

令和元年6月18日現在

機関番号：32660

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07303

研究課題名(和文) GPCRのエンドサイトーシスを制御する因子の網羅的探索

研究課題名(英文) Global analysis of factors controlling GPCR endocytosis

研究代表者

十島 二郎 (Toshima, Jiro)

東京理科大学・基礎工学部生物工学科・教授

研究者番号：00333831

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：GPCRは真核生物に幅広く発現しており、様々な基本的生理現象の調節因子としては知られており、医薬品開発の重要な標的分子とされている。GPCRのエンドサイトーシスによる活性調節機構を明らかにするために、以前、私達GPCRのエンドサイトーシスに異常のある約200種類の変異体を同定した。本研究において、私達は、GPCRのエンドサイトーシスの初期過程に関わる遺伝子と、エンドソーム-リソソーム間の輸送に関わる遺伝子の解析を行った。この結果、GPCRの初期エンドサイトーシス過程に関わる遺伝子と、エンドソーム-リソソーム間の輸送における新しいGPCRの輸送経路を見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

GPCRはヒトの様々な生理現象を司る重要な因子であり、またGPCRの機能異常は多くの疾患の原因となることが明らかにされている。このため、GPCRは創薬の重要な標的分子となっており、GPCRシグナルの活性制御機構を明らかにすることは、基礎生命科学の分野のみならず、臨床応用の面からも重要である。エンドサイトーシスはGPCRの活性調節のための重要な機構の一つであり、本研究ではGPCRがエンドサイトーシスの初期過程でどのようにして細胞内に取り込まれるかを明らかにした。また、新しいリソソームへの輸送経路を見出しており、これらの成果は新しいGPCRシグナルの活性調節機構の解明につながることを期待される。

研究成果の概要(英文)：GPCRs are expressed ubiquitously in eukaryote cells and play fundamental roles in many physiological processes. Additionally, GPCRs are related to many human diseases and therefore they have been the targets of medical therapeutics. Thus, elucidating the control mechanism of GPCR activity is essential for the more effective and safer therapeutic agents. We previously identified ~200 yeast mutants that have defect in GPCR endocytosis. Among these mutants, in this study, we focused at the genes controlling early stage of GPCR endocytosis and controlling transport between endosome and lysosome. By labeling early endocytic protein with GFP and monitoring the dynamics in mutants cells, we found four mutants, *clc1*, *end3*, *las17*, and *sla2*, that have remarkable defect in early stage endocytosis of GPCR. We also examined Rab5 and Rab7 proteins that are involved in GPCR transport from endosomes to lysosomes, and found that novel GPCR transport pathway, the Rab5-independent Rab7-mediated pathway.

研究分野：細胞生物学

キーワード：GPCR エンドサイトーシス 膜小胞輸送

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

Gタンパク質共役型受容体(GPCR)はヒトゲノム中で最大の遺伝子ファミリーを形成しており、800種を超えるGPCRが存在している。GPCRは細胞膜上に存在する受容体であり、細胞外リガンドと結合することにより活性化され、細胞内へとシグナルを伝える。GPCRは様々な生理現象を司っているほか、その異常はがんをはじめとする多くの疾患を引き起こすこと知られており、このためGPCRは創薬の重要な標的分子となっている。このため、GPCRシグナルの活性制御機構を明らかにすることは、基礎生命科学の分野のみならず、臨床応用の面からも重要である。活性化されたGPCRはリガンドの結合により活性化し、細胞内にシグナルを伝え、エンドサイトーシスにより細胞内に取り込まれ、分解される。この機構は、GPCRシグナルの不活性化のための主たる制御機構であるが、その分子機構については不明な点が多い。

