

令和 2 年 4 月 11 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H04782

研究課題名(和文)ホスファチジルセリンが制御するリサイクリングエンドソームの機能の解明

研究課題名(英文)Molecular mechanism by which phosphatidylserine regulates recycling endosomal function

研究代表者

田口 友彦 (TAGUCHI, TOMOHIKO)

東北大学・生命科学研究科・教授

研究者番号：10300881

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、リサイクリングエンドソームの新規機能を明らかにすることを目的に行われた。リサイクリングエンドソームに膜リン脂質ホスファチジルセリン(PS)が濃縮して存在するという研究代表者の知見に基づいて研究を遂行し、リサイクリングエンドソームが細胞増殖を正に制御するオルガネラであることを明らかにした。さらに、その制御が転写コアクチベーターのYAPの活性化によるものであることを示し、その分子メカニズムとして、YAPを脱リン酸化するphosphatase、およびYAPを不活化するLatsタンパク質を分解に導くE3リガーゼがリサイクリングエンドソームに局在していることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究成果は、細胞内物流システム(エンドサイトーシス経路)と細胞増殖シグナル伝達経路(Hippo-YAP経路)のクロストークがあること、そしてそのクロストークの場所がリサイクリングエンドソームであることを示唆している。細胞小器官の新規機能を明らかにしたことに加えて、細胞内物流・細胞内シグナル伝達の両分野に解決すべき新しい課題を提出したという学術的意義を有する。

研究成果の概要(英文)：This study was performed to reveal a novel function of recycling endosomes. I found that recycling endosomes regulate cell proliferation through activation of YAP, an essential transcriptional co-activator for cell proliferation. As a molecular mechanism underlying YAP activation, several recycling endosomal proteins were identified, which include phosphatases that activate YAP through its dephosphorylation and E3 ligases that mediate degradation of Lats that inactivates YAP.

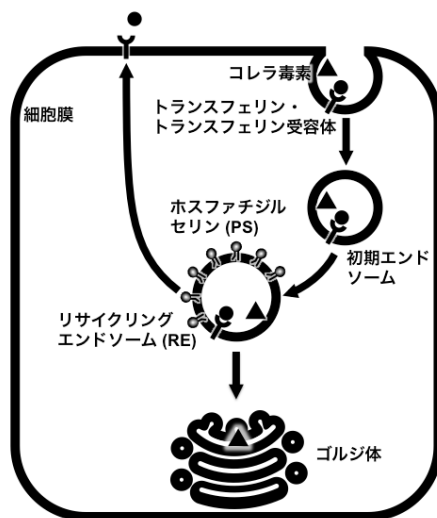
研究分野：細胞生物学

キーワード：細胞小器官 リン脂質 物質輸送 細胞増殖

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

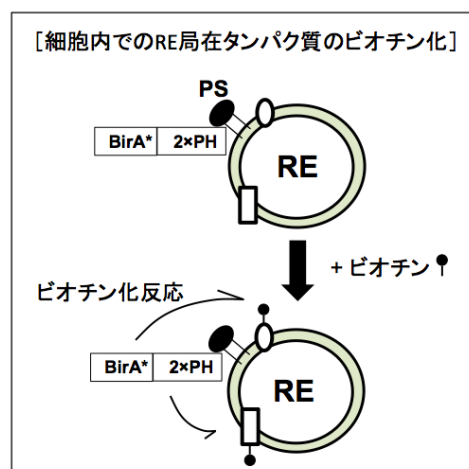
1. 研究開始当初の背景

リサイクリングエンドソーム (RE) は、エンドサイトーシスで取り込まれた細胞膜受容体などを再び細胞膜へ戻すプロセス (リサイクル) や、細胞膜からゴルジ体への物質輸送プロセス (逆行性輸送) に必要な細胞小器官である。研究代表者は RE がリン脂質ホスファチジルセリン (PS) に圧倒的に富んでいること (Uchida et al., PNAS 2011) を見出し、この PS に結合するエフェクター蛋白質が RE を介する物質輸送に必須であることをこれまでに明らかにしてきた (Uchida et al., PNAS 2011; Lee et al., EMBO J 2015)。さらに、RE が PS に非常に富むという特徴を生化学的に利用して、RE に局在する可能性のある新規タンパク質を多数同定しつつある。その中には、今までその局在が予想もされていなかった細胞増殖に関する転写因子およびその制御因子やユビキチン E3 リガーゼが含まれていた。



