Regulatory Events in Glycoprotein Endocytosis: Tyrosine Kinase-receptor Interactions¹

糖タンパク質の細胞内取り込みにおける制御:
チロシンキナーゼ・レセプター間の相互作用

*Fallon, R.J.; Danaher, M.; and Saxena, A.

Department of Pediatrics, St. Louis University School of Medicine, St. Louis, Missouri 63104, USA, FAX: 1-314-268-6411

Key Words: *endocytosis, glycoprotein, receptor, tyrosine-kinase*

Abstract

Specialized plasma membrane domains called coated pits are key regulatory sites in glycoprotein biology. There, glycoproteins destined for endocytosis or receptors which are themselves glycoproteins are clustered and processed for internalization. The structural components and the regulatory mechanisms active at coated pits are the subject of intense investigation. Studies with the asialoglycoprotein (ASGP) receptor have elucidated many of these mechanisms, such as a sorting signal responsible for rapid internalization and the intracellular compartments involved in receptor trafficking. Recent data with this receptor suggest that tyrosine kinase activity specifically influences the rate of receptor internalization. A model of glycoprotein endocytosis is thus suggested where, in addition to their role in signal transduction, tyrosine kinases function in the regulation of the early endocytic pathway.

要約

コーテッドピットと呼ばれる特殊化した形質膜のドメインが、糖タンパク質の生物学において重要な制御部分である。ここでは糖タンパク質は、細胞内に取り込まれるかあるいはそれ自身が糖タンパク質であるレセプターに結合するかが決定される。糖タンパク質は、細胞内への内部化のために塊を形成して集合しプロセッシングを受ける。コーテッドピットに働きかける構造的な構成成分と制御機構は、競争の激しい研究対象となっている。アシアロ糖タンパク質(ASGP)のレセプターに関する研究は、これらの機構の多くを明らかにしてきた。例えば、迅速な細胞内への内部化に関与している選別シグナルやレセプターの往来に関与している細胞内の区画などについてである。このレセプターに関する最近の知見では、チロシンキナーゼの活性が特にレセプターの細胞内内部化速度に影響を与えることが示唆されている。したがって、糖タンパク質の細胞内取り込みのモデルにおいて、チロシンキナーゼはシグナル伝達に関する役割だけでなく、初期の細胞内取り込み経路の制御においても機能していることが示唆された。

A. Introduction

The endocytosis of glycoproteins and cell surface receptors from the surface of epithelial cells is increasingly recognized as an important determinant of receptor activity and of the expression of glycoproteins on the plasma membrane. The steady-state expression of receptors on the cell surface results from many factors such as protein synthesis and degradation, but is most critically and rapidly regulated by removal of the receptor molecules from the cell surface by endocytosis. The rate-limiting step in endocytosis occurs at specialized membrane domains called coated pits and is referred to as internalization. In this process, receptors cluster at clathrin-coated regions of the plasma membrane and are packaged into coated vesicles for transport to intracellular organelles. The structural features and regulatory mechanisms involved in these steps are becoming clarified. These include clathrin and other membrane coat proteins, GTP-binding proteins, protein sorting signals, lipid modification, and others.

A. はじめに

上皮細胞の表面からの糖タンパク質と細胞表面のレセプターの細胞内取り込みは、形質膜における糖タンパク質の発現とレセプターの活性の重要な決定因子であることが次第に認識されつつある。細胞表面のレセプターの定常状態における発現はタンパク質の合成や分解といった多くの因子の結果であるが、細胞内取り込みによって細胞表面からレセプター分子を取り除くことによって非常に厳密で素早い制御が行われている。細胞内取り込みにおける律速段階はコーテッドピットと呼ばれる特殊化した形質膜のドメインを形成する段階であり、細胞内への内部化(internalization)と呼ばれている。この段階において、レセプターは形質膜上のクラスリン被覆領域に塊を形成し、細胞内小器官に輸送されるために被覆小胞のなかに詰め込まれる。これらの過程での構造上の特徴や制御機構が明らかになってきた。これらの段階には、クラスリンと他の膜被覆タンパク質、GTP結合タンパク質、タンパク質選別シグナル、脂質の修飾、その他が含まれている。

¹This work was supported by grants from the National Institutes of Health, the March of Dimes, and the Lauri Strauss Leukemia Foundation.

*to whom correspondence should be addressed.

Recent data from this laboratory concerning the asialoglycoprotein (ASGP) receptor of hepatocytes have suggested novel mechanisms for regulation of endocytosis at coated pits. Experiments with pharmacologic inhibitors have demonstrated that tyrosine kinase activity regulates the rate of ASGP receptor internalization. The action of tyrosine kinases on receptor targeting appears to occur early in the endocytic pathway. Finally, we have evidence that a tyrosine kinase is physically associated with the ASGP receptor. The molecular identification of this kinase and the understanding of its interaction with the receptor from a structural and mechanistic basis remain to be defined.

In summary, glycoprotein biology is critically regulated by events at coated pits. One of these mechanisms is tyrosine kinase activation. These results postulate a role for tyrosine kinases both in the signal transduction and protein targeting pathways.

B. Regulatory and Structural Components of Coated Pits

Rapid internalization of receptors requires sequestration and clustering in coated pits, which is mediated by the interaction between the receptor cytoplasmic domain and structural and regulatory proteins of the coated pits. These components have been identified in studies on the ASGP and other receptors that cluster in coated pits. First, we will briefly review this information. Several reviews on the regulation of endocytosis and coated pit structure have recently been published (1-3).

B-1. Structure and Function of the Clathrin Coat

The efficient transport of transmembrane receptor proteins residing at the plasma membrane or *trans*-Golgi network requires them to cluster in pits coated with specialized molecules called clathrin. These structures, once loaded with receptors, pinch-off into cytoplasm to form clathrin-coated vesicles. The clathrin coat is then stripped, followed by delivery of the contents of the vesicles to their destined intracellular compartments. The purification of coated vesicles allowed the identification of two distinct structural units, the clathrin triskelions and adaptor proteins. Clathrin is a three legged structure or triskelion composed of two different polypeptides (4). A single triskelion contains three heavy chains (180 kDa) and three light chains. Based on the polypeptide sequences, heavy and light chains are presumed to interact with each other in the entire proximal section of the heavy chain and the middle one third of the light chain in α -helical configuration (5). Each triskelion interacts with three other triskelions to form a polyhedral lattice commonly referred to as a clathrin cage. Positioning of the light chains along the edges of the lattice enables them to communicate with cytosolic factors, implying a regulatory role in the clathrin assembly-disassembly process.

Another class of proteins found in the clathrin coat are adaptor proteins (6). They attach to the interior of the clathrin

我々の研究室における肝細胞のアシアロ糖タンパク質 (ASGP) レセプターに関する最近の研究から、コーテッドピットでの細胞内取り込みの制御に関する新しい機構が提案された。薬理的な阻害剤を用いた実験から、チロシンキナーゼの活性がASGPレセプターの内部化速度を制御していることが示された。レセプターが目標にたどりつく送達機構に対するチロシンキナーゼの働きは細胞内取り込み過程の初期に起こるようである。最終的に我々はチロシンキナーゼが物理的にASGPレセプターと会合しているという証拠をつかんだ。このキナーゼの分子的同定およびレセプターとの相互作用の構造面や機械的な面からの理解はまだこれからである。

まとめると糖タンパク質の生物学はコーテッドピットで展開される様々なでき事によって厳密に制御されている。これらの機構のひとつはチロシンキナーゼの活性化である。これらの結果はチロシンキナーゼのシグナル伝達とタンパク質の送達経路の両方における役割を仮定している。

B. コーテッドピットの制御成分と構成成分

レセプターの迅速な細胞内への内部化にはコーテッドピットへ隔離され塊となる必要がある。これらは、レセプターの細胞内ドメインとコーテッドピットの制御タンパク質および構成タンパク質との相互作用によって引き起こされる。これらの構成成分はコーテッドピットで塊を形成するASGPレセプターや他のレセプターに関する研究で同定されている。まず最初に、われわれはこの情報について簡単に概説しようと思う。細胞内取り込みの制御とコーテッドピットの構造に関するいくつかの総説が最近出版された(1-3)。

B-1. クラスリン被膜の構造と機能

形質膜あるいはトランスゴルジネットワークにある膜貫通レセプタータンパク質を効率よく輸送するにはクラスリンと呼ばれる特殊化した分子に包まれたピットの中にタンパク質を集合体として詰め込む必要がある。レセプターとともにひとたびこのような構造物ができると細胞質中にひき込まれてクラスリン被覆小胞を形成する。このクラスリン被覆はその後はがれて、小胞の内容物が決められた細胞内区画へ届けられる。クラスリン被覆小胞の精製によって二つの異なる構造ユニットすなわちクラスリントリスケリオンとアダプタータンパク質が同定された。クラスリンは二つの異なるポリペプチドで構成されている三本足構造すなわちトリスケリオンである(4)。一個のトリスケリオンは三本の重鎖ポリペプチド鎖(180 kDa)と三本の軽鎖ポリペプチド鎖を含んでいる。ポリペプチドの一次配列より、重鎖と軽鎖は重鎖の中央部分と α ヘリックス構造を有する軽鎖の3分の1にあたる中央部分がお互いに相互作用すると考えられている(5)。各トリスケリオンは他の三つと相互作用し、一般的にクラスリンかご構造と呼ばれる(六角形と五角形を組み合わせた形に並ぶ)多角形の格子構造を形成している。軽鎖はこの格子の縁に沿って配置されているので、クラスリンの会合-解離過程の調節作用に関与する細胞質因子とコミュニケーションすることができる。

クラスリン被覆中に発見された別のクラスのタンパク質はアダプタータンパク質である(6)。これらのタンパク質はクラス

lattice and communicate with receptor tails. Two distinct types of adaptor proteins, AP1 and AP2 have been identified. Based on immunofluorescence studies, AP1 was found to be associated with the clathrin coat derived from Golgi compartment, whereas AP2 colocalized with plasma membrane associated coated pits (7). AP1 consists of β and γ adaptins of approximately 100-110 kDa molecular weight and two smaller subunits weighing approximately 47 kDa and 19 kDa. AP2 is composed of two large subunits α and β of ~ 100-110 kDa, and two small subunits having a molecular weight of 50 kDa and 17 kDa. Adaptors play a key role in clathrin assembly, which requires high affinity interactions between adaptors and clathrin chains (8). Removal of adaptors by protease digestion in clathrin stripped vesicle membranes completely abolishes clathrin association with the membrane (9).

Adaptors also interact with the cytoplasmic domains of membrane receptors recruited to coated pits. Pearse reported experiments using the cytoplasmic tail of receptors in an affinity matrix (10). AP2 complexes were retained when the cytoplasmic tail of the plasma membrane resident LDL receptor was used as an affinity matrix. When the cytoplasmic tail of CI-M6P (cation-independent mannose-6-phosphate) receptor, found in both Golgi and plasma membranes, was used as affinity matrix, both AP1 and AP2 complexes bound to CI-M6P tail. However, AP1 and AP2 occupied different sites on the receptor tail (11). The consequence and specificity of these interactions needs to be further defined.

B-2. Receptor Sorting Signals: Amino Acid Motifs Determine Intracellular Sorting

It has become clear that **sorting signals** found in a protein's cytoplasmic domain convey essential information directing the targeting of the newly formed protein to its eventual destination (12). The sorting signals are short linear amino acid domains which target the nascent protein to ER, lysosome, nucleus, mitochondria, or peroxisome. A subclass of these signals mediate rapid endocytosis by being responsible for the clustering of plasma membrane proteins at coated pits. Table I presents several examples of rapid internalization signals that have been defined. This structural information was obtained largely by site-directed mutagenesis of cloned receptor cDNA, and by the complementary approach of translocation of this structural element to another protein that did not participate in endocytosis. Thus these signals are both necessary and sufficient for rapid internalization. The information in the Table illustrates several key features concerning these internalization signals. They are found both in receptors and in proteins which are not receptors (CD3, glucose transporter) but which reside at the cell surface and which are capable of entering coated pits. They have been demonstrated both on receptors which participate in constitutive as well as nonconstitutive (*i.e.*, regulated) internalization. The signals are primarily tyrosine-based, al-

