

②

「微小管脱重合剤存在下でのトランスフェリンの
細胞内輸送と形質膜への復帰」

京都大学大学院理学研究科

生物物理学専攻

堺 立也

— 目 次 —

略語表	p4
序論	
1. タンパク質の細胞内膜器官への移行	p5~19
2. 受容体媒介エンドサイトーシス	
2-1. 被覆ピットからの取り込み	p20~22
2-2. リガンドと受容体の細胞内移行過程とエンドサイ トーシスの分類	p23~29
2-3. エンドソームの形態と機能	p30~33
3. 受容体の復帰と微小管	
3-1. エンドソームの輸送と微小管	p34~36
3-2. 微小管脱重合状態でのエンドソームの輸送と受容 体のリサイクリング	p36~37
3-3. トランスフェリンを用いるこの研究の目的と概要	p37~38
材料と方法	
1. 細胞と培養	p39
2. トランスフェリンの蛍光や酵素による標識	p39~42
3. エンドソームの蛍光顕微鏡試料作成	p42
4. エンドソームの電子顕微鏡試料作成	p42~43
5. トランスフェリンの取り込みの定量化	p44
6. トランスフェリンの放出のタイムコースと その温度依存性・pH依存性	p44~45
7. ^{59}Fe イオン結合トランスフェリンの調製と 細胞への取り込み	p45~46
8. $\alpha 2$ -マクログロブリンの蛍光標識と 細胞内分布の蛍光観察	p46~47
9. 微小管の間接蛍光抗体法による染色	p47~48

10. ゴルジ装置の蛍光染色	p48~49
----------------	--------

結果

1. ノコダゾール処理細胞でのトランスフェリンのリサイクリング	
1-1. トランスフェリンの取り込みとノコダゾールの影響	p50~53
1-2. 蛍光標識トランスフェリンの細胞内分布	p53~56
1-3. HRP標識トランスフェリンをふくむエンドソームの形態と細胞内分布(電子顕微鏡観察)	p57~58
1-4. ノコダゾール処理細胞におけるゴルジ装置と微小管	p58~61
2. トランスフェリンによるFeイオンの取り込みとエンドソームの選別機構に対するノコダゾールの影響	
2-1. Feイオンの取り込み	p62~64
2-2. 蛍光標識 α 2-マクログロブリンの細胞内分布(トランスフェリンと α 2-マクログロブリンの選別、 α 2-マクログロブリンとその受容体の選別)	p65~67
3. トランスフェリンリサイクリングのタイムコース	
3-1. HRP標識トランスフェリンの細胞外放出	p68~69
3-2. HRP標識トランスフェリンの放出の温度依存性	p70~72
3-3. HRP標識トランスフェリンの放出とpH依存性	p73~75

考察

1. FL細胞でのエンドサイトーシスとリサイクリング	p76~77
2. ノコダゾール処理したFL細胞でのトランスフェリンのエンドサイトーシスとリサイクリング	
2-1. トランスフェリンの取り込みとエンドソームの形成、形態変化に対するノコダゾールの効果	p79~81
2-2. トランスフェリンの輸送におよぼすノコダゾールの影響	p81~83
2-3. ノコダゾール処理FL細胞におけるFeイオンの取り込み	p83~84

2-4. ノコダゾール処理細胞でのリガンドの選別	p84~85
2-5. ノコダゾール処理細胞でのトランスフェリンの放出	p85~90
2-6. ノコダゾール処理細胞でのトランスフェリンリサイクリングの経路	p90~91
3. エンドソームの輸送と微小管とモータータンパク質	p92~93
4. トランスフェリンリサイクリングの経路するリサイクリングとエンドソームの輸送(リサイクリングとトランスゴルジネットワーク)	p93~97

謝辞	p98
----	-----

文献	p99~107
----	---------

略語表

ATP	Adenosine 5'-triphosphate
BSA	Bovine serum albumin
C6-NBD-ceramide	N-{6-[(7-Nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)amino]caproyl}-sphingosine
CURL	Compartment of uncoupling of receptor and ligand
DAB	3,3'-Diaminobenzidine
ER	Endoplasmic reticulum
GS	Goat serum
GTP	Guanosine 5'-triphosphate
HBSS	Hanks' balanced salt solution
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperadine-N'-2-ethansulfonic acid
HRP	Horseradish peroxidase
MEM	Eagles' minimum essential medium
MVB	Multivesicular body
OPD	o-Phenylenediamine
OVA	Ovalbumin
PBS	Phosphate buffered saline
PIPES	Piperadine-N-N'-bis(2-ethanosulfonic acid)
SC	Secretory component
TGN	trans-Golgi network
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethane
TRITC	Tetramethylrhodamine isothiocyanate
TVE	Tubulovesicular endosome

序論

細胞内ではさまざまなタンパク質がさまざまな細胞内膜器官に輸送されている。タンパク質の輸送は、強く制御されており特定のタンパク質は特定の膜器官へと選択的に運ばれる。タンパク質輸送の制御機構の解明は生物学の重要な問題点の一つである。細胞内のタンパク質の輸送は大別して、タンパク質が膜小胞に包まれて目標の膜器官まで輸送される場合と、何物にも包まれず細胞質中を移行する場合の二つの輸送形態がある。本序論の〔1〕では、細胞内のタンパク質の細胞内輸送の二機構についての概略を紹介する。次に、〔2〕で、我々の研究対象である膜小胞によるタンパク質輸送の一形態、受容体媒介エンドサイトーシス、の過程を述べ、〔3〕では、受容体媒介エンドサイトーシスにおける受容体の形質膜への輸送の研究の目的で、微小管脱重合状態の細胞でのトランスフェリンのエンドサイトーシスに着目した理由と本報告における成果を述べる。

1. タンパク質の細胞内膜器官への移行

真核細胞は、その内部にさまざまに機能分化した膜器官を持ち、これらの細胞内膜器官や形質膜へは絶えずタンパク質が輸送されている。タンパク質の細胞内輸送には、リボソームで合成されたタンパク質の各膜器官への輸送と、形質膜の膜過程であるエンドサイトーシスにより取り込まれた外界のタンパク質の細胞内輸送の2種類がある。これらの細胞内タンパク質輸送は、それぞれ細胞内の膜器官の維持や外界からの栄養物の摂取といった生命活動に重要な役割を果たしている。次にこの2種類のタンパク質の輸送の各々の場合、どの様な機構で輸送がおこなわれるかを、新生のタンパク質の輸送の場合、エンドサイトーシスにおけるタンパク質輸送の場合の順で述べる。

膜器官の機能分化は機能を担う各器官独自のタンパク質が存在することで達成されているが、これらのタンパク質は絶えず代謝されている。そこで、新生のタ

タンパク質の各膜器官への選択的輸送は、機能分化とその維持にとって重要な過程である。タンパク質の合成のほとんどは、細胞質の遊離リボソームか、小胞体に結合した膜結合リボソームによりおこなわれる。合成されたタンパク質はそれぞれの目的地である細胞内膜器官（ミトコンドリア、葉緑体、核、ゴルジ装置、リソゾーム、形質膜など）に選択的に移行しそこで保持される。この移行の機構は、その移行の過程から2種類に分類できる。第一は、遊離リボソームで合成されたタンパク質が細胞質中を各膜器官（小胞体、ミトコンドリア、核など）へと移行する場合で（図1 a）、第二は、膜結合リボソームにより合成されたタンパク質が、膜小胞に包まれ小胞体から、各膜器官（ゴルジ装置、リソゾーム、形質膜）に移行する膜小胞輸送の場合（図1 b）である。

細胞内タンパク質輸送の第二の例はエンドサイトーシスである。エンドサイトーシスは、外界の栄養物の摂取や、老廃物や有害物質の外液からの除去と分解など、生命活動にとって重要な機能を持つ現象である。エンドサイトーシスの場合、外界の物質は、形質膜の陥没により細胞内に取り込まれ、細胞内の消化器官であるリソゾームに運ばれ分解され、あるいは形質膜に再び戻される（図1 b）。この場合、タンパク質の細胞内での移行は、取り込みの形態からあきらかなように、専ら膜小胞輸送の機構をとる。

このように細胞内でのタンパク質移行過程には異なる二つの機構 [I]、 [II] に分けられる。 [I] 遊離リボソームで合成されたタンパク質の場合に見られるタンパク質自身の（何物にも包まれない形での）細胞質中の移行（図1 a）と、 [II] 膜結合リボソームで合成されたタンパク質やエンドサイトーシスされたタンパク質の場合の膜小胞に包まれた形でのタンパク質の移行（図1 b）である。この各々の場合に、タンパク質の各膜器官への選択的移行のためには独自の制御機構が存在するはずである。次にこの2種のタンパク質の細胞内輸送の過程とその制御の機構に関し [I]、 [II] の順で述べる。

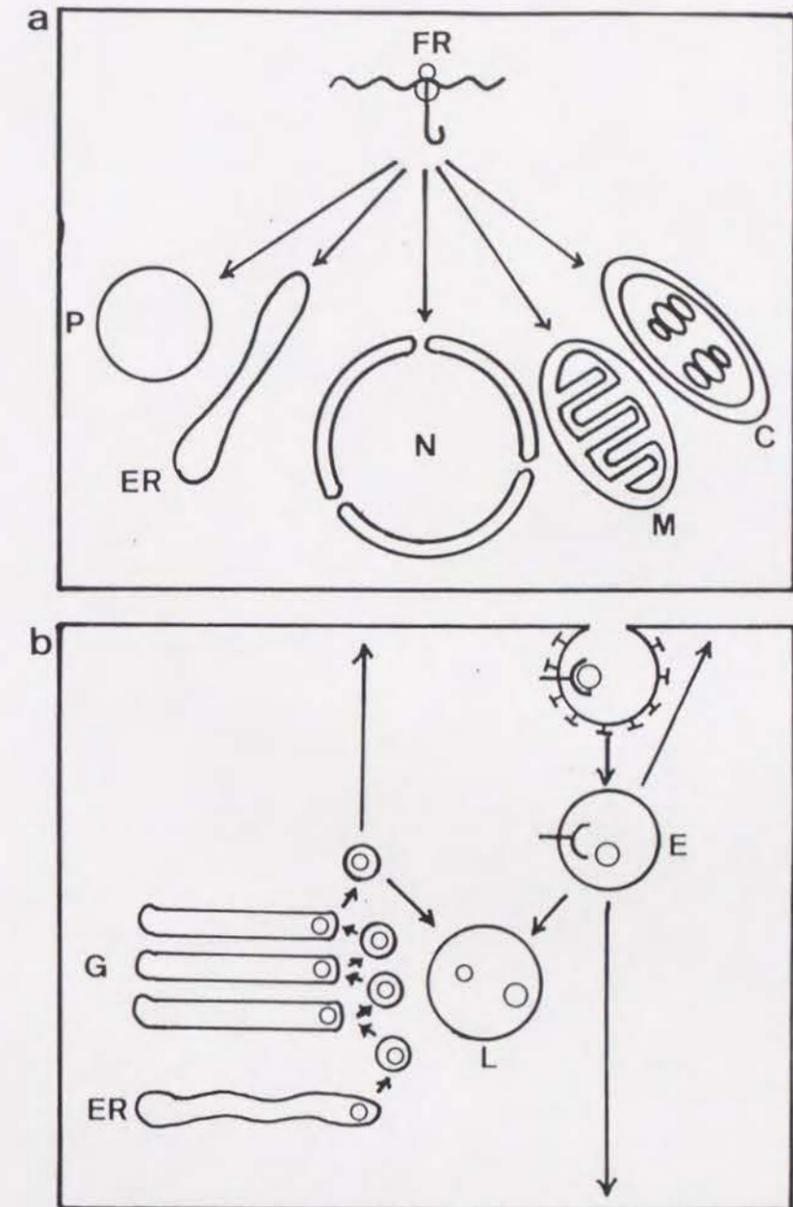


図1. タンパク質の細胞内輸送

タンパク質の細胞内輸送は、タンパク質が何物にも包まれず細胞質中を移行し目標の膜器官まで到達する場合（a）とタンパク質が膜小胞に包まれて目標の器官へと到達する場合（b）の2種類存在する。

（次ページへ）

(図1 legend続き)

aのタンパク質輸送では、輸送されるタンパク質は細胞質の遊離リボソーム(FR)で合成され、小胞体(ER)、ミトコンドリア(M)、葉緑体(C)、ペルオキシゾーム(P)、核(N)へと運ばれる。この型の輸送ではタンパク質に各々の目標の膜器官に個々の指向配列が存在する(表1)。この指向配列の認識機構が各膜器官上に存在する。運ばれるタンパク質は、小胞体以外では、合成が完了した時点で各膜器官へ移行する。例外は、小胞体の場合で、タンパク質のアミノ末端にある小胞体への指向配列(シグナルペプチド)が合成された時点で小胞体へと移行し、リボソームは小胞体の膜上に結合し、その後のタンパク質合成は膜結合リボソームでおきることになる。

bのタンパク質輸送では、輸送されるタンパク質は、膜小胞に包みこまれ、この膜小胞が目標の膜器官と融合することでタンパク質を移行する。膜小胞によるタンパク質の輸送には、新生のタンパク質の小胞体(ER)以降の輸送とエンドサイトーシスによる外液の物質の輸送の2種類がある。新生のタンパク質の輸送は、小胞体(ER)~ゴルジ装置(G)、ゴルジの層板間、ゴルジ装置~形質膜、ゴルジ装置~リソゾームの輸送がある(図1b左側)。エンドサイトーシスの場合は、外液の物質の形質膜~リソゾームが主な経路であるが、形質膜へと復帰する場合や、形質膜の別の面へと輸送が行われる場合もある(図1b右側)。

[1] 遊離リボソームで合成されたタンパク質が、細胞質中を標的器官へと輸送される場合。小胞体、ミトコンドリア、葉緑体、ペルオキシゾームや核内へのタンパク質の移行がこれにあたる(図1a)。これらの膜器官に移行するタンパク質は、その一次構造上に標的器官への移行のための指向配列が組み込まれている(1)。これらの指向配列の発見は、1972年、Milsteinらが、無細胞系で合成した分泌タンパク質が、実際分泌される時点のタンパク質より大きな分子量を持ち、前駆体から成熟型分泌タンパク質に変化する間に失われたペプチド部分が分泌の信号になることを示唆したこと端を発する(2)。続いてBlobelらにより細胞分画で得られたミクロソーム画分を使い、分泌タンパク質の小胞体移行を無細胞系で再現し、この系で分泌タンパク質のアミノ末端領域に小胞体移行のための配列があることを示唆した(3)。彼らは、その配列をシグナルペプチドと名づけている。その後、表1に示したようにミトコンドリア、葉緑体、ペルオキシゾームや核でも、核膜器官に移行するための配列が見ついている(1)。

各器官に移行するタンパク質の膜器官の認識は、標的器官への指向配列が標的器官上の受容体と結合することで達成される(あるいは、小胞体のように、シグナルペプチドを認識するシグナル認識粒子は、細胞質に存在し、さらに小胞上にシグナル認識粒子受容体が存在する場合のように認識機構が二段階になっている場合もある(4))。このように遊離リボソームで合成されたタンパク質の輸送においては、タンパク質の膜器官への選択的移行の重要な段階となる膜器官の認識の分子機構が解明されつつある。

遊離リボソームで合成されたタンパク質の移行は、多くの場合、合成が完了した時点で標的の膜器官に運ばれる。例外は小胞体の場合で、この場合タンパク質は遊離リボソームでアミノ末端のシグナル配列が合成された時点でシグナル認識粒子と結合し、さらにシグナル認識粒子が小胞体上にあるシグナル配列認識粒子受容体と結合することで小胞体に移行し、同時にリボソームは小胞体上の膜結合リボソームとなる。その後、タンパク質合成は膜透過と同時におき、タンパク質は小胞の内部へと移行する(4)。

膜結合リボソームで合成し、小胞体の内腔に移行したタンパク質の多くは、その後、ゴルジ装置や形質膜、リソゾームへと運ばれる。この輸送はすべて次に述べる膜小胞輸送によって行われる。

表1 遊離リボソームで合成されたタンパク質の標的器官への指向配列とその認識分子(1)

膜器官	標的器官への指向配列	配列を認識する分子
小胞体	シグナルペプチド (タンパク質のアミノ末端の15 ~20残基の疎水性ペプチド)	シグナル認識粒子 (32, 5 kDのRNA -タンパク質複合体)
ミトコンドリア	延長ペプチド(リーダーペプチド) (タンパク質のアミノ末端のアミノ 酸20~70残基のペプチド 塩基性アミノ酸K、R、H ⁺ をふ くみ両親媒性 α らせん構造をとる)	30 kDあるいは 32 kDタンパク質 (5、6)
葉緑体	トランジットペプチド (タンパク質のアミノ末端のアミノ 酸30~80残基のペプチド 塩基性アミノ酸K、R、をふくみ 両親媒性 α らせん構造をとる)	30 kDタンパク質
ペルオキシソーム	ペルオキシソーム指向配列 (カルボキシル末端のSKL ² あるいはSHL ³ 配列)(7)	35 kDタンパク質 (8)
核	核移行配列 (塩基性アミノ酸K、Rをふ くむアミノ酸5~30残基 のペプチド)	59、69 kD タンパク質(9)

(注) 表1中のアミノ酸は一文字表記法によった。対応するアミノ酸は以下の様になる。

*1: K = リジン、R = アルギニン、H = ヒスチジン

*2: SHL = セリン・ヒスチジン・ロイシン

*3: SKL = セリン・リジン・ロイシン

〔II〕タンパク質が膜小胞に包まれ、小胞輸送により標的の膜器官へとタンパク質が移行する場合(図1b)。この膜小胞輸送には、新生タンパク質の小胞体からゴルジ装置を経由して形質膜あるいはリソゾームへ至る輸送と、エンドサイトーシスで細胞に取り込まれた外部物質のリソゾームや形質膜までの輸送がある。どちらの場合の輸送でも、輸送されるタンパク質は、膜小胞に包みこまれ、膜小胞が目標の膜器官まで運ばれ、そこで融合することで相手の膜器官内に移行が達成される。膜小胞によるタンパク質輸送が達成されるには、輸送小胞への濃縮や封入、輸送小胞の標的器官への運搬、標的器官の認識と融合の各過程が重要な過程となる。

新生タンパク質の小胞体～ゴルジ装置～形質膜あるいはリソゾームにいたる輸送はすべて膜小胞輸送により行われる。この場合、膜タンパク質は輸送小胞の膜上に埋め込まれて、分泌タンパク質のような可溶性タンパク質は輸送小胞の内腔に包み込まれ運ばれる。新生タンパク質の膜小胞輸送においても、遊離リボソームで合成されたタンパク質の指向配列の場合と同様に、リソゾームや形質膜への移行のためのタンパク質上の信号があることが最近の研究から分かってきた。この最初の成果はリソゾーム酵素のマンノース-6-リン酸型糖鎖の発見であったが(10)、現在では、表2に示したようにその他にもいくつかのタンパク質について、標的器官への移行のための信号がタンパク質上に存在することが報告されている。

表2にみられるように、膜小胞輸送では、アミノ酸の一次配列以外でも糖鎖や脂質が移行の信号になることが、遊離リボソームで合成されたタンパク質の指向配列の場合と異なる特徴である。表2の信号のうち、小胞体タンパク質のKDEL配列は、小胞体への残留シグナルとして働いており、ゴルジ装置への移行が抑えられる(11)。この残留の機構に関しては、図2に示したようにKDEL配列を認識する受容体が小胞体内部と小胞体とゴルジ装置のシス層板の中間に存在するサルベージシステム間を往復しており、小胞体を逃れてサルベージシステムに到着した小胞体タンパク質(KDEL配列を持つ)は、ここで受容体と結合し、小胞体へと戻されることが最近になり明かにされた(12)。

表2 膜小胞輸送による新生タンパク質の輸送とその信号

膜器官	タンパク質	移行の信号
リソゾーム	β ガラクトシダーゼ などのリソゾーム酵素	マンノース-6-リン酸型糖鎖 (10)
リソゾーム	lamp-1、lamp-2 ^{*1} などのリソゾーム膜タンパク質	タンパク質のカルボキシル末端付近のHAGY配列 ^{*2} (13)
バキュオール	カルボキシペプチダーゼY	前駆体のアミノ末端に存在するQRPL配列 ^{*3} (14)
形質膜	アルカリホスファターゼ、 5'-ヌクレオチダーゼなどの GPIアンカータンパク質 ^{*5}	GPI ^{*4} (15)
小胞体	BiP ^{*6} 、PDI ^{*7} などの 小胞体内腔のタンパク質	アミノ末端のKDEL配列 ^{*8} (11)

(注)表2中の略号などに関し以下に補足する。

*1: lamp = lysosome-associated membran protein

*2: HAGY = ヒスチジン・アラニン・グリシン・チロシン

*3: QRPL = グルタミン・アルギニン・プロリン・ロイシン

*4: GPI = glycosylphosphatidylinositol

*5: 特に極性細胞の場合GPIは、天頂面への移行信号となる(16、17)。

*6: BiP = binding protein (免疫グロブリン重鎖結合タンパク質)

*7: PDI = protein disulfide isomerase

*8: KDEL = リジン・アスパラギン・グルタミン酸・ロイシン

KDEL 配列は小胞体への残留シグナルとして働く（ゴルジ装置への移行が抑えられる）

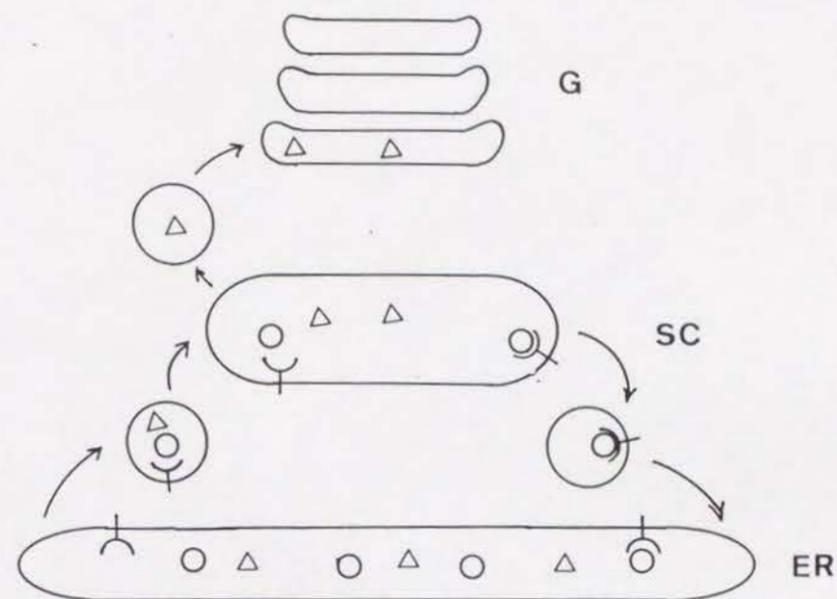


図2. 小胞体へのタンパク質の残留機構

小胞体（ER）に残留するタンパク質（○）の多くは、KDEL 配列を有している。小胞体のタンパク質（○）は、小胞体からサルベージコンパートメント（SC）へと他のタンパク質（△）同様に移行するが、サルベージコンパートメントにおいてKDEL 受容体と結合し小胞体へと戻される。小胞体では、KDEL とその受容体が解離し（この理由は今のところはっきりしていない）、受容体は再びサルベージコンパートメントに戻り再利用される。（Vauxらの結果（12）を改変して示した）

形質膜やリソゾームへ移行するタンパク質では、合成の最終段階であるトランスゴルジネットワークと呼ばれる膜器官で各々の目的地に向かう膜小胞に包み込まれる(18)。形質膜や、リソゾーム(酵母の場合バキューオール)への移行信号が膜小胞の外部(細胞質側)に存在し、指向配列の場合のように、目標の膜器官の受容体により認識されるとすれば話は簡単である。しかしこれらの信号の多くは、小胞の内部に存在しており、標的膜の認識に直接関与しているとは考えにくい。これらの膜小胞内に存在する信号を認識する機構としては、リソゾーム酵素の移行信号であるマンノース-6-リン酸において、その受容体が同定されている(19)。多くのリソゾーム酵素は、マンノース-6-リン酸型の糖鎖を持っている。マンノース-6-リン酸受容体はトランスゴルジネットワークに存在しリソゾーム酵素のリソゾームへの移行を仲介することが報告されている(20)(図3)。トランスゴルジネットワークでマンノース-6-リン酸は受容体と結合し、プレリソゾームと呼ばれるリソゾーム移行の前段階の膜系まで輸送される。プレリソゾームで受容体はマンノース-6-リン酸と解離しトランスゴルジネットワークに戻り、リソゾーム酵素はリソゾームへ移行する。このように受容体はリソゾーム酵素の最終的なリソゾームへの移行段階では、マンノース-6-リン酸と解離しており、リソゾームの認識機構は、受容体とは別に求める必要がある。

新生タンパク質の移行あるいは残留の信号の認識機構について現在知られている2例(KDEL、マンノース-6-リン酸)を紹介した。このいずれの場合も、各々のタンパク質を含む膜小胞自身の標的膜器官との選択的融合を制御する機構は明らかでない。このような問題点は残るものの、タンパク質に存在する移行信号に対する受容体が標的器官への輸送を仲介していることが分かってきた。このように、受容体との結合と解離を巧妙に利用したタンパク質輸送の最も顕著な例は、受容体媒介エンドサイトーシスである。

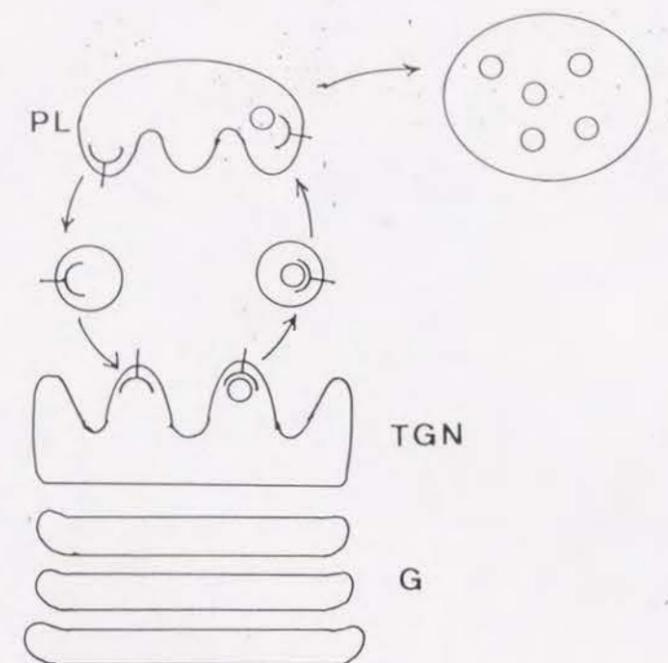


図3. マンノース-6-リン酸を持つリソゾーム酵素のリソゾームへの移行

マンノース-6-リン酸酵素(O)は、トランスゴルジネットワーク(TGN)でその受容体に結合し、プレリソゾーム(PL)へと運ばれる。プレリソゾームの酸性条件でマンノース-6-リン酸と受容体は解離し、マンノース-6-リン酸酵素はその後リソゾーム(L)へ、受容体はトランスゴルジネットワークへと戻り再利用される。(Griffithsら(20)の結果を改変して示した)

新生のタンパク質の膜小胞による輸送が、小胞体から形質膜へ向かう膜の外向きの流れであるなら、エンドサイトーシスにより形質膜から形成した膜小胞の輸送は、膜の内向きの流れといえよう(図1b)。エンドサイトーシスには、外部物質を非特異的に取り込む場合と特定の物質を選択的に取り込む場合とがある(図4)。非特異的な取り込みは、1)細胞などの固体を取り込む食作用(貪食作用)(phagocytosis)(図4a)と、2)外液を取り込む飲作用(pinocytosis)(図4b)がある(但し、食作用をおこなうマクロファージでは、固体を非特異的にも取り込むが、固体が抗体や補体と結合しているとき取り込みが強く、特異的な取り込みの場合もある)。一方、外界の物質の選択的な取り込みの顕著な例は、3)受容体媒介エンドサイトーシス(receptor-mediated endocytosis)である(図4c)(21)。受容体媒介エンドサイトーシスでは、細胞表面の受容体を介し外部の特定の物質(リガンド)を取り込み、その後多くの場合リガンドはリソゾームへ運ばれ分解され、受容体はリソゾームでの分解を免れ形質膜に復帰する(21、22、23、24)。

本報告では、形質膜へのタンパク質の輸送過程を知る上で、受容体媒介エンドサイトーシスにおける受容体の形質膜への復帰(リサイクリング)を問題として扱った。次に、現在まで得られている知見を元にその受容体媒介エンドサイトーシスの取り込みから始まる各段階の概略を述べる。