2. 研究の目的

RE が PS に非常に富んだオルガネラであることから、研究代表者は PS に結合するタンパク質を積極的に同定することで、RE を介する物質輸送を制御する分子基盤がより明確になり、さらに RE の新しい機能が見えてくると考えた。目的分子の極近傍にあるタンパク質を同定する手法として、目的タンパク質にビオチン化酵素 BirA* を結合させ、周辺分子をビオチン化することにより同定する方法 (Bio-ID 法) が報告されている (Roux et al., JCB 2012)。そこで研究代表者は、この手法を PS を認識する優れたプローブ 2xPH-GFP (Uchida et al., PNAS 2011) に応用することを考えた。本研究では Bio-ID 法により同定された PS 近傍新規タンパク質の機能解析を行い、RE の新たな機能を解明することを目的とする。



3. 研究の方法

PS に高い選択性を有するプローブ 2xPH-GFP を Bio-ID 法に供し、PS 近傍タンパク質を質量分析を用いて網羅的に同定する。また、RE に局在する PS 結合タンパク質 eectin-2 (Uchida et al., PNAS 2011) に結合するタンパク質を同定する。これらの PS 近傍タンパク質の中で、RE の新しい機能につながる可能性のあるものを選別し、ノックダウン実験などによりそれらの機能を評価する。

4. 研究成果

(1) Bio-ID 法による結果 (Matsudaira et al., Nature Commun 2017 内で公表)

2xPH-GFP を Bio-ID 法に供し、385 種類の PS 近傍タンパク質を質量分析により決定した。その中には、トランスフェリン受容体や EHD1 などの RE に局在することが既知のタンパク質が多数含まれていた。一方、lamp1 (リソソーム)、calnexin (小胞体)、GS28 (ゴルジ体) などはビオチン化を受けず同定されてこなかった。この結果は、PS に選択的な 2xPH-GFP を用いた Bio-ID 法により、RE 局在性タンパク質が選択的に同定されたことを示しており、本研究戦略の妥当性を支持する結果であった。

興味深いことに、385 種類のタンパク質の中には、YAP を含め Hippo/YAP 経路を制御することが報告されている約 20 種類のタンパク質が含まれていた。Hippo/YAP 経路は、細胞増殖を制御する細胞内シグナル伝達経路であり、細胞増殖を正に制御する転写コアクチベーター YAP と、YAP をリン酸化することで不活性化する Hippo 経路から成り立っている。RE が YAP/細胞増殖の制御を行なっている可能性が示唆された。

(2) RE における YAP の制御 (Matsudaira et al., Nature Commun 2017 内で公表)

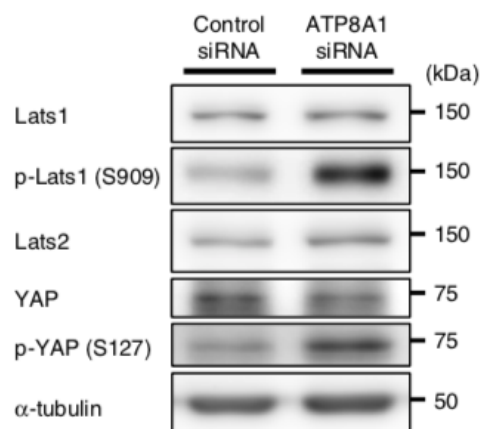
Bio-ID 法により転写コアクチベーター YAP が同定されたことから、YAP の細胞内局在を検討することにした。その結果、細胞増殖期には RE に YAP が局在するが、細胞密度が高くなり細胞周期が停止した状態では YAP の RE 局在が失われることが明らかになった。YAP は非リン酸化体が活性化体であり、リン酸化体が不活性化体である。リン酸化 YAP を認識する抗体により細胞内局在の検討を行った結果、RE にはリン酸化 YAP を認めなかった。この結果は、RE において積極

