

平成 22 年 6 月 18 日現在

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2007～2009

課題番号：19570120

研究課題名 (和文) エンドサイトーシスによる細胞外シグナルの下方制御機構の解析

研究課題名 (英文) Analysis of regulatory mechanism of extracellular signal by 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・講師

研究者番号：00333831

研究成果の概要：エンドサイトーシスにおける細胞外シグナルの下方制御機構について、出芽酵母の接合フェロモンの受容体シグナルをモデルとして用いて研究を行った。本研究では、受容体のリン酸およびユビキチン化が、受容体をエンドサイトーシスの部位へと効率的に輸送するために重要であることを明らかにした。

研究成果の概要 (英文)：

Endocytic internalization of receptor plays a critical role in down-regulation of receptor-mediated signaling, such as cell growth and differentiation. Here we identify recruitment of receptors to pre-existing clathrin-coated pits as a key step regulated by receptor phosphorylation and subsequent ubiquitination upon ligand binding.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2008年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2009年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：

科研費の分科・細目：

キーワード：

## 1. 研究開始当初の背景

細胞外シグナルの下方制御は、活性化した受容体をエンドサイトーシスにより速やかに細胞内に取り込み分解する機構であり、細胞の増殖・分化に関わっているヒトの多くの上皮癌ではこの制御に異常が生じ、細胞の増殖シグナルが恒常的に活性化されていることが報告されているが、活性化した受容体がどのようにしてクラスリン被服小胞により取り込まれ、細胞内へと輸送されるかは、まだ十分には明らかにされていない。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、活性化した受容体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初期エンドソームへの輸送機構を明らかにすることである。エンドサイトーシスは広い生物種において見られる現象であり、その分子機構は高く保存されている。本研究では出芽酵母を用いて先駆的な研究を行い、将来的には同様の現象が哺乳類細胞でも見られるかを調べ、ヒトの病因の解明や、治療法の開発へと繋げていくことを目的とする。

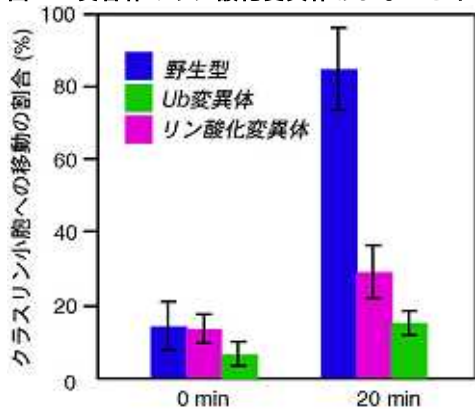
### 3. 研究の方法

- (1) 受容体のリン酸化、ユビキチン化変異体を作製し、クラスリン小胞への移動を解析する。また、受容体のリン酸化酵素 (Yck2) の変異体についても同様の解析を行う。
- (2) リガンド-受容体のクラスリン小胞への移動を制御するタンパク質を酵母ツーハイブリッドシステムおよび、遺伝子の欠損変異体を用いた解析により同定する。
- (3) クラスリン小胞のアクチンフィラメントを介した細胞内への取り込み機構の解析。
- (4) クラスリン小胞のアクチンフィラメントを介した細胞内への取り込みに異常が見られる変異体の解析。

### 4. 研究成果

- (1) 受容体のリン酸化、ユビキチン化変異体を作製し、クラスリン小胞への移動を解析した結果、これらの変異体ではクラスリン小胞への移動が著しく抑制されていた (図1)。また、受容体のリン酸化酵素 (Yck2) の変異体についても同様の結果が得られた。

図1. 受容体のリン酸化変異体およびユビキチン化



(Ub)変異体のクラスリン小胞への移動

- (2) 受容体のクラスリン小胞への移動を制御するタンパク質について探索した結果、クラスリン小胞に存在し、ユビキチン結合ドメインを持つ Ede1p および Ent1p を受容体結合タンパク質として同定した。これらのタンパク質をコードする遺伝子の変異体を用いて同様の実験を行ったところ、Ede1p および Ent1p の二重変異体において、受容体のクラスリン小胞への移動に著しい抑制が見られた (図2)。

さらに、Ste2p のリン酸化型特異的に結合する質を同定するため、酵母ゲノムライブラリーを用いてスクリーニングを行った。40万種の形質転換体をスクリーニングした結果、23個のポジティブなコロニーを得、各コロニーからプラスミドを回収し、遺伝子を同定した。この結果、哺乳類 14-3-3 タンパク質酵母ホモログである Bmh2p を Ste2p の新規結合タンパク質として同定した。Bmh2p の Ste2p