2. 研究の目的

活性化されたGPCRは、クラスリン小胞を介してエンドサイトーシスされ、エンドソームに輸送される。エンドソームは低pH環境にあり、それによりリガンドと解離したGPCRは細胞膜へ戻されリサイクルされるか、もしくはリソソームに輸送され分解される。私達は、以前、出芽酵母のGPCR(Ste2受容体)のリガンドである α -factorに蛍光分子を付加することにより、GPCRのエンドサイトーシス過程をモニターすることができるマーカーの作製に成功した。最近、私達はこのマーカーを用いて、GPCRのエンドサイトーシスに異常のある変異体の網羅的なスクリーニングを行い、約200種類の関連遺伝子の同定に成功した。本研究では、これらの遺伝子の機能解析を通して、新しいGPCRの活性制御機構を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) GPCRのクラスリン小胞への輸送機構、およびクラスリン小胞の形成機構の解明

細胞膜成分脂質であるイノシトールリン脂質(PI)のリン酸化酵素の変異体を作成することにより、細胞膜PIのリン酸化派生体のGPCRのクラスリン小胞への取り込み、およびクラスリン小胞の形成における役割とその分子機構を明らかにする。また、クラスリン小胞形成に関わるタンパク質を蛍光標識し、スクリーニングにより得られた変異体における動態を詳細に解析し、各責任遺伝子の役割を解明する。

(2) GPCRのクラスリン小胞を介した細胞内への取り込み機構の解明

GPCRのエンドサイトーシスの初期過程ではたらく4種類のタンパク質を蛍光標識し、変異体におけるクラスリン小胞の動態を解析し、GPCRのエンドサイトーシスによる取り込みに必要な遺伝子を解析した。

(3) GPCRのエンドソーム-リソソーム間輸送の分子機構の解明

GPCRのエンドソーム-リソソーム間輸送を制御するRab5およびRab7タンパク質について、それぞれ単独および二重欠損変異体を作成し、GPCRのエンドソーム-リソソーム間輸送に与える影響について蛍光顕微鏡を用いて解析した。また、Rab5/Rab7二重変異体について、電子顕微鏡によりエンドソームおよびリソソーム形態に与える影響について調べた。

4. 研究成果

(1) 出芽酵母PI4キナーゼ変異体の作成とGPCRのエンドサイトーシスに与える影響

細胞膜成分であるPI(4)PおよびPI(4,5)₂のクラスリン小胞形成およびGPCRのクラスリン小胞への取り込みへの影響について調べるために、細胞膜PI4キナーゼStt4p、ゴルジ体PI4キナーゼPik1pおよび細胞膜PI(4)5キナーゼMss4pの温度感受性変異体(*stt4-1*, *pik1-1*, *mss4-1*)を作成した(図1)。これらの変異体におけるPI(4)PおよびPI(4,5)₂量を調べたところ、*stt4-1*変異体においては細胞膜のPI(4)Pの減少が見られ、*mss4-1*変異体においては細胞膜でのPI(4,5)₂量の減少が見られた。これに対して、*pik1-1*変異体ではどちらにも影響は見られなかった。これらの変異体を用いて、Ste2 GPCRのエンドサイトーシスに与える影響を調べた結果、*pik1-1*変異体ではほとんど影響がなかったのに対して、*stt4-1*変異体と*mss4-1*変異体においてはGPCRの細胞内への取り込みに

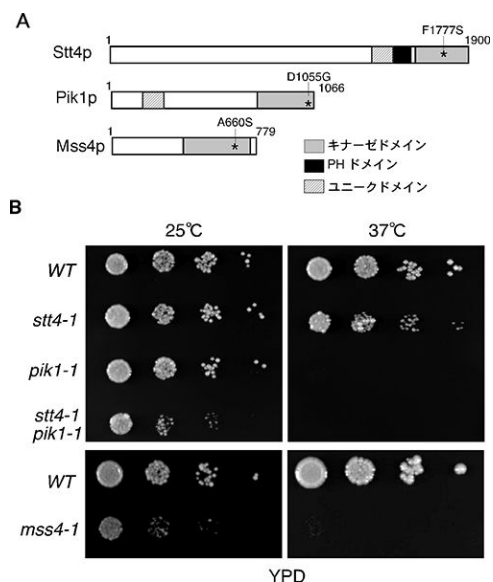


図1 PIキナーゼ変異体の作成

異常が見られた。これらの変異体におけるエンドサイトーシスへの影響についてさらに詳しく解析したところ、興味深いことに、*stt4-1* 変異体ではクラスリン小胞の形成自体には影響がないが、GPCR のクラスリン小胞内部への取り込みに異常が生じていることが分かった。一方、*mss4-1* 変異体では GPCR のクラスリン小胞への取り込みには異常がないが、クラスリン小胞の細胞内への移動に異常が生じていることが分かった。これらの結果は、GPCR のエンドサイトーシスにおける PI(4)P と PI(4,5)P2 の役割の違いを明確に示している (Yamamoto et al., JCS, 2018)。

(2) クラスリン軽鎖のアクチン重合因子 WASp の局在への必要性

GPCR のエンドサイトーシスの初期過程で働く 4 つの蛋白質 Ede1p、Syp1p、Yap1801p および Yap1802p に 3 分子の GFP を付加し、その全てを発現する細胞 (FEC-3GFP 細胞) を作製し、GPCR 取り込みの初期過程を詳細に解析した (図 1A)。まず、はじめに FEC-3GFP の蛍光強度について、それぞれの GFP 融合タンパク質と比較したところ、FEC-3GFP は各タンパク質の蛍光強度に比べ 3~5 倍高く、非常に明るいことが分かった (図 2B)。FEC-3GFP をマーカーとして野生型細胞におけるクラスリン被覆の形成時間を調べたところ、20~270 秒と小胞ごとに大きく異なるが、全体としては平均値 105 ± 35 秒前後をピークとする正規分布の値を示した (図 2C)。次に、GPCR のエンドサイトーシスに関わる 33 種のエンドサイトーシス関連蛋白質の遺伝子欠損に FEC-3GFP を発現させ、クラスリン被覆形成への影響を調べた。この結果、クラスリン被覆小胞の形成時間が伸長しているいくつかの変異体を同定した (図 2D)。

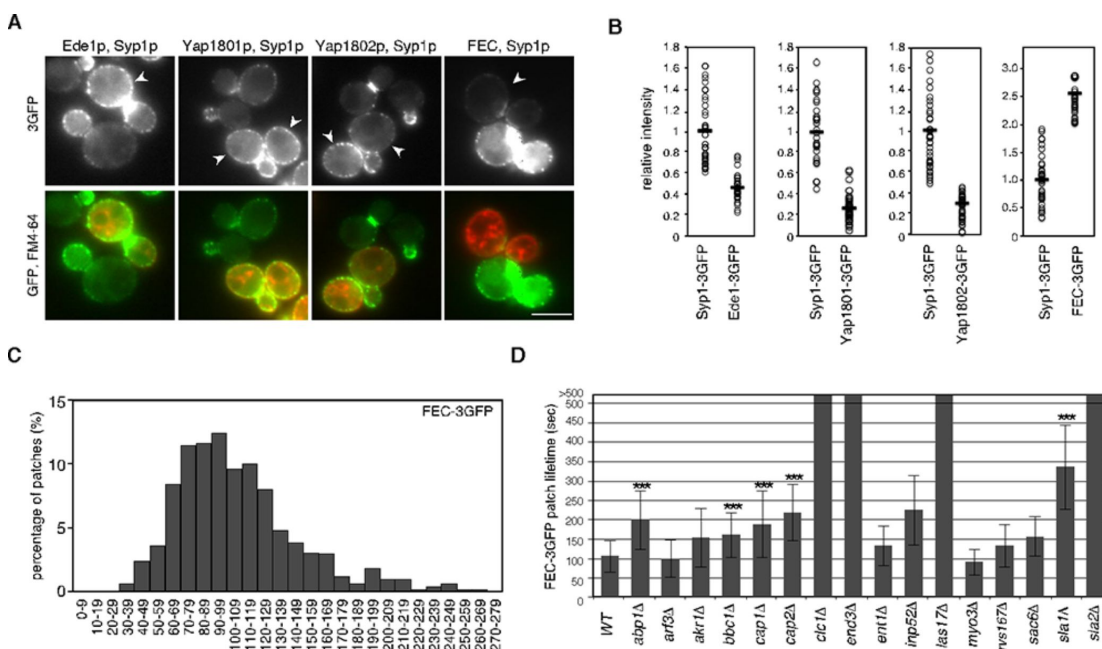


図 2. クラスリン形成初期マーカーの作製とエンドサイトーシス変異体における影響

これらの中で、特にクラスリン被覆小胞の形成時間が伸びている *clc1*、*end3*、*las17*、*sla2* 変異体においては、小胞形成時に一過的に見られるアクチン重合にも大きな異常が見られた。さらに、*end3* 変異体ではクラスリン被覆小胞の形成に重篤な異常が見られるのに対して、*las17*、*sla2* 変異体ではアクチン重合に異常が大きく、その結果としてクラスリン小胞の細胞内への取り込みが抑制されていることが分かった。特に興味深いことに、*clc1* 変異体ではクラスリン小胞の形成が損なわれていると共に、アクチン骨格にも重篤な異常を示すが、GPCR のリクルート自体は正常に起こっていることが分かった。*clc1* 変異体について、さらに詳細に解析した結果、クラスリン小胞の形成部位へのアクチン重合因子 WASp (酵母 *Las17*) のリクルートが損なわれており、アクチン重合が不規則に起こっていることが分かった。これらの結果は、クラスリン軽鎖が WASp の局在および活性を直接もしくは間接的に制御していることを示している。

(3) Rab5 Rab7 による GPCR のエンドソーム-リソソーム間輸送の制御

以前の研究において、GPCR のエンドソーム-リソソーム間輸送に低分子量 GTP アーゼである Rab5、Rab7 およびそれらの相互作用因子が必要であることが示された。Rab7 の活性化は Rab5 の活性化に伴い、Rab コンバージョンと呼ばれる機構で連続的に活性化することが報告されて

いるが、私達は Rab5 の存在しない細胞においても GPCR の一部が正常にリソソームへと輸送され、分解されることを見出した。興味深いことに、Rab5 欠損細胞において Rab7 は活性化され、リソソーム膜に局在することが分かった (図 3B、*rab5Δ*細胞)。このことは、Rab7 が Rab5 非依存的に活性化される機構が存在することを示している。Rab5 (ScRab5) および Rab7 (ScRab7) 欠損変異体における GPCR の輸送への影響を調べたところ、Rab5 欠損細胞では AP-3 経路依存的にリソソームで分解されるのに対して、ScRab7 欠損細胞では断片化したリソソームへの GPCR の輸送が見られた (図 3B)。さらに Rab5 Rab7 の二重変異体ではリソソーム自体の形成が見られなくなり、GPCR の輸送も完全に抑制された (図 3A,B)。これらの結果より、Rab7 の Rab5 非依存的な活性化が AP-3 経路を介している可能性が考えられた。また、ScRab5 ScRab7 二重変異体が ScRab5 または ScRab7 単独変異体と比較して、かなり重篤なリソソームの形成異常を引き起こすことを示すことから、Rab5 と Rab7 はリソソームの形成および GPCR のリソソームへの輸送において、部分的に重複した機能を有することが示唆された。

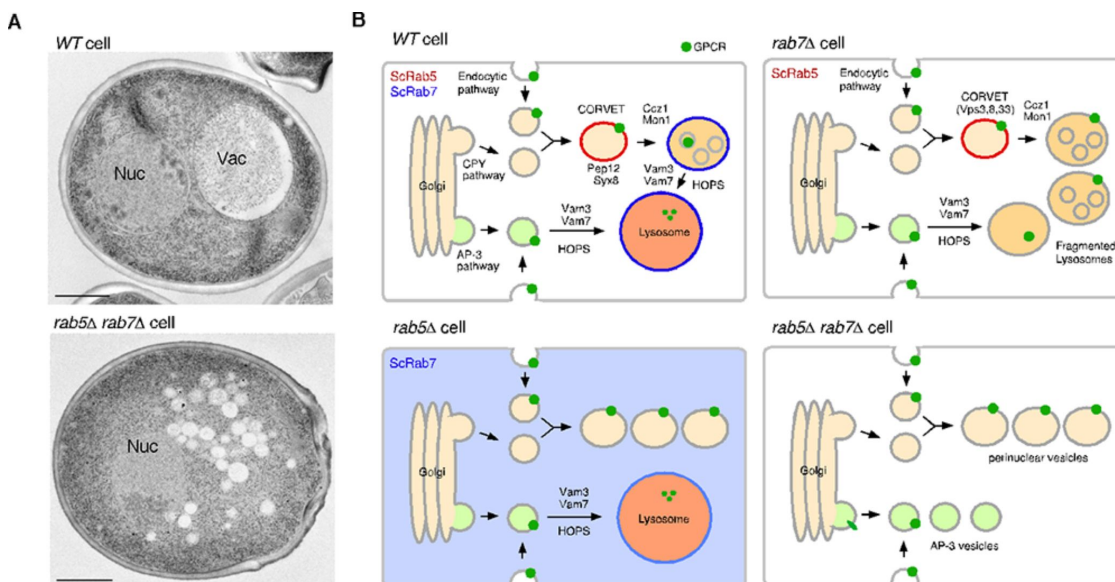


図 3 . 酵母 Rab5 および Rab7 欠損変異体におけるリソソームの形態と GPCR の輸送モデル

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計 6 件)

1. Michiko Abe, Mayu Saito, Ayana Tsukahara, Shuka Shiokawa, Kazuma Ueno, Hiroki Shimamura, Makoto Nagano, Junko Y. Toshima, and Jiro Toshima. Functional complementation reveals that 9 of the 13 human V-ATPase subunits can functionally substitute for their yeast orthologs. *J. Biol. Chem.*, 17, 2019, 8273-8285, DOI: 10.1074/jbc.R118.006192.
2. Hiroki Shimamura, Makoto Nagano, Keita Nakajima, Junko Y. Toshima, and Jiro Toshima. Rab5-independent activation and function of yeast Rab7-like protein, Ypt7p, in the AP-3 pathway. *PLoS One*, 14, 2019, e0210223. DOI: 10.1371/journal.pone.0210223
3. Masashi Miyashita, Ryutaro Kashikuma, Makoto Nagano, Junko Y. Toshima, Jiro Toshima. Live-cell imaging of early coat protein dynamics during clathrin-mediated endocytosis. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Res.*, 1865, 2018, 1566-1578. DOI: 10.1016/j.bbamcr.2018.07.024
4. Wataru Yamamoto, Suguru Wada, Makoto Nagano, Kaito Aoshima, Daria Elisabeth Siekhaus, Junko Y. Toshima, and Jiro Toshima. Distinct roles for plasma membrane PtdIns(4)P and PtdIns(4,5)P₂ during yeast receptor-mediated endocytosis. *J. Cell Sci.*, 131, 2018, jcs207696. DOI: 10.1242/jcs.207696.
5. Takahiro Hamoya, Shingo Miyamoto, Susumu Tomono, Gen Fujii, Ruri Nakanishi, Masami Komiya, Shuya Tamura, Kyoko Fujimoto, Jiro Toshima, Keiji Wakabayashi, Michihiro Mutoh. Chemopreventive effects of a low-side-effect antibiotic drug, erythromycin, on mouse intestinal tumors. *J. Clin. Biochem. Nut.*, 60, 2017, 199-207.

DOI: 10.3164/jcbn.16-107

6. Kazuma Ueno, Makoto Nagano, Shigeki Shimizu, Junko Y. Toshima, and Jiro Toshima. Lipid droplet proteins, Lds1p, Lds2p, and Rrt8p, are implicated in membrane protein transport associated with ergosterol. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 475, 2016, 315-321.

DOI: 10.1016/j.bbrc.2016.05.099.

[学会発表](計103件)

1. 長野真, 十島純子, 十島二郎: 出芽酵母においてトランスゴルジネットワークが制御するエンドソーム形成の分子機構. 第41回日本分子生物学会年会, 2018年
2. 増田露美, 他4名, 十島二郎: 出芽酵母におけるエンドソーム-ゴルジ体間輸送経路の解析. 第41回日本分子生物学会年会, 2018
3. 野間悠加, 他3名, 十島二郎: 出芽酵母ホモログ Rab6 のエンドサイトーシス-リサイクリング経路における役割. 第41回日本分子生物学会年会, 2018年
4. 燕昇司万里子他3名, 十島二郎: エンドサイトーシスにおけるクラスリン小胞のアクチン骨格を介した輸送機構の解析. 第41回日本分子生物学会年会, 2018年
5. 勝又郁実, 他4名, 十島二郎: 出芽酵母 Rho ファミリータンパク質 Cdc42p によるエンドサイトーシスにおけるアクチン細胞骨格の制御. 第41回日本分子生物学会年会, 2018年
6. 小倉一萌, 他3名, 十島二郎: 哺乳類 Eps15 ホモログ Pan1p によるアクチン依存的なエンドサイトーシス小胞の輸送制御. 第41回日本分子生物学会年会, 2018年
7. 諏訪園真大, 他3名, 十島二郎: 細胞内輸送経路における PtdIns(4)P ホスファターゼの役割. 第41回日本分子生物学会年会, 2018年
8. 長岡稜夏, 長野真, 十島純子, 十島二郎: エンドサイトーシスにおけるアクチン結合タンパク質 Abp1p によるアクチン骨格制御. 第41回日本分子生物学会年会, 2018年
9. 青嶋海斗, 山本航, 長野真, 十島純子, 十島二郎: ゴルジ体 PI4 キナーゼ Pik1p の機能欠損によるエンドサイトーシス経路への影響. 第41回日本分子生物学会年会, 2018年
10. 塚原彩菜, 長野真, 十島純子, 十島二郎: エンドサイトーシス経路とポストゴルジ輸送経路の融合機構の探索. 第41回日本分子生物学会年会, 2018年
11. 櫻村絵里子, 他4名, 十島二郎: Rho ファミリーGTPase のアクチン仲介型エンドサイトーシスにおける役割. 第41回日本分子生物学会年会, 2018年
12. 進藤礼奈, 他3名, 十島二郎: クラスリン仲介型エンドサイトーシスにおける PI(4,5)P₂ によるアクチン骨格制御. 第41回日本分子生物学会年会, 2018年11月28日, 横浜
13. 松澤みのり, 他3名, 十島二郎: 出芽酵母プロフィリン Pfy1p によるアクチン仲介型エンドサイトーシスの制御. 第41回日本分子生物学会年会, 2018年
14. 中山怜美, 他3名, 十島二郎: 出芽酵母フリッパーゼの細胞内小胞輸送における機能の重複性の解析. 第41回日本分子生物学会年会, 2018年
15. 島村洋輝, 他3名, 十島二郎: 酵母 Rab7 ホモログ Ypt7p のポストゴルジ輸送経路における活性化機構の解析. 第41回日本分子生物学会年会, 2018年
16. 山本航, 他4名, 十島二郎: 酵母キナーゼ Stt4p の受容体のエンドサイトーシス、リサイクリング経路における役割. 第41回日本分子生物学会年会, 2018年
17. 長野真, 十島純子, 十島二郎: エンドソーム成熟過程における脱ユビキチン化酵素 Doa4p を介した出芽酵母 Rab5 の局在制御. 第91回日本生化学会大会, 2018年
18. 島村洋輝, 長野真, 十島純子, 十島二郎: Rab5 非依存的な経路における酵母 Rab7 による液胞形成機構の解析. 第91回日本生化学会大会, 2018年
19. 野間悠加, 他3名, 十島二郎: 出芽酵母 Rab6 および V 型 ATPアーゼによるエンドサイトーシス-リサイクリング経路の制御. 第91回日本生化学会大会, 2018年
20. 燕昇司万里子, 他3名, 十島二郎: 酵母エンドサイトーシスにおけるクラスリン被覆小胞のアクチン骨格を介した輸送機構の解析. 第91回日本生化学会大会, 2018年
21. 勝又郁実, 他4名, 十島二郎: 出芽酵母 Rho ファミリータンパク質 Cdc42p によるエンドサイトーシスにおけるアクチン細胞骨格の制御. 第91回日本生化学会大会, 2018年
22. 諏訪園真大, 他4名, 十島二郎: 細胞内輸送経路における PtdIns(4)P ホスファターゼの役割. 第91回日本生化学会大会, 2018年
23. 中山怜美, 他3名, 十島二郎: 出芽酵母フリッパーゼの細胞内小胞輸送における機能の重複性の解析. 第91回日本生化学会大会, 2018年
24. 進藤礼奈, 他3名, 十島二郎: クラスリン仲介型エンドサイトーシスにおける PI(4,5)P₂ によるアクチン骨格制御. 第91回日本生化学会大会, 2018年
25. 長野真, 十島純子, 十島二郎: ESCRT 関連ユビキチン化酵素 Doa4p を介した Rab5 ホモログ

- の局在解析. 酵母遺伝学フォーラム第 51 回研究報告会, 2018 年
26. 櫻村絵里子, 他 3 名, 十島二郎: Rho ファミリーGTPase のアクチン仲介型エンドサイトーシスにおける役割. 酵母遺伝学フォーラム第 51 回研究報告会, 2018 年
 27. 島村洋輝, 他 3 名, 十島二郎: 出芽酵母 Rab7 の Rab5 非依存的な細胞内輸送経路における必要性. 酵母遺伝学フォーラム第 51 回研究報告会, 2018 年
 28. 塚原彩菜, 長野真, 十島純子, 十島二郎: エンドサイトーシス経路と VPS 経路の融合機構の探索. 酵母遺伝学フォーラム第 51 回研究報告会, 2018 年
 29. 松澤みのり, 他 3 名, 十島二郎: 出芽酵母プロフィリン Pfy1p によるアクチン仲介型エンドサイトーシスの制御. 酵母遺伝学フォーラム第 51 回研究報告会, 2018 年
 30. 山本航, 他 3 名, 十島二郎: 受容体エンドサイトーシスにおける PtdIns(4)P の必要性. 酵母遺伝学フォーラム第 51 回研究報告会, 2018 年
 31. 長野真, 十島純子, 十島二郎: Arf1p and Rab11 play key roles in Rab5 activation in *Saccharomyces cerevisiae*. 第 70 回日本細胞生物学会大会, 2018 年
 32. 燕昇司万里子, 他 4 名, 十島二郎: Requirement of Pan1p complex for recruitment of actin filaments to endocytic site. 第 70 回日本細胞生物学会大会, 2018 年
 33. 勝又郁実, 他 4 名, 十島二郎: Distinct roles for the Rho-family GTPases in yeast actin-mediated endocytosis. 第 70 回日本細胞生物学会大会, 2018 年
 34. 増田露美, 他 3 名, 十島二郎: Involvement of COPI-coated vesicle in protein sorting from the endosome to the Golgi. 第 70 回日本細胞生物学会大会, 2018 年
 35. 野間悠加, 他 5 名, 十島二郎: Cooperative function of yeast Rab6/Ypt6 and V-ATPase in the endocytic recycling pathway. 第 70 回日本細胞生物学会大会, 2018 年
 36. 小倉一萌, 他 4 名, 十島二郎: Regulation of transport of endocytic vesicles through actin cytoskeleton by Pan1p. 第 70 回日本細胞生物学会大会, 2018 年
 37. 島村洋輝, 長野真, 十島純子, 十島二郎: Rab5-independent vacuolar formation by Rab7 in budding yeast. 第 70 回日本細胞生物学会大会, 2018 年
 38. 諏訪園真大, 他 5 名, 十島二郎: Requirement of PtdIns(4)P metabolism by PI4 kinase and phosphatase during receptor-mediated endocytosis. 第 70 回日本細胞生物学会大会, 2018 年 6 月 6 日, 東京
(他 6 5 件)

〔図書〕(計 1 件)

1. 長野真、十島純子、十島二郎(分担執筆)、化学同人、メンブレントラフィック(福田光則・吉森保編) / 14 章 酵母を用いたメンブレントラフィック研究, 2016, 200-213
ISBN : 9784759817232

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

なし

6 . 研究組織

(1)研究分担者

(2)研究協力者

なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。