的に YAP の脱リン酸化反応が行われていることを示唆する。

(3) PS による YAP の制御 (Matsudaira et al., Nature Commun 2017 内で公表)

RE 膜の細胞質側脂質層には PS が豊富に存在する。この PS の濃縮には、PS フリッパーゼ ATP8A1 (PS をルーメン側脂質層から細胞質側脂質層にリップする酵素) が必要である (Lee et al., EMBO J 2015) ことから、ATP8A1 による YAP の活性制御の可能性を検討した。ATP8A1 のノックダウンにより細胞増殖が低下すること、YAP の不活化体 (リン酸化体) が増加すること、YAP をリン酸化することで不活性化するキナーゼである Lats1 の活性化体 (リン酸化体) が増加することを見出した。

2xPH (PS に結合するタンパク質性プローブ) を細胞質に過剰に発現することで、本来 PS に結合して RE において機能しているタンパク質の機能阻害を行うことができる (Uchida et al., PNAS 2011)。2xPH を過剰発現させたところ、RE に局在する YAP の量が顕著に減少し、リン酸化 YAP の量が増加した。一方、PS に結合できない点変異体 2xPH (K20E) は、YAP の RE 局在性、リン酸化 YAP の量に影響を与えなかった。

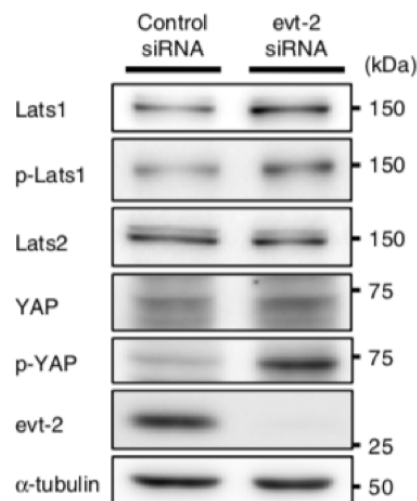


(4) RE 局在性 PS 結合タンパク質 evectin-2 による YAP の制御 (Matsudaira et al., Nature Commun 2017 内で公表)

evectin-2 は RE に局在する PS 結合タンパク質である。研究代表者は、evectin-2 が細胞膜からゴルジ体へ至る逆行性輸送経路の制御因子であることを報告している (Uchida et al., PNAS 2011)。evectin-2 が PS に結合することから、evectin-2 の YAP への制御を検討した。evectin-2 のノックダウンにより細胞増殖が低下すること、YAP の RE 局在性が失われること、YAP の不活化体 (リン酸化体) が増加すること、YAP をリン酸化することで不活性化するキナーゼである Lats1 の量が増加することを見出した。

evectin-2 が Lats1 の量を負に制御する分子機構を次に検討した。evectin-2 結合タンパク質を質量分析により同定したところ、Nedd4 family に属する種々の E3 リガーゼ (Itch, WWP1, WWP2) が同定された。これら E3 リガーゼのノックダウン実験によっても、evectin-2 ノックダウンと同様に、細胞増殖が低下すること、YAP の RE 局在性が失われること、YAP の不活化体 (リン酸化体) が増加すること、YAP をリン酸化することで不活性化するキナーゼである Lats1 の量が増加することを見出した。

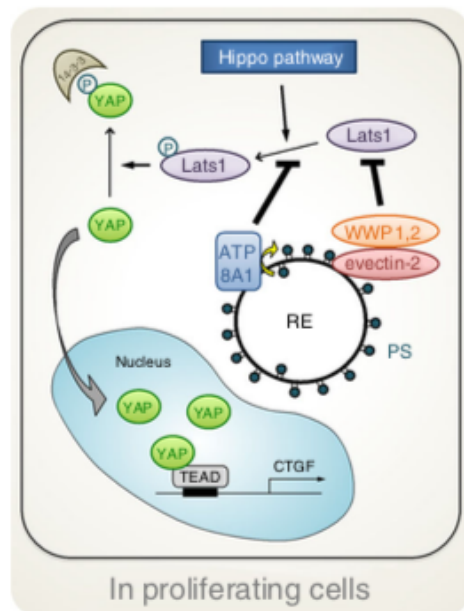
以上、これらの結果から、evectin-2/Nedd4 E3 リガーゼ複合体による Lats1 の分解が示された。Lats1 が分解を受けることによって YAP のリン酸化が制限され、その結果、非リン酸化体 (活性化体) YAP の量が担保されていることが示唆される。



(5) Ser/Thr ホスファターゼによる YAP の制御

RE に豊富に存在する PS の近傍タンパク質として 385 種類のタンパク質を同定したが、この中には 12 種類の Ser/Thr ホスファターゼが含まれていた。PP1 ファミリーに属するホスファターゼ (6 種類の調節サブユニット PPP1R8, PPP1R9A, PPP1R10, PPP1R12A, PPP1R13A, PPP1R37 と 3 種類の触媒サブユニット PP1A, PP1B, PP1C) と PP2 ファミリーに属するホスファターゼ (2 種類の調節サブユニット PPP2R1A, PPP2R5D と 1 種類の触媒サブユニット PPM1G) である。The Cancer Genome Atlas Program で公開されているデータの解析から、この 12 種類のホスファターゼのうち PPP1R12A と PP1B はその発現量と乳がんの悪性度に相関が認められた。この 2 種類のホスファターゼが細胞増殖・YAP シグナルに関与するかどうか検討を行なった。YAP 依存的に増殖する乳がん細胞 MDA-MB-231 で PPP1R12A および PP1B をノックダウンしたところ、細胞増殖が劇的に抑制され、YAP の不活性化型であるリン酸化 YAP が増加した。一方、YAP 非依存的に増殖する乳がん細胞 MCF-7 では、PPP1R12A および PP1B のノックダウンは、細胞増殖に影響を与えなかった。ついで、PPP1R12A の細胞内局在を検討したところ、RE を含む核近縁部のオルガネラに局在していることが示唆された。RE の細胞質側脂質層に存在する PS 量は、PS flippase である ATP8A1 の制御を受けているが、ATP8A1 をノックダウンしたところ、PPP1R12A の RE 局在が減少する傾向を見出した。以上により、PPP1R12A ホスファターゼが PS 依存的に RE に局在し、YAP の脱リン酸化を行うことで YAP シグナルを正に制御していることが示唆された。

以上、RE は、細胞増殖を正に制御するオルガネラであることを見出し、その制御が転写コアクチベーターYAP の活性化によるものであることを示した。その分子メカニズムとして、YAP を脱リン酸化する phosphatase、および YAP を不活性化する Lats タンパク質を分解に導く E3 リガーゼが RE に局在していることを明らかにした。本研究成果は、細胞内物流システム（エンドサイトーシス経路）と細胞増殖シグナル伝達経路（Hippo-YAP 経路）のクロストークがあること、そしてそのクロストークの場所が RE であることを示唆している。細胞小器官の新規機能を明らかにしたことに加えて、細胞内物流・細胞内シグナル伝達の両分野に解決すべき新しい課題を提出したという学術的意義を有するものと考えられる。



(6) RE を通過する新規物質輸送経路の同定 (Mukai et al., Nature Commun 2016 内で公表)