リン格子構造の内側に結合しており、レセプターの末端とコミュニケーションすることができる。二種の異なるアダプタータンパク質すなわちAP-1とAP-2がいままでに同定されている。免疫蛍光を用いた実験より、AP-1はゴルジ画分由来のクラスリン被覆と会合しているのに対し、AP-2は形質膜に会合したコートドピットと共存していることがわかった(7)。AP-1は分子量約100-110 kDaの β および γ -アダプチンとより小さい分子量約47 kDaと19 kDaの二つのサブユニットから成っている。AP-2は二つの大きな分子量約100-110 kDaのサブユニット α および β と小さい分子量約50 kDaと17 kDaの二つのサブユニットから成っている。アダプタータンパク質はクラスリン会合において重要な役割を果たしており、この会合にはアダプターとクラスリン鎖の間の非常に強い相互親和作用が必要である(8)。小胞膜からはがされたクラスリンにおいてプロテアーゼ消化によりクラスリンアダプターが除去されると、クラスリンと膜の会合能は完全に失われてしまう。

アダプターはまたコートドピットに引き寄せられた膜レセプターの細胞質ドメインと相互作用する。Pearceは親和性マトリックスとしてレセプターの細胞質末端部分を用いた実験を報告している(10)。形質膜に存在するLDLレセプターの細胞質末端部分を親和性マトリックスとして用いた時、AP-2複合体は保持された。ゴルジと形質膜の両方に存在するCI-M6P(カチオン非依存性マンノース6リン酸)レセプターの細胞質末端を親和性マトリックスとして用いた時、AP-1複合体とAP-2複体の両方がCI-M6Pレセプター末端に結合した。しかし、AP-1とAP-2はレセプター末端上のそれぞれ別の位置で結合していた(11)。これらの相互作用の因果関係と特異性はさらなる検討が必要である。

B-2. レセプター選別シグナル: アミノ酸モチーフは細胞内選別機構を決定する

タンパク質の細胞質ドメインにおいて見つかった選別シグナルは、新しく作られたタンパク質の最終的な行き先を方向づける必須の情報を伝えていることが明らかになってきた(12)。この選別シグナルは短い直線状のアミノ酸ドメインで、生成期のタンパク質をER、リソゾーム、核、ミトコンドリア、あるいはペルオキシゾームに方向づけて持っていく。これらのシグナルのサブクラスのひとつは、コートドピットにおいて形質膜タンパク質の集合に関与することによって迅速な細胞内取り込みを引き起こす。表Iにこれまでに同定されている迅速な内部化シグナルの例をいくつか示した。これらの構造に関する情報は、ほとんどがクローン化されたレセプターcDNAの部位特異的変異技術によってあるいは細胞内取り込みに関係のない別のタンパク質にこの構造エレメントを移植するという相補的なアプローチによって得られた。このように、これらのシグナルは迅速な内部化反応にとって必要かつ十分である。表中の情報は、これらの内部化シグナルに関していくつかの重要な特徴を示している。そのシグナルはレセプターおよびレセプターではないが細胞表面に存在しておりコートドピットに入る可能性があるタンパク質(CD3、グルコース輸送体)の両方に見い出されている。また、非構成的な(すなわち制御された)細胞内への内部化はもちろん構成的な内部化に関与しているレセプターにおいても示されている。このシグナルは最初チロシンがもたっている

though, there are examples of rapid internalization signals which contain phenylalanine rather than tyrosine. An example of this is the glucose transporter, as shown in the Table. It is important to point out, however, that insertion of a single tyrosine in a protein's cytoplasmic domain is not sufficient to produce rapid internalization (13). The surrounding structural context appears to be of major importance in determining the rate of clustering in coated pits. In fact, analysis of the higher order structure of these internalization motifs with nuclear magnetic resonance (NMR) or computer modeling have indicated that they possess a common structural feature known as a tight or beta-turn (14). Further correlation between the structural modeling studies and the biological behavior of these domains was obtained when it was shown that amino acid substitutions which disrupt this beta-turn structure produced a slowly-internalizing receptor when expressed *in vivo*.

Recent studies with several proteins including the CD3 molecule and the mannose-6-phosphate receptor have indicated that a leucine-leucine motif can also function as a coated pit/internalization signal (15-16). The NMR structure of these peptide regions has not been reported. This information may provide insights into the structures that interact with these rapid internalization domains. However it remains possible that two or more parallel rapid internalization pathways exist in cells, each possessing its own sorting signals and signal recognition apparatus.

B-3. G Proteins and Endocytic Sorting

Vesicle trafficking in all intracellular locations, including the endocytic pathway, is regulated by GTP-binding proteins (G proteins) (17-19). Proteins of this class which have been implicated in protein targeting include the "classical" or heterotrimeric G proteins, dynamin-like proteins, and the small

たが、迅速な内部化シグナルの例ではチロシンよりもむしろフェニルアラニンを含んでいる。一例としては、表の中に示したようにグルコース輸送体がある。しかしながら、タンパク質の細胞質ドメインに一個のチロシンを挿入しても迅速な内部化を引き起こすには十分ではないということが指摘されている(13)。周辺の構造的な関係はコーテッドピットへの集合の速度を決定する上でかなり重要であると思われる。実際、核磁気共鳴(NMR)やコンピューターモデリングによるこれらの内部化モチーフの高次元構造解析から、これらのモチーフは β -ターンとして知られる共通の構造上の特徴を持っていることが示された。さらに、この β -ターン構造を壊すようなアミノ酸の置換を *in vivo* で発現させたとき、ゆっくりと内部化の起こるレセプターが生じたことから、これらのドメインの構造上のモデリングの研究と生物学的なふるまいとの関係が得られた。

CD3分子やマンノース-6-リン酸レセプターを含むいくつかのタンパク質に関する最近の研究では、ロイシン-ロイシンモチーフもコーテッドピット/内部化シグナルとして機能することを示している(15-16)。これらのペプチド部分のNMR解析による構造はまだ報告されていない。この情報はおそらくこれらの迅速な内部化シグナルと相互作用する構造について洞察を与えるかもしれない。しかしながら、細胞内に二つあるいはそれ以上の並行した迅速な内部化経路があって、それぞれの経路がそれぞれ自身の選別シグナルとシグナル認識装置を持っている可能性も残されている。

B-3. Gタンパク質と細胞内取込みの選別

細胞内取り込み経路を含む全ての細胞内での小胞の出入りは、GTP結合タンパク質(Gタンパク質)によって制御されている(17-19)。タンパク質の送達に関わっているこのクラスのタンパク質には、"古典的"ともいえるヘテロ3量体Gタンパク質、ダイナミン様タンパク質およびプロトオンコジーンrasに相同性をも

Table I. Sorting signals for rapid internalization

Receptor		Internalization signal
ASGP	human rat	<u>Y</u> QDL <u>Y</u> QDF
Low density lipoprotein		NPV <u>Y</u>
Transferrin		<u>Y</u> TRF
Polymeric immunoglobulin		<u>Y</u> SAF
Mannose-6-phosphate, CI		<u>Y</u> K <u>Y</u> SKV
Insulin		NPE <u>Y</u>
Epidermal growth factor		NPV <u>Y</u>
CD3		<u>Y</u> QPL; LL
Glucose transporter (GLUT-4)		FQQ <u>I</u>

molecular weight G proteins homologous to the proto-oncogene ras. The ras superfamily includes rab proteins, of which thirty individual members have been identified by DNA cloning. It also includes rac and rho, which are involved in cytoskeletal organization, and the ADP ribosylation factor (ARF) family.

Though initially described for their role in signal transduction, oncogenesis, and ER-to-Golgi transport, it is now clear that several G proteins function in the endocytic pathway as well. These include dynamin, rab5 and the heterotrimeric protein G_i (20-22). These G proteins are membrane-associated by virtue of myristic- or palmitic-acid modifications of the polypeptide. The structural diversity in the rab family illustrates an important principle of protein targeting mechanisms. The members of this family are specifically targeted to an individual pathway (for example ER to Golgi or endocytosis) by means of a sorting signal located within the hypervariable C-terminal domain (23). There is overlap and redundancy, however, so that more than one rab protein may have activity in a particular trafficking step.

The function of G proteins at sites of protein targeting appears to be the recruitment of receptors and factors needed for packaging into transport vesicles. These mechanisms have been most clearly defined in Golgi trafficking. G proteins alternate between an inactive and an active state. Binding of GTP drives this equilibrium to the active conformation and facilitates the aggregation of coat proteins and packaging factors. Small molecular weight G proteins from species as diverse as yeast and man are able to substitute for their homologs in other protein transport reactions, but as mentioned, their action appears to be confined to a specific pathway. In addition to the yeast mutants and knockout experiments in eukaryotic organisms that have elucidated this specificity, the recent development of semi-intact, permeabilized cell systems for analysis of receptor endocytosis should help define the role of individual G proteins in this process (24).

B-4. Role of Palmitic Acid in Endocytosis

Many membrane receptors have been found to be covalently linked to palmitate. In majority of cases palmitate is linked *via* a labile thioester bond to cysteine in the cytoplasmic tail of receptors. Transferrin receptor, β_2 -adrenergic receptor, and myeloid and lymphocyte cell adhesion receptor are modified in this way (25-27). Since the discovery of receptor palmitoylation, studies have been performed to understand the significance of this posttranslational modification. In one study the role of palmitate was investigated in transferrin receptor endocytosis (28). Mutations of palmitate attachment residue increased the internalization rate of the receptor, which behaved normally in recycling back to the plasma membrane. Thus palmitate attachment to receptors appears to slow down their internalization rate.

つ低分子量Gタンパク質が含まれている。rasのスーパーファミリーにはrabも含まれており、DNAクローニングによってこれまでに30の異なるメンバーが同定されている。このスーパーファミリーにはracやrhoのような細胞骨格機構やADPリボシル化因子(ARF)のファミリーに属しているものも含まれている。

最初、Gタンパク質の役割はシグナル伝達、発癌、およびERからゴルジへの輸送において述べられていたが、現在ではいくつかのGタンパク質が細胞内取り込み経路においても同様に機能を果たしていることが明らかである。これにはダイナミン、rab5およびヘテロ3量体タンパク質Gsが含まれている(20-22)。これらのGタンパク質はポリペプチドのミリスチン酸あるいはパルミチン酸修飾によって膜に結合している。rabファミリーに見られる構造の多様性はタンパク質の送達機構の重要な原理を示している。このファミリーのメンバーは高変異C末端ドメイン内に存在している選別シグナルによって個々の経路(例えばERからゴルジへ、あるいは細胞内への取り込み)へと振り分けられる(23)。しかし、重複や余剰もあるので、いくつかのrabタンパク質が一つの特別な送達段階において活性を持っていることもある。

タンパク質の送達部位におけるGタンパク質の機能は輸送小胞への詰め込みに必要な因子とレセプターをその場所に補充することにあると思われる。これらの機構はゴルジでの小胞輸送において最も明確にされている。Gタンパク質は非活性と活性の状態に変化する。GTPの結合はこの平衡を活性型へと傾け、被覆タンパク質と詰め込みに必要な因子の凝集を促進する。酵母やヒトなど様々な種に由来する低分子量Gタンパク質は、他のタンパク質輸送反応において相同する低分子量Gタンパク質と置き換えることができる。しかし前に述べたように、このタンパク質の作用は特別な経路に限られているようである。この特異性を解明した酵母の変異体の実験と真核生物のノックアウト実験に加えて、最近のレセプターの細胞内取り込みを解析するための半無傷のつまり形質膜透過が自由な細胞系の開発によりこの過程における個々のGタンパク質の役割が明確になるとと思われる(24)。

B-4. 細胞内取り込みにおけるパルミチン酸の役割

多くの膜レセプターはパルミチン酸に共有的に結合していることがこれまでにわかっている。大部分においてパルミチン酸はレセプターの細胞質側の末端に存在するシステインに不安定なチオエステル結合を介してくっついている。トランスフェリンレセプター、 β_2 -アドレナリンレセプター、骨髄系およびリンパ球系の細胞の接着レセプターはこの形式で修飾されている(25-27)。レセプターのパルミトイル化が発見されてから、この転写後修飾の意義を探る研究が行われてきた。ある研究でトランスフェリンレセプターの細胞内取り込みにおけるパルミチン酸の役割が調べられた(28)。パルミチン酸が結合する残基の変異によってこのレセプターの細胞内取り込みの速度が増加し、また取り込まれたレセプターは正常に働き形質膜に再びもどってきた。つまり、レセプターへのパルミチン酸の結合はレセプターの細胞内への内部化速度を遅くするようである。

B-5. Tyrosine Kinases and Endocytosis

B-5-a. Growth Factor Receptors

A structural element of tyrosine kinase-containing growth factor receptors (*e.g.*, epidermal growth factor receptor, insulin receptor) which has long been known to be present at coated pits, but which until recently was felt to be involved solely in intracellular signal transduction, is the tyrosine kinase activity itself. In this and the following sections, we will review data that suggest that this activity also plays a major role in the regulation of endocytosis. Growth factor receptors respond to ligand binding with receptor dimerization, tyrosine kinase activation, receptor autophosphorylation, and clustering in coated pits followed by internalization. Work from other laboratories with kinase-negative mutants has shown that a receptor's catalytic activity modulates both signal transduction as well as internalization. The EGF receptor lysine-to-methionine 721 mutation is unable to bind ATP and has no tyrosine kinase activity. This receptor mutant is able to bind ligand, but transmits no signal and (importantly) is endocytosed at a slow rate (29-30). In studies with the insulin receptor, Carpentier and colleagues defined in greater detail the site of abrogation of receptor trafficking (31). Mutations of the insulin receptor kinase activity were examined and found to cause deficient internalization. The process of sequestration from random locations on the plasma membrane into coated pits was blocked. This early step in receptor internalization thus appears to be a critical target for tyrosine kinase activity.

In similar studies, tyrosine kinase activity was also shown to regulate the endocytosis of the transforming growth factor alpha precursor (32). This molecule, though it contains a short cytoplasmic domain, was found to be associated with tyrosine kinase activity and to undergo rapid endocytosis. Truncation of this molecule using molecular techniques resulted in a decrease in tyrosine kinase association with the precursor and a corresponding decrease in the endocytic rate.

Tyrosine kinase activity was also shown to have a role in the clustering of another receptor which lacks an intrinsic tyrosine kinase domain. The acetylcholine receptor undergoes a well-described clustering reaction on the surface of neurons (33). This step is blocked by the addition of tyrosine kinase inhibitors genistein and tyrphostin.

These findings from the literature suggest that tyrosine kinases are located at coated pits and are associated with receptors during endocytosis. The data with tyrosine kinase inhibitors further suggest that catalytic activity of the kinase is required during the early events in endocytosis.

B-5-b. The ASGP Receptor: Tyrosine Kinase Regulation Of Constitutive Receptor Endocytosis

Based on the data presented above, we investigated the hypothesis that tyrosine kinase activity regulates the endocytic rate of the ASGP receptor. This molecule participates in consti-

B-5-a. チロシンキナーゼと細胞内取り込み

B-5-a. 成長因子のレセプター

チロシンキナーゼ活性を持つ成長因子のレセプター(例えば上皮成長因子(EGF)レセプター、インシュリンレセプター)の構造エレメントが、コートドピットに存在していることが以前から知られ、最近までこの構造エレメントは細胞内情報伝達にのみ関係があると思われていた。しかしこの構造エレメントこそチロシンキナーゼ活性そのものなのである。本セクションと次に続くいくつかのセクションで、この活性が細胞内取り込みの制御においても主要な役割を果たしていることを示唆する結果を概説する。成長因子のレセプターはリガンドの結合に対応してレセプターの二量体形成、チロシンキナーゼの活性化、レセプターの自己リン酸化、そしてコートドピット内への集合が起こり、その後細胞内への内部化が起こる。他の研究室で行われたキナーゼを欠損した変異体を用いた研究より、レセプターの触媒活性が情報伝達と同様に内部化も調節していることが示された。EGFレセプターにおいて721番目のリジンをメチオニンに置換した変異体は、ATPが結合できずチロシンキナーゼ活性も持たない。このレセプター変異体は、リガンドと結合することができるが、情報を伝えないし、そして(重要なことに)遅い速度で取り込まれる(29-30)。インシュリンレセプターに関する研究では、Carpentierと共同研究者によってレセプターの往来をなくす部位が非常に詳細に決定された。インシュリンレセプターキナーゼ活性の変異体が解析され、不完全な内部化を引き起こすことが明らかになった。形質膜上のばらばらな位置からコートドピットへの集合の段階が阻止されていた。したがって、レセプターの取り込みにおけるこの初期の段階がチロシンキナーゼ活性の決定的な標的であると思われる。

同様の研究においてチロシンキナーゼ活性はTGF- α 前駆体の細胞内取り込みも制御していることが示された(32)。この分子は短い細胞内ドメインしか持っていないけれど、チロシンキナーゼ活性と連携して迅速に細胞内に取り込まれる。分子生物学的な手法を用いてこの分子の端を切って短くすると、前駆体とチロシンキナーゼ活性との連携が減少し、それに対応して細胞内取り込みの速度も減少した。

チロシンキナーゼ活性は、本質的にチロシンキナーゼドメインを持っていない他のレセプターの集合においても役割を担っていることが示された。アセチルコリンレセプターはニューロンの表面で集合し、この集合については詳細に記述されている(33)。この段階はチロシンキナーゼの阻害剤であるゲニステインとチロホスチンを加えることにより阻止される。

これらの論文の結果から、チロシンキナーゼがコートドピットに存在し、細胞内取り込みが起こる時間レセプターと結合していることが示唆された。チロシンキナーゼ阻害剤を用いた結果から、キナーゼによる触媒活性は細胞内取り込みの初階段階に要求されることも示唆している。

B-5-b. ASGPレセプター: 構成的なレセプターの細胞内取り込みにおけるチロシンキナーゼによる制御

上記の結果にもとづいて、我々はチロシンキナーゼ活性がASGPレセプターの細胞内取り込み速度を調節しているという仮説を検討した。この分子は構成的なレセプター介在型の細胞内

tutive receptor-mediated endocytosis and therefore is internalized at identical rates in the presence or absence of ligand. We performed studies to investigate the role of tyrosine kinases in ASGP receptor endocytosis in the hepatoma cell line HepG2. This receptor is comprised of two subunits, H1 and H2, with short cytoplasmic domains (34). These polypeptides lack tyrosine kinase activity and combine *in vivo* to form a heterooligomer. There is a single tyrosine at position five of the H1 subunit, which we had previously shown was phosphorylated in HepG2 cells (35). This suggested that a cellular tyrosine kinase was capable of interacting with the cytoplasmic domain of the receptor. To further explore this relationship, we examined the effect of tyrosine kinase inhibitors on ASGP receptor endocytosis. In a recently reported study, we found that tyrosine kinase inhibitors decreased the rate of receptor endocytosis (36). The magnitude of the reduction is shown in Figure 1. Tyrophostin and genistein are both kinase inhibitors which are specific for tyrosine kinases. Staurosporine has a broad anti-kinase specificity; however, through control experiments, we were able to show that an equipotent serine/threonine kinase inhibitor, H7, had no effect on this reaction. This confirmed that the tyrosine kinase inhibiting activity of staurosporine was responsible for its effects. These compounds also decreased the internalization rate of the transferrin receptor, another molecule which participates in constitutive endocytosis. By employing assays specific for all known trafficking pathways of the ASGP receptor, including biosynthesis, receptor exocytosis, and receptor degradation, we showed that the

取り込みに関係しており、したがってリガンドが存在するしないに関わらず、一定の速度で取り込まれる。我々は、肝癌由来細胞株HepG2のASGPレセプターの細胞内取り込みにおいて、チロシンキナーゼの役割を調べるために実験を行った。このレセプターは、短い細胞内ドメインを持つ2つのサブユニットH1とH2から成る(34)。これらのポリペプチドはチロシンキナーゼ活性を持たず、生体内において結合し、ヘテロオリゴマーを形成する。H1サブユニットの5番目の位置に1個のチロシンがあり、これは以前に我々がHepG2細胞内でリン酸化されていることを示した(35)。このことより、細胞内チロシンキナーゼがレセプターの細胞質ドメインと相互作用できることが示唆された。この相互関係をさらに解明するために、チロシンキナーゼ阻害剤を用いてASGPレセプターの細胞内取込みに対する影響を調べた。その結果、これら阻害剤がレセプターの取り込み速度を減少させることを最近報告することができた(36)。図1にその減少の程度を示した。チロホスチンとゲニステインは両者ともチロシンキナーゼに特異的な阻害剤である。スタウロスポリンは広範囲のキナーゼに阻害活性を示す。しかしながら、対照実験において、等しい効力を示すセリン/スレオニンキナーゼの阻害剤であるH7は、この反応に影響を与えないことがわかっている。このことは、スタウロスポリンのチロシンキナーゼ阻害活性がこの効果に関わっていることを確かにした。これらの物質は、構成的な細胞内取り込みに関与している別の分子であるトランスフェリンレセプターの取り込み速度も減少させた。知られているASGPレセプターのすべての往来経路、すなわち生合成、レセプターの細胞外放出、レセプターの分解などの経路に特異的なアッセイを行うことにより、我々は阻害剤の効果が初期の取り

Fig. 1. Tyrosine kinase inhibitors decrease the rate of receptor endocytosis. ASGP receptor endocytosis, measured as described in reference 36, was determined in the presence of the tyrosine kinase inhibitors staurosporine (S), tyrophostin (T), genistein (G), or solvent alone (control-no letter). Mean $\pm$ S.E.M. is shown.

inhibitors' effect was specific for events in early internalization. Furthermore, pinocytosis was not decreased, emphasizing the fact that receptor clustering appears specifically dependent on tyrosine kinase activity.

One model suggested by these findings was that a cellular tyrosine kinase interacts with the ASGP receptor during its approach to, and clustering in, coated pits. To test one aspect of this hypothesis, we examined detergent lysates of HepG2 and other cells to ask whether the ASGP receptor was associated with tyrosine kinase activity. High affinity polyclonal antibodies against both subunits of the ASGP receptor were used to immunoprecipitate the receptor. These purified receptor populations were then incubated with radioactive ATP and an exogenous substrate, reduced, carboxymethylated lysozyme (RCM-L). Recently obtained data from our laboratory using this approach showed that a tyrosine kinase activity capable of phosphorylating RCM-L exists in association with the ASGP receptor. The association is specific since it requires cell lysate and the addition of specific anti-receptor antibody (37).

We then proceeded with investigations to characterize the tyrosine kinase associated with the ASGP receptor. First, we performed an immune complex autophosphorylation reaction. In this protocol, the ATP concentration was lowered from 25 μ M to 0.8 μ M in the presence of high manganese. This has been shown by others to favor the autophosphorylation of tyrosine kinases (38). Analysis of the labeled products from this reaction showed there was a phosphorylated band migrating at 127,000 molecular weight. By eluting this phosphorylated band from the anti-receptor antibody, resuspending it in buffer, and performing a second immunoprecipitation with anti-phosphotyrosine antibody, we were able to show that this protein was phosphorylated on tyrosine. Furthermore, the protein labeled with the photoaffinity reagent 32 P-azido-ATP suggesting that it is capable of binding ATP. Thus these experiments suggested that p127 is a tyrosine kinase associated with the ASGP receptor.

Further experiments are currently in progress in our laboratory to identify p127, and the structural requirements for its interaction with the ASGP receptor. This interaction is specific, since recent experiments have shown that p127 is not associated with a randomly chosen membrane protein, human HLA. Studies with receptor-negative cells expressing the transfected H1 ASGP receptor alone have demonstrated that p127 binding is not dependent on the presence of both H1 and H2 receptor polypeptides (37). Furthermore, mutations in the receptor which alter its internalization motif do not inhibit the binding of p127. This indicates that the structural domain required for p127 interaction is outside of the internalization motif. Additional studies have demonstrated that ASGP receptor-p127 association occurs in normal human liver cells, therefore eliminating the possibility that this finding is an artifact of the

込みの過程に特異的であることを示した。さらに、飲作用による取り込みは減少しないことからレセプターの集合が特にチロシンキナーゼ活性に依存していると考えられる。

これらの結果から提案されるモデルの一つは、ASGPレセプターがコーテッドピットに近づき、その中に塊となって集合する過程で細胞内チロシンキナーゼと相互作用するというものである。この仮説の側面を確かめるため、界面活性剤で可溶化したHepG2およびその他の細胞の溶解物について、ASGPレセプターがチロシンキナーゼ活性と結合しているかを調べた。ASGPレセプターの二つのサブユニットに対して高い親和性を持つポリクローナル抗体を用いて免疫沈降を行った。これら一連の精製したレセプターを次に放射活性ATPおよび外因性基質として還元したカルボキシメチル化リゾチーム(RCM-L)とインキュベートした。このような方法を用いて最近我々の研究室で得られた結果から、RCM-Lをリン酸化することができるとチロシンキナーゼ活性がASGPレセプターとの結合物質の中に存在することが示された。この結合は特異的である。なぜなら、この結合は細胞の溶解物を必要とし、さらに特異的な抗レセプター抗体の添加を必要とするからである(37)。

我々は、次にASGPレセプターと結合しているチロシンキナーゼの性質の特定を行った。最初に、免疫複合体の自己リン酸化反応を行った。この方法では、高濃度のマンガン存在下でATPの濃度を25 μ Mから0.8 μ Mまで下げた。この条件はチロシンキナーゼの自己リン酸化に適していることが他の研究者によって示されている(38)。この反応によって得られた標識された生成物を解析したところ、分子量127,000(p127)のところにリン酸化されたバンドがみられた。このリン酸化されたバンドを抗レセプター抗体から溶出し、緩衝液にふたたび溶解し、抗リン酸化チロシン抗体を用いて二回目の免疫沈降を行ったところ、このタンパク質はチロシンがリン酸化されていることが示された。さらに、このタンパク質は、フォトアフィニティー試薬である 32 P-アジド-ATPによってラベルされたことから、ATPとの結合能を有することが示唆された。このように、これらの実験はp127がASGPレセプターと結合しているチロシンキナーゼであることを示唆した。

さらに、われわれの研究室では現在p127の同定およびASGPレセプターとの相互作用に必要な構造について研究が進められている。この相互作用は特異的である。なぜなら、無作為に選んだ膜タンパク質であるヒトHLAとはp127は結合しないことが最近の実験でわかったからである。レセプターを持たない細胞にASGPレセプター-H1サブユニットのみを導入し、発現させた実験では、H1とH2の両方のポリペプチドが存在しなくてもp127の結合が起こることが示された(37)。さらに、このレセプターの内部化モチーフを変えた変異体はp127の結合を阻害しなかった。このことは、p127との相互作用に必要な構造ドメインは、内部化モチーフ以外にあることを示している。他の実験でもASGPレセプターとp127の結合が正常ヒト肝細胞でも起こっていることが示されたので、この現象が形質転換した細胞の発現型で見られる人為的なものである可能性は排除できる。これら

transformed cell phenotype. The conclusions from these preliminary experiments are that a tyrosine kinase is present in association with the ASGP receptor, and that tyrosine kinase activity is critically involved in the regulation of rapid endocytosis. The functional implications of these findings for the ASGP and other receptors are currently under investigation.

C. Tyrosine Kinase - Dependent Rapid Endocytosis: A Model

A model incorporating the key features of receptor regulation during rapid endocytosis is presented in Table 2. The Table lists the specific events which are known to occur during the clustering and internalization of ASGP receptor at coated pits, and contrasts them with the events previously described during activation, signal transduction, and endocytosis of the tyrosine kinase - containing receptors such as EGF receptor. We make two conclusions from the results presented in this Table. First, the biology of these two receptor molecules is considerably different, from the perspective of ligand activation of receptor activity, to the eventual routing behavior and cell biology of the receptors. Second, despite these differences, similar if not identical biochemical mechanisms operate during their processing at coated pits. As noted, this model differs from the classical concept of the internalization of a constitutively endocytosing receptor, which is presented in the left column. However, as described in this review, recent data from this and other laboratories suggest that, in fact, many mechanisms, including tyrosine kinase activation, multimer formation, and the presence of rapid internalization motifs, operate in

の予備的な実験から得られた結論は、ASGPレセプターと結合する分子の中にチロシンキナーゼが存在していること、そしてそのチロシンキナーゼ活性は迅速な細胞内取り込みの調節に深く関与していることである。これらのASGPレセプターや他のレセプターに関する知見の機能面でのかかわり合いについては、現在検討中である。

C. チロシンキナーゼ依存性の迅速な細胞内取り込み: ひとつのモデル

迅速な細胞内取り込みの過程で起こるレセプター調節の主な特徴を取り入れたモデルを表2に示した。この表に示した項目はコーテッドピットにおけるASGPレセプターの集合と内部化の過程で起こることが知られている特異的な事象であり、先に述べたEGFレセプターのようなチロシンキナーゼ型レセプターの活性化、情報伝達、細胞内取り込みの過程で起こる事象と対比させてある。我々はこの表に示した結果から、二つの結論を導いた。第一に、これら二つのレセプター分子はレセプターの活性がリガンドによって活性化されるという点や最終的な運命、レセプターの細胞生物学という点にいたるまでかなり異なっている。第二に、これらの相違にもかかわらず、同一とは言えないがよく似た生化学的な機構によってコーテッドピットにおける過程が進められている。既に指摘したようにこのモデルは構成的に細胞内に取り込まれているレセプターの内部化に関する古典的な概念とは異なっている。古典的な概念については左の列に示してある。しかし、この総説で述べたように、我々の研究室や他の研究室における最近の結果より、実際にチロシンキナーゼの活性化、多量体形成、迅速な内部化モチーフの存在と

Table II. Features of glycoprotein endocytosis.

	ASGP-R Classical	Endocytosis "New Model"	Endocytosis of EGF Receptor
Ligand binding-dependent	No	No	Yes
Multimer formation	Yes	Yes	Yes
Tyrosine Kinase Activation	No	Yes	Yes
Autophosphorylation	No	???	Yes
Cluster in coated pits	Yes	Yes	Yes
Rapid internalization motif	Yes	Yes	Yes
Endocytosis	Constitutive	"Regulated Constitutive"	Regulated
Destination	Recycle to PM	Recycle	Degradation

both classes of receptors. Therefore, the constitutive receptors may be seen as behaving in a fashion similar to the ligand-regulated tyrosine kinase receptors, under conditions of continuous stimulation. This concept is expressed as "regulated constitutive" in the Table. This indicates that regulatory mechanisms are in fact at work but that they are always in the "on" position.

The second major aspect of this model is that it proposes that structures and proteins traditionally placed at the plasma membrane only during signal transduction are required for a second role, that of protein internalization. This aspect of the model does not require that it is the same tyrosine kinase molecule or GTP-binding protein which functions in these two pathways. It is more likely, based on analogy with the G protein data obtained in many other systems, that these are homologous members of a family. The elucidation of tyrosine kinase molecules involved in coated pit regulation and protein endocytosis requires much further study, yet holds considerable implications for our understanding of the regulation of glycoprotein biology and the control of glycoprotein expression at the cell surface.