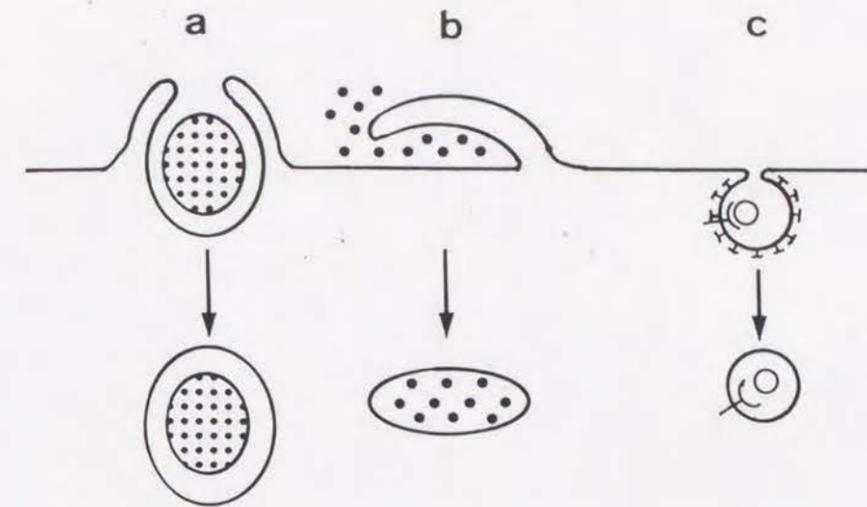


図4. エンドサイトーシスによる物質の取り込み

エンドサイトーシスには外液の固体を取り込む食作用(a)、液体を取り込む飲作用(b)と、特定の物質を取り込む受容体媒介エンドサイトーシス(c)がある。

aの食作用は、原生動物や、マクロファージなどで顕著に観察され、外部の固体を非特異的に取り込む。マクロファージなどでは、取り込まれる固体表面に抗体や補体が結合している場合は取り込みが強くおき、特異的な取り込みと見なせる場合もある。食作用により形成した膜小胞は食胞(phagosome)とよばれる。

bの飲作用では、外部の液体を非特異的に取り込む。飲作用により形成した膜小胞を飲胞(pinosome)とよばれる。

cの受容体媒介エンドサイトーシスでは、外部の主にタンパク質を細胞表面の受容体への吸着により特異的に取り込む。受容体媒介エンドサイトーシスは、被覆ピットと呼ばれる形質膜のくぼみを取り込み口となっている。受容体媒介エンドサイトーシスで形成した膜小胞をエンドソーム(endosome)とよばれる。

2. 受容体媒介エンドサイトーシス

2-1. 被覆ピットからの取り込み

受容体媒介エンドサイトーシスの概念は、1974年にGoldsteinとBrownが、細胞のコレステロール代謝に関係する血中の低密度リポタンパク質の細胞表面への吸着、細胞内への取り込みとリソゾームでの分解の過程を説明するものとして提出された(25)。1976年には、Andersonらは、フェリチンを結合した低密度リポタンパク質を使い電子顕微鏡観察から、形質膜上の低密度リポタンパク質受容体の分布を調べ、細胞表面の受容体50~80%が形質膜上で集合していることを見だし(26)、続いて受容体が集合する領域が被覆ピットと呼ばれる裏打ち構造を持つ形質膜のくぼみであることを示した(27)。それ以前すでに、RothとPorterが被覆ピットから卵黄タンパク質が卵細胞内へ取り込まれることを観察しており、この被覆ピットと呼ばれる形質膜の領域が外液の物質の取り込みには重要な役割を果たしていることが示唆されていた(28)。しかし彼らの実験では、卵黄タンパク質の取り込みが、非特異的な液相の取り込みなのか、選択的な取り込みなのか区別はついていなかった。先のAndersonらの観察は、被覆ピットが外部物質の特異的な取り込みである受容体媒介エンドサイトーシスの場であることを証明した。それと同時に、取り込まれるタンパク質の濃縮の問題が受容体の被覆ピットへの集合により達成されることが分かった。

Andersonの発見以降、被覆ピットに集まる物質と受容体の探索が精力的におこなわれ、さまざまな物質が、被覆ピットから受容体媒介エンドサイトーシスにより細胞内に取り込まれることが現在までに分かっている。取り込まれる物質(リガンド)は、表3に示したように、栄養物などの血中物質、ペプチドホルモンなどの情報伝達に関する物質、抗体、ウイルスなどがある(21、22、29)。

表3 受容体媒介エンドサイトーシスのリガンドと受容体(21、22、29)

リガンド	受容体	エンドソームの経路 ^{*1}
〈栄養物、老廃物など〉		
低密度リポタンパク質	160 kD 糖タンパク質	a
トランスフェリン	180 kD 糖タンパク質 (90 kD 二量体)	c
トランスコバラミンII	50 kD 糖タンパク質	a
アシアロ糖タンパク質	42 kD 糖タンパク質	a
	59 kD 糖タンパク質	
α2-マクログロブリン	420 kD 糖タンパク質 (30)	a
〈情報伝達物質〉		
上皮成長因子	190 kD 糖タンパク質	b
インシュリン	440 kD 糖タンパク質 (135 kD の二量体と 95 kD の二量体から なる四量体)	b
〈抗体〉		
マウス免疫グロブリンG		bあるいはc
IgG1、IgG2b	47 kD 糖タンパク質	
	60 kD 糖タンパク質	
IgG2a	65 kD 糖タンパク質	
母性免疫グロブリンG	(Fcγ受容体)	d
免疫グロブリンA二量体	90 kD 糖タンパク質 (SC ^{*2})	d

(次ページへ)

(表3 続き)

(ウイルスと毒素)

インフルエンザウイルス	シアル酸を持つ糖タンパク質	e
セムリキ森林ウイルス		e
水ぼうし性口内炎ウイルス		e
ジフテリア毒素	14, 5 kDサブユニットを ふくむタンパク質(31)	e
リシン		e

*1: 図7に示したリガンドと受容体の目的地別にみたエンドサイトーシスの経路

*2: 免疫グロブリンA二量体受容体は、トランスサイトーシス後、その一部が細胞外に分泌されるため、SC (secretory component) と呼ばれる。

2-2. リガンドと受容体の細胞内移行過程とエンドサイトーシスの分類

受容体媒介エンドサイトーシスにおいて物質(リガンド)は、被覆ピットが細胞の内向きにちぎれることにより細胞内に取り込まれる。Pearseにより、被覆ピットの被覆を構成するタンパク質が単離され、その主要成分はクラスリンと名付けられた(32, 33)。クラスリンは、三量体を単位とし、さらにこれが結合しあって被覆を構成している(34)(図5)。クラスリン三量体は、図5に示したように結合の様式を変化させ平面状の構造から球状に近い構造に変化し、この構造変化にともない被覆ピットは、被覆小胞となり細胞内に取り込まれる。形成した被覆小胞は、クラスリンの被覆が脱被覆ATPアーゼの働きにより外される(35)。この被覆の外れた小胞をエンドソームと呼ぶ。

エンドサイトーシスされたリガンドの多くは、リソゾームに運ばれ分解を受ける。一方、受容体の移行に関しては、1976年、Goldsteinらが、タンパク質合成を阻害し新しく受容体が合成されない細胞でも低密度リボタンパク質は数時間、定常的に取り込まれることを見だし、受容体が形質膜に復帰し再利用されていることを指摘した(36)。それでは受容体はリソゾームへの移行までのどの段階でリガンドと別れリサイクリングするのであろうか。

Dunnらは、受容体のリサイクリングが少なくともリソゾームへ運ばれる以前の段階で起きることを見いだしている(37)。彼らは、リソゾーム移行型のリガンドであるアジアロ糖タンパク質をラット肝初代培養細胞に16°Cでエンドサイトーシスさせた。この温度では、アジアロ糖タンパク質がリソゾームへ移行する以前の段階で細胞内の膜小胞に蓄積していた。しかしこの場合でも細胞表面の受容体数は常に一定であり、受容体は少なくともリガンドがリソゾームに到達する以前の段階でリガンドと別れリサイクリングしていることを示唆している。

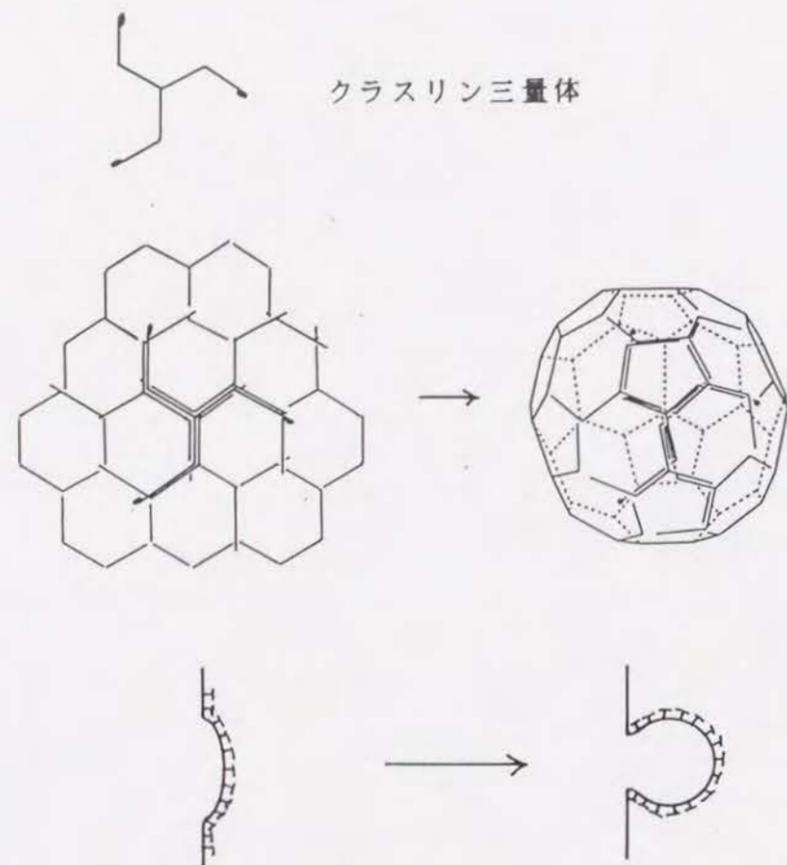


図5. クラスリン被覆の構造変化による被覆ピットの陥入

被覆ピットの被覆を構成するクラスリンは、三量体で一単位を構成している。この三量体が、さらに結合しあい被覆を形成する。三量体の結合様式は、六角形を形成する場合と五角形を形成する場合があるが、六角形のみの場合、全体では平面的な構造をとり、これから、五角形が増えるに従い三次元的な球を形成する。この構造変化にともない被覆ピットは、細胞内に陥入すると考えられる。

(Heuser (34)の結果を改変して示した)

受容体がリサイクリングするのに先だって、リガンドは受容体から解離するはずである。Lodishらは、アシアロ糖タンパク質とその受容体の結合のpH依存性を調べ酸性条件(pH 5~6)で解離することを示唆した(図6)(38)。また、TyckoとMaxfieldは、pHで蛍光強度の変化する蛍光試薬で標識したデキストランを使い、デキストランをふくむ膜系(エンドソーム)の内部は、エンドサイトーシス後、速やかに酸性化することを見いだした(39)。リガンドと受容体は、このエンドソームの酸性化により解離し、その後リソゾームに至る以前の段階で膜分裂により別々の膜内に選別されリガンドはリソゾームへ、受容体は形質膜へと移行すると考えられる。

現在まで各種のリガンドと受容体の移行が調べられた結果、低密度リポタンパク質のようにリガンドはリソゾームへ移行し受容体は形質膜へ復帰する以外の経路をとる場合もあることが判明している。リガンドと受容体の移行先の組合せからエンドサイトーシスを分類すると次の1)~5)になる(図7)(23)。

1) リガンドはリソゾームへ運ばれ、受容体は形質膜へ復帰するタイプ。低密度リポタンパク質(LDL)、アシアロ糖タンパク質、 $\alpha 2$ -マクログロブリンがこのタイプに属する。リガンドは、エンドソームの酸性化により受容体から解離する。その後、受容体をふくむ膜小胞(リサイクリング小胞)とリガンドをふくむ小胞に別れる。その後、受容体は形質膜へ復帰し、そこで再利用され、リガンドはリソゾームへ移行し、そこで分解される(図7a)。

2) リガンドと受容体がともにリソゾームへ運ばれるタイプ。上皮成長因子やインシュリンなどの情報伝達物質がこのタイプに属する。リガンドは、エンドソームの酸性化により受容体と解離する。その後、リガンドと受容体はリソゾームに移行し分解される(図7b)。この場合、受容体もリソゾームで分解を受けるため、細胞表面の受容体数は減少し情報伝達物質に対する応答が悪くなる。この現象は受容体のダウンレギュレーションと呼ばれている。

3) リガンドと受容体がともに形質膜へ復帰するタイプ。トランスフェリンがこのタイプに属する。リソゾーム移行型の免疫グロブリンG、上皮成長因子、インシュリン、アシアロ糖タンパク質が形質膜へ復帰する場合もある。トランスフェリンは酸性条件で受容体と解離せず、ともに形質膜へ戻る。ただしトランスフ

エリンは酸性条件下でFeイオンを遊離し、Feイオン解離型トランスフェリン（アポトランスフェリン）になる。形質膜へ復帰したアポトランスフェリンは外液へ遊離し、受容体は形質膜上で再利用される（図7c）。

4) リガンドと受容体がエンドサイトーシスされた形質膜の面とは別の面へ輸送されるタイプ。免疫グロブリンA (IgA) 二量体、免疫グロブリンMがこのタイプに属する。リガンドと受容体は、形質膜の天頂面 (apical surface) から基底面 (basolateral surface) へ、あるいはその逆の経路で輸送される。この現象はトランスサイトーシスと呼ばれている。この場合も、3) と同様細胞内でリガンドと受容体の解離はない（図7d）。

5) リガンドがエンドソームから細胞質に移行する場合。ウィルスのゲノムや、や毒素の一部をなすペプチドは、エンドソームの酸性化により細胞質へ移行する（図7e）。

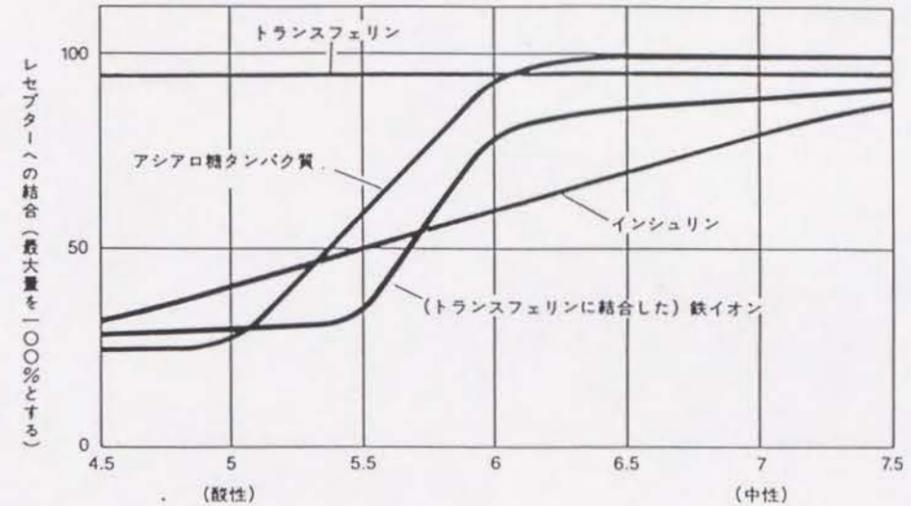


図6. リガンド-受容体の結合のpH依存性

エンドサイトーシス後、リソゾームで分解されるリガンドであるアシアロ糖タンパク質は、酸性条件下でその受容体と解離する。図には、アシアロ糖タンパク質以外にも、インスリンやトランスフェリンの受容体との結合、あるいは、トランスフェリンとFeイオンの結合のpH依存性も同時に示した。後に述べるが、インスリンの場合、リガンドと受容体の両者がリソゾームに移行し、トランスフェリンは、リガンドと受容体の両者が形質膜に復帰する。アシアロ糖タンパク質やインスリンは、pH 5.5になると受容体から約半数が解離することが分かる。トランスフェリンの受容体との結合は、酸性条件下でも変化しないが、FeイオンはpH 5.5以下でほぼ完全にトランスフェリンから解離することが分かる。

(Dautory-Varsatらの結果(38)を改変して示した)

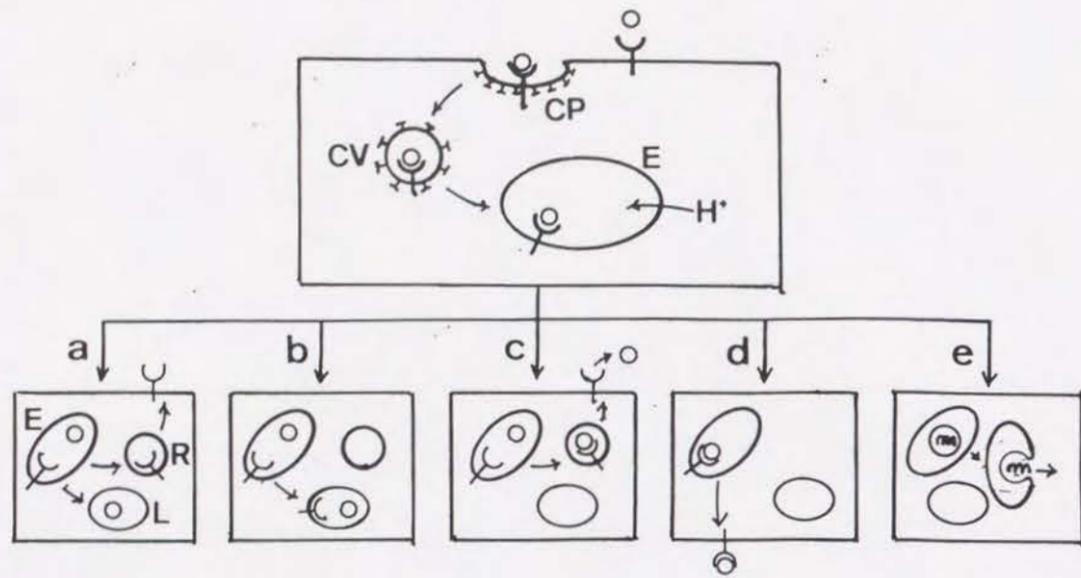


図7. 受容体媒介エンドサイトーシスにより取り込まれたリガンドと受容体の目的地

受容体媒介エンドサイトーシスでは、リガンドは細胞表面の受容体に結合しクラスリンが裏打ちする被覆ピット (CP) に集まる。被覆ピットは細胞の内向きにちぎれ被覆小胞 (CV) となり、さらに被覆が外れエンドソーム (E) となる。エンドソームの内部は H^+ -ATPアーゼの働きで酸性化する。ここまでの過程は、全てのリガンド受容体で共通である。その後リガンドと受容体は、a~eの経路のいずれかをとる。

a: リガンドはリソゾームへ移行し受容体は形質膜へ復帰するタイプ。アシアロ糖タンパク質、低密度リボタンパク質、 $\alpha 2$ -マクログロブリンなどがこれに属する。エンドソーム (E) の酸性化によりリガンドと受容体は解離しリガンドはリソゾーム (L) へ移行し加水分解を受ける。受容体は形質膜へリサイクリング小胞 (R) により形質膜へと復帰し再利用される。

b: リガンドと受容体がともにリソゾームへ運ばれるタイプ。上皮成長因子、インスリンがこれに属する。エンドソームの酸性化でリガンドは受容体と解離するが、その後、両者はともにリソゾームへ運ばれ加水分解を受ける。(次ページへ)

(図7 legend続き)

c: リガンドと受容体がともに形質膜へ復帰するタイプ。トランスフェリンがこれに属する。エンドソームの酸性化でリガンドは受容体と解離せずともに形質膜へと復帰する。

d: リガンドと受容体がともに形質膜のエンドサイトーシスされたのとは別の面に運ばれるタイプ。免疫グロブリンA二量体、免疫グロブリンGがこれに属する。極性細胞において観察され、エンドソームの酸性条件でリガンドは受容体と解離しない。リガンドと受容体はエンドサイトーシスされたのとは形質膜のエンドソームされた面と別の面へ運ばれる。これはトランスサイトーシスと呼ばれる。

e: リガンドの一部が細胞質に移行するタイプ。ウイルスや毒素がこれに属する。図はエンベロープウイルスの場合を示している。エンドソームの酸性条件下でウイルス膜がエンドソーム膜と融合しウイルスゲノムを細胞質へ移す。

(各リガンドが、この分類a~eのどれに当てはまるかは表3中に示した)

(Goldsteinらの報告(23)を改変して示した)

2-3. エンドソームの形態と機能

エンドサイトーシスされた各種のリガンドと受容体は細胞内で選別されリソゾームや形質膜といった各々の目的地に運ばれる。リガンドや受容体の細胞内での移行の過程は、1980年前後、電子顕微鏡観察により多くの知見が得られた。Willinghamらはリソゾームへ運ばれるリガンドである $\alpha 2$ -マクログロブリンについて、被覆ピットからリソゾームに至るまでの移行過程を電子顕微鏡観察により追跡している(40、41、42)。この結果はエンドソームの形態と形態変化をよく示しているので図8(a~f)に模式的に紹介する。 $\alpha 2$ -マクログロブリンは、エンドサイトーシス直後は直径150nm程度の被覆ピットあるいは被覆小胞に存在し、その後(10分前後で)、細胞の中心部に存在する直径150~350nmの膜小胞内に観察されるようになり、次に、ゴルジ域の直径1 μ m程度のマルチベジキュラーボディに移行した。マルチベジキュラーボディは、さらにその内部に直径50nm程度の膜小胞をふくむ膜系である。被覆をはずした直径150nm程度の小胞から、直径1 μ m程度のマルチベジキュラーボディまでの各種の形態の膜小胞を総称して、エンドソーム(endosome)と呼んでいる(43)。その後 $\alpha 2$ -マクログロブリンは、リソゾーム内に移行する。このようにエンドソームはその形態をさまざまに変化させ、リガンドのリソゾームへの移行を仲介している。

リガンドがリソゾームへ運ばれ受容体は形質膜へ復帰するエンドサイトーシスの場合($\alpha 2$ -マクログロブリン、低密度リボタンパク質やアシアロ糖タンパク質などの場合)、受容体はリソゾームに達する以前の段階でリガンドと選別される。また同一の被覆ピットから目的地の違う複数のリガンドが取り込まれるが、これらのリガンド間の選別も細胞内でおこなわれる(21)。各種のエンドソームの形態がリガンドと受容体の選別とどの様に対応するかは、興味ある問題である。Geuzeらは、アシアロ糖タンパク質の抗体とその受容体の抗体を直径の違う金コロイドで標識し、一つの膜小胞内での両者の分布を免疫電子顕微鏡法で観察した(44)。その結果、球状の小胞から管状構造の突出した構造を持つエンドソーム(チュープロベジキュラーエンドソーム: TVE)(図8c)の管部分に受容体が、球内にリガンドが存在しているのが観察された。彼らは、このエンドソームをそ

の選別機能から特にCURL(compartment of uncoupling of receptor and ligand)と名付けている。また形質膜に復帰するトランスフェリン受容体とリソゾームに移行する上皮成長因子受容体の選別がマルチベジキュラーボディ(図8e)で起きるとする報告もある(45、46)。

リガンドと選別された後の受容体の形質膜への復帰は、リガンドのリソゾームへの移行と並ぶエンドサイトーシスの一つの問題である。Geuzeらは、受容体をふくむCURLの管状部分が膜分裂により本体よりちぎれ、これが形質膜へ復帰する小胞(リサイクリング小胞)となるとしている(44)。しかし同時に彼らのグループは、ラット肝細胞のアシアロ糖タンパク質受容体が、被覆ピット、被覆小胞やエンドソーム以外にもトランスゴルジネットワーク(図8g)内に移行することを観察しており、受容体の復帰にトランスゴルジネットワークが関与する可能性も示唆している(47、48)。トランスゴルジネットワークは、ゴルジのトランス層板のさらに外側に位置する網目状の膜構造で、ここで新生のタンパク質はリソゾームあるいは形質膜行きの小胞に選別され詰め込まれる。タンパク質合成の経路においてトランスゴルジネットワークは選択的な輸送を司る器官であると考えられている(18)。

アシアロ糖タンパク質受容体以外でも、形質膜復帰型のトランスフェリンとその受容体(49、48)、リソゾーム移行型の上皮成長因子(49、50)、トランスサイトーシス型のIgA二量体受容体(SC)(47)、あるいは細胞質へ移行する毒素であるリシン(51)などが、トランスゴルジネットワークに移行することが報告されており、これらのリガンドや受容体の標的器官への移行のためのトランスゴルジネットワークの重要性が示唆されている。しかし、一時的にトランスゴルジネットワーク内に観察される受容体は全受容体数に比べ少数(アシアロ糖タンパク質受容体で全受容体の20%)であり、トランスゴルジネットワーク経由の経路が、受容体の形質膜までの復帰に必須の経路であるのか(49)、一部の受容体のみ経由する二次的な経路であるのか(52、53)不明である。

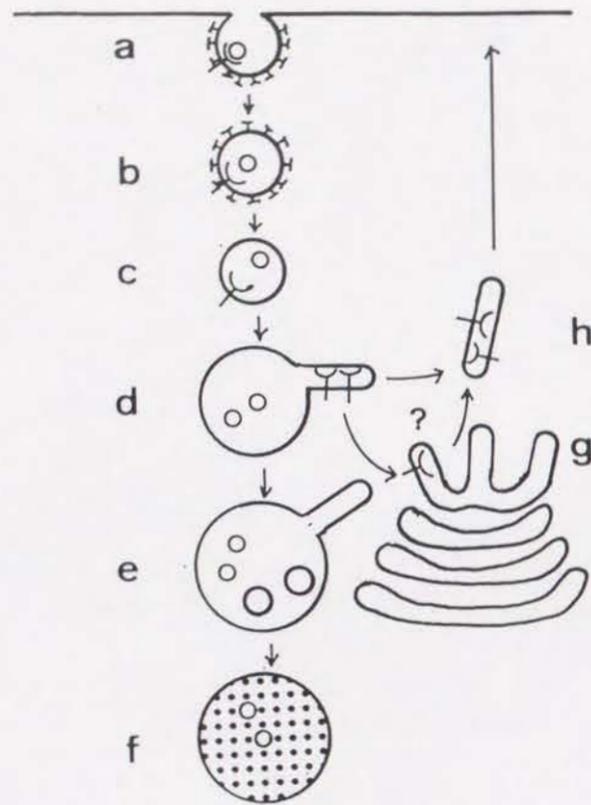


図8. エンドソームの形態変化

リガンドの取り込みからリソゾームに移行するまでのエンドソームの形態を模式的に示した。リガンドの存在が観察された膜系は、エンドサイトーシスの初期(0~5分)には、直径150nmの被覆ピット(a)や、被覆小胞(b)、5~15分で直径150nm~350nmの球状(c)や球の一部から管状の構造が突出した小胞(チュプロベジキュラーエンドソーム)(d)であった。また、15分ではゴルジ域に直径約1 μ mのマルチベジキュラーボディ(e)内にもリガンドが観察された。直径350nm程度の小胞(d)やマルチベジキュラーボディ(e)ではその一部が管状になっているものもある。リガンドは1.5~60分でリソゾーム(f)内に移行する。(Willinghamらの結果(42)を改変して示した)

(次ページへ)

(図8 legend続き)

c~eの段階の膜系がエンドソームと呼ばれる。リガンドと受容体の選別に関するCURLは、dの形態をとり管部分に受容体、球部分にリガンドが存在する(44)。またマルチベジキュラーボディ(e)にもCURL同様選別機能があるとする説もある(45、46)。

受容体の形質膜への復帰については、CURL(d)の管部分がちぎれリサイクリング小胞(f)となり形質膜へ復帰するのか、トランスゴルジネットワーク(g)を経由して形質膜へと復帰するのかははっきりしない(49、47)。

3. 受容体の復帰と微小管

我々は受容体の形質膜までの復帰の制御とその経路におけるトランスゴルジネットワークの役割を調べるため、受容体の移行をトランスゴルジネットワーク以前の段階で妨げることを試みた。トランスゴルジネットワークは細胞の中心部に位置する膜構造体である(18)。一方、形質膜から形成したエンドソームはその形態を変化させながら細胞中心部へと移動していく。そこでエンドソームの移動を妨げることができればトランスゴルジネットワークへの移行も妨げられることが予想される。エンドソームの移動の機構は次に述べるように細胞骨格の一つである微小管が関与することが示唆されている。