への結合がリン酸化依存적であるかを調べるため、脱リン酸化型 Ste2p との結合を調べた。この結果、Bmh2p は脱リン酸化型 (Ste2-6SA) とは結合しなかった (図3)。以前の研究において、*BMH2* 遺伝子はクラスリン遺伝子と遺伝学的に相互作用することが報告されており、これらのことから Bmh2p は Ste2p のクラスリン被覆小胞によるエンドサイトーシスに参与している可能性が示唆された。

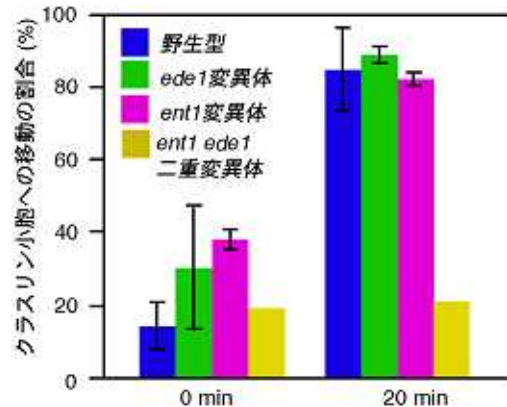


図2. 受容体のリン酸化変異体およびユビキチン化 (Ub) 変異体のクラスリン小胞への移動

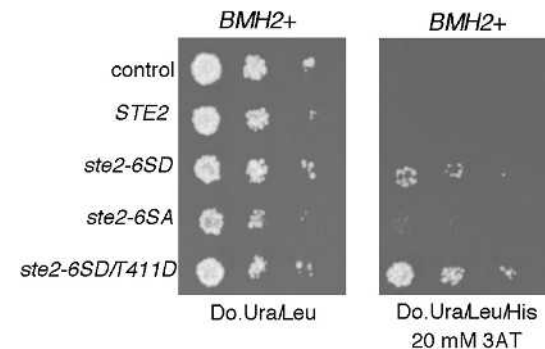


図3. Ste2p の Bmh2p へのリン酸化依存的結合

- (3) クラスリン小胞のアクチンフィラメントを介した細胞内への取り込み機構の解析については、クラスリン小胞形成の異なる過程で働くタンパク質 Sla1p、Abp1p を mRFP で、またアクチンフィラメントを Abp140-3GFP で標識し、アクチンフィラメントがクラスリン小胞形成のどの段階で現れるかを調べた (図4)。この結果、Sla1p が現れてからアクチンフィラメントがクラスリン小胞の部位に現れるまでの時間は  $19.8 \pm 3.2$  秒、Abp140p が現れてから消失するまでの時間は  $12.3 \pm 2.0$  秒であった。また、Sla1p で標識されたエンドサイトーシス部位にアクチンケーブルは 99%以上の確率で現れた。更に、クラスリン小胞はアクチンフィラメントの重合の方向に、約 200 ~ 300 nm/秒の速度で細胞内に

取り込まれることが明らかになった。

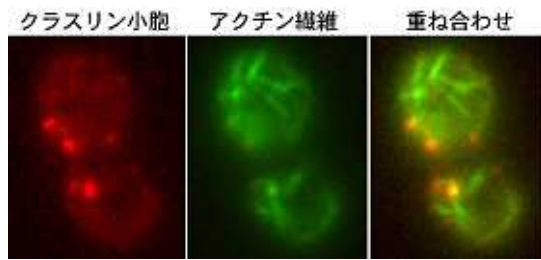
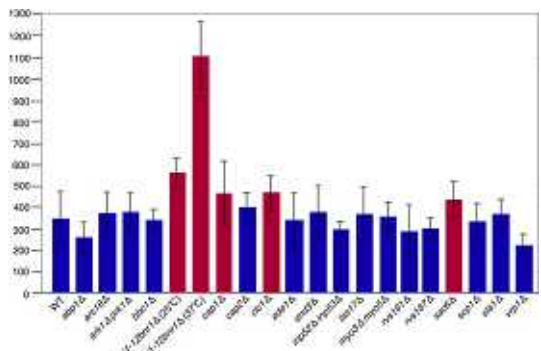