いった多くの機構が、両方のクラスのレセプターに機能していることが示唆されている。したがって、構成的に発現しているレセプターは常に刺激を受けているような状態のもとでリガンドで調節されるチロシンキナーゼ型レセプターと同様にふるまうようである。この概念は、表の中で、"制御下での構成的 (regulated constitutive)"と表現した。これは調節機構が働いているが、その機構はいつでも"on"の状態であるということを表わしている。

このモデルの重要な第二の点は、構造とタンパク質は情報伝達の過程では通常形質膜にあり、それらがタンパク質の内部化という次の役割に必要であることを提案していることである。このモデルのこの側面では二つの経路で働くチロシンキナーゼ分子もしくはGTP結合タンパク質は、同一である必要はない。多くの他のシステムで得られたGタンパク質の類比の結果にもとづくともしろ一つのファミリーを成す相同的な分子の集合のようである。コーテッドピットの調節とタンパク質の細胞内取り込みに関連しているチロシンキナーゼ分子の解明にはさらなる研究が必要であり、これは糖タンパク質の生物学的調節や細胞表面における糖タンパク質の発現の調節を理解することが依然大きな意味を持っている。

北里研究所・生物機能研究所・細胞機能研究室
三浦 広美記

Reference

1. Robinson, M.S. (1994) *Curr. Opin. Cell Biol.* **6**, 538-544
2. Schmid, S.L. (1992) *BioEssays* **14**, 589-596
3. Trowbridge, I.S., Collawn, J.F., and Hopkins, C.R. (1993) *Ann. Rev. Cell Biol.* **9**, 129-161
4. Pearce, B.M.F. (1987) *J. Mol. Biol.* **126**, 803-812
5. Brodsky, F.M., Hill, B.L., Action, S.L., Nathke, I., Wong, D.H., Ponnambalaun, S., and Parham, P. (1991) *TIBS* **16**, 208-213
6. Pearce, B.M.F., and Robinson, M.S. (1990) *Ann. Rev. Cell Biol.* **6**, 151-171
7. Robinson, M.S. (1987) *J. Cell Biol.* **104**, 887-895
8. Zarembo, S., and Keen, J.H. (1983) *J. Cell Biol.* **28**, 47-58
9. Virshup, D.M., and Bennett, V. (1988) *J. Cell Biol.* **106**, 39-50
10. Pearce, B.M.F. (1988) *EMBO J.* **7**, 3331-3336
11. Glickman, J.N., Conibear, E., and Pearce, B.M.F. (1989) *EMBO J.* **8**, 1041-1047
12. Trowbridge, I.S. (1991) *Curr. Opin. Cell Biol.* **3**, 634-641
13. Lazarovits, J., and Roth, M. (1988) *Cell* **53**, 743-752
14. Collawn, J.F., Stangel, M., Kuhn, L.A., Esekogwu, V., Jing, S., Trowbridge, I.S., and Tainer, J.A. (1990) *Cell* **63**, 1061-1072
15. Letourneur, F., and Klausner, R.D. (1992) *Cell* **69**, 1143-1157
16. Johnson, K.F., Chan, W., and Kornfeld, S. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci., USA.* **87**, 10010-10014
17. Novick, P., and Brennwald, P. (1993) *Cell* **75**, 597-601
18. Bomsel, M., and Mostov, K. (1992) *Mol. Biol. Cell* **3**, 1317-1328
19. Zerial, M., and Stenmark, H. (1993) *Curr. Opin. Cell Biol.* **5**, 613-620
20. Van der Blik, A.M., Redelmeier, T.E., Damke, H., Tisdale, E.J., Meyerowitz, E.M., and Schmid, S.L. (1993) *J. Cell Biol.* **122**, 553-563
21. Bucci, C., Parton, R.G., Mather, I.H., Stunnenberg, H., Simons, K., Hoflack, B., and Zerial, M. (1992) *Cell* **70**, 715-728
22. Columbo, M.I., Mayorga, L.S., Nishimoto, I., Ross, E.M., and Stahl, P.D. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 14919-14923
23. Chavrier, P., Gorvel, J., Stelzer, E., Simons, K., Gruenberg, J., and Zerial, M. (1991) *Nature* **353**, 769-771
24. Carter, L.L., Redelmeier, T.E., Woolenweber, L.A., and Schmid, S.L. (1993) *J. Cell Biol.* **120**, 37-45
25. Omary, M.B., and Trowbridge, I.S. (1981) *J. Biol. Chem.* **256**, 4715-4718
26. Schneider, C., Sutherland, R., Newman, R., and Greaves, M. (1982) *J. Biol. Chem.* **257**, 8516-8522
27. O'Dowd, B.F., Hnatowich, M., Caron, M.G., Lefkowitz, R.J., and Bouvier, M. (1989) *J. Biol. Chem.* **264**, 7564-7569
28. Alvarez, E., Girones, N., and Davis, R.J. (1990) *J. Biol. Chem.* **265**, 16644-16655
29. Sorkin, A., Waters, C., Overholser, K.A., and Carpenter, G. (1991) *J. Biol. Chem.* **266**, 8355-8362
30. Wiley, H.S., Herbst, J.J., Walsh, B.J., Lauffenberger, D.A., Rosenfeld, M.G., and Gill, G.N. (1991) *J. Biol. Chem.* **266**, 11083-11094
31. Carpentier, J.L., Paccaud, J.P., Baecker, J., Gilbert, A., Orci, L.M., and Kahn, C.R. (1993) *J. Cell Biol.* **122**, 1243-1252
32. Shum, L., Reeves, S.A., Kuo, A.C., Fromer, E.S., and Derynck, R. (1994) *J. Cell Biol.* **125**, 903-916
33. Baker, L.P., and Peng (1993) *J. Cell Biol.* **120**, 185-195
34. Spiess, M. (1990) *Biochemistry* **29**, 10009-10018
35. Fallon, R.J. (1990) *J. Biol. Chem.* **265**, 3401-3406

36. Fallon, R.J., Danaher, M., Saylor, R.L., and Saxena, A. (1994) J. Biol. Chem. **269**, 11011-11017
37. Fallon, R.J., Danaher, M., Saxena, A. (1994) J. Biol. Chem. **269**, 26626-26629
38. Veillette, A., Bookman, M.A., Horak, E.M., and Bolen, J.B. (1988) Cell **55**, 301-308

Received on November 8, 1994, accepted on November 15, 1994.