自然免疫は、異物を排除するための先天的に備わっているプログラムである。近年、ウイルスの感染や核・ミトコンドリア膜の傷害によって細胞質に漏出した DNA が異物として認識され、自然免疫応答を誘導することが明らかになった。この応答の要が小胞体膜タンパク質 STING である。研究代表者は細胞質 DNA 刺激後の STING の細胞内動態を検討し、STING の活性化には、STING の細胞内輸送が必須であること、その活性化の実体がゴルジ体で起きる STING のパルミトイル化であることを発見した。STING はゴルジ体を脱出後、RE を経由してリソソームへ運搬されて分解を受け、STING の自然免疫応答シグナルは収束する。[小胞体→ゴルジ体→RE→リソソーム]という RE を通過する新規細胞内物質輸送経路を同定し、その輸送経路の生物学的意義を見出すことができた。[RE→リソソーム]の輸送経路を制御する分子機構を明らかにすることは、今後の重要な課題である。

(7) PS の細胞内分布についての新規知見 (Tsuji et al., PNAS 2019 内で公表)

名古屋大学大学院医学系研究科分子細胞学分野の藤本豊士 教授（現・順天堂大学特任教授）、大阪大学免疫学フロンティア研究センターの長田重一 名誉教授と、細胞内 PS 分布を見るための新たな電子顕微鏡の解析方法を開発し、細胞内小器官膜の PS 分布をナノレベルで可視化することに成功した。その結果、これまで PS がほとんど存在しないと考えられていた小胞体膜の細胞質側脂質層にも PS が分布すること、細胞内のカルシウム濃度が上昇すると小胞体膜細胞質側脂質層の PS が減少するとともに小胞体の内腔側脂質層や核膜の PS が増加することが明らかになった。これらの結果は、小胞体膜や核膜での PS の機能的意義の解明など、新たな研究の展開につながるものと期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 3件）

| | |
|---|---------------------------|
| 1. 著者名 Tsuji Takuma, Cheng Jinglei, Tatematsu Tsuyako, Ebata Aoi, Kamikawa Hiroki, Fujita Akikazu, Gyobu Sayuri, Segawa Katsumori, Arai Hiroyuki, Taguchi Tomohiko, Nagata Shigekazu, Fujimoto Toyoshi | 4. 巻 116 |
| 2. 論文標題 Predominant localization of phosphatidylserine at the cytoplasmic leaflet of the ER, and its TMEM16K-dependent redistribution | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences | 6. 最初と最後の頁 13368-13373 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.1822025116 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である) | 国際共著 - |
| 1. 著者名 田口友彦 | 4. 巻 90 |
| 2. 論文標題 エンドソームの機能破綻に起因する疾患とその発症メカニズム | 5. 発行年 2018年 |
| 3. 雑誌名 生化学 | 6. 最初と最後の頁 35-42 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.14952/SEIKAGAKU.2018.900035 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |
| 1. 著者名 Matsudaira Tatsuyuki, Mukai Kojiro, Noguchi Taishin, Hasegawa Junya, Hatta Tomohisa, Iemura Shun-ichiro, Natsume Tohru, Miyamura Norio, Nishina Hiroshi, Nakayama Jun, Semba Kentaro, Tomita Takuya, Murata Shigeo, Arai Hiroyuki, Taguchi Tomohiko | 4. 巻 8 |
| 2. 論文標題 Endosomal phosphatidylserine is critical for the YAP signalling pathway in proliferating cells | 5. 発行年 2017年 |
| 3. 雑誌名 Nature Communications | 6. 最初と最後の頁 1246 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-017-01255-3 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である) | 国際共著 - |
| 1. 著者名 Mukai Kojiro, Konno Hiroyasu, Akiba Tatsuya, Uemura Takefumi, Waguri Satoshi, Kobayashi Toshihide, Barber Glen N., Arai Hiroyuki, Taguchi Tomohiko | 4. 巻 7 |
| 2. 論文標題 Activation of STING requires palmitoylation at the Golgi | 5. 発行年 2016年 |
| 3. 雑誌名 Nature Communications | 6. 最初と最後の頁 11932 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/ncomms11932 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である) | 国際共著 該当する |

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 6件 / うち国際学会 0件）

| |
|---|
| 1. 発表者名 Shenwei Ni, Kojiro Mukai, Takehiro Suzuki, Naoshi Dohmae, Hiroyuki Arai & Tomohiko Taguchi |
| 2. 発表標題 A Proximity Labeling Strategy Provides Insights into Proteomes of early endosome |
| 3. 学会等名 第70回細胞生物学会第51回発生物学会合同大会 |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|-------------------------------------|
| 1. 発表者名 田口友彦 |
| 2. 発表標題 生体内膜リン脂質近傍タンパク質の新規同定法の開発 |
| 3. 学会等名 第60回日本脂質生化学会（招待講演） |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|--------------------------------------|
| 1. 発表者名 田口友彦 |
| 2. 発表標題 自然免疫分子STINGの活性化機構 |
| 3. 学会等名 第59回日本生化学会中国・四国支部例会（招待講演） |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|--------------------------------------|
| 1. 発表者名 田口友彦 |
| 2. 発表標題 自然免疫分子STINGの活性化と不活性化の分子機構 |
| 3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会（招待講演） |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|---------------------------------------|
| 1. 発表者名 田口友彦 |
| 2. 発表標題 リン脂質ホスファチジルセリンが制御する細胞内物質輸送 |
| 3. 学会等名 第122回日本解剖学会（招待講演） |
| 4. 発表年 2017年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 田口友彦 |
| 2. 発表標題 細胞内ホスファチジルセリンの可視化 |
| 3. 学会等名 第4回JFAS (Japan/Joy of Fatty Acids Secrets/Society) (招待講演) |
| 4. 発表年 2017年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 田口友彦 |
| 2. 発表標題 周辺ピオチン化酵素を用いたリン脂質近傍タンパク質の新規同定法 |
| 3. 学会等名 ConBio2017 (Consortium of Biological Sciences 2017) (招待講演) |
| 4. 発表年 2017年 |

〔図書〕 計6件

| | |
|---------------------------|-----------------|
| 1. 著者名 田口友彦、向井康治朗、新井洋由 | 4. 発行年 2018年 |
| 2. 出版社 ニューサイエンス社 | 5. 総ページ数 4 |
| 3. 書名 月刊「細胞」 | |

| | |
|---------------------|-----------------|
| 1. 著者名 田口友彦、新井洋由 | 4. 発行年 2018年 |
| 2. 出版社 医学書院 | 5. 総ページ数 5 |
| 3. 書名 生体の科学 | |

| | |
|----------------|-----------------|
| 1. 著者名 田口友彦 | 4. 発行年 2018年 |
| 2. 出版社 医学書院 | 5. 総ページ数 4 |
| 3. 書名 生体の科学 | |

| | |
|-------------------------------|-----------------|
| 1. 著者名 田口友彦、小林俊彦、反町典子、仁木隆裕 | 4. 発行年 2018年 |
| 2. 出版社 羊土社 | 5. 総ページ数 5 |
| 3. 書名 実験医学 | |

| | |
|---------------------------|-----------------|
| 1. 著者名 向井康治朗、新井洋由、田口友彦 | 4. 発行年 2018年 |
| 2. 出版社 羊土社 | 5. 総ページ数 7 |
| 3. 書名 実験医学 | |

| | |
|-------------------------------|-----------------|
| 1. 著者名 田口友彦 | 4. 発行年 2017年 |
| 2. 出版社 エヌ・ティー・エス | 5. 総ページ数 7 |
| 3. 書名 オルガネラの多様性を生むリン脂質の多様性 | |

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

| | 氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号) | 所属研究機関・部局・職 (機関番号) | 備考 |
|--|---------------------------|-----------------------|----|
|--|---------------------------|-----------------------|----|