図 4. クラスリン小胞とアクチンフィラメントの二重蛍光写真

(4) クラスリン小胞のアクチンフィラメントを介した細胞内への取り込みに異常が見られる変異体の解析

エンドサイトーシスに関わるタンパク質の遺伝子欠損変異体 30 種類についてアクチンフィラメントとクラスリン小胞の動態を解析した(図 5)。この結果、5 種類の変異体において顕著な異常がみられた。これらの変異体について、さらにアクチンフィラメントの動態について解析したところ、哺乳類 Formin の酵母ホモログである Bni1、アクチンキャッピングタンパク質である Cap1、アクチン束化タンパク質である Sac6 において、顕著な異常が認められた。

図 5. エンドサイトーシス関連遺伝子変異体におけるア



クチンケーブルの移動速度

蛍光標識したエンドサイトーシスマーカー、Alexa-*a*-factor を用いたスクリーニングを行った。Alexa-*a*-factor は野生型細胞においてエンドサイトーシスされた後、約 5 分で初期エンドソームへと輸送され、約 10 分後には後期エンドソームから液胞 (リソソーム)、約 15 分後には、大部分の Alexa-*a*-factor が液胞へと輸送される。このマーカーを用いて、出芽酵母のエンドサイトーシス経路で機能するタンパク質のスクリーニングを行った。まず、酵母のゲノムデータベースより、酵母のエンドサイトーシスに関連するタンパク質、約 300 種類を選び、これらの遺伝子欠損変異体を作成した。これ

らの各遺伝子欠損変異体を用いて、Alexa-*a*-factor を取り込ませた後、15 分において、Alexa-*a*-factor の液胞への輸送に遅延が生じている変異体のスクリーニングを行った。現在までに、約 200 種類の遺伝子欠損変異体のスクリーニングが完了しており、10 種類の変異体を同定した。輸送の異常が見られた変異体は大きく 2 種類に分類された。一つは、Alexa-*a*-factor が細胞膜上に局在し、細胞内へ取り込まれていない変異体であり、これらには End3、Rvs161、Sac6、Sla1 などの遺伝子欠損変異体が含まれている。これらのタンパク質にはクラスリン被覆小胞の形成に関わるものが多く含まれているため、クラスリン形成異常により Alexa-*a*-factor の輸送に遅延が生じていると考えられる。もう一つのグループは、Alexa-*a*-factor が細胞内には取り込まれるが、液胞への輸送が野生型と比べて遅れているものであり、Cap1、Rom2、Ypt7p の変異体などが含まれていた。これらの変異体は Alexa-*a*-factor のエンドソーム-液胞間の輸送に異常がある可能性がある。現在、残りの遺伝子欠損変異体のスクリーニングを継続しているとともに、スクリーニングで得られたタンパク質の機能解析を進めている。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 3 件)

Junko Y. Toshima, Jun-ichi Nakanishi, Kensaku Mizuno, Jiro Toshima, and David G. Drubin: Requirements for recruitment of a G protein-coupled receptor to clathrin-coated pits in budding yeast.. *Mol. Biol. Cell*, vol.20, 2009, pp.5039-5050.

十島純子、十島二郎: エンドサイトーシスによる受容体シグナルの制御とがん, *最新医学*, vol.24, 2010, pp.1295-1301.

十島純子、十島二郎: G 蛋白質共役型受容体 (GPCR) のユビキチンを介したエンドサイトーシス機構. *生化学*, 2010, 印刷中.

[学会発表](計 5 件)

十島純子、中西淳一、水野健作、David Drubin、十島二郎: G蛋白質共役型受容体 (GPCR) のクラスリン被覆小胞を介したエンドサイトーシス機構, 第32回分子生物学

会, 2009年12月, 横浜

鈴木良平、十島純子、十島二郎: 出芽酵母におけるEHドメインタンパク質によるエンドサイトーシスの制御機構の解析, 第32回分子生物学会, 2009年12月, 横浜

小島愛、十島純子、十島二郎: Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>対向輸送体NHX1pの細胞内局在と細胞内小胞輸送における役割, 第32回分子生物学会, 2009年12月, 横浜

佐藤祥史、十島純子、十島二郎: 出芽酵母Rab5ホモログYpt51pの細胞内局在とエンドサイトーシスにおける役割, 第32回分子生物学会, 2009年12月, 横浜

長島万希子、十島純子、十島二郎: 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フィラメントを介した輸送機構の解析, 第32回分子生物学会, 2009年12月, 横浜

〔図書〕(計0件)

なし

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計 件)

〔その他〕

ホームページ等

なし

## 6. 研究組織

(1)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・講師

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし