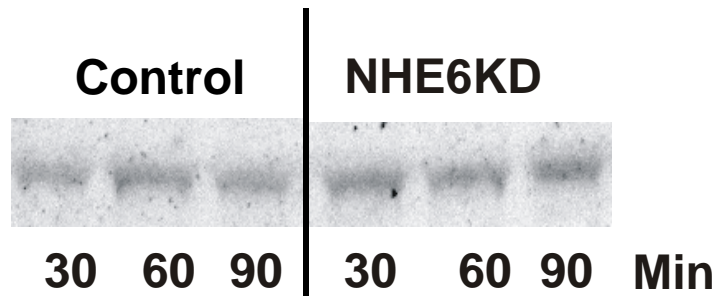
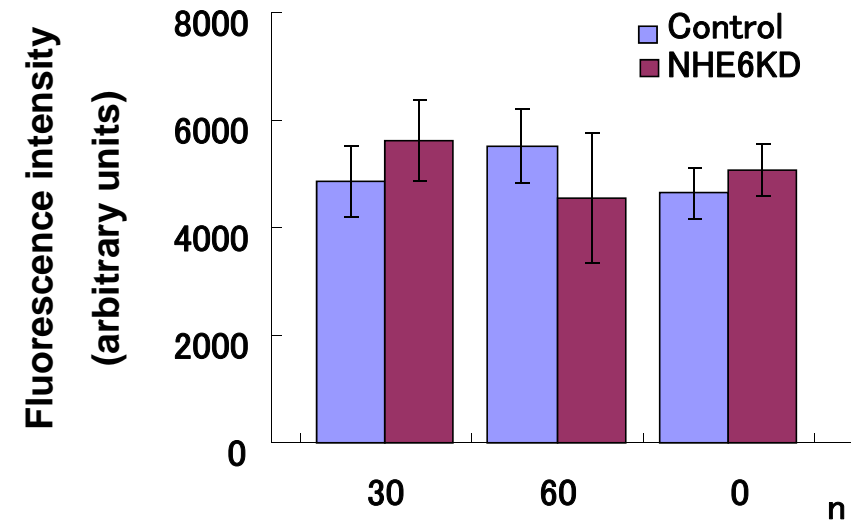
A**B**

Fig.4-2 NHE6ノックダウン 細胞における細胞表面へのトランスフェリンの結合量

FITC-トランスフェリン (25 $\mu\text{g}/\text{ml}$) を4°Cで細胞に、30、60、90分間 した後、細胞と結合してないトランスフェリンを ために緩衝液(4°C)で 分に した。細胞を破碎した後、SDS-PAGEより分 した。

(A) トランスフェリンのバンドを蛍光検出器で検出した。

(B) (A)のバンドの蛍光強度。この定量は、3回実験した平均値である。

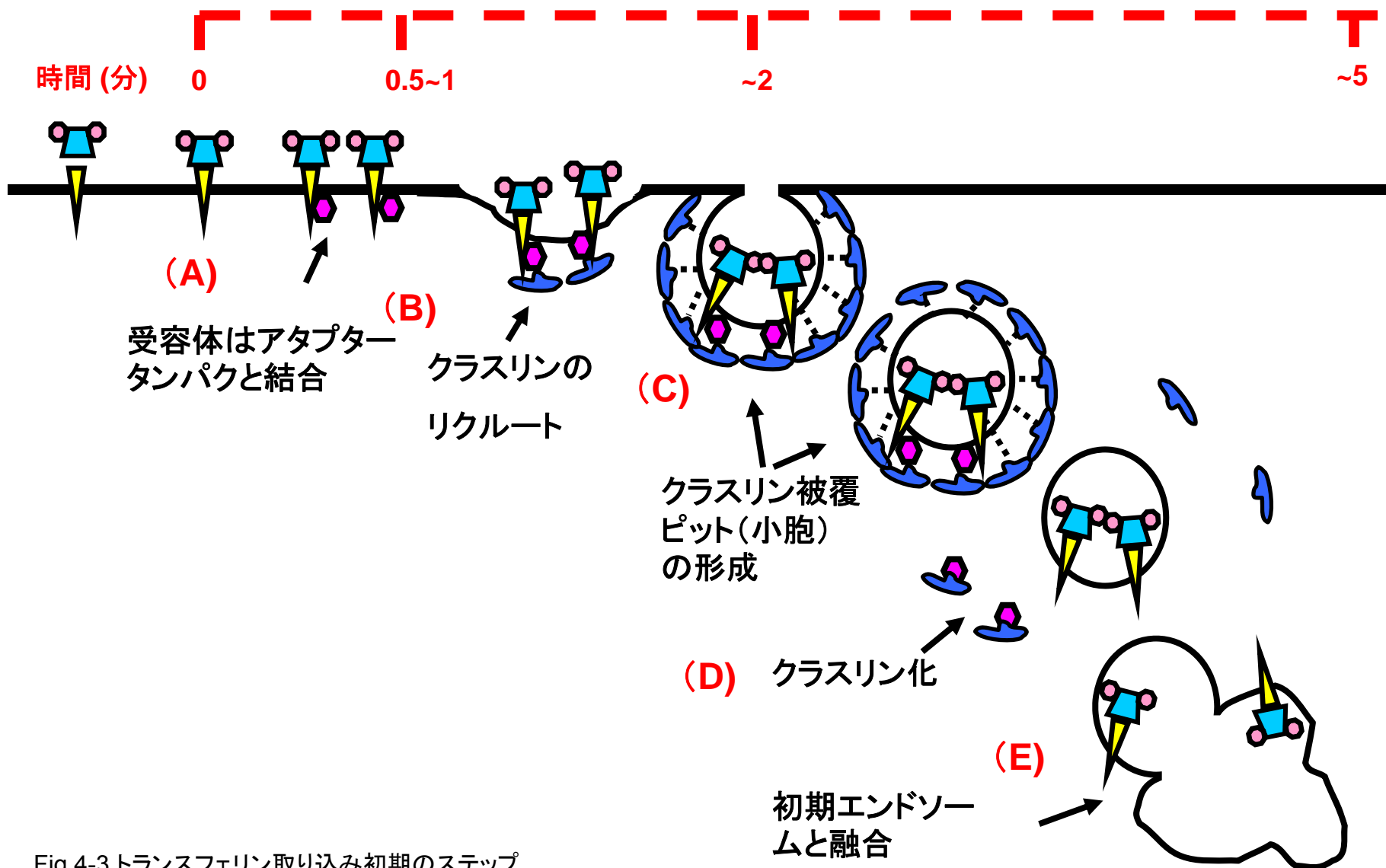


Fig.4-3 トランスフェリン取り込み初期のステップ

- (A) トランスフェリン取り込み初期は様々ステップにわけられる。まず、トランスフェリンは膜上のトランスフェリン受容体と膜上に結合する。
- (B) 次にアダプタータンパク質と受容体が結合することにより、膜のコレステロールに 2 重に 積(クラスタリング)する
- (C) 次にクラスリンが膜に 積され、クラスリンで覆われた部分が細胞内に 入り、 入り部分が びり られる。こうしてクラスリン被覆小胞が形成される(1 2分)。
- (D) その後、 クラスリンにより成 なる小胞が形成する。
- (E) 最後に小胞は初期エンドソームと融合する(5 分 後)。

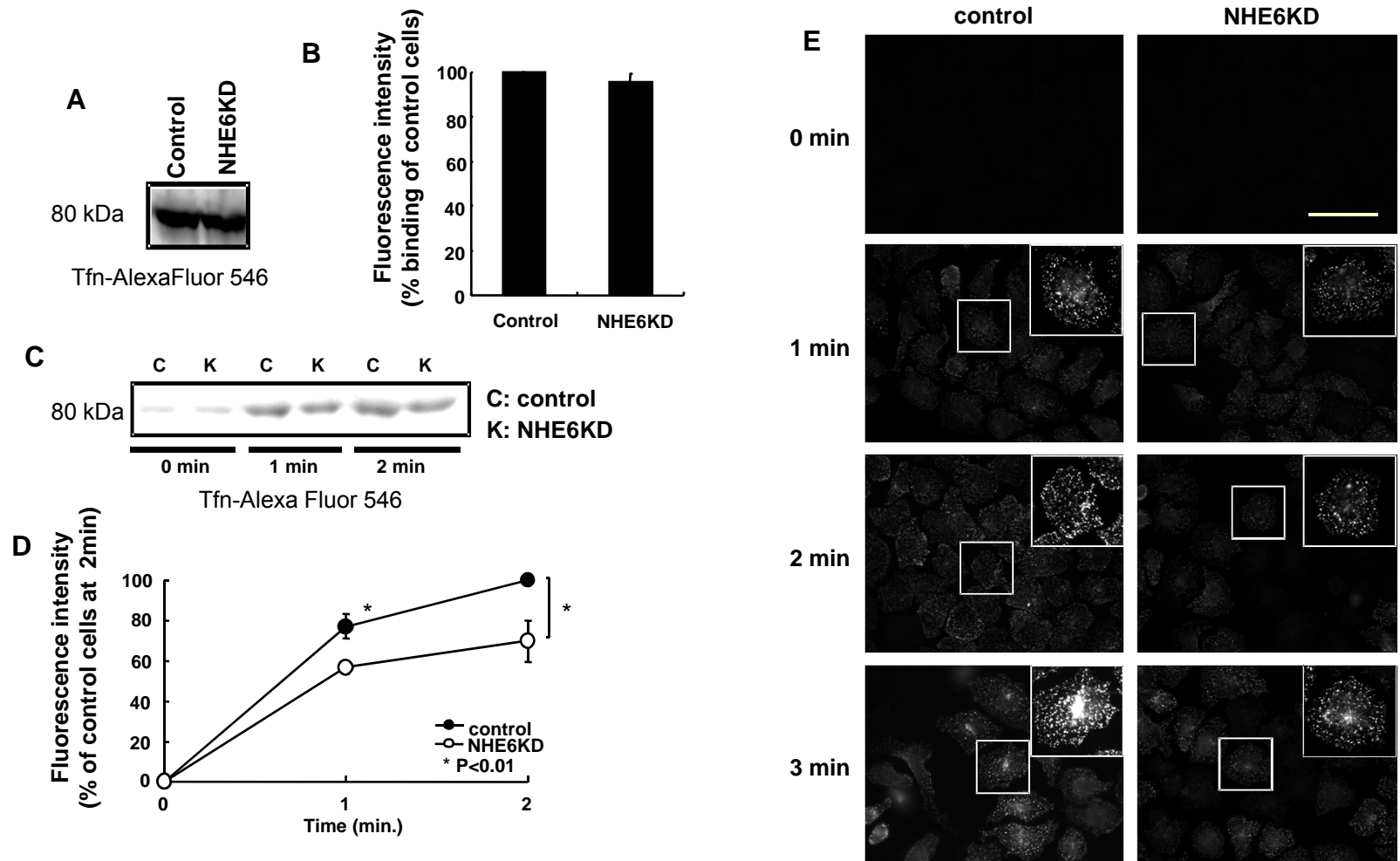


Fig.4-4 NHE6 ノックダウン 細胞のトランスフェリン取り込みの阻害は初期でみられた

(A) Alexa546-トランスフェリン(25 μ g/ml)を4°Cで1時間、にコントロールとNHE6ノックダウン細胞に した。分のトランスフェリンを ためにバッファーで したあと細胞を破碎し、細胞表面に結合したトランスフェリンを蛍光検出器より検出した。

(B) (A)のバンドの強度。

(C) Alexa546-トランスフェリン(25 μ g/ml)を4°Cで1時間、コントロールとNHE6ノックダウン細胞に した。分のトランスフェリンを ために したバッファーで したあと37°Cでエンドサイトーシスを開始させた。各時間点で取り込みを止め、酸性バッファーで外部に残るトランスフェリンを 後、細胞を破碎し、細胞に取り込まれたトランスフェリンを蛍光検出器より検出した。

(D) (C)のバンドの強度。

(E) (C)と同様に取り込み開始後、各時間点で細胞を固定し、顕微鏡とCCDカメラで撮影した写真(枠内は拡大部分の蛍光強度を増強した写真)。(スケールバー:50 μ m)

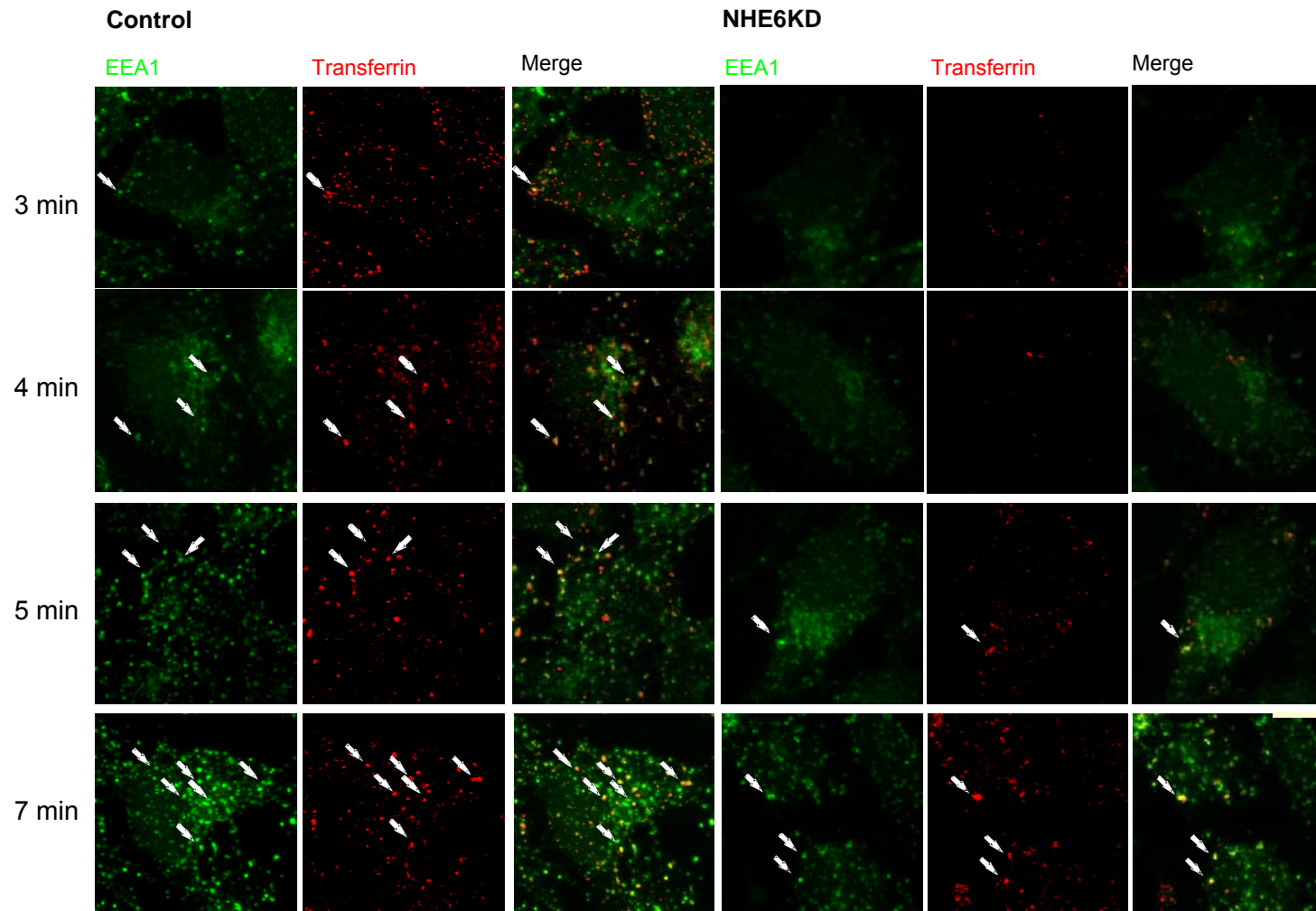


Fig.4-5 細胞に取り込まれたトランスフェリンの初期エンドソームへの移行
 Alexa546-トランスフェリン(25 μ g/ml)を4°Cで1時間、コントロールとNHE6ノックダウン細胞に処理した。5分のトランスフェリンを
 ために処理した緩衝液で処理したあと37°Cでエンドサイトーシスを開始させた。各時間点で取り込みを止め、細胞を固定し、初期エン
 ドソームのマーカであるEEA1と共染色し、顕微鏡とCCDカメラで撮影した。緑色はEEA1の染色、赤色はAlexa546-トランスフェリ
 ンの局在を示し、共局在するととなる。矢印の黄色はトランスフェリンとEEA1の共局在を示している。

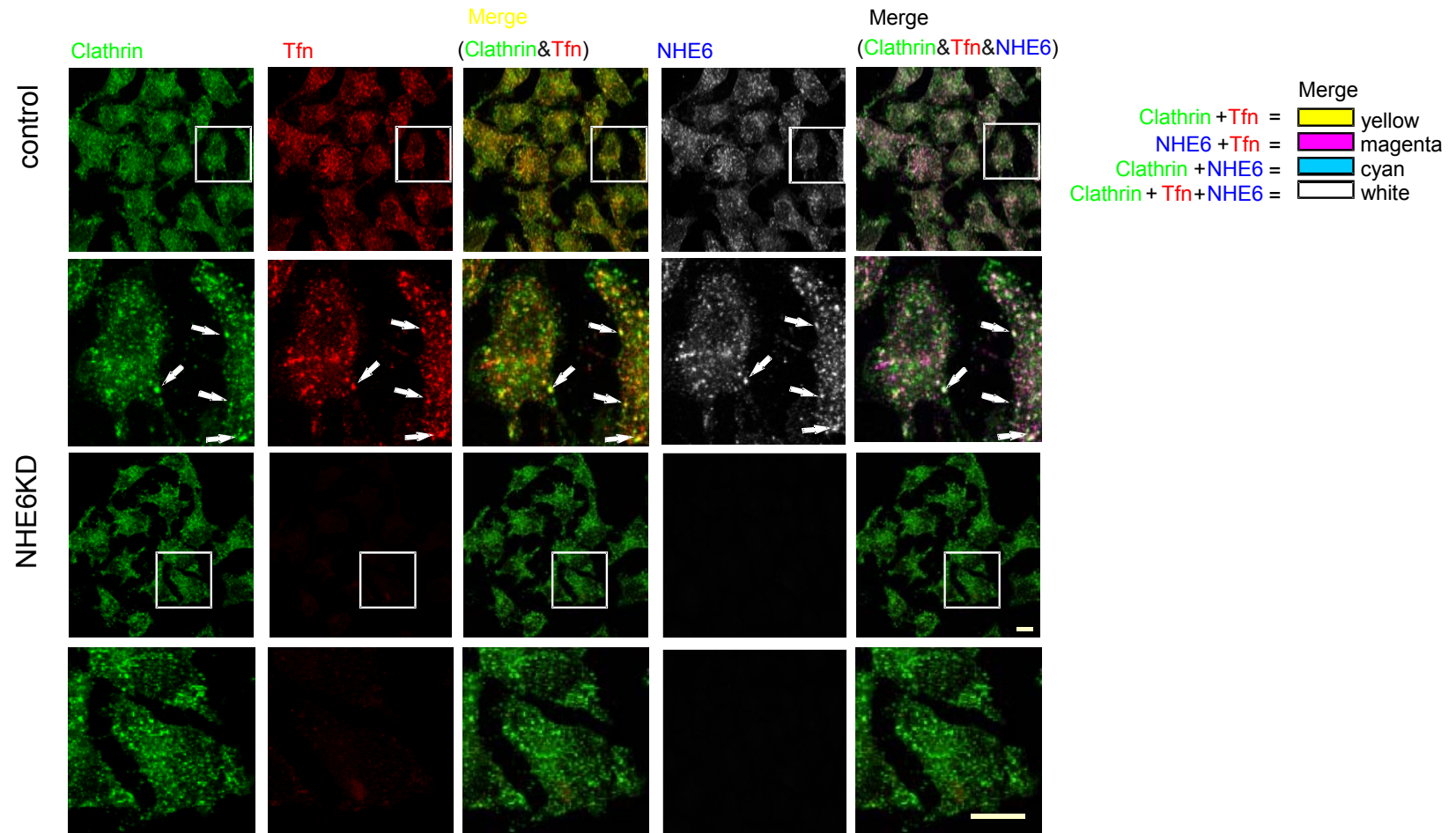


Fig.4-6 トランスフェリン取り込み後2分における、クラスリン、トランスフェリン及びNHE6の共局在
 Fig 4-5と同様に蛍光ラベルしたトランスフェリンの取り込みを開始させた。2分後に取り込みを止め、細胞を固定し、クラスリンとNHE6を共染色し、蛍光トランスフェリンと合わせて3重染色像をレーザー共焦点顕微鏡で取得した。二行目は一行目、四行目は三行目の枠内の拡大図を示している。NHE6は単独では白黒で表示しているが、3重染色像(5列目)では青色で表示している。第5列目の色の表示の凡例は右上に表示している。矢印はクラスリン、トランスフェリン及びNHE6の共局在を示している。

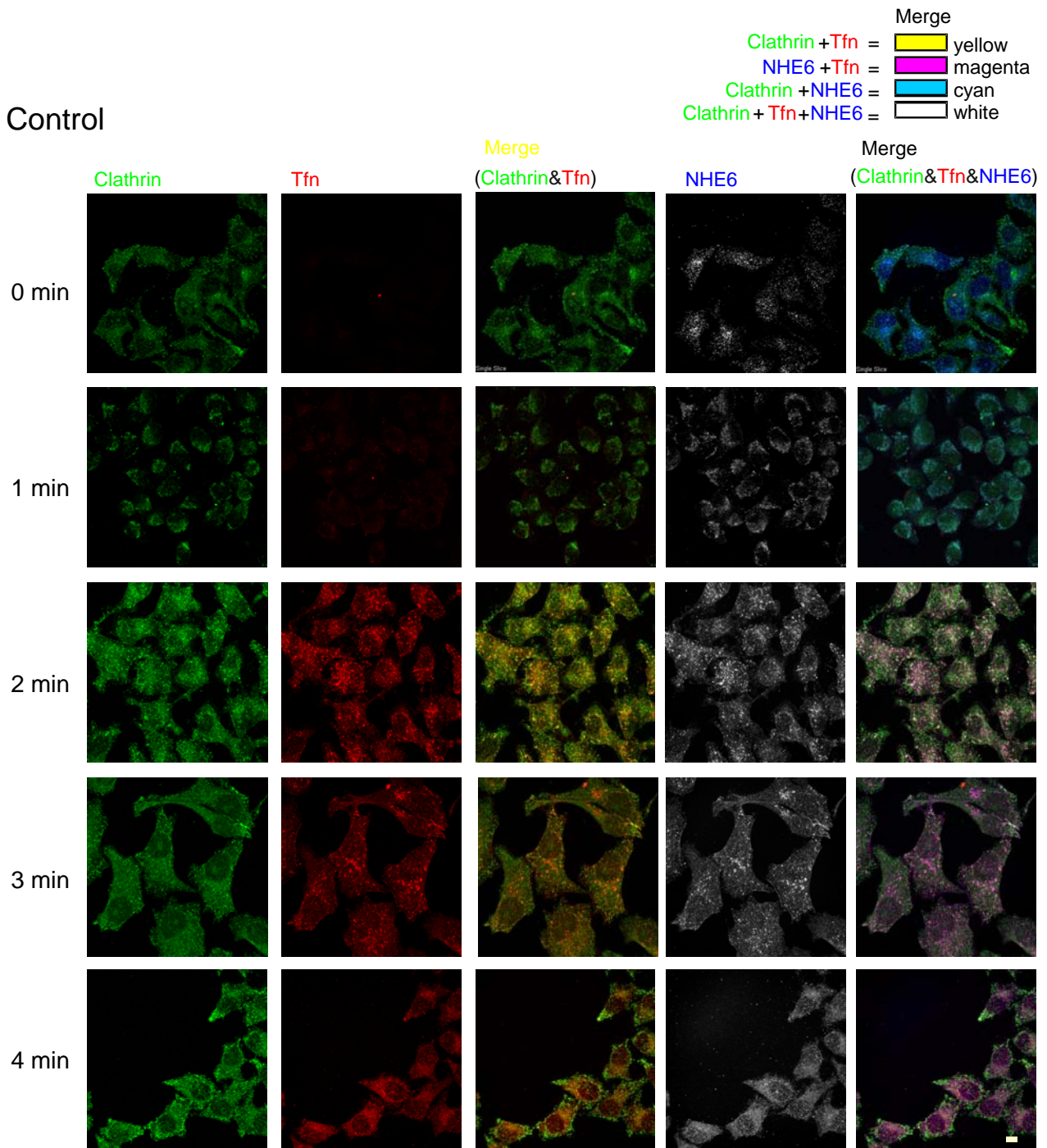


Fig. 4-7 コントロール細胞での、トランスフェリン取り込み初期における、クラスリン、トランスフェリン及びNHE6の共局在

Fig 4-6と同様に蛍光ラベルしたトランスフェリンの取り込みを開始させた。0~4分の各時間点に取り込みを止め、細胞を固定し、クラスリンとNHE6を共染色し、蛍光トランスフェリンと合わせて3重染色像をレーザー共焦点顕微鏡で取得した。クラスリンは緑色、トランスフェリンは赤色、クラスリンとトランスフェリンの共局在は黄色で表示している(3列目)。NHE6は単独では白黒で表示しているが、3重染色像(5列目)では青色で表示している。第5列目の色の表示の凡例は右上に表示している。

(スケールバー:50 μ m)

NHE6KD

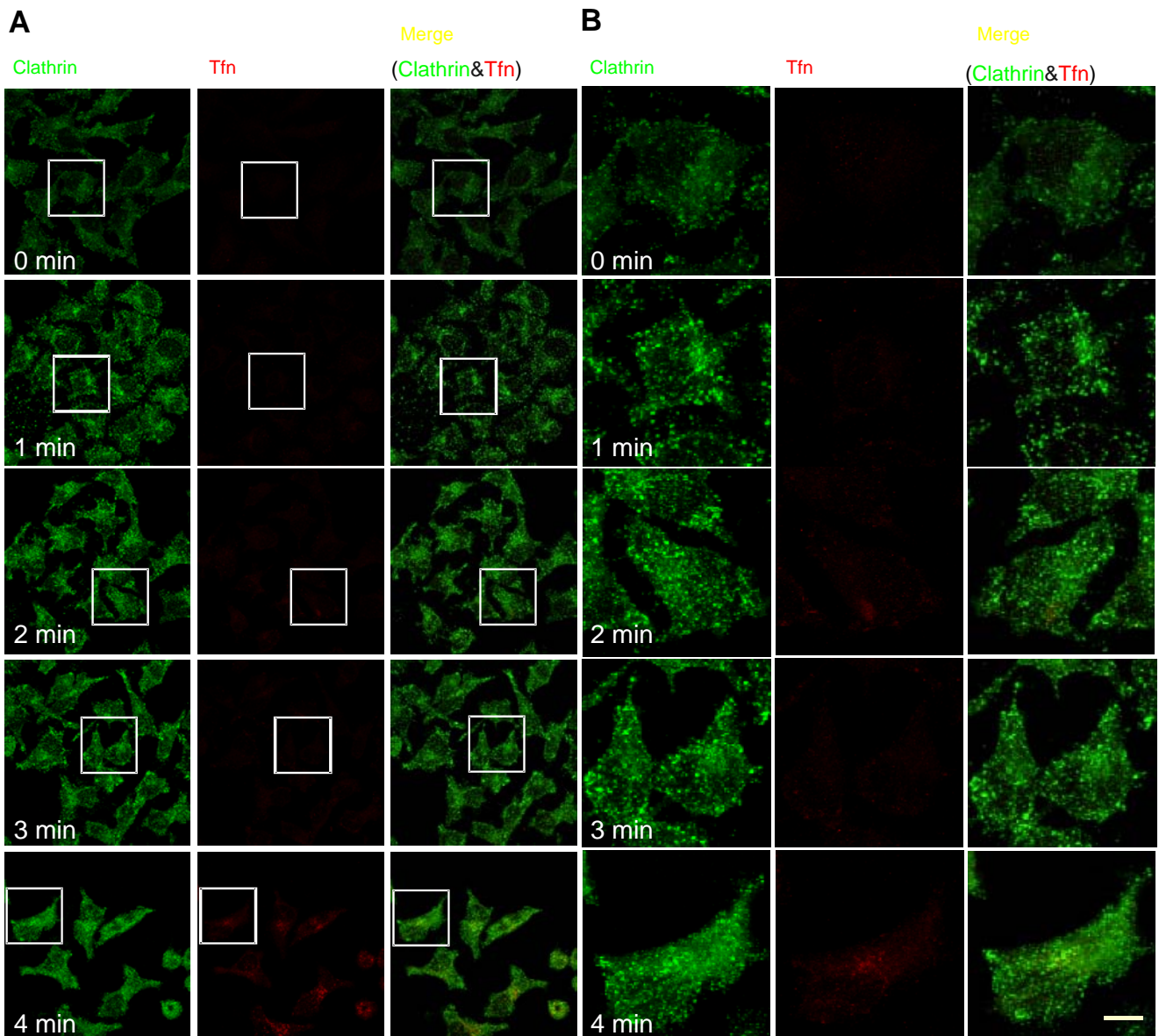


Fig. 4-8 トランスフェリン取り込み初期における、NHE6ノックダウン細胞での、クラスリン、トランスフェリン及びNHE6の局在

Fig 4-6と同様に蛍光ラベルしたトランスフェリンの取り込みを開始させた。0~4分の各時間点に取り込みを止め、細胞を固定し、クラスリンと蛍光トランスフェリンを共染色した2重染色像をレーザー共焦点顕微鏡で取得した。クラスリンは緑色、トランスフェリンは赤色、クラスリンとトランスフェリンの共局在は黄色で表示している(3列目)。一列目、二列目及び三列目の枠内の拡大図はそれぞれ四列目、五列目と六列目で表示している。

(スケールバー:50 μ m)

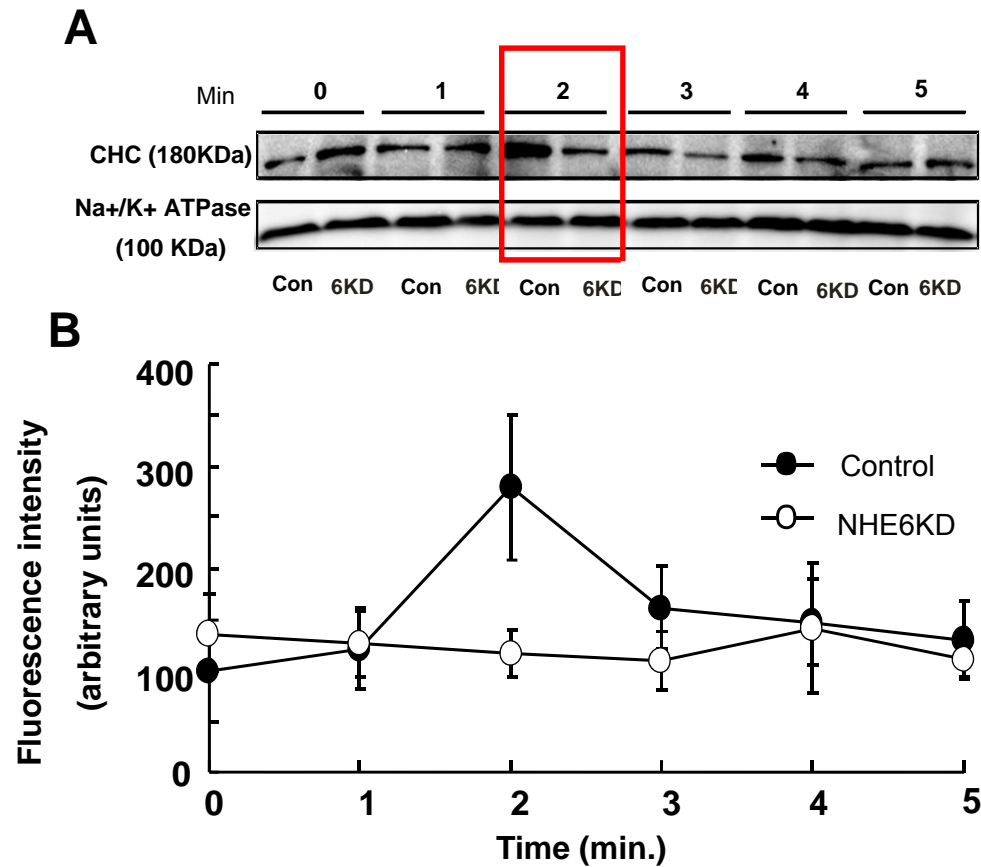


Fig.4-9 NHE6 ノックダウン 細胞では、トランスフェリン取り込み初期に起こるクラスリンの膜へのリクルートが する

(A) 25 $\mu\text{g/ml}$ のトランスフェリンを含む培地($^{\circ}\text{C}$)中で、1時間、細胞表面にトランスフェリンを結合させた後に、結合していない分のトランスフェリンを した。いて、 37°C でエンドサイトーシスを開始させ、1分から 分後に取り込みを止め、細胞を回収した。さらに細胞を破碎後、膜 分を により分 した。ウェスタンブロッティングにより、各時間点における膜 分に含まれるクラスリンと Na^+/K^+ ATPase(細胞膜マーカー)を検出した。なお、クラスリンは、抗クラスリン重鎖 Clathrin heavy chain (CHC)抗体で検出した。

(B) (A)で検出された、膜 分に含まれるクラスリンの量を定量した。

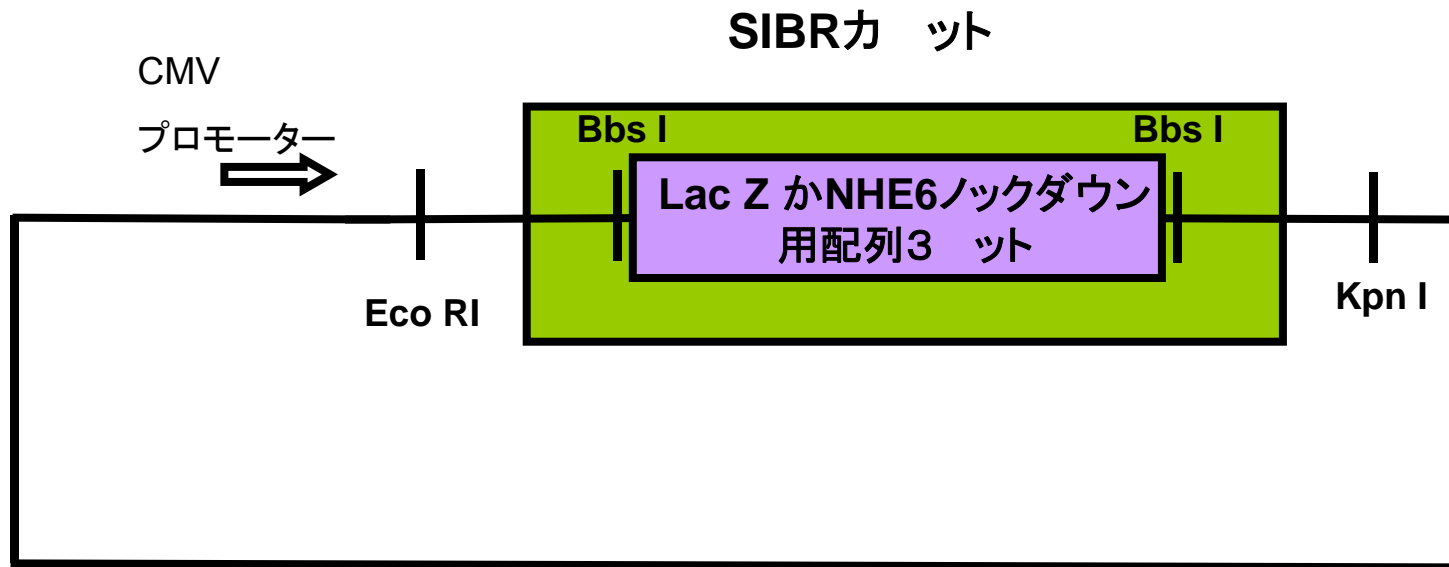


Fig.6-1 NHE6 ノックダウンプラスミドの構

RNA 用のプラスミドはpEGFP-C1 を基に作成した。pEGFP-C1は動物細胞で発現するサイトメガロウィルス (CMV)プロモーターの下流にGFPをコードしているGFP融合蛋白質発現ベクターである。このベクターからGFPを させ、CMVプロモーター下流のEcoR I-Kpn IサイトにShort Interfering BIC-derived RNA (SIBR)カ ットを み込んだ。RNA を起こすために なる標的的特異的な2 鎖RNA配列は、このSIBRカ ットの中の二つのBbs Iサイトの間に アピンRNAをコードする配列として み込むように計されている。 アピンRNAをコードするDNA配列については、コントロールであるLacZノックダウン用配列は1種類、NHE6ノックダウン用の配列は3 ット用 した。