3-1. エンドソームの輸送と微小管

エンドサイトーシスにより形成した膜小胞の移動に関しては、1930年代すでにLewisがマクロファージの飲作用により取り込まれた物質が、細胞の周辺から核近くへ移行することを報告している(54)。1964年には、Strausが、細胞外液にくわえた西洋わさび過酸化酵素を、非特異的な液相のエンドサイトーシスにより取り込ませることでエンドソームを青色に染色して、一方リソゾーム酵素である酸性ホスファターゼの活性によりリソゾームを赤色に染色し、エンドソームとリソゾームを染め分けた(55)。その結果、西洋わさび過酸化酵素をふくむエンドソームは時間とともに細胞全体からリソゾームの分布する核近くに分布するようになり、最終的にはその内容物をリソゾーム内に移行することを観察した。

細胞内の膜器官の運動に関しては、色素細胞における色素顆粒の運動が、細胞骨格の一つである微小管に依存することが知られていた(56)。微小管は、主に分子量56 kDの α チューブリンと53 kDの β チューブリンの二量体が重合してできた直径2.5 nmの管状の構造体である(57)。間期の培養細胞内での微小管は、核近傍の微小管形成中心から放射状に伸びるネットワーク構造をとっている(58)。色素顆粒は直線的な運動をするが、微小管を脱重合させる薬剤、コルヒチンで細胞を処理することにより、この運動が止まることが報告されていた

(56)。

FreedとLebowitzは、同様の考えをエンドサイトーシスの系に適用し、光学顕微鏡下で容易に観察できるリソゾームの運動を繊維芽細胞で観察した。彼らは、リソゾームの直線的な運動が、微小管脱重合剤であるコルヒチンにより阻害されることを報告している(59)。

リソゾームの細胞内での分布あるいは運動が、微小管に沿っているなら、エンドソームが微小管に沿って移動すれば、エンドソームの内容物はリソゾームへ、効率よく移行するはずである。そこで、コルヒチンなどの微小管脱重合剤で微小管を破壊すれば、エンドサイトーシスされたリガンドのリソゾームでの加水分解が阻害されることが予想される。Ostlundらは、コルヒチン処理したヒト繊維芽細胞に低密度リボタンパク質をエンドサイトーシスさせ、リソゾームでの分解速度を測定した(60)。その結果、コルヒチン処理した細胞では、リソゾーム酵素の活性には影響がないにもかかわらず、低密度リボタンパク質の分解が抑えられた。他のリガンドや細胞でも同様の実験が試みられ、その結果はOstlundらの結果を支持した。いくつかのグループが、ラット肝実質細胞の初代培養細胞でアシアロ糖タンパク質の一種であるアシアロフェツインやアシアロオロソムコイドを使って実験をおこない、これらのアシアロ糖タンパク質の消化速度がコルヒチン処理や、ビンブラスチン処理(微小管の繊維構造を破壊しバラクリスタル構造を形成する)で、正常値の50~10%に抑えられることを報告している(61、62、63)。またBrownらは、リガンドと受容体の両者がリソゾームに運ばれるタイプである上皮成長因子について同様の実験を行い、リソゾームでの上皮成長因子の分解がコルヒチンとビンブラスチンにより阻害を受けるという結果を報告している(64)。

一方、受容体媒介エンドサイトーシスにより形成したエンドソームの運動を顕微鏡下で観察する試みもなされた。それまでエンドソームの運動の観察は、細胞外液に蛍光試薬などの物質を加え、液相の取り込みによりエンドソームを染色していた。しかしこの方法では、非特異的な取り込みで形成した食胞などと、受容体媒介エンドサイトーシスで形成したエンドソームと区別がつかない。最近になってPastanとWillinghamは、蛍光顕微鏡にビデオ解析装置を組み合わせた方法(ビデオ画像強調顕微鏡法)を使い、受容体媒介エンドサイトーシスで形成したエ

ンドソームのみを観察することに成功した。彼らは、リソゾーム行きのリガンドである $\alpha 2$ -マクログロブリンを蛍光試薬で標識し、ビデオ画像強調顕微鏡法により、生きた細胞でエンドソームの運動を追跡した(65)。その結果、エンドソームの運動は跳躍運動であった。跳躍運動は微小管依存の運動の特徴であり、エンドソームの移動に微小管が関与している可能性を示唆している。さらにHermanとAlbertiniも、同様の観察法により、蛍光標識した低密度リボタンパク質でエンドソームを染色し、リソゾームに蓄積する蛍光試薬であるアクリジンオレンジでリソゾームを染色して、エンドソームとリソゾームの運動と分布を一つの細胞内で観察することを試みた。その結果、彼らは、エンドソームは跳躍運動により、リソゾームの存在する核近傍に移動することを示し、リガンドのリソゾームでの分解と微小管脱重合の関係とその運動性から説明している(66)。

3-2. 微小管脱重合状態でのエンドソームの輸送と受容体のリサイクリング

微小管に依存したエンドソームの運動により、リガンドや受容体が細胞中心部に運ばれるなら、微小管を脱重合させることで、受容体のトランスゴルジネットワークへの移行を抑制することが期待できる。トランスゴルジネットワークの経路が受容体の形質膜への復帰にとって必須の経路であるなら、微小管脱重合は受容体の形質膜への復帰に影響を及ぼすことが期待できる。

(3-1)で述べたように、リソゾームへ移行するリガンドに関しては、すでにこの着想の実験が試みられており、微小管の脱重合によりリガンドの分解が阻害されることが報告されている。同時に微小管脱重合状態での受容体の形質膜への復帰に関するいくつかの知見も示されている。しかしこれらの知見は、標識したリガンドの取り込み等から受容体の挙動を判断することになるため、間接的なものにならざるおえない。例えば、アジアロ糖タンパク質受容体のリサイクリングの効率がコルヒチンにより抑制されることが指摘されている(60、63)。これは、コルヒチンが、1回のアジアロ糖タンパク質の取り込みの効率に影響を与えないのに対し、定常的取り込みは抑えられたことから推察したものである(63)。しかし、この定常的取り込みに対するコルヒチンの阻害は、一旦取り込まれたアジアロ糖タンパク質の再放出(63)、薬剤処理による細胞の受容体数

の変動(61)などが原因となる可能性も存在し、受容体のリサイクリング効率の低下に特定できない。これら問題は、リガンドの取り込み量から受容体のリサイクリング量を間接的に求めるのではなく、エンドサイトーシスされた受容体のリサイクリング量を直接測定することで解決できる。

3-3. トランスフェリンを用いるこの研究の目的と概要

我々は、受容体の復帰の過程を追跡するためトランスフェリンに着目した。トランスフェリンは、分子量80kDの血中タンパク質で受容体媒介エンドサイトーシスにより細胞にFeイオンを供給している(67)。トランスフェリンはエンドソームの酸性化によりFeイオンを解離するが、トランスフェリン自身は受容体と解離せず形質膜へと復帰する(図3)。そこでトランスフェリンを標識し細胞にエンドサイトーシスさせることでトランスフェリン受容体の取り込みから形質膜への復帰までの過程を追跡することができる。トランスフェリンのリサイクリングに関しては、トランスゴルジネットワーク経由とする説(49)とCURLやマルチベジキュラーボディなどのエンドソームから復帰するとしている説(45、46、52)があり、その細胞内経路に関しては、(2-3)で述べたアジアロ糖タンパク質受容体の形質膜への復帰と同様の問題をふくんでいる。

我々は、蛍光および酵素で標識したトランスフェリンを調製し、微小管脱重合剤(ノコダゾール)存在下でのこれらの標識トランスフェリンをヒト上皮由来のFL細胞にエンドサイトーシスさせ、その細胞内挙動を光学および電子顕微鏡下で追跡した。また、ノコダゾール存在下でのトランスフェリンの取り込みとリサイクリングの効率を定量化した。その結果、①トランスフェリンの取り込みの効率、またエンドソーム形成、形態変化に関しては、ノコダゾールは影響しなかった。②トランスフェリンの細胞内経路は、ノコダゾールにより著しく変化し、通常観察される細胞の中心部を経由するリサイクリング経路が完全に阻害された。しかしこの場合でも、③トランスフェリンのリサイクリングの速度と量には影響はなかった。④またノコダゾール処理で生じたリサイクリングの経路でもトランスフェリンの生理機能であるFeイオンの取り込みは観察され、⑤エンドソームに

おけるリガンド間の選別、リガンド-受容体間の選別機能も保持していた。これらの結果から、ノコダゾール処理細胞でもエンドソームの形成から形態変化、Feイオンの取り込み、リガンド間の選別といったエンドソームの機能は影響を受けていないが、リサイクリングの細胞内経路のみ変化し、トランスフェリンは形質膜近くのエンドソームから直接リサイクリングしていると考えられる。この場合、トランスフェリンが、リサイクリングの過程で細胞中心部に位置するトランスゴルジネットワークのような生合成の経路を通過することはないと考えられ、トランスフェリンリサイクリング(受容体のリサイクリング)においてトランスゴルジネットワークを経由することは必須な経路ではないと推察できた。

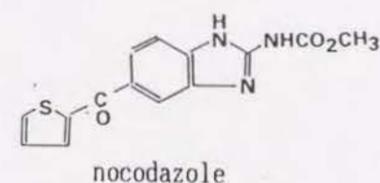
さらにトランスフェリンの形質膜への復帰は速度論的解析から、正常細胞で見られるトランスフェリンをふくむエンドソームの微小管依存的な輸送が、リサイクリングの全時間に比べ速い過程であることが分かった。このことから正常の細胞内で観察される微小管によるエンドソームの輸送と、細胞中心部を経由するリサイクリング経路の意味についても検討する。

材料と方法

1. 細胞と培養

細胞は、ヒト上皮由来のFL細胞を用いた。培養は、5%ウシ胎児血清を含むイーグルMEM培地(Nissui)で1~2日培養し、実験の2時間前に血清中のトランスフェリンを除くため血清不含のMEMに交換した。

微小管の脱重合剤はノコダゾール(Aldrich)を使用した。ノコダゾールは分子量301Dの化学合成された除虫剤の誘導体で、チューブリンに結合し微小管を脱重合する(68)。ノコダゾールはチューブリンと1対1で結合し、その結合定数は、 $6.3 \times 10^{-7} M$ である。



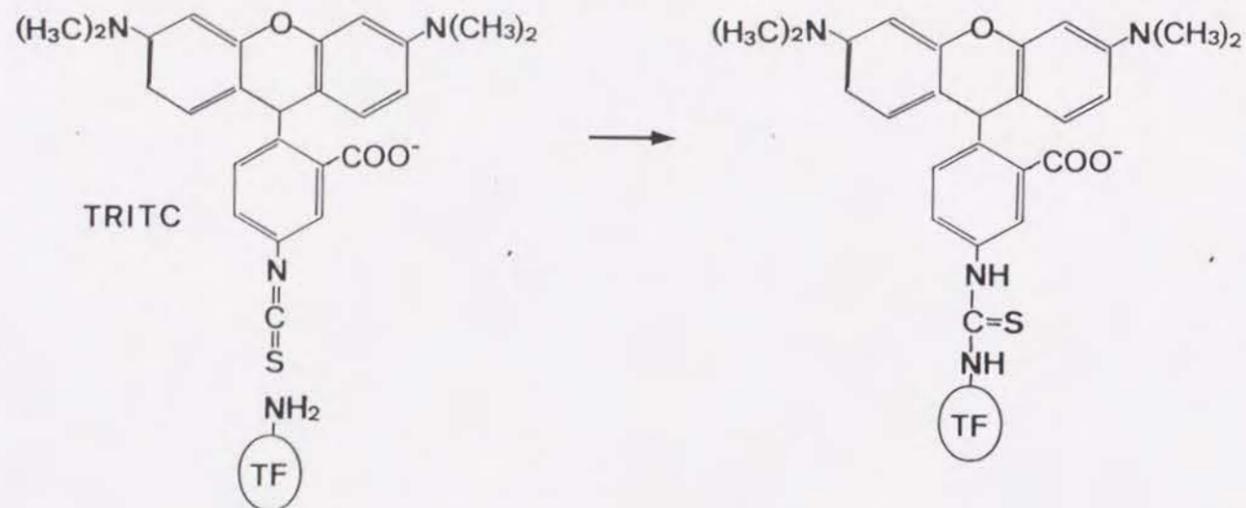
ノコダゾールは、 4 mg/ml でジメチルスルホキシドに溶解し保存溶液とした。ノコダゾールの投与は、実験の2時間前に終濃度 $20 \text{ } \mu\text{g/ml}$ ($60 \text{ } \mu\text{M}$)になるように細胞培養液に加えた。他の薬剤ではコルヒチン(Sigma)、ビンブラスチン(Wako)、タキソール、ルミコルヒチン(Sigma)を使い、各々 $10 \text{ } \mu\text{M}$ 、 $20 \text{ } \mu\text{M}$ 、あるいは $20 \text{ } \mu\text{M}$ の終濃度で実験の2時間前に加えた。コルヒチンは、微小管を脱重合させ、ビンブラスチンは、微小管のパラクリスタル構造を形成させることにより微小管ネットワークを破壊する。ルミコルヒチンは、コルヒチンの誘導体であるが、微小管脱重合作用はない。タキソールは、微小管の安定化の効果がある。

実験は、 5 mM HEPES (pH 7.4)を含むハックス生理塩水(HBSS)を用い、特に記さない場合は実験終了時までノコダゾールを含んでいる。

2. トランスフェリンの蛍光や酵素による標識

エンドサイトーシスしたトランスフェリンの細胞内での挙動を光学顕微鏡下で

追跡する目的でトランスフェリンをテトラメチルローダミンイソチオシアネート (TRITC) (Molecular Probes) で蛍光標識した。下図のように、TRITCは、トランスフェリンのアミノ基と反応する。

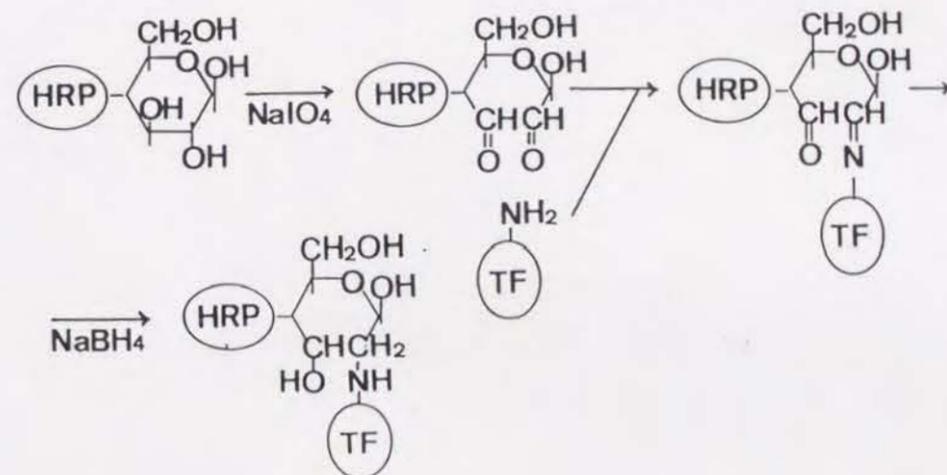


反応の条件と手順は、Ennsらの方法(69)に一部変更を加えた。Ennsらの方法では、トランスフェリン1分子当たり平均3.3分子のTRITCが結合する。我々は、蛍光観察を容易にするためトランスフェリン1分子当りに結合するTRITC量を上げることを目的とし彼らの方法を変更した。変更点は、反応時のTRITC濃度をあげた点と、pHと塩濃度をあげた点(TRITCは、非解離のアミノ基(-NH₂)と反応するため)である。我々の方法ではトランスフェリン1分子当たり平均6.0分子のTRITCが結合した標品を得ることができた。またトランスフェリンの収率もEnnsらの方法と同程度(78%)であるが、未反応のTRITCを除く操作が煩雑になる欠点もある。

我々のおこなった手順を以下に述べる。ヒトトランスフェリン(Green Cross) 10mgを1.5mlの炭酸ナトリウム(2M、pH10)に溶解し、30μlの30mg/mlのテトラメチルローダミンイソチオシアネート(TRITC)(Molecular Probes)のジメチルスルフォキシド溶液を加え室温で1.5時間攪はんし反応させた。さらに30μlの30mg/mlのTRITC溶液を加え室温で1.5時間攪はんした。未反応のTRITCを取り除くため、セファデックスG-25(coarse)(Pharmacia)のカラム(直径1.2cm x 長さ15cm)

でゲル濾過し、さらにセファデックスG-75(superfine)(Pharmacia)のカラム(直径2cm x 長さ75cm)でゲル濾過した後、リン酸緩衝生理液(PBS)中で一晩、透析した。

エンドサイトーシスしたトランスフェリンの細胞内分布を電子顕微鏡的に調べる目的で酵素標識をおこなった。トランスフェリンの西洋わさび過酸化酵素(HRP)による標識は、NakaneとKawaoiの方法によった(70)。この方法では(下図のように)、まずHRPの糖鎖を酸化することでアルデヒド基をつくる。次に、このアルデヒド基とトランスフェリンのアミノ基との間にSchiff塩基をつくり、これを還元しHRPをトランスフェリンに安定に結合させる。



HRP標識反応は次の手順によりおこなった。ジアルデヒドとHRP自身のアミノ基の結合を防ぐため、HRP(Toyobo)5mgを溶解した0.3M重炭酸ナトリウム溶液(pH8.1)1mlに、4%パラホルムアルデヒドを10μl加え、室温で30分間反応させた。次に、HRPの糖鎖を酸化するため0.08Mの過よう素酸ナトリウム0.5mlを加え室温で30分間反応させた。未反応の過よう素酸は、0.08Mのエチレングリコール0.5mlと室温、1時間反応させた後、0.01Mの炭酸ナトリウム(pH9.5)1l中で4℃で一晩、透析して除いた。次にSchiff塩基結合を作るため、このアルデヒド基を持つHRP

溶液とヒトトランスフェリン10mgをふくむ0.01M炭酸ナトリウム溶液(pH9.5)0.5mlを混合し、室温で2時間攪はんした。その後、この混合溶液を氷冷し2.5mgの水素化ほう酸ナトリウムを加え4°Cで2時間攪はんし、Sichff塩基の還元をおこなった。反応溶液は、PBS1l中で4°Cで一晩、透析した後、セファデックスG-75(superfine)のカラム(直径2cm x長さ75cm)でゲル濾過し分画した。各画分の組成をSDSポリアクリルアミドゲル電気泳動法(71)で調べ、主にトランスフェリン1分子当り西洋わさび過酸化酵素1分子結合した反応生成物をふくむ画分を得た。

3. エンドソームの蛍光顕微鏡試料作成

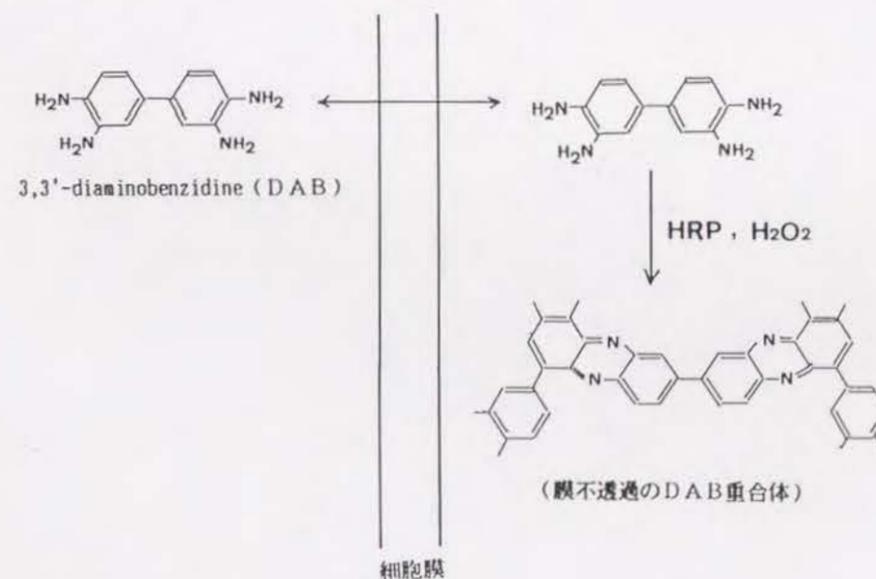
蛍光標識トランスフェリンのエンドサイトーシスは、次の条件でおこなった。カバーガラス上に培養したFL細胞は、蛍光標識トランスフェリンの細胞への非特異的結合を防ぐため、1%卵黄アルブミンを含むHBSS(OVA-HBSS)で37°Cで10分インキュベートした。次に、100μg/mlのTRITC標識トランスフェリンをふくむOVA-HBSSに外液を交換し37°Cで5分間インキュベートしエンドサイトーシスさせた。その後、外液を1mg/mlの非標識トランスフェリンを含むOVA-HBSSに交換し37°Cで各時間(0~25分)インキュベートした。細胞は、氷冷したHBSSで4回洗った後、固定した。固定は、4%パラホルムアルデヒドをふくむPBS中で室温、5分間処理した後、100%メタノールで-20°C、5分間処理によりおこなった。試料の包埋は、グリセロールと10倍濃度のPBSを9:1に混合した包埋剤(PBS-GLOH)を用いた。

4. エンドソームの電子顕微鏡試料作成

HRP標識トランスフェリンのエンドサイトーシスは、次の条件でおこなった。細胞は、35mm培養皿上に培養した。標識トランスフェリンの細胞への非特異的結合を防ぐため、培養皿上の細胞を、1%卵黄アルブミンを含むHBSS(OVA-HBSS)で37°C、10分インキュベートした。100μg/mlのH

RP標識トランスフェリンをふくむOVA-HBSSに外液を交換し、37°Cで5分間インキュベートしエンドサイトーシスさせた。外液を1mg/mlの非標識トランスフェリンを含むOVA-HBSSに交換し7分間インキュベートした。細胞は、氷冷したHBSSで7回洗った後、2.5%グルタルアルデヒドと1mM塩化カルシウムをふくむ0.1Mカコジル酸緩衝液(pH7.2)で前固定した。次にジアミノベンジジン(DAB)によるHRP反応(詳しくは後述する)の後、1%四酸化オスミウムをふくむ0.1Mカコジル酸緩衝液で後固定し、ウラニルアセテートで染色し、エタノールで脱水の後、エポンに包埋した。

HRP反応は、ジアミノベンジジン(DAB)を使った。DABは、単体では細胞膜を透過するが、HRPの酸化反応で電子密度の高い不溶性の重合体をつくる(下図)。このことを利用し、HRP標識トランスフェリンをふくむ膜系を選択的に染色できる。



HRP反応は、次の手順によった。1mg/mlDABをふくむ50mMTRIS緩衝液(pH7.4)で室温10分間前処理しDABを細胞内に浸透させた。次に0.2mg/mlジアミノベンジジンと0.012%過酸化水素をふくむ50mMTRIS緩衝液中で室温で20分間反応させた。

5. トランスフェリンの取り込み定量化

ノコダゾール処理によるトランスフェリンの細胞への取り込みの影響を調べる目的で、HRP標識トランスフェリンを使い以下の手順で取り込みのタイムコースを測定した。FL細胞は35mm培養皿上に培養した。HRP標識トランスフェリンの非特異的吸着を抑えるため、細胞外液をOVA-HBSSに交換し37°Cで10分インキュベートした。次に10 μ g/ml HRP標識トランスフェリンをふくむOVA-HBSSに外液を交換し37°Cで各時間インキュベートした。外液のHRP標識トランスフェリンを除くため細胞を氷冷したHBSSで7回洗い、0.1%ノニデットP-40(NP-40)をふくむHBSS 1ml中で可溶化した。細胞の可溶化液中のHRP活性は、0.4mg/ml o-フェニレンジアミン(OPD)と0.007%過酸化水素をふくむ24.3mMクエン酸-51.4mMリン酸緩衝液(pH 5.0) 3ml中で室温で10分間反応させた。反応は、終濃度1Mの硫酸0.3mlを加え停止させた。OPDの発色は492nmの吸光度を測定した。

6. トランスフェリンの放出のタイムコースとその温度依存性・pH依存性の測定

ノコダゾール処理によるトランスフェリンリサイクリングへの影響を調べる目的でHRP標識トランスフェリンを使いその細胞外放出速度を以下の手順で測定した。FL細胞は35mm培養皿に培養した。HRP標識トランスフェリンの非特異的な吸着を抑えるため細胞を1%OVA-HBSSで4°Cで10分間インキュベートし、その後、外液を50 μ g/mlのHRP標識トランスフェリンをふくむ1%OVA-HBSSに交換しさらに4°Cで20分間インキュベートした。細胞に吸着しなかったHRP標識トランスフェリンを除くため、細胞を氷冷のHBSSで7回洗った後、1%OVA-HBSSで37°C5分インキュベートし、過剰量の非標識トランスフェリンを加えさらに各時間インキュベートした。外液中に放出したHRP活性と細胞に残ったHRP活性をそれぞれ測定し両者の合計

を100%に規格化しタイムコースを出した。放出のタイムコースへの温度の影響、エンドソームの酸性化の阻害剤(NH₄Cl、モネンシン)の影響を見た実験も同様の手順で行った。NH₄Cl、モネンシンは、各々10mM、10 μ Mで使用し実験の10分前から終了時まで外液に加えている。

7. ⁵⁹Feイオン結合トランスフェリン調製と細胞への取り込み

エンドサイトーシスされたトランスフェリンによるFeイオンの細胞への取り込みを測定するため⁵⁹Fe³⁺結合トランスフェリンを以下の手順により調製した。アポトランスフェリン5mgをふくむ0.5mlのPBSと⁵⁹FeCl₃(DuPont) 200 μ Ciをふくむ150mM TRIS緩衝溶液(pH 7.2) 1mlを混合し4°Cで30分反応させ、次に未結合の⁵⁹Fe³⁺はセファデックスG-50(coarse)(Pharmacia)のカラム(直径1cm x 長さ15cm)で除去した。

Feイオンの取り込みの測定は以下の手順でおこなった。100mm培養皿に培養したFL細胞をOVA-HBSSで37°Cで10分間インキュベートした後、外液を15 μ Ciの⁵⁹Fe結合トランスフェリンをふくむOVA-HBSSに交換し60分インキュベートした。外液の過剰の⁵⁹Fe結合トランスフェリンを除去するため細胞を氷冷したHBSSで5回洗った。250mMショ糖と1mMエチレンジアミン四酢酸(EDTA)をふくむ5mM HEPES(pH 7.4)緩衝液中で細胞を培養皿からはがしホモジナイズした。ホモジネートは、Sibilleの方法で各膜画分を遠心分離により分画した(72)。各膜画分の遠心分離の条件は、核(N)画分: 750g、10分、ミトコンドリア(M)画分: 1 \times 10⁴g、10分、軽ミトコンドリア(L)画分: 4 \times 10⁴g、7分、ミクロソーム(P)画分: 1 \times 10⁵g、40分。細胞質(S)画分は、最後の遠心分画上清である。全ての遠心分離操作は、4°Cでおこなった。

⁵⁹Feの細胞質への移行を調べる目的で、細胞質(S)画分のフェリチンの免疫沈降をおこなった。抗体はウサギ抗ヒトフェリチン抗体(Cosmo Bio)を使い、抗体の沈降回収はPansorbin(Hoechst)を使った。Pansorbinは、細胞表面に抗体と特異的に吸着するprotein Aを持つStaphylococcus aureusの死菌体である。実験手順は、Stanlyらの方法によった(73)。まず、Pansorbin中の微粒子を除くた

め2 mlのPansorbinにDET緩衝液(0.3%NP-40、0.1%ドデシル硫酸ナトリウム、0.3%デオキシコール酸ナトリウムと0.15M塩化ナトリウムをふくむ0.01MTRIS緩衝液、pH7.4)2 mlを加え室温で15分静置した後、1200gで1分間、室温で遠心分離し沈澱を回収した(以下の遠心分離操作はすべてこの条件でおこなった)。次に、抗体の菌体への非特異的吸着を防ぐため、沈澱に2 mlの1 mg/mlウシ血清アルブミンをふくむDET緩衝液(BSA-DET)を加え沈澱を分散させた後、遠心分離した。この操作を2回繰り返し最後に1.8 mlのBSA-DET緩衝液中に分散させた。次に、 ^{59}Fe をふくむ細胞質(S)画分中に存在するPansorbinとの非特異的(抗体を介さない)吸着部分を除くため以下の操作を行った。S画分2 mlに20 μl のウサギ血清と1 mlのBSA-DET緩衝液を加え水中で30分静置した。これに前処理したPansorbin0.2 mlを加え水中で15分静置した後、遠心上清を分取した。この遠心上清に前処理したPansorbinを加え同様の操作を繰り返した。得られた上清1.7 mlに55 mg/mlの抗フェリチン抗体を10 μl 加え、水中で60分静置した後、前処理したPansorbin0.1 mlを加えさらに60分静置した。遠心操作により得た沈澱をさらにBSA-DET緩衝液0.5 mlで3回、DET緩衝液0.5 mlで2回遠心により洗浄し沈澱を得、沈澱中にふくまれる ^{59}Fe の放射活性を測定した。

8. $\alpha 2$ -マクログロブリンの蛍光標識と細胞内分布の蛍光観察

リゾーム移行型のリガンドと形質膜復帰型のトランスフェリンは細胞内で選別される。この選別の情報を得るためリゾーム移行型のリガンドである $\alpha 2$ -マクログロブリンのノコダゾール処理細胞での挙動をトランスフェリンと比較した。 $\alpha 2$ -マクログロブリンはTRITCで蛍光標識しトランスフェリン場合と同様に細胞内挙動を追跡した。

$\alpha 2$ -マクログロブリンのTRITC標識は、Pastanらの方法によった(40)。ウシ血清 $\alpha 2$ -マクログロブリン(Boehringer)1.5 mgとTRITC180 μg を0.5M炭酸ナトリウム緩衝液(pH9.5)0.15 ml中で、4°Cで18時間攪はんし反応させた。未反応の蛍光試薬を除くため、PBS中で一夜透析

した後、セファデックスG-50(coarse)(Pharmacia)のカラム(直径1 cm x長さ25 cm)でゲル濾過した。

$\alpha 2$ -マクログロブリンの細胞内分布の蛍光試料は、トランスフェリンの場合と同様の手順で作成した。カバーガラス上の細胞を1%OVA-HBSS中で37°Cで10分間インキュベートし非特異的吸着を抑えた後、外液を100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ TRITC標識 $\alpha 2$ -マクログロブリンをふくむ1%OVA-HBSSに交換し37°Cで5分間エンドサイトーシスさせた。その後1 mg/mlの非標識 $\alpha 2$ -マクログロブリンをふくむOVA-HBSS中で37°Cで各時間チェイスした。試料は、4%パラホルムアルデヒドをふくむPBS中で室温で5分処理し、さらに100%メタノール中で-20°Cで5分処理し固定した後、PBS-GLOHに包埋し観察した。

次に、 $\alpha 2$ -マクログロブリン受容体のリサイクリングを調べるため、TRITC標識 $\alpha 2$ -マクログロブリンを定常的に取り込ませ蛍光の細胞内への蓄積を観察した。細胞は1%OVA-HBSSで37°Cで10分間インキュベートした後、外液を100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ TRITC標識 $\alpha 2$ -マクログロブリンをふくむ1%OVA-HBSSに交換し、37°Cで15~60分インキュベートした。その後の固定と包埋の操作は上記の手順と同様におこなった。

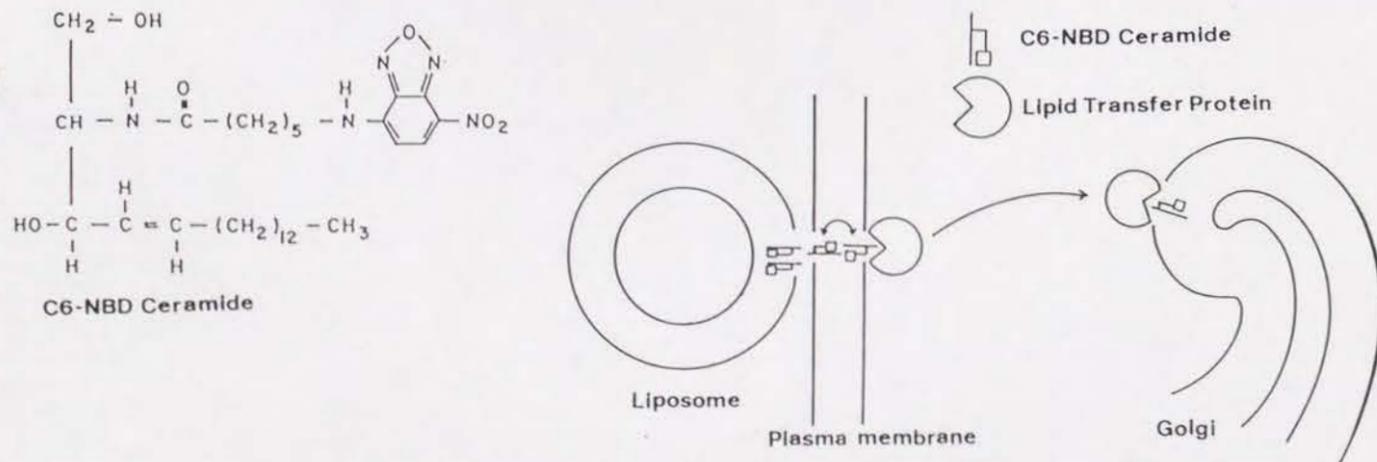
9. 微小管の間接蛍光抗体法による染色

微小管は間接蛍光抗体法により染色した。手順は、OsbornとWeberの方法によった(58)。カバーガラス上に培養した細胞を、0.5%Tween 20をふくむ微小管安定化緩衝液(100 mMPIPES-1 mM塩化マグネシウム-2.5 mM GTP-4%ポリエチレングリコール、pH7.0)に37°C、5分間インキュベートして細胞膜を可溶化した後、安定化緩衝液で2度洗い、100%メタノールで-20°C、5分間で固定した。抗体の非特異的吸着を防ぐためPBSで2倍に希釈したヤギ血清(GS-PBS)で37°C、30分インキュベートした。一次抗体は、ウサギ抗ラットチューブリン抗血清(Advans)をGS-PBSで10倍希釈して使用し、37°C、1時間反応させた。過剰の一次抗体を除くため、試料を室温のPBS中で2分間ゆるやかに攪はんして細胞を洗浄した。この洗浄

を計4回繰り返した後、二次抗体を結合させた。二次抗体はローダミン標識ヤギ抗ウサギIgG抗体(Advans)をGS-PBSで50倍に希釈して使用し、37℃、2時間反応させた。試料を室温のPBSで2分間洗浄した。この洗浄を計4回繰り返した後、蒸留水で1回洗い、PBS-GLOHに包埋した。

10. ゴルジ装置の蛍光染色

微小管に関連する薬剤はゴルジ装置の細胞内分布に影響を与えることが知られている(74)。ノコダゾールやタキソールのゴルジ装置に与える影響を調べるためC6-NBDセラミドによりゴルジ装置を蛍光染色した。PaganoらによるとC6-NBDセラミドを含むリボソームを細胞とインキュベーションすると、C6-NBDセラミドは、始めリボソームから形質膜へ移行し、時間とともにゴルジ装置に蓄積する(75)。このC6-NBDセラミドの移行と蓄積の機構は、今のところはっきりしていない。Paganoは、リボソームから形質膜の脂質2重層の外葉に移行したC6-NBDセラミドは、セラミドの脂肪鎖の一本が短いことにより容易にflip-flopするため脂質2重層の内葉に移動し、ここで脂質移行タンパク質(lipid transfer protein)と結合し、細胞質中をゴルジに輸送される(下図)、としている(76)。



ゴルジ装置の染色は、C6-NBDセラミドを使いvan Meerらの方法によりおこ

なった(77)。カバーグラス上に培養した細胞を、20%のC6-NBDセラミド(Molecular Probes)をふくむ1mM卵黄フォスファチジルコリンのリボソーム溶液中で20℃、30分インキュベートする。形質膜に残存するC6-NBDセラミドを除くため、氷冷したHBSSで細胞を2回洗った後、ウシ血清アルブミン2mg/mlを含むHBSSで4℃、30分インキュベートした。氷冷HBSSで細胞を2回洗った後、未固定の状態では蛍光顕微鏡で観察した。

結果

1. ノコダゾール処理細胞でのトランスフェリンのリサイクリング

1-1. トランスフェリンの取り込みとノコダゾールの影響

トランスフェリンのFL細胞への取り込みの過程に与えるノコダゾールの影響を調べた。細胞外液にHRP標識トランスフェリンを加え、37°Cで定常的にヒト上皮由来の培養細胞のFL細胞に与え各時間での取り込み量を測定した。図9に見られるように、ノコダゾール処理していない正常のFL細胞のHRP標識トランスフェリンの取り込みは、約20分まで直線的に増加し、その後、60分程度で定常状態に達した(図9の○)。HRP標識トランスフェリンの取り込みがトランスフェリン受容体による特異的取り込みであることを確かめるため、HRP標識トランスフェリンのかわりに同じ活性量のHRPを外液に加えてその取り込みをみた。この場合HRP活性の細胞への取り込みは観察されなかった(図9の△)。

次にトランスフェリンの取り込みの微小管依存性を調べるため、微小管脱重合剤であるノコダゾールで処理した細胞で同様のタイムコースをとった。ノコダゾールは、20 µg/mlで使用し実験の2時間前から実験終了時まで外液に加えている。ノコダゾールで処理した細胞のHRP標識トランスフェリンの取り込みは、正常のFL細胞とほぼ同様のタイムコースをとり、20分まで直線的に増加し、その後定常状態に達した(図9の●)。ノコダゾール処理細胞では、取り込みの初速度、定常状態(60分以降)での量ともにコントロールと比べ若干低い値をとり、初速度はコントロール細胞の88%、定常状態(60~120分)での取り込み量は91%とともに10%程度の減少を示している。

定常状態(60~120分)での細胞に取り込んだHRP標識トランスフェリンの活性量は、コントロール細胞で0.162、ノコダゾール処理細胞で0.148 Abs·min⁻¹·mg⁻¹であった。この量から一細胞当たり取り込んだHRP標識トランスフェリンの分子数を計算すると、コントロールの細胞で5.6 × 10⁴、ノコダゾール処理細胞で5.1 × 10⁴分子であった。

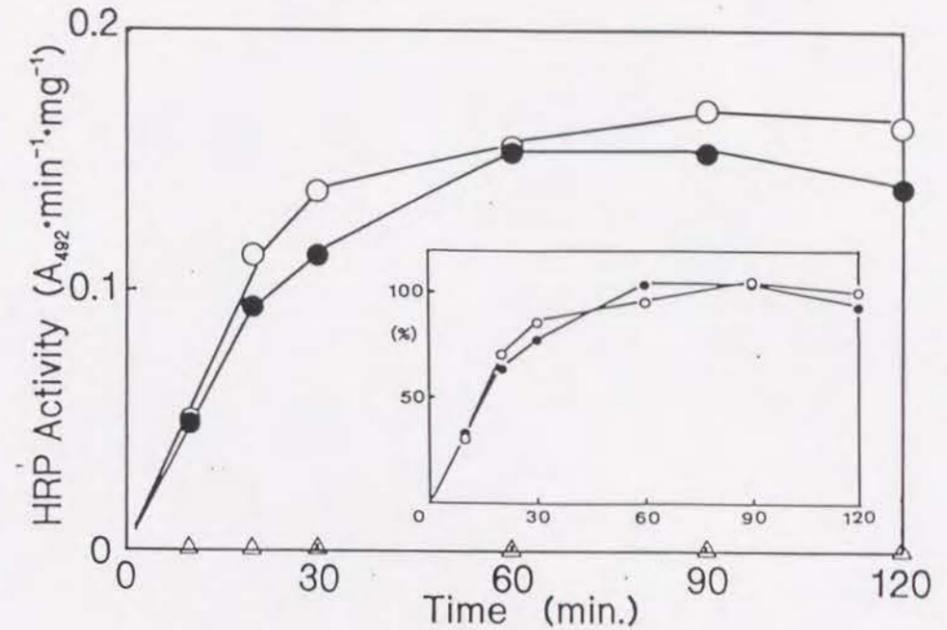


図9. HRP標識トランスフェリンの定常的取り込み

トランスフェリンの取り込みに対するノコダゾールの影響を調べるため、細胞外液にHRP標識トランスフェリンを加え37°Cでの定常的取り込み量を測定した。縦軸：細胞が取り込んだHRP活性。HRP活性は、OPDの発色で得られた相対量を細胞タンパク質1mg当りの活性量に換算した値を示している。横軸：HRP標識トランスフェリンを細胞に与えた時間。

正常のFL細胞(○)では、20分まで取り込みは直線的におきるが、それ以降30~60分で定常状態となる。ノコダゾール処理したFL細胞(●)では20分程度直線的に取り込み量は増え、60分で取り込みは定常状態に達する。取り込みの初速度、定常状態での量(60~120分の平均)ともにノコダゾール細胞ではコントロールの90%程度に減少した。△では、HRP標識トランスフェリンの代わりに同じ活性のHRPを加えた。この場合、取り込みは観察されず、HRP標識トランスフェリンの取り込み量は、トランスフェリン依存的なものに見なせる。

(次ページへ)

(図9 legend続き)

insetは、各細胞の定常状態での取り込み量(コントロール細胞: 0.162 、ノコダゾール処理細胞: $0.148 \text{ Abs}_{492} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$)を100%とし、細胞のトランスフェリン受容体のHRP標識トランスフェリンによる占有の割合のタイムコースを示している。この場合、コントロール細胞とノコダゾール処理細胞ともに同様のタイムコースを示した。ノコダゾール処理細胞においては、全トランスフェリン受容体数が10%程度減少していると考えられるが、存在する受容体によるトランスフェリンの取り込み効率はノコダゾール処理の影響を受けないと考えられる(詳しくは、本文の〔考察〕で述べる)。

次に、コントロール細胞、ノコダゾール処理細胞ともに定常状態の取り込み量を100%として、HRP標識トランスフェリンによる各細胞の受容体の占有率のタイムコースをとった(図9 inset)。この受容体占有率のタイムコースは、コントロール、ノコダゾール処理細胞の両者でほぼ同様のタイムコースであった。

以上の結果からノコダゾールが、トランスフェリンの細胞への取り込み速度や量に与える影響は10%程度であることがわかった。次にエンドサイトーシスされたトランスフェリンの細胞内過程に対するノコダゾールの影響を調べた。

1-2. 蛍光標識トランスフェリンの細胞内分布

ローダミン(TRITC)標識トランスフェリンの細胞内挙動を経時的に追跡し、その経時変化へのノコダゾールの影響を調べた。FL細胞に、ローダミン標識トランスフェリンを 37°C で5分間あたえ、その後、過剰量の非標識トランスフェリンを含む外液で 37°C で7分間、25分間インキュベーションし、各時間の蛍光の分布を正常のFL細胞とノコダゾール処理したFL細胞で比較した。その結果を図10に示す。正常のFL細胞では、5分間ローダミン標識トランスフェリンを与えた直後の蛍光分布は、顆粒状の蛍光が細胞一面に分布した(図10 a)。ローダミン標識トランスフェリンを 37°C で5分間与え、続いて非標識トランスフェリンで7分間チェイスした細胞では、蛍光顆粒は核近傍の領域に集合し、蛍光のクラスターが観察されるようになり、細胞一面へ分布するものは少なくなった(図10 b)。非標識トランスフェリンで25分間チェイスした細胞では、蛍光は、ほとんど細胞内に観察されなくなった(図10 c)。

次に、トランスフェリンをふくむエンドソームの核近傍への集合と微小管の関連を調べるため、 $20 \mu\text{g}/\text{ml}$ のノコダゾールで処理したFL細胞で同様のタイムコースを追った(図10 d、e、f)。ローダミン標識トランスフェリンを5分間与えたノコダゾール処理FL細胞では、顆粒状の蛍光が観察された(図10 d)。これらの蛍光顆粒は、細胞の境界領域に集中しており、細胞の辺縁部が強く光るパターンを示した。その後7分間、非標識トランスフェリンでチェイスした細胞でも蛍光顆粒が細胞の縁に分布したままで、同じ時間のコントロールの

細胞にみられたような蛍光のクラスターは形成しなかった(図10e)。25分間チェイスした細胞では、蛍光は細胞内にほとんど観察されなくなった(図10f)。ローダミン標識トランスフェリンの取り込みがトランスフェリン受容体に特異的な取り込みであることを調べるため、外液に過剰量の非標識トランスフェリンをローダミン標識トランスフェリンと同時に加えておくと、蛍光顆粒は観察されなかった。

ノコダゾール以外の微小管破壊剤であるコルヒチンとビンブラスチン処理でもノコダゾールと同様に蛍光のクラスター形成はみられなかった。一方、微小管を脱重合しないルミコルヒチンや、微小管の重合促進効果のあるタキソール処理では、コントロールと同様に、10~15分で核近傍に蛍光のクラスター形成がみられた。また全ての薬剤において約30分で細胞内の蛍光は消失した。これら薬剤とトランスフェリンの分布の傾向は図11にまとめた。

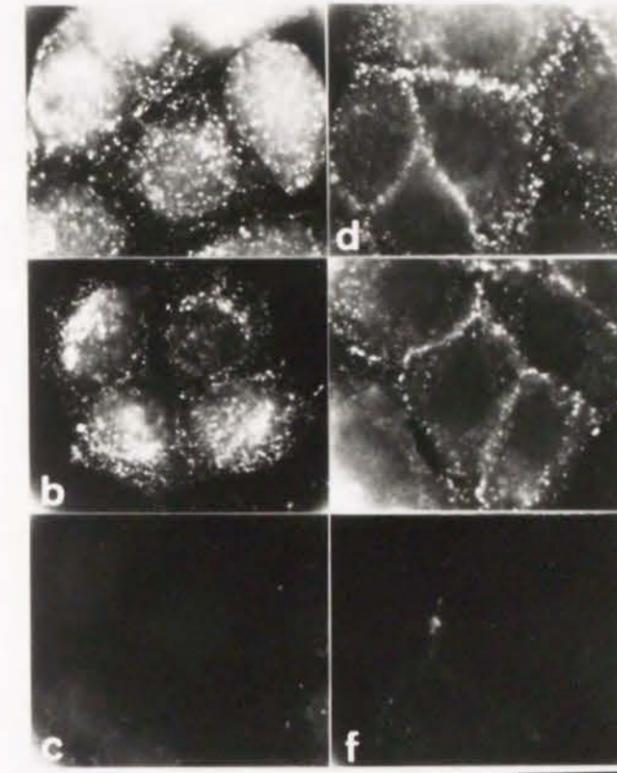


図10. ローダミン標識トランスフェリンの細胞内分布

FL細胞にローダミン標識トランスフェリン(100 $\mu\text{g}/\text{ml}$)を5分間与え(a、d)、その後、非標識トランスフェリンで7分間(b、e)、25分(c、f)チェイスした。a、b、cはコントロールのFL細胞。d、e、fはノコダゾール(20 $\mu\text{g}/\text{ml}$)で処理したFL細胞。a: コントロール細胞の5分のローダミン標識トランスフェリンの蛍光は、顆粒状に細胞一面に分布する。b: 12分(5分パルス+7分チェイス)では、顆粒状の蛍光は、核付近に集まり蛍光クラスターを形成する。c: 30分(5分パルス+25分チェイス)になると細胞内から蛍光は消失する。d: ノコダゾール処理細胞の5分では、蛍光顆粒が細胞境界部分に分布する。e: 12分でも5分の分布パターンは変わらないが、蛍光の強度は弱くなる。f: 30分では細胞内の蛍光は消失した。

bar = 20 μm

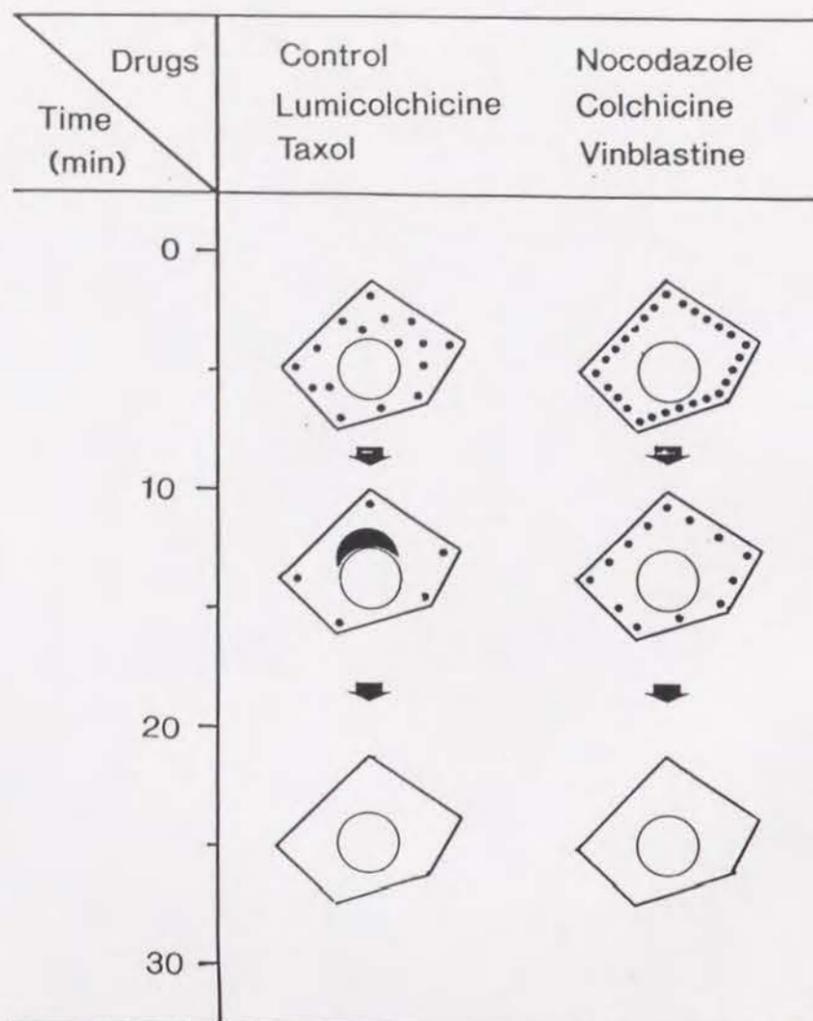


図11. トランスフェリンの集合におよぼす各種の微小管関連の薬剤の効果

微小管に効果のある薬剤のFL細胞にエンドサイトーシスされたトランスフェリンの核近傍の集合に対する影響を調べ、その結果を模式的にまとめた。各薬剤の効果は、ノコダゾール、コルヒチンは、微小管を脱重合させる。ビンブラスチンは、微小管のパラクリスタル構造を作り、本来のネットワークを破壊する。ルミコルヒチンは、コルヒチンの誘導体だが微小管を脱重合させない。タキソールは、微小管の重合を促進する。

ノコダゾール、コルヒチン、ビンブラスチンの微小管ネットワークを破壊する薬剤はすべてトランスフェリンの集合を抑えた。一方、タキソールやルミコルヒチンなどの微小管ネットワークを破壊しない薬剤ではトランスフェリンの集合はコントロール同様観察された。

1-3. HRP標識トランスフェリンをふくむエンドソームの形態と細胞内分布 (電子顕微鏡観察)

トランスフェリンを含むエンドソームの形成と形態、分布に与えるノコダゾールの影響を調べる目的で、HRP標識トランスフェリンを使いエンドソームの電子顕微鏡観察をおこなった。細胞外液に、HRP標識トランスフェリン加え、37°Cで5分間インキュベートした後、過剰量の非標識トランスフェリンで7分間チェイスした。細胞は、前固定後、DABを使ったHRP反応を行い、HRP標識トランスフェリンをふくむ膜系を特異的に染色した。

まず形質膜近くのエンドソームの形態と分布を、コントロールの細胞とノコダゾール処理細胞で比較した(図12)。コントロールの細胞の形質膜直下では、DABにより染色される膜系は、直径100~200nmの球状小胞、幅50~100nm、長さ100~200nmの管状の小胞であった(図12a)。形質膜からやや深い(1μm程度)細胞質には、直径500nm程度の小胞がDABにより染色された。これらの直径の大きな小胞の中には、さらにその内部に直径50nm~100nmの小胞をふくむマルチベジクルタイプの小胞(マルチベジキュラーボディー: MVB)が観察された。また外膜の一部が管状になっている小胞(チュープロベジキュラーエンドソーム: TVE)も観察された(図12a)。

ノコダゾールで処理した細胞でも、直径100~200nmの球状、管状小胞、直径約500nm球形の小胞、管状構造を持つMVBが観察された(図12b)。エンドソームの分布については、500nm程度の小胞が形質膜直下にみられることもあった(図12b)。またしばしば隣接する細胞との境界の形質膜直下に球形エンドソームが並んでいるのが観察された。これらの大半(約90%)は直径100nm~200nmの球形の小胞であった(図12c)。

蛍光標識したトランスフェリンの分布からコントロールの細胞では核付近にトランスフェリンの集合が観察された。この集合の起きる領域とその場所でのエンドソームの形態を調べるため、電子顕微鏡観察による核付近のエンドソームの分布と形態を比較した。コントロール細胞の核付近ではゴルジ域にDAB陽性のエンドソームが観察された。これらのエンドソームの形態は、500nm程度のMVBや、100nm程度の球形小胞であった。また、管状やダンベル型の小胞が、

微小管に密着しているのが観察された(図13a)。ノコダゾール処理細胞では、核付近にはDAB陽性の膜系はほとんど観察されなかった。ノコダゾール処理細胞では、ゴルジ装置がちぎれ分散していた。この分散したゴルジ装置の近くに50nm程度のDAB陽性の小胞が分布した(図13b)。

1-4. ノコダゾール処理細胞におけるゴルジ装置と微小管

エンドソームの電子顕微鏡観察から、コントロールの細胞では、ゴルジ装置は、核付近の領域に観察されるのに対し、ノコダゾールで処理した細胞では、ゴルジ装置は、層板構造をある程度保ったままちぎれ、細胞質に分散しているのが観察され、この分散したゴルジの近くにトランスフェリンをふくむエンドソームが観察された。そこで、このゴルジ装置の分散とトランスフェリンの集合の関係を調べるため、ゴルジ装置の蛍光染色を行った。C6-NBDセラミドによりゴルジ装置を染色すると、コントロールでは、ゴルジ装置は核近傍に1個観察される(図14a)のに対し、ノコダゾール処理した細胞では、分散したゴルジ装置が細胞質一面に分布していた(図14b)。ノコダゾール処理の蛍光標識トランスフェリンの分布は、細胞辺縁部に強くゴルジ装置の分散のパターンとは異なった。

ところでチューブリンの重合安定効果のあるタキソールもゴルジ装置を分散させた(図14c)。タキソールによるゴルジ装置の分散の程度は、ノコダゾールより低く、数個の塊で細胞内に分散した。

次に、蛍光抗体法により微小管を染色するとコントロール細胞では、微小管は、核付近から放射状に伸びている(図15a)。ノコダゾール処理では微小管は完全に破壊されている(図15b)。タキソール処理では微小管は放射状のパターンを保っていた(図15c)。

タキソール処理では、ゴルジ装置は分散するが、トランスフェリンの核近傍への集合は観察され、トランスフェリンの核近傍への集合は、ゴルジ装置の分散に依存するのではなく、放射状の微小管ネットワークに依存していることが分かる。

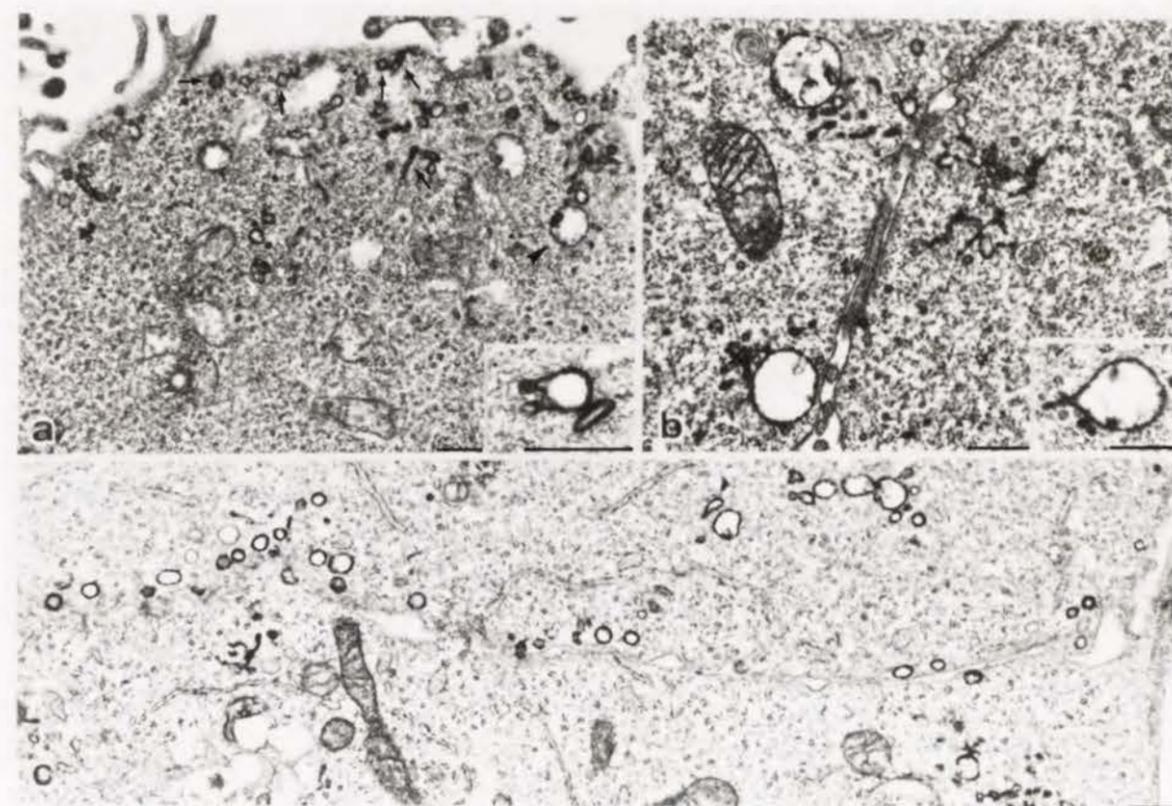


図12. 形質膜付近のエンドソームの形態と分布

HRP標識トランスフェリン(100μg/ml)を5分パルスで細胞に与え7分チェイスした。HRP標識トランスフェリンをふくむ膜系は、DABにより黒く染色される。

コントロール細胞(a)では、形質膜直下のエンドソームは、100nm程度の球上、管状ベジクル(arrow)である。形質膜からやや離れたところには、500nm程度のマルチベジキュラーボディー(arrowhead)や、管状構造を持つベジクル(チュープロベジキュラーエンドソーム)が観察される(aのinset)。ノコダゾール処理細胞(b)では、形質膜付近のエンドソームの形態は、コントロールと同様、球状、管状のベジクル、マルチベジキュラーボディー、チュープロベジキュラーエンドソームが観察された(b、bのinset)。ノコダゾール処理細胞では、bで見られるように500nm程度のマルチベジキュラーボディーが形質膜直下に存在することも多くみられた。また、cで見られるように直径100~200nmの球形のエンドソームが形質膜直下に並んでいるのも観察された。

bar = 0.5 μm

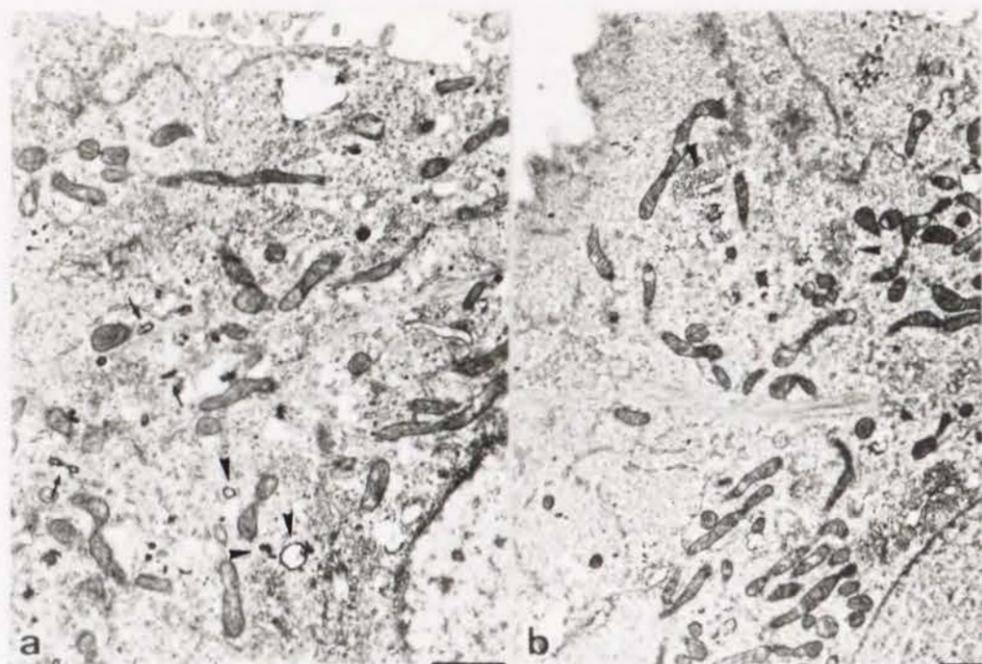


図13. 核付近のエンドソームの形態と分布

コントロール細胞 (a) では、ゴルジ域の 500 nm のマルチベジキュラーボディ (arrowhead) や、100 nm 程度の球形ベジクル (arrowhead) が、DAB で染色された。また管状、ダンベル状のベジクル (arrow) が、微小管に密着しているのが観察できる。ノコダゾール処理細胞 (b) では、核付近には、DAB 陽性の膜構造は観察されない。分散したゴルジ装置 (arrowhead) が細胞質に観察されその周辺に 50 nm 程度のトランスフェリンを含むベジクルが観察される。

bar = 1 μ m

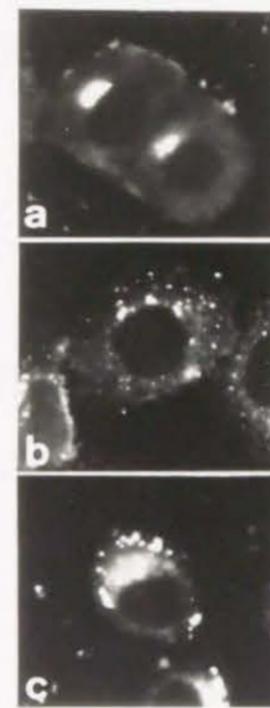


図14. ノコダゾールとタキソールによるゴルジ装置の分散

C6-NBDセラミドによるゴルジ装置の蛍光染色像を示す。コントロール細胞 (a) のゴルジ装置は、細胞に1個、核の近くに存在した。ノコダゾール処理細胞 (b) では、ゴルジ装置は、核のそばに比較的大きな構造が、細胞質中に小さな構造が点状に分散した。タキソール処理細胞 (c) でもゴルジ装置は分散するが、分散の程度は、ノコダゾールより少なく、比較的大きな点状に分布した。

bar = 20 μ m

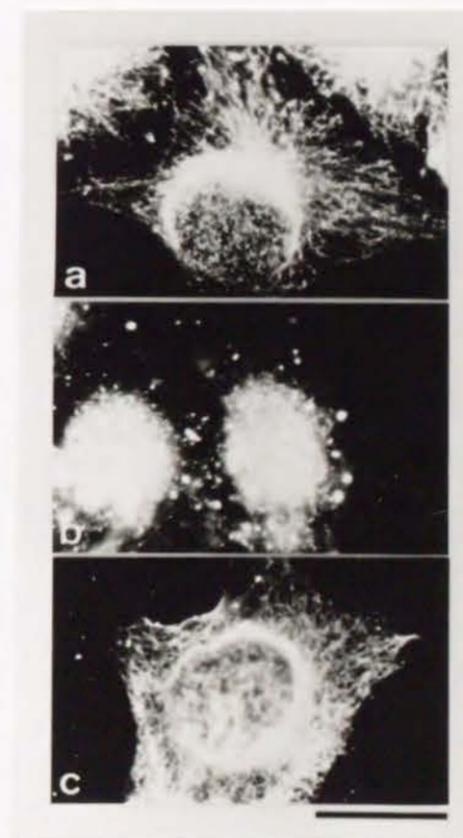


図15. 微小管ネットワークとノコダゾール、タキソールの効果

間接蛍光抗体法により微小管を染めると、コントロール細胞 (a) では、核付近から放射状に伸びるネットワークが観察される。ノコダゾール処理細胞 (b) では微小管ネットワークは完全に破壊されることが分かる。タキソール処理細胞 (c) では、放射状ネットワークは影響を受けない。

bar = 20 μ m

2. トランスフェリンによるFeイオンの取り込みとトランスフェリンと α 2-マクログロブリンとの選別に対するノコダゾールの影響

トランスフェリンはエンドサイトーシスにより細胞内に取り込まれた後、エンドソームの酸性化によりFeイオンを遊離する。その後Feイオンは細胞質へ移行する(78, 72)。また、トランスフェリンはリソゾーム移行型のリガンドと同一の被覆ピットから取り込まれ細胞内で膜分裂により選別される(79, 80)。(2-1)ではノコダゾール処理によるFeイオンの取り込みに対する影響を調べた結果を、(2-2)では、リソゾーム移行型リガンドの α 2-マクログロブリンとのトランスフェリンの選別について調べた結果を述べる。

2-1. Feイオン取り込み

ノコダゾール処理細胞におけるトランスフェリンのエンドサイトーシスが生理的に正常であるかどうかを調べるため、トランスフェリンによるFeイオンの細胞への取り込みを測定した。 $^{59}\text{Fe}^{3+}$ を結合したトランスフェリンをコントロールとノコダゾール処理した細胞に37°Cで、60分間あたえ、細胞をホモジナイズ後、細胞の膜系を遠心分画しそれぞれの画分への $^{59}\text{Fe}^{3+}$ の分布を調べた(図16)。 10^7 細胞当たり取り込んだ ^{59}Fe の量は、コントロール細胞で 0.82×10^5 c.p.m、ノコダゾール処理細胞で 1.12×10^5 c.p.mだった。トランスフェリンにより取り込まれたFeイオンは、主にミトコンドリアを含む画分(M、L)と細胞質画分(S)に分布することがラット肝実質細胞で報告されている(72)。図16に見られるように、FL細胞においてもコントロールの細胞(図16の□)で、取り込まれた $^{59}\text{Fe}^{3+}$ は、M画分に29.9%、L画分に16.5%、S画分に31.2%存在し、全 $^{59}\text{Fe}^{3+}$ の77.6%がM、L、Sの3画分に分布した。ノコダゾールで処理した細胞での $^{59}\text{Fe}^{3+}$ の分布(図16の■)は、M画分に32.9%、L画分に20.4%、S画分に24.4%で、これら3画分に77.7%が存在した。このようにノコダゾール処理した細胞のFeイオンの分布は、コントロールとほぼ同様のパターンを示した。

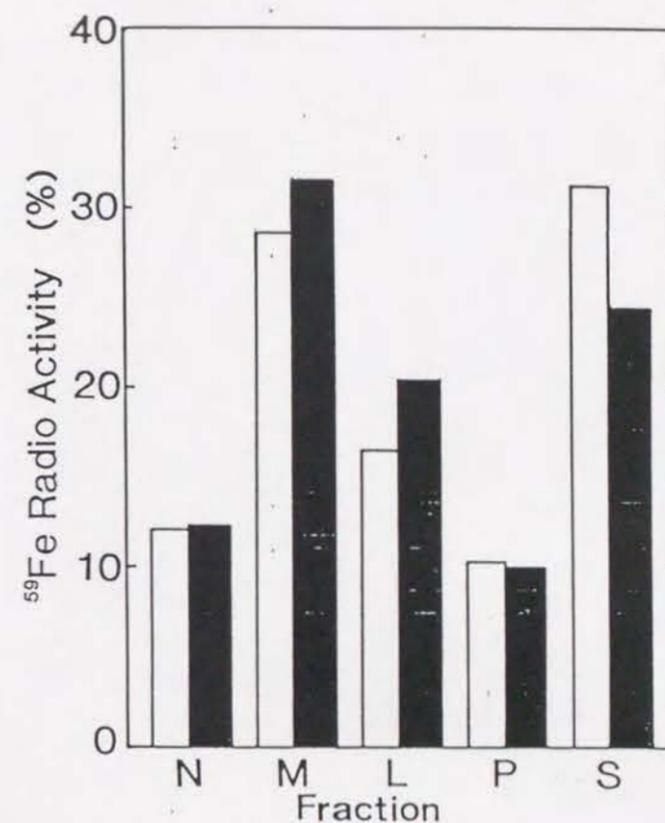


図16. トランスフェリンにより取り込まれた ^{59}Fe の分布

^{59}Fe 結合トランスフェリン $15 \mu\text{Ci}$ を37°Cで1時間細胞に与えた後、遠心分画により各膜画分(N、M、L、P)と細胞質画分(S)を得た。コントロール細胞(□)、ノコダゾール処理細胞(■)。

縦軸: 各細胞(10^7 当り)の取り込んだ全 ^{59}Fe 量(コントロール細胞: 0.82×10^5 c.p.m、ノコダゾール処理細胞: 1.12×10^5 c.p.m)を100%とし、各分画に存在する ^{59}Fe の割合(%)を示している。

細胞質のFeイオンは、フェリチンに結合していることが知られている(78、72)。つぎに細胞質(S)画分をフェリチン抗体で免疫沈降をおこない、トランスフェリンにより取り込まれた ^{59}Fe の細胞質フェリチンとの結合量を測定した。コントロール細胞では、S画分にふくまれる $^{59}\text{Fe}^{3+}$ $2.55 \times 10^4 \text{ cpm}$ のうち48%が、フェリチン抗体により沈降した。ノコダゾール処理細胞では、S画分の 2.74×10^4 のうち43%の $^{59}\text{Fe}^{3+}$ がフェリチン抗体で沈降した(表4)。

表4. 細胞質画分の抗フェリチン抗体による免疫沈降

	コントロール	ノコダゾール
immunoprecipitate	48%	43%
supernatant	52%	57%
total	100%	100%
(cpm/ 10^7 cells)	(2.55×10^4)	(2.74×10^4)

2-2. 蛍光標識 $\alpha 2$ -マクログロブリンの細胞内分布(トランスフェリンと $\alpha 2$ -マクログロブリンの選別、 $\alpha 2$ -マクログロブリンとその受容体の選別)

受容体媒介エンドサイトーシスでは、目的地の異なる複数のリガンドが同一の被覆ピットから取り込まれ、その後細胞内で選別される(21、79、80)。ノコダゾール処理細胞内で、リソゾーム移行型のリガンドである $\alpha 2$ -マクログロブリンと形質膜復帰型のトランスフェリンの選別が起きていれば、両者の細胞内挙動が異なるはずである。そこで $\alpha 2$ -マクログロブリンを蛍光標識しその細胞内分布をトランスフェリンと比較した。ローダミン(TRITC)標識した $\alpha 2$ -マクログロブリンをコントロールの細胞にエンドサイトーシスさせると、5分で細胞質に分散していた蛍光顆粒は、10分で核近くに集まる(図17a、c)。その後蛍光は消失したが、リソゾーム酵素の阻害剤により、この消失は阻害されることから、 $\alpha 2$ -マクログロブリンのリソゾーム酵素による加水分解の結果であると考えられる。ノコダゾール処理細胞では、 $\alpha 2$ -マクログロブリンはエンドサイトーシス後細胞質に顆粒状に分布したままで核付近に集まらず、1時間近く蛍光の消失も観察されなかった(図17e、g、i)。

正常の細胞では $\alpha 2$ -マクログロブリンの受容体も細胞内で $\alpha 2$ -マクログロブリンと選別され形質膜へとリサイクリングする(29)。ノコダゾール処理細胞で $\alpha 2$ -マクログロブリン受容体のリサイクリングしているなら、外液に定常的にローダミン標識 $\alpha 2$ -マクログロブリンを加えておけば、細胞にはローダミン標識 $\alpha 2$ -マクログロブリンの取り込みも定常的に起き、細胞に蛍光が蓄積するはずである。そこで、外液に $100 \mu\text{g/ml}$ のローダミン標識 $\alpha 2$ -マクログロブリンを加えて 37°C でのノコダゾール処理細胞への定常的取り込みを見た。その結果、ノコダゾール処理細胞内には時間とともに蛍光が蓄積していった(図18)。シクロヘキシミドにより新生の受容体合成を阻害した細胞でも同様の蛍光の蓄積が観察された。

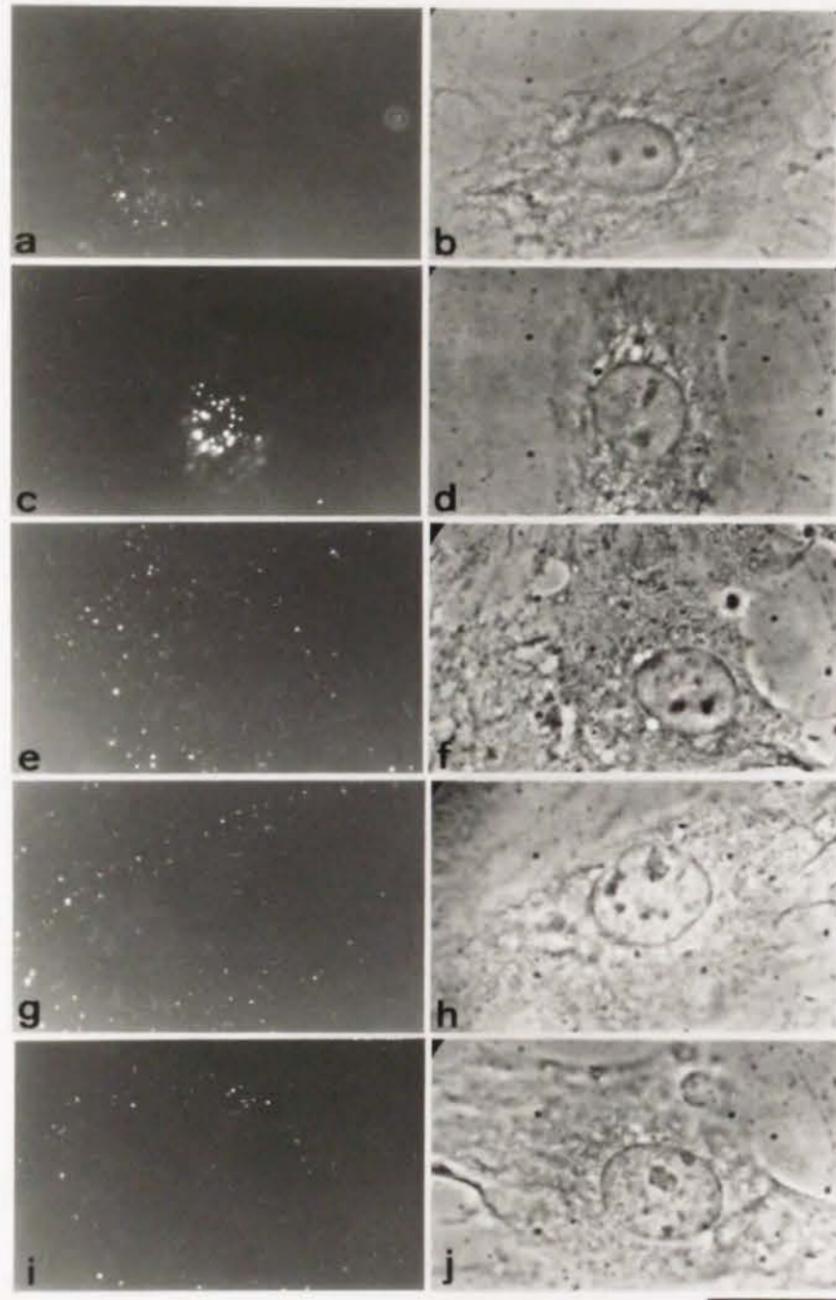


図17. ローダミン標識 $\alpha 2$ -マクログロブリンの細胞内分布

リソゾーム移行型のリガンド $\alpha 2$ -マクログロブリンのノコダゾール処理細胞での細胞内移行を調べた。細胞にローダミン標識 $\alpha 2$ -マクログロブリン ($100 \mu\text{g}/\text{ml}$) を与えその後の細胞内分布を見た。左側 (a、c、e、g、i) は蛍光像、右側 (b、d、f、h、j) は同じ焦点深度での位相差像。コントロールの細胞では、5分の蛍光パターンは細胞質に顆粒状に分布している (a)。10分で蛍光は、核付近に集まってくる (c)。ノコダゾール処理細胞では、10分で蛍光顆粒は、周辺部に分布し (e)、その後、蛍光の集合や消失は観察されず、このパターンは20分 (g)、50分 (i) でも変わらない。bar = $20 \mu\text{m}$

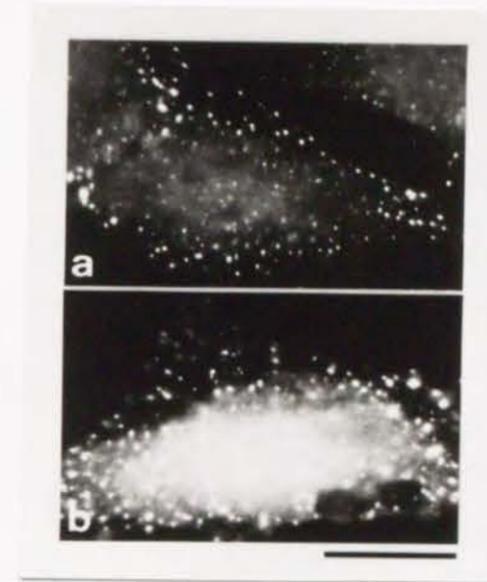


図18. ノコダゾール処理細胞へのローダミン標識 $\alpha 2$ -マクログロブリンの定常的な取り込み

ノコダゾール処理細胞における $\alpha 2$ -マクログロブリン受容体のリサイクリングを調べる目的で、 $\alpha 2$ -マクログロブリンの定常的な取り込みを調べた。ノコダゾール処理細胞の外液にローダミン標識 $\alpha 2$ -マクログロブリン ($100 \mu\text{g}/\text{ml}$) を加え 37°C で15分 (a)、60分 (b) インキュベーションした。インキュベーション時間が延びるとともに細胞内に蓄積する蛍光顆粒の量は増える。

bar = $20 \mu\text{m}$

3. トランスフェリンリサイクリングのタイムコース

蛍光標識トランスフェリンの蛍光観察から、トランスフェリンの細胞内挙動が大きく変化した。しかし、エンドサイトーシスから30分後は、正常の細胞とノコダゾール処理細胞の両方で蛍光は消失した。これは、ノコダゾール処理細胞でもトランスフェリンがリサイクリングしていることを示唆する。〔3-1〕では、HRP標識トランスフェリンを使い、ノコダゾール処理細胞でトランスフェリンリサイクリングの定量化を試みた。

また、膜小胞輸送は（エンドサイトーシス、生合成の経路の両方で）、低温や細胞内膜器官の酸性化の阻害剤により輸送効率が著しく阻害される場合が報告されている（1、18、53）。〔3-2〕、〔3-3〕では、ノコダゾール処理細胞と正常の細胞でのトランスフェリンリサイクリングを低温への感受性、酸性化阻害剤への感受性の2点から比較することを試みた。

3-1. HRP標識トランスフェリンの細胞外放出

トランスフェリンのリサイクリング時間におよぼすノコダゾールの影響を調べるため、HRP標識トランスフェリンを使いその細胞外放出を定量的に追った。細胞外液にHRP標識トランスフェリンを加え4℃で20分間インキュベートした後、37℃に昇温してエンドサイトーシスを開始させ、その後の細胞のHRP活性と、外液に放出したHRP活性を測定した。図19に見られるように正常のFL細胞での放出は、ほぼ一相性のタイムコースをとり、12分で50%、30分で80%のHRP標識トランスフェリンが細胞外へ放出された（図19上図）。

ノコダゾールで処理したFL細胞で、同様のタイムコースを測定した。放出のタイムコースは、コントロールの細胞とほぼ同様の結果が得られ、ハーフタイムは12分で、30分で80%以上の活性が外液に放出された（図19下図）。

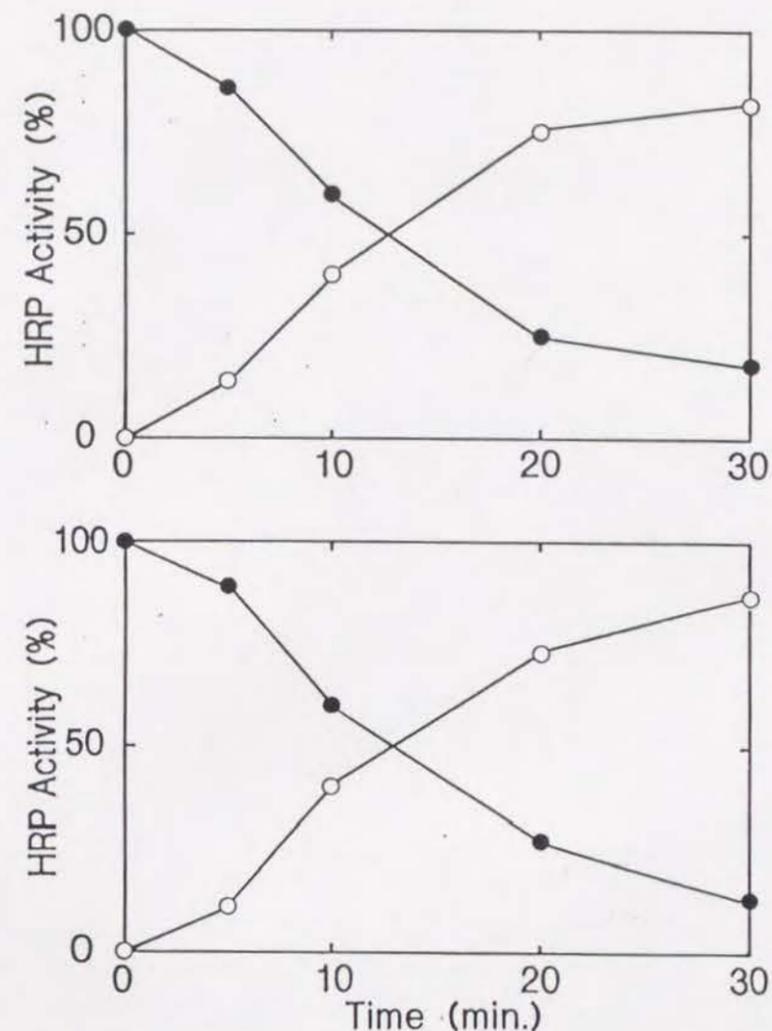


図19. HRP標識トランスフェリンの放出

細胞表面の受容体に4℃でHRP標識トランスフェリンを結合させ37℃に昇温しエンドサイトーシスを開始させ、それ以降各時間でのトランスフェリンの細胞外放出を測定した。縦軸：HRP標識トランスフェリンの相対量。各時間の外液のHRP活性（○）と細胞のHRP活性（●）の合計を100%として各々の値を換算している。横軸：37℃に昇温後の時間。

上図：コントロール、下図：ノコダゾール細胞。

HRP標識トランスフェリンの放出は、コントロール、ノコダゾール細胞の両方でほぼ同様のタイムコースを示し、ハーフタイム12分であった。

3-2. HRP 標識トランスフェリンの放出の温度依存性

次に、実験温度を 1.5 ~ 37 °C で変化させ HRP 標識トランスフェリンの放出の温度依存性をとった (図 20)。15 °C ~ 37 °C の範囲の各温度での放出は、正常の細胞とノコダゾール処理細胞で同様のタイムコースを示した。図 20 から算出した各温度での速度定数は表 5 にまとめた。コントロール、ノコダゾール処理細胞の両方でトランスフェリンの放出の速度定数は、25 °C より低い温度で急激に増加するという特徴が観察された。

トランスフェリンの放出の律速段階の活性化エネルギーを求めるため、各温度での放出の速度定数 (k) の対数と絶対温度 (T) の逆数に対しプロットした (図 21)。次の Arrhenius の式によると、グラフの傾きから律速段階の活性化エネルギー (E) が算出できる。

$$\log k = - \{ E / (2.0303 RT) \} + \text{定数}$$

k: 放出の速度定数

E: 律速段階の活性化エネルギー

R: 気体定数

T: 絶対温度

活性化エネルギーの値は、37 ~ 25 °C で 5.5 kcal/mol、25 ~ 15 °C で 29 kcal/mol だった (図 21)。速度定数が同じであることから、この活性化エネルギーの値も、コントロールとノコダゾール処理細胞で同じ値である。

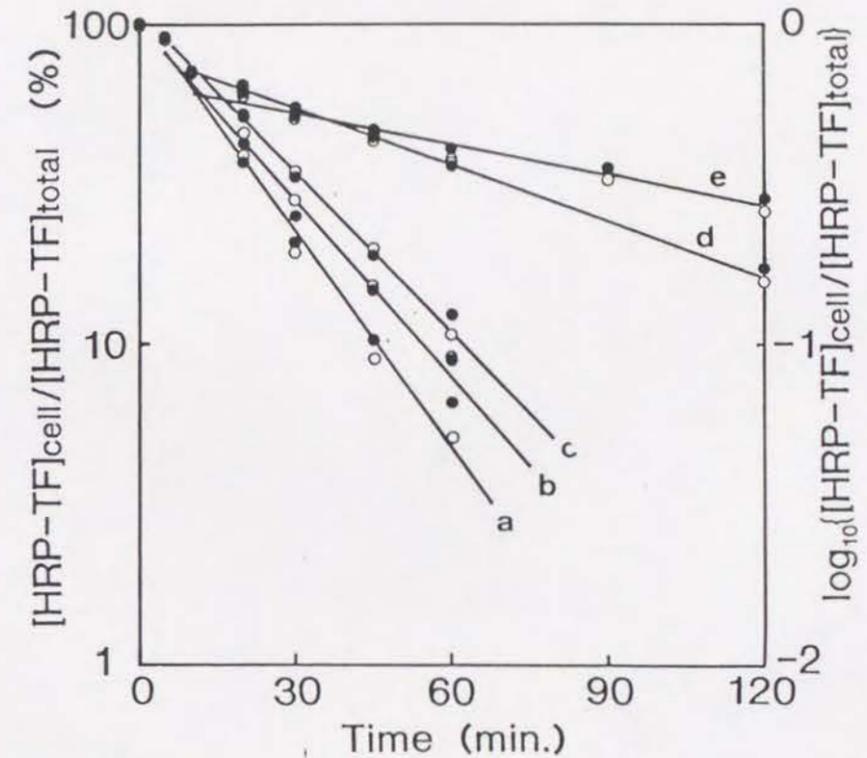


図 20. HRP 標識トランスフェリンの放出の温度依存性

図 11 と同様のトランスフェリンの放出を、15 ~ 37 °C の各温度で測定した。

縦軸: 各時間の細胞に存在する HRP 量の対数值 (図 19 の ● の対数值)。

横軸: 図 19 と同様 37 °C に昇温後の時間。

a: 37 °C、b: 30 °C、c: 25 °C、d: 20 °C、e: 15 °C。

コントロール (O)、ノコダゾール処理細胞 (●)。

各温度でコントロール、ノコダゾール処理細胞で放出のタイムコースに差はみられない。放出速度は、25 °C ~ 20 °C 間で急激な変化がみられる。

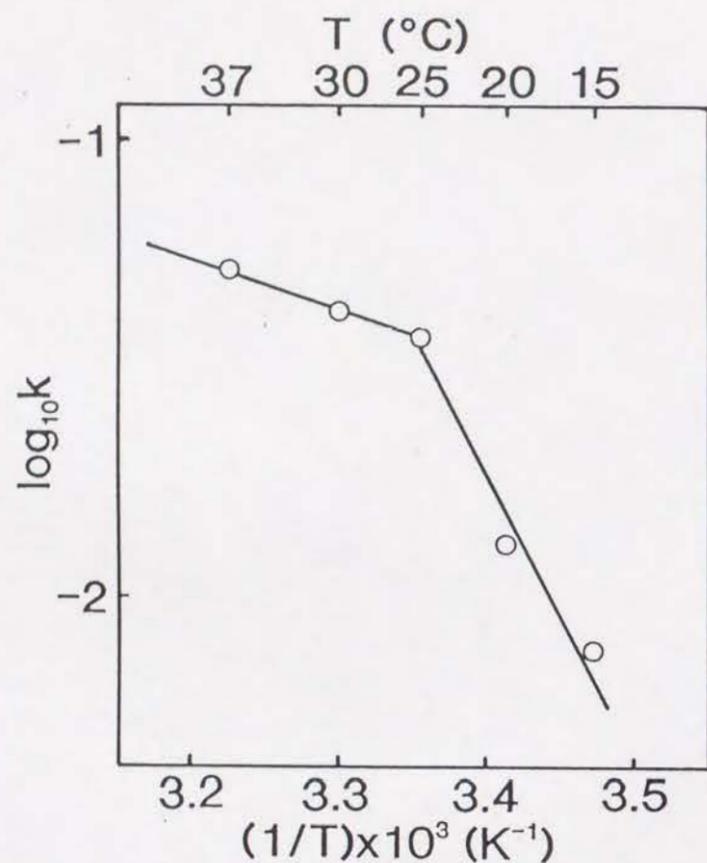


図21. 速度定数のArrheniusプロット

図20で得た各温度の速度定数(k)の対数と絶対温度(T)の逆数の関係をプロットした。次のArrheniusの式によれば、グラフの傾きから律速段階の活性化エネルギー(E)が計算できる。

$$\log k = - \left\{ \frac{E}{2.303RT} \right\} + \text{定数}$$

k: 放出の速度定数

E: 律速段階の活性化エネルギー

R: 気体定数

T: 絶対温度

トランスフェリンリサイクリングの律速段階の活性化エネルギーの値は、25°C以上で5.5 kcal/mol、25°C以下で2.9 kcal/molであった。

3-3. HRP標識トランスフェリンの放出とpH依存性

次にトランスフェリンの放出に対するエンドソームの酸性化の阻害剤であるNH₄Clとモネンシンの影響を見た(図22)。NH₄⁺イオンは、NH₃の状態でエンドソームの膜を透過し、エンドソーム内で再びイオン化しエンドソーム内のpHを中性化する。またモネンシンは、陽イオンイオノフォアとして働きエンドソーム内のpHを中性化する。

これらの薬剤の存在下では、表6に見られるように、HRP標識トランスフェリンの放出の速度は、NH₄Clの場合はコントロールの27%に、モネンシンの場合は18%に減少した。さらにノコダゾール存在下では酸性化阻害剤処理のみの場合よりさらに20~30%遅くなった。

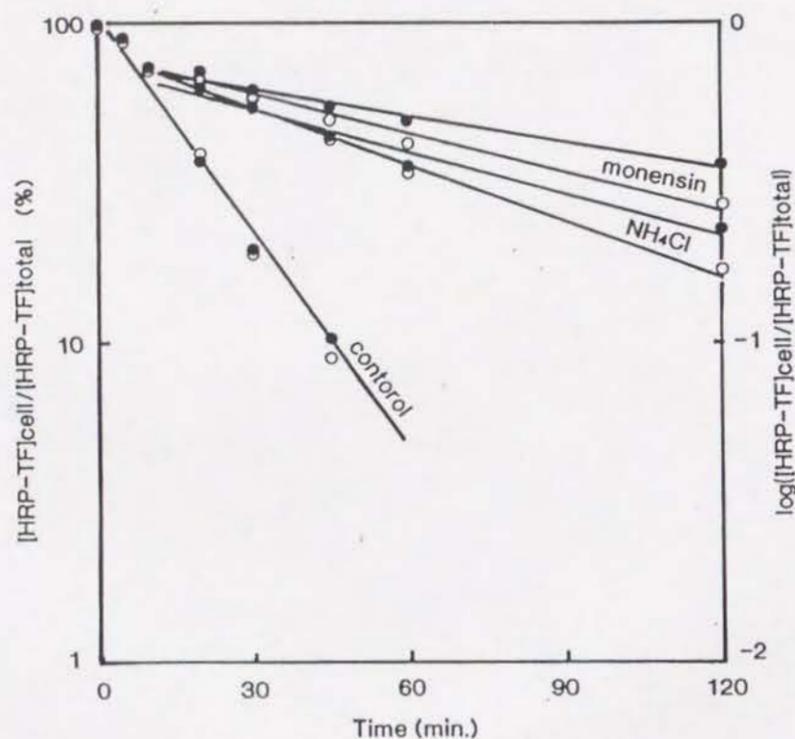


図22. HRP標識トランスフェリンの放出のpH依存性

トランスフェリン放出に及ぼすNH₄Clとモネンシンの影響を見た。これらの薬剤はエンドソームやリソゾームなどの細胞内の酸性の膜器官内のpHを中性化する。NH₄Clは10 mM、モネンシンは10 μMで使用した。実験は37°Cでおこなっている。

コントロール細胞(○)、ノコダゾール処理細胞(●)。

酸性化の阻害剤によりトランスフェリンの放出速度は、NH₄Cl処理でコントロールの27%、モネンシン処理で18%に低下した。さらに各薬剤でノコダゾール処理により放出速度の低下がみられた。

表5. リサイクリング速度定数と温度依存性

温度(°C)	37	30	25	20	15
速度定数(x 10 ⁻² min ⁻¹)	5.2	4.2	3.7	1.3	0.76

表6. リサイクリングの速度定数と酸性化阻害剤の効果

	コントロール	NH ₄ Cl	モネンシン
コントロール	5.2	1.4	0.96
ノコダゾール	5.2	1.0	0.76

*表の速度定数は、10²倍の値。単位はmin⁻¹。

測定は37°Cでおこなっている。

考察

膜小胞の運搬は、膜小胞によるタンパク質の細胞内輸送における重要な一過程である。エンドサイトーシスにおける輸送小胞であるエンドソームでは、細胞骨格の一つである微小管が輸送に関与することが示唆されている(60、61、62、63、64、66)。我々は、微小管脱重合剤であるノコダゾールを使い、エンドソームの輸送過程に揺動を与えることで、トランスフェリンの形質膜への復帰に必須な細胞内過程を明らかにすることを試みた。本考察では、先ず〔1〕で、我々が使用したFL細胞におけるトランスフェリンエンドサイトーシスの特徴を他の細胞と比較を行う。〔2〕では、ノコダゾール処理により微小管を破壊したFL細胞でのトランスフェリンリサイクリングの特徴を述べる。〔3〕、〔4〕では、ノコダゾール処理FL細胞で得られたトランスフェリンのリサイクリングの知見から、正常細胞でのエンドソームの輸送過程における微小管の役割やトランスゴルジネットワーク経由の経路の意義についても考察する。

1. FL細胞でのエンドサイトーシスとリサイクリング

トランスフェリンのエンドサイトーシスの研究には、ヒト腫瘍細胞由来のA431細胞、HeLa細胞などの培養細胞が使われる。我々は、これらの細胞と比較してエンドサイトーシスした蛍光標識トランスフェリンの核近傍への集合が同調して起きる細胞としてFL細胞を選択した。蛍光標識トランスフェリンの核付近の集合は、他の細胞(A431細胞、HeLa細胞(S3株)、KB細胞)では10~50%の細胞に観察されたのに対し、FL細胞では92%の細胞で観察された。

我々は、FL細胞のHRP標識トランスフェリンの取り込みのタイムコースを測定したが、この取り込みは定常状態まで達する時間は30~60分程度要した(図9)。一方、トランスフェリンの1回のエンドサイトーシスにおいて、受容体の結合と取り込みにかかる時間は5分以下であることが報告されている(81)。この時間の差は、トランスフェリン受容体がトランスフェリンを結合していない状態でもエンドサイトーシスされ(82)、一時的に細胞表面に存在するトラ

ンスフェリン受容体は細胞全体の受容体の一部であるためである。HeLa細胞では、全トランスフェリン受容体の80%が細胞内に存在することが報告されている(83、84)。このため、我々の測定したトランスフェリンの取り込みのタイムコースは、始めは、HRP標識トランスフェリンによる細胞全体の受容体の占有のタイムコースを意味し、定常状態はトランスフェリンの取り込みと放出が平衡に達した状態と考えることができる。ところで、リサイクリングした受容体と、トランスフェリンの再結合にかかる時間はトランスフェリンリサイクリングの全時間に比べると非常に短いため(HepG2細胞では全時間の約40分の1(81))、受容体がトランスフェリンと結合していない割合は低い。そこで、定常状態でのトランスフェリンの結合量は細胞内の全受容体量にほぼ等しいと推定される。定常状態のHRP標識トランスフェリンの量から概算した受容体数は、1細胞当たり 5.6×10^4 分子であった。

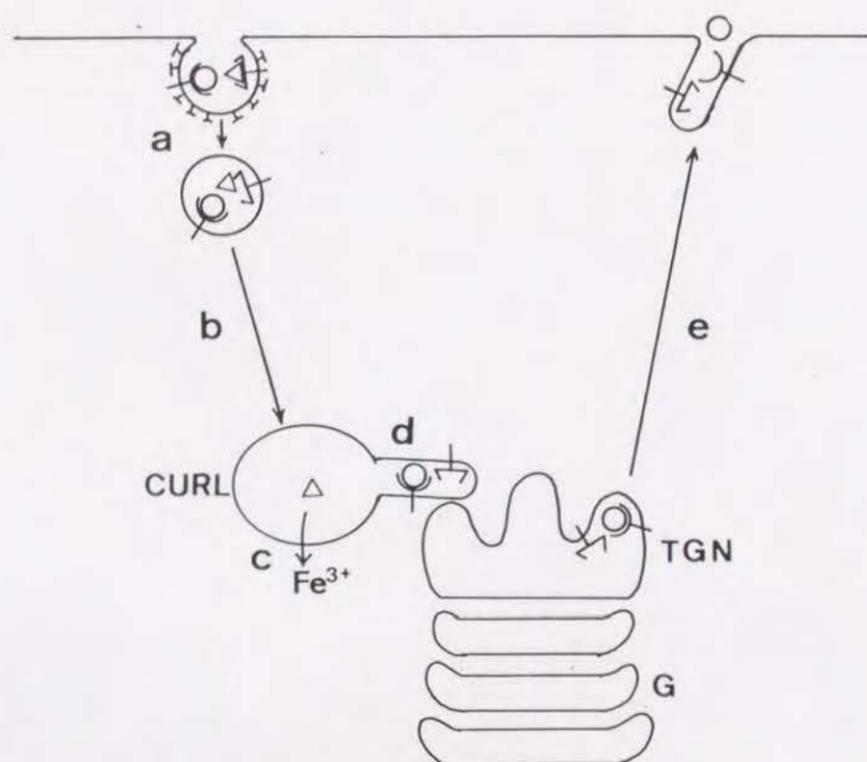
Feイオンは、細胞の増殖に必須で、その細胞への取り込みはトランスフェリンエンドサイトーシスが主な経路であるため(67)、トランスフェリン受容体は、多数の組織細胞(21)や継代可能な培養細胞で発現していることが報告されている(85)。1細胞当たりのトランスフェリン受容体の分子数は細胞によりかなり差がみられるが、(FL細胞との比較のためその数を挙げておくと)、マウスの腫瘍細胞由来の培養細胞では 5×10^3 分子であるが、ヒト網状赤血球由来のK562細胞では 4×10^5 分子に達する(86、87)。

次に、FL細胞にエンドサイトーシスされたトランスフェリンの放出は、一相性の指数関数的におき、その速度定数は37°Cで 0.052 min^{-1} 、放出のハーフタイムは12分だった(図19、図20)。これは、過去に報告されているK562細胞の5分、A431細胞の7.5分より長く、HepG2細胞の16分より短い値であった(83、46、81)。

2. ノコダゾール処理したFL細胞でのトランスフェリンのエンドサイトーシスとリサイクリング

トランスフェリンのエンドサイトーシスとリサイクリングの各段階は下図に示

したように、(a) 取り込みとエンドソーム形成、(b) エンドソームの輸送、(c) エンドソーム内の酸性化とFeイオンのトランスフェリンからの遊離と細胞質への移行、(d) リソゾーム移行型のリガンドとの選別、(e) 形質膜への復帰と外液への放出に分けられる。



以下でトランスフェリンのリサイクリングにおけるノコダゾールの効果を各段階(a~e)について検討する。〔2-1〕では(a)の段階の取り込みおよびエンドソームの形成と形態に関し、〔2-2〕でトランスフェリンの細胞内分布をもとに、(b)のエンドソームの輸送に関し検討する。〔2-3〕では、トランスフェリンのエンドサイトーシスの機能である(c)の段階のFeイオンの取り込みについて、〔2-4〕では、(d)のエンドソームにおけるリガンド間、リガンド-受容体間の選別の機能面に関し、〔2-5〕では、トランスフェリンの放出のタイムコースから、(e)のトランスフェリンの形質膜への復帰と放出について検討する。これらを総合し〔2-6〕でノコダゾール処理細胞で生じたトランスフェリンのリサイクリング経路に関し考察する。

2-1. トランスフェリンの取り込みとエンドソームの形成、形態変化に対するノコダゾールの効果

トランスフェリンのFL細胞への取り込みに対するノコダゾールの影響を、細胞へのHRP標識トランスフェリンの取り込み(蓄積)の速度と、エンドソームの形態の両面から調べた結果、この段階にノコダゾールは大きな影響はなかった。

図9で示したように、HRP標識トランスフェリンの細胞への取り込みは、正常のFL細胞とほぼ同様のタイムコースをとるが、初速度、定常状態での量ともに若干(10%程度)低い値であった。この原因は、トランスフェリンエンドサイトーシスにかかわる受容体数の減少と、トランスフェリンリサイクリングにかかる全時間の増加の二つの可能性が考えられる。図19で得られたトランスフェリンのリサイクリングのタイムコースから、1回のリサイクリングの時間にノコダゾールは影響しない。そこで後者の可能性は否定でき、定常的取り込みの減少は受容体数の減少に起因すると考えられる。トランスフェリン受容体数は、HRP標識トランスフェリンの蓄積量から概算すると、1細胞当りコントロール細胞の 5.6×10^4 分子に対しノコダゾール処理細胞で 5.1×10^4 分子であった。

取り込みを絶対量からみた場合その初速度はノコダゾールで影響を受けるが、定常状態での取り込み量を100%と見なした場合の(相対的な)初速度は、ノコダゾール処理の影響はみられない(図9 inset)。このことから、取り込みの効率に対してはノコダゾールは影響しないと考えられる。OkaとWeigelは、微小管脱重合剤と取り込み効率の関係に関して、リソゾームに移行するリガンド、アシアロ糖タンパク質でより直接的な測定をおこなっている(63)。彼らの方法は、我々のおこなった定常的な取り込みとは違い、低温で細胞表面の受容体に吸着させたアシアロ糖タンパク質の細胞内への取り込みを測定するものであるが、その結果は、吸着したリガンドが細胞内への取り込まれる割合は、微小管を破壊する薬剤(コルヒチン、ビンブラスチン)により影響されなかった。また、Brownらは、リガンドと受容体がともにリソゾームに運ばれるタイプの上皮成長因子のマウス由来3T3細胞への定常的な取り込みを測定し、コルヒチンやビンブラスチン処理により影響を受けないことを報告している(64)。多くの場合、エンドサイトーシスにおける取り込みの過程に関し微小管は関与しないようである。

表面の受容体数に対する微小管破壊剤の影響については、受容体の種類により議論の分かれるところである。低密度リボタンパク質や上皮成長因子の場合、2時間程度のコルヒチン処理の後でも、リガンドの取り込みの初速度は正常の細胞と変わらなかった(60、64)。これは、表面の受容体数の直接測定でないため幾分間接的な証拠ではあるというものの、表面に存在する受容体数に変動はないと考えられる。一方、アシアロ糖タンパク質に関しては、30分程度の薬剤処理で細胞表面の受容体数をリガンドの吸着量から直接測定した結果、受容体数は75%に減少している(61)。トランスフェリンの場合は、取り込みの初速度から判断すると細胞表面の受容体数はノコダゾール処理で10%程度減少していると考えられる。

トランスフェリンをふくむエンドソームの形態に関してDAB法による電子顕微鏡観察からは、正常のFL細胞では直径100nm~200nmの球形小胞、長さ100nm幅50nmの管状小胞、直径500nm程度の管状部分を持つチューブロベジキュラーエンドソームやマルチベジキュラーボディが観察された(図12a)。従来の報告によれば、小型の小球がエンドサイトーシス直後に観察され、その後チューブロベジキュラーエンドソームやマルチベジキュラーボディが観察される(45、46、49)。この傾向はトランスフェリン以外にもリゾーム移行型のリガンドである $\alpha 2$ -マクログロブリン(42)や上皮成長因子(50)をふくむエンドソームの場合でもほぼ同様であった。しかし管状の小胞は、トランスフェリンの場合において顕著に観察され、Willinghamらは、この管状の小胞を形質膜へ向かうリサイクリング小胞であるとしている(49)。しかし、この管状小胞に関しては議論の分かれるところで、同様の形態の小胞について、Hopkinsは、トランスフェリンのエンドサイトーシス直後に多数観察できることから、エンドソームの初期の形態であるとしている(45)。この点に関し決着はついていないが、いずれにしてもこれら各種の形態のエンドソームがトランスフェリンのリサイクリングの過程に関与する膜系として同定されている。

ノコダゾール処理したFL細胞においても、小型の球状の小胞、管状の小胞、チューブロベジキュラーエンドソーム、マルチベジキュラーボディといった従来報告されているの各種の形態の膜系が観察され(図12b、c)、エンドソーム

の形成と形態変化に微小管が必須ではないと考えられる。しかし、ノコダゾール処理細胞においては、形質膜直下のエンドソームの大半(約90%)が、小型の小胞の形態をとる場合(図12c)もあり、各種の形態のエンドソームの存在の割合がノコダゾールにより影響をうけている可能性は残されている。

2-2. トランスフェリンの輸送におよぼすノコダゾールの影響

ノコダゾールは、エンドソーム形成や形態には影響しないと考えられるが、その細胞内分布には大きな影響を与えた。蛍光トランスフェリンの分布(図10a、b)でみられたように、正常のFL細胞では、蛍光標識トランスフェリンを5分間エンドサイトーシスさせた直後のエンドソームのパターンは、細胞質一面に分布し、その後7分間で核近傍に集まってくる。一方、ノコダゾール処理細胞において、蛍光標識トランスフェリンはエンドサイトーシス直後(5分)は細胞の辺縁部に分布し、その後も(12分でも)正常の細胞で観察されたような核付近の領域への集合は観察されず、辺縁部に分布したままであった(図10d、e)。両者の比較から、核付近への集合が、微小管依存的であることが分かる。

電子顕微鏡観察から、正常の細胞でトランスフェリンを含むエンドソームが集合する領域はゴルジ域で特にゴルジ装置のトランス側に位置し、その形態はマルチベジキュラーボディや球状、あるいは管状構造をとった(図13a)。一方、ノコダゾール処理細胞の電子顕微鏡観察でも、蛍光観察に対応する結果が得られエンドソームは、核付近の領域には観察されず細胞の辺縁部(形質膜直下)に分布しているパターンが得られた(図12c)。Hopkinsは、A431細胞でトランスフェリン受容体の形質膜上での分布を調べ、受容体の取り込みがおきる(被覆ピットの)領域が主に細胞の辺縁部に分布することを報告している(88)。彼の示したA431細胞での蛍光抗体法によるトランスフェリン受容体の分布は、我々の得たノコダゾール処理細胞のエンドソームの分布と非常に似かよったパターンをであった。このことから、我々は、ノコダゾール処理細胞でのエンドソームは、被覆ピットの領域付近にとどまっていると推測している。蛍光標識トランスフェリンの5分パターンがコントロールとノコダゾール処理細胞ですでに異な

っていることは、コントロール細胞では、5分ですでにエンドソームの核近く（ゴルジ域）への移動が始まっているのであろう。

エンドソームの核近傍への集合の阻害効果は、コルヒチンやビンブラスチンでもノコダゾール同様観察され、微小管に影響しないルミコルヒチンや微小管の安定化効果のあるタキソールではエンドソームの集合は観察された。ノコダゾール、コルヒチン、ビンブラスチンの共通な薬剤効果は微小管ネットワークの破壊であり、この効果がエンドソームの集合阻害の原因となっていると結論できる。

ノコダゾールの直接の効果は、微小管の脱重合であるが、微小管の脱重合は、細胞内膜器官の分布や維持に影響を与える。小胞体の網目状のネットワーク構造が微小管により維持されていることや（89）、リソゾームの核近傍の分布や管状の形態に微小管が必要であることが報告されている（90）。またゴルジ体の層板構造の維持にも微小管が必要であることが報告されている（74）。我々も電子顕微鏡観察（図13）とC6-NBDセラミドによるゴルジ装置の蛍光観察（図14）から、ノコダゾールによる微小管の破壊がゴルジ装置を破壊し核近傍の領域から細胞質中へ分散させるという結果を得た。さらに、ノコダゾール処理細胞の電子顕微鏡観察から、トランスフェリンを含むエンドソームの一部が、この分散したゴルジ装置の近くに存在していた。これは、ゴルジ装置あるいはトランスゴルジネットワークといったゴルジ域の膜系とエンドソームに何等かの親和性があることを示唆する。ノコダゾール細胞でエンドソームの集合が妨げられたのは、エンドソームと親和性のあるゴルジ装置が細胞質中に分散したことによる可能性もある。しかし、蛍光顕微鏡観察によるノコダゾール処理細胞での分散したゴルジ装置は細胞質中に一様に分布し（図14b）、一方、エンドソームは細胞辺縁部に分布し、その分布パターンは両者で異なっている（図10d、e）。これは、電子顕微鏡観察でみられた、分散したゴルジ装置付近のエンドソームは量的には少なく、ノコダゾールの二次的効果であるゴルジ装置の分散によりエンドソームの集合が抑えられたのではないと考えられる。さらに、チュブリンの重合を促進するタキソール処理でもゴルジ装置が分散するが（図14c）、エンドソームの核近傍への集合は阻害されない。一方、微小管の蛍光抗体法による観察から、タ

キソール処理した細胞では、微小管の放射状のネットワークが観察された（図15c）。エンドソームの集合は、ゴルジ装置の正常な状態ではなく、微小管ネットワークの存在に直接依存していることが分かる。

ノコダゾール処理細胞ではエンドソームの分布は正常の細胞と大きく異なるが、形態的にはチュプロベジキュラーエンドソームやマルチベジキュラーボディーの段階まで移行していることが観察された。これらのエンドソームは、正常のエンドソームと同等の機能を持つのであろうか。次にトランスフェリンをふくむエンドソームのFeイオンの透過と他のリガンドとの選別の機能に関し検討する。

2-3. ノコダゾール処理FL細胞におけるFeイオンの取り込み

トランスフェリンに結合したFeイオンは、酸性条件下（pH 5.5~6）でトランスフェリンと解離し（38、91）、その後細胞質へ移行し酵素のヘムとしてFeイオンを必要とするミトコンドリアや、細胞質の鉄結合タンパク質であるフェリチンへ移行する（78、72）。Feイオンの細胞質への移行の起る膜系に関しては、細胞内のFeイオンがリソゾームを含む膜系に移行しないことが密度勾配遠心による細胞分画で確認され（92、93）、またエンドソームとリソゾームの融合を阻害する温度でもFeイオンの細胞質への移行が観察されることから（72）、リソゾーム以前の段階（エンドソームの段階）でFeイオンの膜透過が起きると考えられる。

ノコダゾール処理した細胞に取り込まれたFeイオンの細胞の各膜画分への分布は、主にミトコンドリアを含む画分（M、L）と細胞質画分（S）に分布し、これは正常のFL細胞とほぼ同様のパターンを示した（図16）。ノコダゾール処理細胞のトランスフェリンエンドサイトーシスは、Feイオンの取り込みに関しては正常のエンドサイトーシスと等価であると考えられる。ただしこの測定では、ミトコンドリアをふくむ膜画分（M、L画分）に存在するFeイオンが、現実にエンドソームの膜を透過しミトコンドリアに移行したのではなく、M、L画分中に

分布するエンドソーム内に存在する可能性も否定できない。M、L画分に関しこれ以上の膜透過の証拠を得ることはできなかったが、細胞質(S)画分に関しては、フェリチン抗体による免疫沈降法からFeイオンの膜透過の直接の証拠を得た。その結果は、細胞質のFeイオンの43%がフェリチンと結合しており(表4)、これは、正常の細胞の48%と大きな差はなかった。ノコダゾール処理細胞のエンドソームでもエンドソーム内腔の酸性化や、それに引き続いて起きるFeイオンのトランスフェリンとの解離、Feイオンのエンドソームの膜透過の過程は達成されていることがわかる。

エンドソームのどの段階でFeイオンの膜透過が起きるかについては、Sibilleらが、エンドサイトーシス後10分程度で細胞質への移行がほぼ完了しているという観察結果から、Feイオンが比較的初期のエンドソームの膜を透過し細胞質へ移行することを示唆している(72)。このFeイオンの膜透過の機構は不明であるが、Bakkerenらは、単離したエンドソームからのFeイオンの放出をin vitroで測定し、形成から2~3分後のエンドソームでもすでにFeイオンの膜透過が可能であることを見だしている(94)。Feイオンは、トランスフェリンから解離するのに必要な酸性化が達成されれば、速やかに細胞質へ移行するものと思われる。エンドソーム内の酸性化に関しては、YamashiroとMaxfieldが、酸性条件で蛍光強度の変化するフルオレッセインで標識した α 2-マクログロブリンあるいはデキストランをCHO細胞にエンドサイトーシスさせ、蛍光顕微鏡下でエンドソームの内腔のpHを測定している(95、96)。その結果によれば、エンドソームの内腔は、形成後5分以内のエンドソームではpH6.2で、5~10分程度で、pH6以下になり、Feイオンの解離に必要な酸性条件となる。彼らは、この時間帯でのCHO細胞内のエンドソームの形態を調べ、Feイオンの解離の起きるエンドソームはチュプロベジキュラーエンドソームであるとしている。ノコダゾール処理細胞でFeイオンの移行がほぼ正常に観察されることは、少なくともFeイオンの取り込みに関与する段階のエンドソーム(おそらくチュプロベジキュラーエンドソーム)までは、機能面でも正常であると判断できる。

2-4. ノコダゾール処理細胞でのリガンドの選別

形質膜復帰型のリガンドであるトランスフェリンは、リソゾーム移行型のリガンドであるアシアロ糖タンパク質(80)、上皮成長因子(79、97)、インスリン(97)と同一の被覆ピットから取り込まれ、細胞内で別々の膜小胞に選別される。この選別は、CURL(44)やマルチベジキュラーボディー(45、46)で起きることが報告されている。電子顕微鏡観察からノコダゾール処理したFL細胞のエンドソームにも、形態的にはCURL様の構造であるチュプロベジキュラーエンドソームあるいは、これも選別の機能を持つ可能性のあるマルチベジキュラーボディーが観察された(図12)。しかし、その選別の機能は形態からでは判断はつかない。我々は、リソゾーム移行型の α 2-マクログロブリンのエンドサイトーシス後の細胞内挙動から選別に関する知見を得た(図17、図18)。ノコダゾール処理細胞に、エンドサイトーシスされた α 2-マクログロブリンは細胞内に長時間(1時間程度)とどまり(図17)、一方、トランスフェリンは12分でリサイクリングした(図19)。同一の被覆ピットから取り込まれるトランスフェリンと α 2-マクログロブリンの細胞内挙動が異なることは、両者がノコダゾール処理細胞内で選別されている可能性を示唆する。また外液に常時 α 2-マクログロブリンが存在する場合、その細胞内蓄積がノコダゾール存在下で観察された(図18)。これは、受容体が再利用されていることを意味し、細胞内で α 2-マクログロブリンとその受容体の選別が達成されていると考えられる。以上の2点から、リガンド-リガンド間の選別やリガンド-受容体間の選別機能を持つエンドソームが、ノコダゾール処理細胞でも機能していると考えられる。

しかし、ノコダゾール処理細胞でのリガンド間、あるいはリガンドと受容体間の選別の効率が、正常の細胞の効率に比べどの程度であるかの定量的判断は我々の結果からはできない。Wolkoffらは、コルヒチンとサイトカラシンBで処理した細胞でアシアロ糖タンパク質とその受容体の解離は起きるが、選別(別々の膜系への分離)の速度が50%程度阻害されることを報告している(98)。彼らの実験では、アクチン繊維の阻害剤であるサイトカラシンBを併用しており、我々の実験と同列には論じられないが、微小管脱重合剤がリガンドと受容体の選別の効率に影響をおよぼす可能性は否定できない。

2-5. ノコダゾール処理細胞でのトランスフェリンの放出

正常の細胞ではトランスフェリンは核近くに一旦集合しリサイクリングするのに対し、ノコダゾール処理細胞では形質膜直下からトランスフェリンはリサイクリングする。このように細胞内経路が異なるにもかかわらず、ノコダゾール処理細胞のトランスフェリンの放出は、その速度、量ともに正常の細胞と同じであり(図19)、トランスフェリンリサイクリングの効率がノコダゾールにより影響を受けないことが分かった。Kolsetらは、ラット肝実質細胞でアシアロ糖タンパク質受容体数が、コルヒチン処理により25%程度減少することを見だし、この理由を受容体のリサイクリング効率の低下としている(61)。我々のノコダゾール処理の場合、表面のトランスフェリン受容体数は正常値より10%程度減少していたが、リサイクリング効率に影響はなかった。微小管脱重合剤による細胞表面の受容体数の減少は、リサイクリング効率の低下が原因ではないと考えられる。

図19で得られたトランスフェリンの放出のタイムコースの測定は、低温でトランスフェリンを細胞表面の受容体に吸着させた後、37℃に昇温しエンドサイトーシスを開始させその後の外液へのトランスフェリンの放出を測定している。そのためこのタイムコースは、トランスフェリンの取り込みから放出までの全過程のタイムコースを示すことになる。そこで、トランスフェリンをふくむリサイクリング小胞の形質膜への復帰の素過程に対するノコダゾールの処理の影響は、放出のタイムコースだけからでは分からない。正常細胞では、形質膜への復帰の過程は、リサイクリング小胞の形質膜への接近と膜融合の2段階が存在すると考えられる。一方、ノコダゾール処理細胞では、取り込み直後からエンドソームは、形質膜直下に存在し、形質膜への接近の段階は存在しない。正常細胞とノコダゾール処理細胞でリサイクリングの全時間が等しいことから、少なくとも正常細胞におけるリサイクリング小胞の形質膜への接近は、リサイクリング時間に比べ速い段階であると推察できる。融合の段階に関してはノコダゾール処理に影響を受けるかどうかは決定できない。しかし、仮に融合段階にノコダゾール処理の影響があるにしても、それはリサイクリングの全時間に影響しない程度の変化である。

蛍光トランスフェリンの細胞内分布の観察から、正常の細胞ではトランスフェリンは細胞の中心部へ集合した後、形質膜へ復帰することが分かった(図10)。WillinghamらやStoorvogelらは、トランスフェリンが、細胞中心部のトランスゴルジネットワーク内に移行することを報告している(48、49)。ところで、新生の分泌タンパク質は20℃以下で分泌が止まり、トランスゴルジネットワーク内に蓄積する(18)。我々は、このことを利用し、トランスフェリン放出の温度変化をとることで、正常細胞のゴルジ域からのトランスフェリンの復帰とノコダゾール処理細胞の形質膜付近からの復帰を温度感受性の点から区別することを試みた(図20、表5)。正常細胞でのトランスフェリンの放出速度は、確かに20℃で著しく低下した。しかし15~37℃の各温度での放出速度は、正常細胞とノコダゾール処理細胞で相違はなく、形質膜への復帰で経由する膜系をその温度感受性により区別することはできなかった。

また、分泌毒であるモネンシンやNH₄Cl(1)を使ってノコダゾール処理細胞と正常細胞におけるトランスフェリンの復帰を薬剤感受性の点から区別することも試みた(図22)。その結果、薬剤感受性に関しては、正常細胞とノコダゾール処理細胞におけるトランスフェリンの復帰で差がみられた。意外なことに細胞中心を經由しない(従ってトランスゴルジネットワークのような分泌の経路を經由しない)と考えられるノコダゾール処理細胞におけるトランスフェリンの放出のほうが正常細胞より20~30%程度、薬剤の阻害効果が強かった(図22、表6)。この差が、ノコダゾール処理細胞では形質膜付近のエンドソームからのリサイクリングに対し、正常細胞でトランスフェリンが細胞中心部のトランスゴルジネットワークを經由するために生じたものかどうかは判断できない。しかし、少なくとも正常細胞とノコダゾール処理細胞で薬剤感受性の異なる膜系をトランスフェリンが復帰の過程で経由していると考えられる。

トランスフェリンのリサイクリングの時間がノコダゾール処理によらないことは、微小管に依存するエンドソームの形質膜~ゴルジ域間の移動が、リサイクリングの全時間に対し速い過程であることを意味する。言い替えると、リサイクリングの律速段階になるのは、エンドソームの形成、形態変化、形質膜との融合などのコントロール細胞とノコダゾール処理細胞で共通に存在する段階であると考

えられる。次にこのリサイクリングの律速段階について検討する。

トランスフェリンの放出の温度依存性を $15^{\circ}\text{C}\sim 37^{\circ}\text{C}$ の範囲で調べた結果、 25°C 前後で放出速度の急激な低下がみられたが、 $15^{\circ}\text{C}\sim 37^{\circ}\text{C}$ の全温度範囲で放出のタイムコースにノコダゾールは影響しなかった(図20)。これも、エンドソームの微小管依存的な輸送以外の段階が、トランスフェリンリサイクリングの律速段階であることを支持する。トランスフェリンリサイクリングの律速段階の候補としては、被覆ピットからエンドソームの形成、エンドソーム間の融合、エンドソームの分裂、エンドソーム内の酸性化、リサイクリング小胞と形質膜の融合、トランスフェリンの受容体からの解離、などを考えることができる。

Ciechanoverらは、HepG2細胞でトランスフェリンの受容体からの解離は0.36分という結果を報告している(81)。この段階はリサイクリングの律速ではなさそうである。

トランスフェリンリサイクリングの律速段階に関して、速度定数のArrheniusプロットから活性化エネルギーを求めた(図21)。その値は、正常の細胞とノコダゾール処理細胞ともに 37°C で 5.5 kcal/mol の活性化エネルギーを持ち、 25°C を転移点とし、それ以下では 29 kcal/mol であることが分かった。IacopettaとMorganは、ウサギ赤血球芽細胞での、細胞内トランスフェリンの交換速度の速度定数から活性化エネルギーを出している(99)。それによると、活性化エネルギーの値は $37\sim 26^{\circ}\text{C}$ で 12.3 kcal/mol 、 $26\sim 12^{\circ}\text{C}$ で 33.0 kcal/mol であった。我々の得た値に比べやや大きい値になっているが、転移点に関してはよく一致している。彼らは、トランスフェリンの定常的な取込みにおける細胞内のトランスフェリン受容体の占有速度を測定しているため、リサイクリングにおける全ての段階を含んでいる。そこで彼らの結果からも律速段階を特定することはできない。我々の測定法と彼らの測定法の比較から、トランスフェリンの受容体との結合と被覆ピットへの集合が両者に共通しない段階で、この段階は律速段階ではないことになる。

エンドサイトーシスにおける取り込み(エンドソーム形成)の段階については、 $\alpha 2$ -マクログロブリンやアシアロ糖タンパク質に関し温度依存性が調べられている(37、100、101)。活性化エネルギーの値は、細胞によりさまざまであるが、いずれの場合も 25°C 付近に転移点を持つという特徴はみられない。ま

た、各種のリガンドで取り込みのハーフタイムが2~3分であることが報告されており(29、81)、取り込みの段階はリサイクリングの律速段階ではないであろう。

エンドソーム内部の酸性化の段階に関しては、SipeとMurphyは蛍光標識したトランスフェリンを使い、その温度依存性を測定している(102)。彼らは、 24°C 前後で酸性化の速度が著しく変化することを示している。しかし、残念ながら活性化エネルギーの値や、転移点の正確な温度は彼らの結果からは判断できない。エンドソームの酸性化を律速段階とした場合、 25°C 以下でリサイクリング速度の低下の原因に、エンドソームのプロトンATPアーゼの活性低下が考えられる。図22で見られたように酸性化の阻害剤である NH_4Cl やモネンシンは、確かにリサイクリングの速度を著しく低下させた。速度定数の値は、 NH_4Cl ではコントロールの27%、モネンシンでは18%に減少した(図22、表2)。しかし、これらの薬剤処理で酸性化を阻害した細胞は、ノコダゾール処理することでさらに速度定数が20~30%減少する。このノコダゾールの効果の作用機構は今のところ分からないが、低温での速度定数の減少の場合は、このノコダゾールの阻害効果は見られない(図20)。このため 25°C 以下で観察された速度の低下がエンドソームの酸性化阻害を原因とするには疑問も残る。

エンドソーム間の融合の段階については、Diazらが、*in vitro*の実験で融合の温度依存性を調べ、 15°C 以下で融合がほぼ完全に抑えられることを報告している(103)。彼らの結果からは残念ながら融合の活性化エネルギーは見積れないが、 25°C 以下で活性化エネルギーの増大が膜融合効率の低下に関係する可能性も否定できない。

以上で述べたように、トランスフェリンリサイクリングの律速段階としては、トランスフェリンの受容体との結合と解離、トランスフェリンの被覆ピットへの集合と取り込み、エンドソームの輸送の段階は除外でき、エンドソーム内部の酸性化、エンドソームの融合と分裂、形質膜との融合の段階のいずれかであると考えられる。

2-6. ノコダゾール処理細胞でのトランスフェリンリサイクリングの経路

〔2-1〕～〔2-5〕で述べたことを総合してノコダゾールのトランスフェリンのエンドサイトーシスとリサイクリングにおよぼす影響とノコダゾール処理細胞におけるトランスフェリンリサイクリングの経路を図23に模式的にまとめた。ノコダゾールで処理したFL細胞では、トランスフェリン受容体数は正常の細胞に比べ10%程度減少する。しかし受容体によるトランスフェリンの取り込みの段階には、ノコダゾールは影響しない。取り込まれたトランスフェリンは、正常のFL細胞の場合、核近傍の領域（ゴルジ域）に輸送されるが、この輸送をノコダゾールは阻害する。その結果、トランスフェリンは、形質膜近傍のエンドソーム内に留まる。この形質膜近傍のエンドソームは、正常の細胞にみられる各種のエンドソームと同様の形態が観察されノコダゾール処理細胞においてもエンドソームは正常の形成と形態変化を遂げているものと思われる。またエンドソームの機能に関して、Feイオンの細胞質への移行に関しては正常の機能を果たしており、リガンド間あるいはリガンド-受容体間の選別に関して（その効率に関しては不明であるが）その機能を有していた。これらFeイオンの移行や選別の場となるエンドソームはチュープロベジキュラーエンドソームやマルチベジキュラーボディと呼ばれるエンドソームであると考えられ、少なくともこの段階のエンドソームまでは正常の細胞でみられるエンドソームと同じ形態と機能をもつと推測できる。その後、トランスフェリンは形質膜へと復帰する。この復帰に関しては、ノコダゾール処理において生じた分散したゴルジ装置付近に若干のトランスフェリンをふくむエンドソームが観察されたことから、この分散したゴルジ装置を経由する可能性は否定できないものの、大半のトランスフェリンは形質膜直下のエンドソームから直接リサイクリングしているものと考えられる。

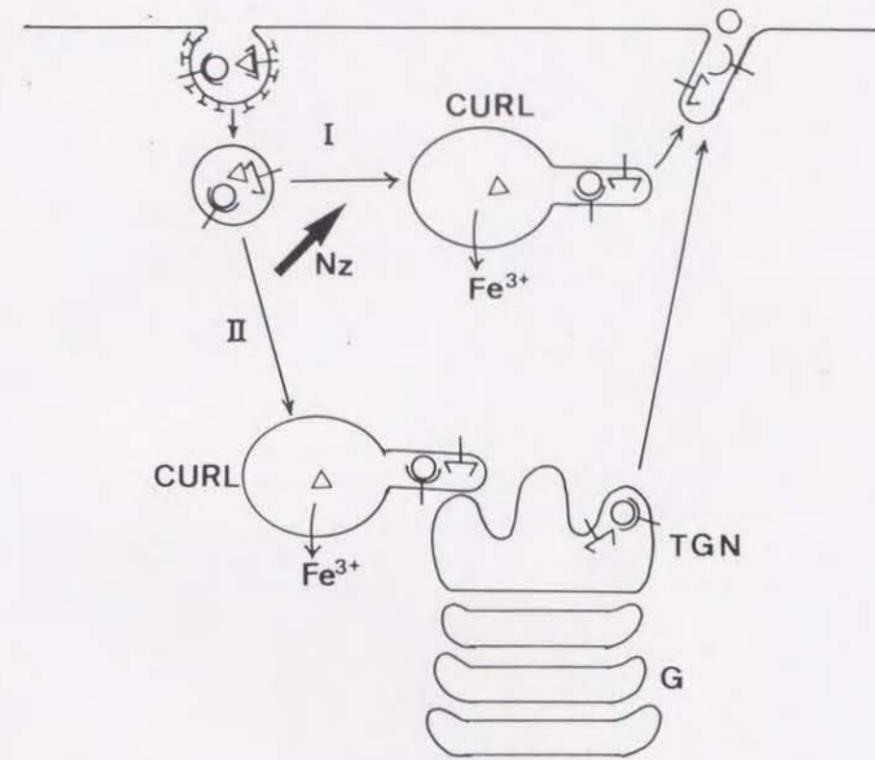


図23. ノコダゾール処理細胞におけるトランスフェリンのリサイクリング

ノコダゾール処理細胞において、トランスフェリンは形質膜近くを通りリサイクリングする。この経路（I）で、エンドソームの形態や、Feイオンの取り込みとリガンド間の選別といったエンドソームの機能は、通常核付近（ゴルジ域）を経由する経路（II）と変わらないと考えられる。ノコダゾール処理細胞において、このように形質膜付近からリサイクリングし得ることは、逆に正常の細胞においても同様の経路Iが存在する可能性を示唆する。本文の〔考察4〕で述べるが、我々は、正常の細胞において、微小管依存性なリサイクリング経路IIと非依存性な経路Iが存在しており、ノコダゾール（Nz）処理により通常経路IIが阻害され、その結果、取り込まれたトランスフェリンはすべて経路IIを経由してリサイクリングするものと考えられる。

TGN: トランスゴルジネットワーク、G: ゴルジ装置

3. エンドソームの輸送と微小管とモータータンパク質

正常の細胞では、トランスフェリンをふくむエンドソームは、細胞の中心部へ10分程度で集合した(図10)。Luby-Phelipsらは、細胞にマイクロインジェクションした粒子の運動から、直径26nm以上の粒子は細胞質中を単純拡散だけでは動けないことを報告している(104)。エンドソームは100nm~1μmの直径をもち単純拡散のみでは細胞質中を移動できないことになる。ノコダゾール処理細胞において、エンドソームは細胞辺縁部にとどまり10分程度ではその位置を変えなかったが(図10)、これはエンドソームの単純拡散による移動がないことを反映しているのであろう。逆に、正常の細胞ではエンドソームの集合のために微小管に依存したなんらかの積極的な機構が存在すると考えられる。

それでは、形質へ復帰するリサイクリング小胞のゴルジ域から形質膜までの輸送は、微小管に依存するのだろうか。核付近に一旦集合したトランスフェリンは、トランスフェリンリサイクリングの全時間に影響しない速さで速やかに形質膜まで到達しなければならない。一方、細胞内の膜小胞は単純拡散だけではほとんど動かないと考えられ(104)、リサイクリング小胞の形質膜までの輸送に関しても何等かの積極的な輸送機構が存在していると思われる。De Brabanderらは、トランスフェリン受容体に金コロイドで標識した抗体を結合させ、その細胞内運動をビデオ顕微鏡法を使いリアルタイムで追跡した(105)。その結果、金コロイドの運動は、細胞中心へ向かう求心性の運動と周辺部へ向かう遠心性の運動があり、両者とも跳躍運動であった。跳躍運動は、微小管依存的な膜器官の輸送の特徴であり、リサイクリング小胞のゴルジ域から形質膜までの輸送も積極的な微小管関連の輸送である可能性が高い。

膜小胞輸送の発達した系である神経細胞の軸索輸送では、膜小胞を微小管に沿って輸送するモータータンパク質としてキネシンと細胞質ダイニン(MAP1C)が単離されている(106、107、108)。微小管は、チューブリンの重合による伸長速度が両端で違い、伸長の速い端が+端、遅い端が-端と呼ばれる(57)。キネシンは、微小管の-端から+端に向かい膜小胞を輸送し、細胞質ダイニンは、この逆方向の輸送に関与することが知られている(109、110、108)。微小管は、間期の培養細胞内では、核近傍に存在する微小管形成中心(

MTOC)側に一端、細胞の辺縁部に+端を向けて放射状に配列している(111)。そこで、キネシンは、細胞の中心部から辺縁部へ、細胞質ダイニンは、辺縁部から中心部への輸送に関与していると思われる。これらのモータータンパク質は、軸索以外にも、副腎髄質細胞(112)、ニワトリの胚繊維芽細胞(113)、ウニの卵細胞(114)で存在することが知られている。特にニワトリの胚繊維芽細胞では、細胞質ダイニンが膜小胞を運搬することがin vitroで観察され(113)、軸索以外の系でもモータータンパク質が膜小胞輸送に関与していることが示唆された。

エンドソームの輸送がキネシンや細胞質ダイニンによるという直接の証拠は今のところない。ところでエンドソームやリサイクリング小胞の形質膜~ゴルジ域間の輸送は、リサイクリングの全時間(12分)に比べ速い段階であった。これらのモータータンパク質による小胞輸送の速度は、再構成系の実験によると0.5~2μm/秒である(110、113)。エンドソームの輸送がこれらのモータータンパク質によるならば、形質膜直下~ゴルジ域間の輸送は1分以内に完了することになり、輸送の過程はリサイクリングの律速にならないという要求は満たされるであろう。

4. トランスフェリンリサイクリングの経路とエンドソームの輸送(リサイクリングとトランスゴルジネットワーク)

正常の細胞でトランスフェリンは、微小管依存的に細胞中心部(ゴルジ域)へ集められ、その後、形質膜へと復帰する。このゴルジ域でトランスフェリンは、トランスゴルジネットワーク内に観察されるが、このトランスフェリンのトランスゴルジネットワークの通過に関して二つの仮説がある(47、49、52)。WillinghamとPastanは、エンドサイトーシスされたトランスフェリンは、エンドソーム→トランスゴルジネットワーク→形質膜、と連続的に移行すると考えている(連続的復帰)(図24a)(49)。彼らは、この場合トランスゴルジネットワークを形質膜への復帰のための膜器官であるとともに、この膜器官においてリガンドや受容体間の選別も起きるとしている。一方、Geuzeらは、CURLを初

期のエンドソームとトランスゴルジネットワーク間の中間的な膜系と考え、CURL⇔トランスゴルジネットワークの輸送は両方向におき、トランスフェリンの形質膜への復帰はCURLとトランスゴルジネットワークのどちらからでもおきるとするエンドサイトーシスの複数の段階からの復帰の機構を考えている(段階的復帰)(図24b)(47、52)。連続的復帰ではトランスゴルジネットワークの経路は、復帰のための必須の経路と考えられ、段階的復帰では必須の経路ではないことになる。まず、トランスフェリンの復帰がトランスゴルジネットワークを経由する連続的復帰であると仮定し、ノコダゾール処理した細胞で得られたトランスフェリンリサイクリングを考えてみる。ノコダゾール処理細胞では、トランスフェリンが形質膜直下にとどまりトランスゴルジネットワークへの移行はないと考えられる。連続的復帰では、この状態は復帰の経路が阻害された状態となる。しかし実際には、ノコダゾール処理細胞においてトランスフェリンはリサイクリングすることが可能で、さらにそのリサイクリングの速度にも正常の場合と変化はみられなかった(図19)。この結果は、トランスゴルジネットワークを形質膜への復帰の経路とする連続的復帰では説明できない。また、リガンドや受容体の選別もノコダゾール処理細胞で観察され、トランスフェリンにとってトランスゴルジネットワークが選別の膜器官とする連続的復帰とこの点でも矛盾する。一方、段階的復帰では、トランスフェリンはCURLまで移行すれば、それ以降CURL→形質膜とCURL→トランスゴルジネットワーク→形質膜の復帰の2経路が存在することになる。ノコダゾール処理細胞内では、形質膜近くにCURL様の形態のエンドソームが観察でき、その機能に関しても正常であった。これは、段階的復帰の立場では、CURLからの復帰の経路が保証されたことになり実際のトランスフェリンの復帰を説明できる。ノコダゾール処理細胞におけるトランスフェリンのリサイクリングにかかる時間は、正常細胞の場合と同じであり(図19)、トランスフェリンがCURL→形質膜のリサイクリング経路をとった場合でもCURL→トランスゴルジネットワーク→形質膜の経路をとった場合でも同じ時間でリサイクリングすると考えられる。これは一見、奇異に感じられるが、両経路に共通なエンドソームの融合・分裂、酸性化、形質膜との融合などの段階が律速段階となると考えれば、少なくとも矛盾はない。

トランスフェリンの形質膜への復帰が段階的な復帰(図24b)であれば、CURLの段階までトランスフェリンが移行すれば、形質膜への復帰が可能になる。正常細胞において、CURL様のエンドソーム(チュープロベジキュラーエンドソーム)は形質膜の近くにも観察され(図12、45)、正常の細胞においてもノコダゾール処理細胞で観察されたトランスフェリンの復帰(図23のIの経路)のような比較的形質膜付近からの復帰が存在する可能性がある。Hopkinsによると、A431細胞ではトランスフェリンの核近傍への集合が観察されるものの、このためには長時間(37°Cで30分程度)トランスフェリンを取り込ませる必要があった(45)。彼はA431細胞におけるトランスフェリンリサイクリングのハーフタイムは7.5分(46)であり、さらに電子顕微鏡観察からエンドサイトーシス後5~10分のトランスフェリン受容体は形質膜近くのエンドソームに存在するという結果から、核近傍を経由するリサイクリング経路がA431細胞における主経路ではなく、大半のトランスフェリンは形質膜直下からリサイクリングしている可能性が高いことを指摘している(45)。他の細胞で形質膜近くのリサイクリング経路を検討している例はないが、A431細胞における観察は、正常の細胞にも形質膜直下からリサイクリングする経路が存在する可能性を支持する。我々のノコダゾール処理細胞のトランスフェリンリサイクリングから、形質膜近くのリサイクリング経路は、その効率(速度)の面やFeイオンの取り込みといった機能に関しほぼ正常細胞のそれと等価であることが分かった。このことは、仮に正常のA431細胞で、大部分のトランスフェリンが、形質膜近くの経路(図23のI)をとった場合にも生理的には問題がないことを示し、正常細胞に経路Iが存在することを機能面から支持する。このように正常の細胞においても形質膜付近のリサイクリング経路が存在する可能性があるが、実際の、どの程度の量のトランスフェリンがこの経路でリサイクリングしているかは不明である。量的な問題は、細胞中心部(ゴルジ域)を経由するトランスフェリンでも同様で、例えば我々の使ったFL細胞細胞では、中心部へ集まるトランスフェリンの量を示すものは蛍光観察結果(図10)のみであり、その正確な量は不明である。

我々は、正常の細胞には、リサイクリングの経路として生理的に等価の2経路、ゴルジ域を経由する経路と形質膜付近を経由する経路(図23のIIとI)が存在し、FL細胞の場合、通常は微小管の存在に依存しゴルジ域の経路が顕著に観察

されるが、ノコダゾール処理で微小管を破壊するとゴルジ域の経路を阻害され、形質膜近くの経路が主経路となると考える。

トランスフェリンと他のリガンドとの選別や形質膜への復帰がトランスゴルジネットワークの経路と独立な過程であるなら、トランスフェリンのトランスゴルジネットワークへの移行とここからの復帰はどのような意味があるのだろうか。Stroovogelらは、アシアロ糖タンパク質受容体のトランスゴルジネットワークからのリサイクリングは、通常のリサイクリングに比べ遅い段階で、エンドサイトーシスの機能（アシアロ糖タンパク質の取り込み）に直接関係のない経路で受容体の細胞内poolとして役割を持つとしている（82）。我々のトランスフェリンリサイクリングの結果からは、核付近に集まるトランスフェリンのリサイクリングは形質膜直下からのものと時間的には変わらなかった。トランスフェリンの復帰が段階的復帰であれば、核近くに集まったトランスフェリンの一部しかトランスゴルジネットワークを経由しない場合が考えられ、リサイクリング時間に反映しない程度の細胞内poolが存在する可能性は否定できない。

また、トランスゴルジネットワーク経路のリサイクリング経路を予備的な経路と考えることもできる。エンドソームの輸送は形成後速やかに起きる。一方、ノコダゾール処理細胞でもトランスフェリンと $\alpha 2$ -マクログロブリン間の選別が観察されたことから、エンドソームの輸送とリガンドや受容体の選別は独立の過程である。そこで、CURLの膜分裂によるリガンド間の選別が輸送の段階より遅いか、せいぜい同程度の速さであれば、トランスフェリンは、リソゾーム行きのリガンドと選別される前に核付近に達してしまうことは十分あり得る。このようなトランスフェリンが細胞質の深い位置から効率よく形質膜へ復帰するため、合成の経路であるトランスゴルジネットワークを利用してリサイクリングしているのではないだろうか。

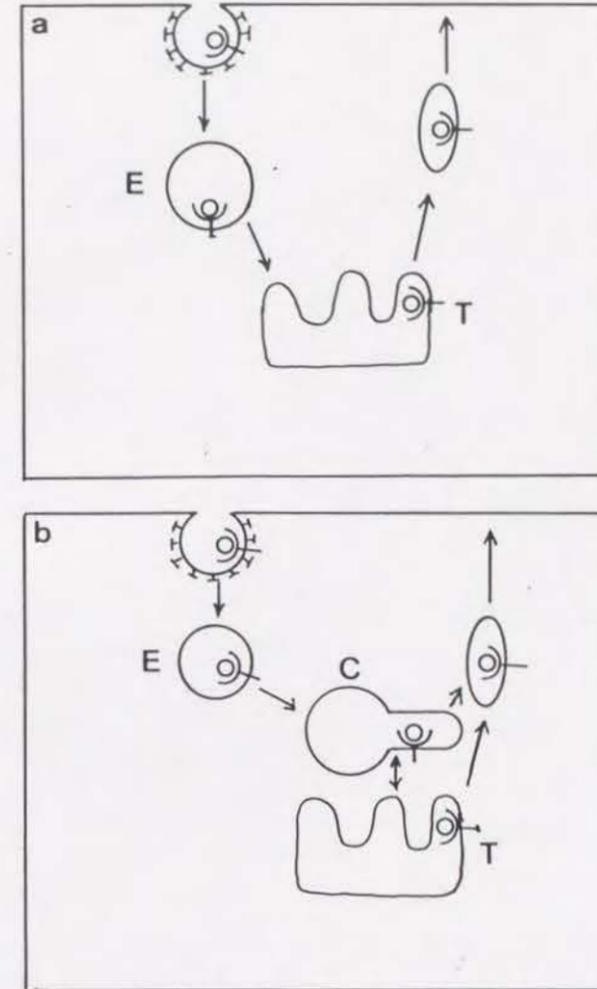


図24. トランスフェリンのリサイクリングにおける核付近の経路とトランスゴルジネットワークの通過

トランスフェリンの形質膜への復帰に関しては、Willinghamらの、aに示した被覆ピット→エンドソーム（E）→トランスゴルジネットワーク（T）→形質膜といった一つの流れ（連続的復帰）であるとする説と、Geuzeらの、bに示した被覆ピット→初期のエンドソーム（E）→CURL（C）→形質膜、あるいは、CURL⇄トランスゴルジネットワーク（T）→形質膜といった複数の流れ（段階的復帰）とする説がある。我々のノコダゾール処理細胞で得られた結果は、トランスゴルジネットワークの復帰が必須ではないことを示し、段階的復帰を支持している。

トランスフェリンと他のリガンドとの選別や形質膜への復帰がトランスゴルジネットワークの経路と独立な過程であるなら、トランスフェリンのトランスゴルジネットワークへの移行とここからの復帰はどのような意味があるのだろうか。Stroovogelらは、アシアロ糖タンパク質受容体のトランスゴルジネットワークからのリサイクリングは、通常のリサイクリングに比べ遅い段階で、エンドサイトーシスの機能（アシアロ糖タンパク質の取り込み）に直接関係のない経路で受容体の細胞内poolとして役割を持つとしている（82）。我々のトランスフェリンリサイクリングの結果からは、核付近に集まるトランスフェリンのリサイクリングは形質膜直下からのものと時間的には変わらなかった。トランスフェリンの復帰が段階的復帰であれば、核近くに集まったトランスフェリンの一部しかトランスゴルジネットワークを経由しない場合が考えられ、リサイクリング時間に反映しない程度の細胞内poolが存在する可能性は否定できない。

また、トランスゴルジネットワーク経路のリサイクリング経路を予備的な経路と考えることもできる。エンドソームの輸送は形成後速やかに起きる。一方、ノコダゾール処理細胞でもトランスフェリンと $\alpha 2$ -マクログロブリン間の選別が観察されたことから、エンドソームの輸送とリガンドや受容体の選別は独立の過程である。そこで、CURLの膜分裂によるリガンド間の選別が輸送の段階より遅いか、せいぜい同程度の速さであれば、トランスフェリンは、リソゾーム行きのリガンドと選別される前に核付近に達してしまうことは十分あり得る。このようなトランスフェリンが細胞質の深い位置から効率よく形質膜へ復帰するため、合成の経路であるトランスゴルジネットワークを利用してリサイクリングしているのではないだろうか。

謝辞

本研究をご指導して下さい下さった大西俊一教授に深く感謝します。
電子顕微鏡観察において多大な労力を裂いて頂き、また多くの有益な助言をして下さった北里大学の山科正平教授に心から感謝します。
 ^{59}Fe の測定では、佐甲靖志博士（現 東大助手）に忙しい中、無理に手伝って頂きました。深く感謝します。
最後になりましたが、大西研のスタッフ、院生の皆様にこの場を借りて感謝します。

文献

1. Pugesley, A.P. 1989. Protein targeting. Academic Press, Inc. San Diego.
2. Milstein, C., G.G. Brownlee, T.M. Harrison, M.B. Mashews. 1972. A possible precursor of immunoglobulin light chains. *Nature* 239:117-120.
3. Blobel, G. and B. Dobberstein. 1975. Transfer of proteins across membranes. I. Presence of proteolytically processed and unprocessed nascent immunoglobulin light chains on membrane-bound ribosomes of murine myelomas. *J. Cell. Biol.* 67:835-851.
4. Wichner, W.T., and H.F. Lodish. 1985. Multiple mechanisms of protein insertion into and across membrane. *Science* 230:400-407.
5. Gillespie, L.L. 1987. Identification of an outer mitochondrial membrane protein that interacts with a synthetic signal peptide. *J. Biol. Chem.* 262:7939-7942.
6. Pain, D., H. Murakami, and G. Blobel. 1990. Identification of a receptor for protein import into mitochondria. *Nature* 347:444-449.
7. Gould, S.J., G.A. Keller, and S. Subraman. 1988. Identification of peroxisomal targeting signals located at the carboxy terminus of four peroxisomal proteins. *J. Cell. Biol.* 107:897-905.
8. Tsukamoto, T., S. Miura, and Y. Fujiki. 1991. Restoration by a 35K membrane protein of peroxisome assembly in a peroxisome-deficient mammalian cell mutant. *Nature* 350:77-79.
9. Yoneda, Y., N. Imamoto-Sonobe, Y. Matsuoka, R. Iwamoto, Y. Kiho, and T. Uchida. 1988. Antibodies to Asp-Asp-Glu-Asp can inhibit transport of nuclear proteins into the nucleus. *Science* 242:275-278.
10. Kaplan, A., D.T. Achord, and W.S. Sly. 1977. Phosphohexosyl components of a lysosomal enzyme are recognized by pinocytosis receptors on human fibroblasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74:2026-2030.
11. Munro, S., and H.R.B. Pelham. 1987. A C-terminal signal prevents secretion of luminal ER proteins. *Cell* 48:899-907.
12. Vaux, D., J. Tooze, and S. Fuller. 1990. Identification by anti-idiotypic antibodies of an intracellular membrane protein that recognizes a mammalian endoplasmic reticulum retention signal. *Nature* 345:495-502.
13. Williams, M.A., and M. Fukuda. 1990. Accumulation of membrane glycoproteins in lysosomes requires a tyrosine residue at a particular position in the cytoplasmic tail. *J. Cell. Biol.*

111:955-966.

14. Valls, L.A., J.R. Winther, and T.H. Stevens. 1990. Yeast carboxypeptidase Y vacuolar targeting signal is defined by four polypeptide amino acids. *J. Cell. Biol.* 111:361-368.
15. Ferguson, M.A.J. 1988. Cell-surface anchoring of protein via glycosylphosphatidyl inositol structures. *Ann. Rev. Biochem.* 57:285-320.
16. Brown, D.A., B. Crise, and J.K. Rose. 1989. Mechanism of membrane anchoring affects polarized expression of two protein in MDCK cells. *Science* 245:1499-1501
17. Lisanti, M.P., M. Sargiacomo, L. Graeve, A.R. Saltiel, and E. Rodriguez-Boulan. 1988. Polarized apical distribution of glycosyl-phosphatidylinositol-anchored proteins in a renal epithelial cell line. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:9557-9561.
18. Griffiths, G., and K. Simons. 1986. The trans-Golgi network: sorting at the exit site of the Golgi complex. *Science* 234:438-443.
19. Fisher, H.D., A. Gonzalez-Noriega, W.S. Sly, and D.J. Morre. 1980. Phosphomannosyl-enzyme receptors in rat liver. *J. Cell. Biol.* 255:9608-9615.
20. Griffiths, G., B. Hoflack, K. Simons, I. Mellman, and S. Kornfeld. 1988. The mannose 6-phosphate receptor and the biogenesis of lysosomes. *Cell* 52:329-341.
21. Pastan, I., and M.C. Willingham. 1985. Endocytosis. Plenum Press. New York.
22. Goldstein, J.L., R.G.W. Anderson, and M.S. Brown. 1979. Coated pits, coated vesicles and receptor-mediated endocytosis. *Nature* 279:679-685.
23. Goldstein, J.L., M.S. Brown, R.G.W. Anderson, D.W. Russell, and W.J. Schneider. 1985. Receptor-mediated endocytosis: concepts emerging from the LDL receptor system. *Ann. Rev. Cell. Biol.* 1:1-39.
24. Brown, M.S., R.G.W. Anderson, and J.L. Goldstein. 1983. Recycling receptors: the round-trip itinerary of migrant membrane proteins. *Cell* 32:663-667.
25. Goldstein, J.L., and M.S. Brown. 1974. Binding and degradation of low density lipoproteins by cultured human fibroblasts: Comparison of cells from a normal subject and from a patient with homozygous familial hypercholesterolemia. *J. Biol. Chem.* 249:5153-5162.
26. Anderson, R.G.W., J.L. Goldstein, and M.S. Brown. 1976. Localization of low density lipoprotein receptors on plasma membrane of normal human fibroblasts and their absence in cells

from a familial hypercholesterolemia homocysteine.
Proc.Natl.Acad.Sci.USA 73:2434-2438.

27. Anderson,R.G.W., J.L.Goldstein, and M.S.Brown. 1977. A mutation that impairs the ability of lipoprotein receptors to localise in coated pits on the surface of human fibroblasts. *Nature* 270:695-699.

28. Roth,T.F., and K.R.Porter. 1964. Yolk protein uptake in the oocyte of the mosquito *Aedes aegypti* L. *J.Cell.Biol.* 20:313-332.

29. Steinman,R.M., I.S.Mellman, W.A.Muller, and Z.A.Chon. 1983. Endocytosis and the recycling of plasma membrane. *J.Cell.Biol.* 96:1-27.

30. Ashcom,J.D., S.E.Tiller, K.Dickerson, J.L.Cravens, W.Scott Argraves, and D.K.Strckland. 1990. The human alpha2-macroglobulin receptor: identification of a 420-kD cell surface glycoprotein specific for the activated conformation of alpha2-macroglobulin. *J.Cell.Biol.* 110:1041-1048.

31. Mekada,E., Y.Okada, and T.Uchida. 1988. Identification of diphtheria toxin receptor and a nonproteinous diphtheria toxin-binding molecule in Vero cell membrane. *J.Cell.Biol.* 107:511-519.

32. Pearse,B.M.F. 1975. Coated vesicles from pig brain: purification and biochemical characterization. *J.Mol.Biol.* 97:93-98.

33. Pearse,B.M. 1976. Clathrin: a unique protein associated with intracellular transfer of membrane by coated vesicles. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 73:1255-1259.

34. Hueser,J. 1980. Three-dimensional visualization of coated vesicle formation in fibroblasts. *J.Cell.Biol.* 84:560-583.

35. Schlossman,D.M., S.L.Schumid, W.A.Braell, and J.E.Rothman. 1984. An Enzyme that removes clathrin coats: purification of an uncoating ATPase. *J.Cell.Biol.* 99:723-733.

36. Goldstein,J.L., S.K.Basu, G.Y.Brunschede, M.S.Brown. 1976. Release of low density lipoprotein from its cell surface receptor sulfated glycosaminoglycans. *Cell* 7:85-95.

37. Dunn,W.A. A.L.Hubberd, and N.N.Aronson. 1980. Low temperature selectively inhibits fusion between pinocytotic vesicles and lysosomes during heterophagy of ¹²⁵I-asialofertuin by the perfused liver. *J.Biol.Chem.* 255:5971-5978.

38. Dautry-Varsat,A., A.Ciechanover, and H.Lodish. 1983. pH and the recycling of transferrin during receptor-mediated endocytosis. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 80:2258-2262.

39. Tycko,B., and F.R.Maxfield. 1982. Rapid acidification of endocytic vesicles containing alpha2-macroglobulin. *Cell.* 28:643-

651.

40. Pastan,I., M.Willingham, W.Anderson, and M.Gallo. 1977. Localization of serum derived alpha2-macroglobulin in cultured cells and decrease after moloney sarcoma virus transformation. *Cell* 12.:609-617.

41. Willingham,M.C., F.R.Maxfield, and I.H.Pastan. 1979. Alpha2-macroglobulin binding to the plasma membrane of cultured fibroblasts diffused binding followed by clustering in coated regions. *J.Cell.Biol.* 82:614-625.

42. Willingham,M.C., and I.Pastan. 1980. The receptosome:an intermediate organelle of receptor-mediated endocytosis in cultured fibroblasts. *Cell* 21:67-77.

43. Helenius,A., I.Mellman, D.Wall, and A.Hubbard. 1983. Endosome. *TIBS.* 8:245-250.

44. Geuze,H.J., J.W.Slot, and G.J.A.M.Strous. 1983. Intracellular site of asialoglycoprotein receptor-ligand uncoupling; double-label immunoelectron microscopy during receptor-mediated endocytosis. *Cell* 32:277-287.

45. Hopkins,C.R. 1983. Intracellular routing of transferrin and transferrin receptors in epidermoid carcinoma A431 cells. *Cell.* 35:321-330.

46. Hopkins,C.R., and I.S.Trowbridge. 1983. Internalization and processing of transferrin and the transferrin receptor in human carcinoma A431 cells. *J.Cell Biol.* 97:508-521.

47. Geuze,H.J., J.W.Slot, G.J.A.M.Strous, J.Peppard, K.von Figura, A.Hasilik, and A.L.Schwartz. 1984. Intracellular receptor sorting during endocytosis: comparative immunoelectron microscopy of multiple receptors in rat liver. *Cell* 37:195-204.

48. Stoorvogel,W., H.J.Geuze, J.M.Griffith, and G.J.Strous. 1988. The pathways of endocytosed transferrin and secretory protein are connected in the trans-golgi reticulum. *J.Cell.Biol.* 106:1821-1829.

49. Willingham,M.C., J.A.Hanover, R.B.Dickson, and I.Pastan. 1984. Morphologic characterization of the pathway of transferrin endocytosis and recycling in human KB cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 81:175-179.

50. Willingham,M.C., H.T.Haigler, D.J.P.FitzGerald, M.G.Gallo, A.V.Rutherford, and I.Pastan. 1983. The morphologic pathway of binding and internalization of epidermal growth factor in cultured cells: studies on A431, KB, 3T3 cells using multiple methods of labeling. *Exp.Cell.Res.* 146:163-175.

51. van Deurs,B., K.Sadvig, O.W.Petersen, S.Olsnes, K.Simons, and G.Griffiths. 1988. Estimation of the amount of internalized ricin

that reaches the trans-golgi network. *J.Cell.Biol.* 106:253-267.

52. Stoorvogel,W., H.J.Geuze, J.M.Griffith, A.L.Schwartz, and G.J.Strous. 1988. Relation between the intracellular pathways of the receptors for transferrin, asialoglycoprotein, and mannose 6-phosphate in human hepatoma cells. *J.Cell.Biol.* 108:2137-2148.

53. Zijderhand-Bleekemolen,J.E., A.L.Schwartz, J.W.Slot, J.L.Strous, and H.J.Geuze. 1987. Ligand- and weak base-induced redistribution of asialoglycoprotein receptors in hepatoma cells. *J.Cell.Biol.* 104:1648-1654.

54. Lewis,W.H. 1931. Pinocytosis. *Bull.Johnes Hopkins Hosp.* 49:17-27.

55. Straus,W. 1964. Cytochemical observation on the relationship between lysosomes and Phagosomes in kidney and liver by combined staining for acid phosphatase and intravenously injected horseradish peroxidase. *J.Cell.Biol.* 20:497-507.

56. Wikswo,M.A., and R.R.Novales. 1969. The effect of colchicine on migration of pigment granules in the melanophores of *fundulus heteroclitus*. *Biol.Bull.* 137:228-237.

57. Bergen,L.G., and G.G.Borisy. 1980. Head-to-tail polymerization of microtubules in vitro. Electron microscope analysis of seeded assembly. *J.Cell.Biol.* 84:141-150.

58. Osborn,M., and K.Weber. 1977. The display of microtubules in transformed cells. *Cell* 12:561-571

59. Freed,J.J., and M.M.Lebowitz. 1970. The association of a class of saltatory movements with microtubules in cultured cells. *J.Cell.Biol.* 45:334-354.

60. Ostlund,Jr.R.E., B.Pfleger, and G.Schonfeld. 1979. Role of microtubules in low density lipoprotein processing by cultured cells. *J.Clin.Invest.* 63:75-84.

61. Kolset,S.O., H.Tolleshaug, and T.Berg. 1979. The effects of colchicine and cytochalasin B on uptake and degradation of asialoglycoproteins in isolated rat hepatocytes. *Exp.Cell Res.* 122:159-167.

62. Grind,B., and P.O.Seglen. 1981. Role of microtubuli in lysosomal degradation of endogeneous and exogenous protein in isolated rat hepatocytes. *Hoppe-Seyler's Z.Physiol.Chem.* 362:549-556.

63. Oka,J.A., and P.H.Weigel. 1983. Microtubule-depolymerizing agents inhibit asialo-orsomucoid delivery to lysosomes but not its endocytosis in isolated rat hepatocytes. *Biochim.Biophys.Acta.* 763:368-376.

64. Brown,K.D., M.Friedkin, and E.Rozengurt. 1980. Colchicine

inhibits epidermal growth factor degradation in 3T3 cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 77:480-484.

65. Willingham,M.C., and I.Pastan. 1978. The visualization of fluorescent proteins in living cells by video intensification microscopy (VIM). *Cell.* 13:501-507.

66. Herman,B. and D.F.Albertini. 1984. Time-lapse video image intensification analysis of cytoplasmic organelle movements during endosome translocation. *J.Cell.Biol.* 98:565-576.

67. Aisen,P., and I.Listowsky. 1980. Iron transport and storage proteins. *Ann.Rev.Biochem.* 49:357-393

68. Lee,J.C. D.J.Field, and L.L.Y.Lee. 1980. Effect of nocodazole on structures of calf brain tubulin. *Biochemistry* 19:6209-6215.

69. Enns,C.A., J.W.Larrick, H.Suomalainen, J.Schroder, and H.H.Sussman. 1983. Co-migration and internalization of transferrin and its receptor on K562 cells. *J.Cell.Biol.* 97:579-585.

70. Nakane,P.K., and A.Kawaoi. 1974. Peroxidase-labeled antibody a new method of conjugation. *J.Histochem.Cytochem.* 22:1084-1091.

71. Laemmli,U.K. Cleavage of structural proteins during assembly of the head of the bacteriophage T4. 1970. *Nature* 227:680-685.

72. Sibille,J.-C., J.-N.Octabe,, Y.-J.Schneider, R.R.Crichton, and A.Trouet. 1986. Subcellular localization of transferrin protein and iron in the perfused rat liver. Effect of Triton WR 1339, digitonin and temperature. *Eur.J.Biochem.* 155:47-55.

73. Stanley,J.R., P.Hawley-Nelson, S.H.Yuspa, E.M.Shavach, and S.I.Katz. 1981. Characterization of bullous pemphigoid antigen: a unique basement membrane protein of stratified squamous epithelia. *Cell.* 24:897-903.

74. Rogalski,A., and S.J.Singer. 1984. Association of elements of golgi apparatus with microtubules. *J.Cell.Biol.* 99:1092-1100.

75. Pagano,R.E., M.A.Sepanski, and O.C.Martin. 1989. Molecular trapping of a fluorescent ceramide analogue at the Golgi apparatus of fixed cells: interaction with endogenous lipids provides a trans-Golgi marker for both light and electron microscopy. *J.Cell.Biol.* 109:2076-2079.

76. Pagano,R.E. 1988. What is the fate of diacylglycerol produced at the Golgi apparatus. *TIBS* 13:202-205

77. van Meer,G. E.H.K.Stelzer, R.W.Wijnaendts-van-Resandt, and K.Simons. 1987. Sorting of sphingolipids in epithelial (Madin-Darby canine kidney) cells. *J.Cell.Biol.* 105:1623-1635.

78. Octabe,J.-N., Y.-J.Schneider, R.R.Crichton, and A.Trouet.

1981. Transferrin uptake by cultured rat embryo fibroblasts. The influence of temperature and incubation time, subcellular distribution and short-term kinetic studies. *Eur.J.Biochem.* 115:611-618.

79. Dickson,R.D., J.A.Hanover, M.C.Willingham, and I.Pastan. 1983. Prelysosomal divergence of transferrin and epidermal growth factor during receptor-mediated endocytosis. *Biochemistry.* 22:5667-5674.

80. Stoorvogel,W., H.J.Geuze, and G.J.Strous. 1987. Sorting of endocytosed transferrin and asialoglycoprotein occurs immediately after internalization in HepG2 cells. *J.Cell.Biol.* 104:1261-1268.

81. Ciechanover,A., A.L.Schwartz, A.Dautry-Versat, and H.F.Lodish. 1983. Kinetics of internalization and recycling of transferrin and the transferrin receptor in human hepatoma cell line. Effect of lysosomotropic agents. *J.Biol.Chem.* 258:9681-9689.

82. Watts,C. 1985. Rapid endocytosis of the transferrin receptor in the absence of bound transferrin. *J.Cell.Biol.* 100:633-637.

83. Klausner,R.D., J.van Renswoude, G.Ashwell, C.Kempf, A.N.Schecter, A.Deang, and K.R.Bridges. 1983. Receptor-mediated endocytosis of transferrin in K562 cells. *J.Biol.Chem.* 258:4715-4724.

84. Ajioka,R.S., and J.Kaplan. 1986. Intracellular pools of transferrin receptors result from constitutive internalization of unoccupied receptors. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 83:6445-6449.

85. Hamilton,T.A., H.G.Wada, and H.H.Sussman. 1979. Identification of transferrin receptors on the surface of human cultured cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 76:6406-6410.

86. Karin,M., and B.Mintz. 1981. Receptor-mediated endocytosis of transferrin in developmentally totipotent mouse teratocarcinoma stem cells. *J.Biol.Chem.* 256:3245-3252.

87. Hunt,R.C., R.Ruffin, and Y.-S.Yang. 1984. Alterations in the transferrin receptor of human erythroleukemia cells after induction of hemoglobin synthesis. *J.Biol.Chem.* 9944-9952.

88. Hopkins,C.R. 1985. The appearance and internalization of transferrin receptors at margins of spreading human tumor cells. *Cell* 40:199-208.

89. Dabora,S.L., and M.P.Scheetz. 1988. The microtubules-dependent formation of a tubulovesicular network with characteristics of the ER from cultured cell extracts. *Cell* 54:27-35.

90. Swanson,J., A.Bushnell, and S.C.Silverstein. 1987. Tubular lysosome morphology and distribution within macrophages depend on

the integrity of cytoplasmic microtubules. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 84:1921-1925.

91. Klausner,R.D., G.Ashwell, J.van Renswoude, J.B.Harford, and K.R.Bridges. 1983. Binding of apotransferrin to K562 cells: explanation of the transferrin cycle. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 80:2263-2266.

92. van Renswoude,J., K.R.Bridges, J.B.Harford, and R.D.Klausner. 1982. Receptor-mediated endocytosis of transferrin and the uptake of Fe in K562 cells: Identification of a nonlysosomal acidic compartment. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 79:6186-6190.

93. Lamb,J.E., F.Ray, J.H.Ward, J.P.Kushner, and J.Kaplan. 1983. Internalization and subcellular localization of transferrin and transferrin receptors in Hela cells. *J.Cell.Biol.* 258:8751-8758.

94. Bakkeren,D.L., N.M.H.De Jeu-Jaspars, M.L.Kroos, and H.G.van Eijk. 1988. Characteristics of iron release from isolated heavy and light endosomes. *Int.J.Biochem.* 20:837-844.

95. Yamashiro,D.J., and F.R.Maxfield. 1987. Kinetics of endosome acidification in mutant and wild-type chinese hamster ovary cells. *J.Cell.Biol.* 105:2713-2721.

96. Yamashiro,D.J., and F.R.Maxfield. 1987. Acidification of morphologically distinct endosomes in mutant and wild-type chinese hamster ovary cells. *J.Cell.Biol.* 105:2723-2733.

97. Ajioka,R.S., and J.Kaplan. 1987. Characterization of endocytic compartments using the horseradish peroxidase-diaminobenzidine density sift technique. *J.Cell.Biol.* 104:77-85.

98. Wolkoff,A.W., R.D.Klausner, G.Ashwell, and J.Harford. 1984. Intracellular segregation of asialoglycoproteins and their receptor :a prelysosomal event subsequent to dissociation of the ligand-receptor complex. *J.Cell.Biol.* 98:375-381.

99. Iacopetta,B.J., and E.H.Morgan. 1983. The kinetics of transferrin endocytosis and iron uptake from transferrin in rabbit reticulocytes. *J.Biol.Chem.* 258:9108-9115.

100. Kaplan,A., And M.L.Neilsen. 1979. Analysis of macrophage surface receptors. *J.Cell.Biol.* 254:7329-7335.

101. Weigel,P.H., and J.A.Oka. 1981. Temperature dependent of endocytosis mediated by the asialoglycoprotein receptor in isolated rat hepatocytes. Evidence for two potential rate-limiting steps. *J.Biol.Chem.* 256:2615-2617.

102. Sipe,D.M., and R.F.Murphy. 1987. High-resolution kinetics of transferrin acidification in BALB/c 3T3 cells: exposure to pH6 followed by temperature-sensitive alkalization during recycling. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 84:7119-7123.

103. Diaz,R., L.Mayorga, and P.Stahl. 1988. *In vitro* fusion of endosomes following receptor-mediated endocytosis. *J.Biol.Chem.* 263:6093-6100.
104. Luby-Phelips,K., P.E.Castle, D.L.Taylor, and F.Laani. 1987. Hindered diffusion of inert tracer particles in the cytoplasm of mouse 3T3 cells. *proc.Natl.Acad.Sci.USA* 84:4910-4913.
105. De Brabander,M., R.Nuydens, H.Geerts, and C.R.Hopkins. 1988. Dynamic behavior of the transferrin receptor following in living epidermoid carcinoma (A431) cells with nanobid microscopy. *Cell Motil.Cytoskeleton.* 9:30-47.
106. Vale,R.D. 1987. Intracellular transport using microtubule-based motors. *Ann.Rev.Cell.Biol.* 3:347-378.
107. Pasckal,B.M., H.S.Schptner, and R.B.Vallee. 1987. MAP1C is a microtubule-activated ATPase which translocates microtubules in vitro and has dynein-like properties. *J.Cell.Biol.* 105:1273-1282.
108. Pasckal,B.M., and R.B.Vallee. 1987. Retrograde transport by the microtubule-associated protein MAP1C. *Nature* 330:672-674.
109. Vale,R.D., B.J.Schnapp, T.Mitchison, E.Steuer, T.S.Reese, and M.Sheetz. 1985. Different axoplasmic proteins generate movement in opposite directions along microtubules in vitro. *Cell* 43:623-632.
110. Vale,R.D., T.S.Reese, and M.Sheetz. 1985. Identification of novel force-generating protein, kinesin, involved in microtubule-based motility. *Cell* 42:39-50.
111. Soltys,B.J., and G.G.Borisy. 1985. Polymerization of tubulin in vivo: direct evidence for assembly onto microtubule ends and from centrosomes. *J.Cell.Biol.* 100:1682-1687.
112. Murofushi,H., A.Ikai, K.Okuhara, S.Kotani, H.Aizawa, K.Kumakura, and H.Sakai. 1988. Purification and characterization of kinesin from bovine adrenal medulla. *J.Biol.Chem.* 263:12744-12750.
113. Schroer,T.A.,E.R.Steuer, and M.P.Sheetz. 1988. Cytoplasmic dynein is a minus end-directed motor for membranous organelles. *Cell* 56:937-946.
114. Scholey,J.M., M.E.Porter, P.M.Grissom, and J.R.McIntosh. 1985. Identification of kinesin in sea urchin eggs, and evidence for its localization in the mitotic spindle. *Nature* 318:483-486.