

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 7 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24770098

研究課題名(和文) SH3YL1による細胞膜形態制御機構とエンドサイトーシス機構への関与の解析

研究課題名(英文) Analysis of the role of SH3YL1 in the morphology of plasma membrane and endocytosis machinery

研究代表者

長谷川 純矢 (HASEGAWA, Junya)

大阪大学・生命機能研究科・助教

研究者番号：00533788

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円、(間接経費) 1,080,000円

研究成果の概要(和文)：SH3YL1は新規の脂質結合ドメイン(SYLFドメイン)を有しており、細胞膜ラッフリング形成に重要であることを報告している。本研究では、*in vitro*でのリポソームを小さくするSYLFドメインのvesiculation活性の生理的意義の解明を目的とした。

細胞内でSH3YL1-GFPは、初期エンドソーム近傍に局在することが認められた。また、SH3YL1 RNAiにおいて、EGFの取り込み、EGFRの分解の減少、またMultivesicular body(MVB)形成も抑制され、SH3YL1がMVB形成に必須であることが示された。今後は、より詳細なメカニズム解明を実施する予定である。

研究成果の概要(英文)：The ubiquitinated signaling receptors such as the epidermal growth factor (EGF) receptor (EGFR) are delivered to early endosomes, and then sorted to lysosomes for degradation via multivesicular bodies (MVBs). The mechanism underlying the formation and scission of intraluminal vesicles to generate MVBs has remained elusive. In this study, we find that the localization of SH3YL1, which has been found by our group previously, shows the punctate pattern and the puncta is localized close to early endosomes. Deficiency of SH3YL1 prevents EGF trafficking from early to late endosomes, and inhibits the degradation of EGFR. Moreover, we show that loss of SH3YL1 results suppression of EGFR sorting into MVBs, indicating that SH3YL1 is required for the MVB biogenesis. Taken together, our observations reveal that an indispensable role of SH3YL1 in sorting of EGFR and MVB biogenesis.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・構造生物化学

キーワード：イノシトールリン脂質 エンドサイトーシス

1. 研究開始当初の背景

細胞膜は、成長因子やホルモンなどの外界刺激に応答し、ダイナミックな変化をとげ、その結果、細胞の運動や分化等に適應することができる。その膜変形の基本原理を支えているのが、細胞膜を構成する脂質分子と細胞質中のタンパク質との直接的な相互作用である。これまでに PH ドメイン、PX ドメイン、BAR や F-BAR ドメイン等リン脂質結合ドメインは広く研究され機能も判明しているものも多いが、未だ発見・解明されていないリン脂質結合ドメインも多い。

申請者は最近、新規のリン脂質結合ドメイン SYLF ドメインを発見・定義し、そのドメインを有する哺乳類細胞唯一の SH3YL1 という機能未知であったタンパク質が、イノシトールリン脂質との結合を介して膜ラフリングの形成を制御することを見出している (Hasegawa *et al.* J Cell Biol. 2011)。また、興味深いことに、*in vitro* において、SYLF ドメインが酸性リン脂質含有リポソームを小胞化する活性 (vesiculation 活性) を示すことを明らかにしている。さらに、全反射顕微鏡 (TIRF) を用いて SH3YL1-GFP の細胞内局在を観察したところ、ドット状の局在を示すことが判明した。このドットはクラスリンやカベオリンといった既知のエンドサイトーシスマーカーと一致せず、SH3YL1 は新規のエンドサイトーシス経路の分子であることが想定された。

2. 研究の目的

本研究の目的は、*in vitro* 及び *in vivo* で観察された SYLF ドメインの vesiculation 活性について、その生理的意義を解明することである。SH3YL1 が既存のエンドサイトーシスマーカーと一致しないことから、新規のエンドサイトーシス経路の分子であり、これまでと異なる新規経路を発見・提示できるものと思われる。

3. 研究の方法

a) *in vitro* vesiculation 活性の測定

リコンビナントタンパク質 (SYLF ドメインのみ、SH3YL1 全長) を大腸菌より精製し、Folch 画分 (酸性脂質が豊富な画分) のリポソームと混合し、顕微鏡下でその変化を観察した。リポソームを可視化するため、Folch 画分に少量のローダミン-PE を添加した。

b) マーカータンパク質の探索

SH3YL1-GFP は、クラスリンやカベオリン等のエンドサイトーシスマーカーとは共局在しなかったため、EEA1 (初期エンドソーム) や CD63 (後期エンドソーム) といったオルガネラマーカーとの共染色を試みた。また、EGF や transferrin (Tfn) を取り込ませて、SH3YL1-GFP のドットと共局在するのを経時的に観察した。

c) SH3YL1 RNAi によるエンドサイトーシスへの影響

HeLa もしくは COS-1 細胞を用いて SH3YL1 のノックダウンの系を構築し、EGF の取り込みへの影響並びに EGF 受容体の分解アッセイを行った。

d) Multivesicular body (MVB) 形成への影響の検討

SH3YL1 RNAi によって EGF の取り込みに影響はないものの、初期・後期エンドソーム間の輸送に影響があることが示唆されたことから、MVB への輸送に影響が出るか観察した。具体的には、SH3YL1 RNAi による MVB マーカーの局在変動及び EGFR の MVB への移行具合を検討した。後者に関しては、Rab5 (Q79L) 発現に伴い形成されるラージエンドソーム内に通常では EGF 受容体が含有されるが、MVB 陥入に異常が生じるとラージエンドソーム内への局在は認められなくなる、ということを指標に検討した。

4. 研究成果

(1) vesiculation 活性の再現確認

まずは、*in vitro* での vesiculation 活性の確認を行った。リコンビナントタンパク質 (SYLF ドメインのみ、SH3YL1 全長) を精製し、リポソームの挙動を顕微鏡下で観察した。以前と同様、SYLF ドメインを添加した場合は、大きいリポソームは効率良く小さいリポソームに変化した (vesiculation 活性)。一方、SH3YL1 全長タンパク質の添加では、vesiculation 活性を示したものの、SYLF ドメインほどの活性はなかった。これは全長タンパク質ではフォールディングにより、SYLF ドメインが隠されてしまっているのが原因だと思われる。現在、SYLF ドメイン及び全長において結晶構造解析を進めており、構造が解けたら、どのようにフォールディングされているのかより理解が進むものと思われる。また、SYLF ドメイン内のどのアミノ酸 (特に塩基性アミノ酸) が vesiculation 活性に必須なのか、点変異体を作製し、検討する予定である。

(2) オルガネラマーカーとの共局在

次に、SH3YL1-GFP のドットがどのオルガネラマーカーと重なるか、初期エンドソームマーカーの EEA1、リサイクリングエンドソームマーカー-transferrin receptor (TfnR)、後期エンドソームマーカー-CD63 などとの共染色を行った。その結果、いずれのマーカーとも共局在を示さなかったが、SH3YL1 は EEA1 の非常に近傍に局在することが明らかとなった (図 1)。また、蛍光が付加された EGF 及び Tfn を細胞に取り込ませ、経時的に SH3YL1-GFP との共局在を観察したところ、0min ではほとんど重ならなかったものの、取り込み後 15min で、EGF の一部が SH3YL1 と共局在性を示した。このことから、SH3YL1 はエンドサイトーシスの初期ではなく後期過程に局在し、機能していることが推測された。

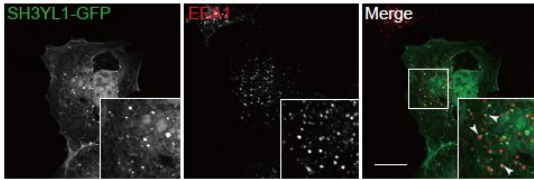


図 1. SH3YL1-GFP と EEA1 の共染色

(3) SH3YL1 RNAi によるエンドサイトーシス経路への影響

SH3YL1 がエンドサイトーシスのどの段階で機能しているのか検討するため、SH3YL1 のノックダウン (RNAi) の系を構築した。HeLa 細胞においてタンパク質レベルでノックダウンされているか確認後、細胞内に取り込んだ EGF を経時的に観察した。取り込み後すぐ (0min) では、初期エンドソームマーカーの EEA1 と良く共局在し、これは取り込み後 30min では共局在率は減少し

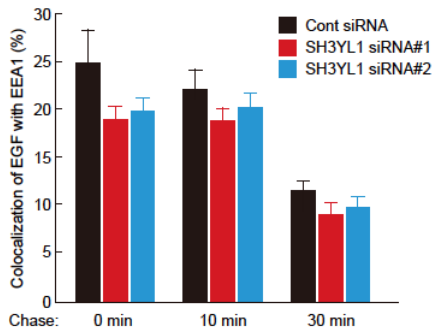


図 2. EGF と EEA1 との共局在率

た。SH3YL1 RNAi でもコントロールと同様な結果が得られ (図 2) SH3YL1 は EGF の細胞膜から初期エンドソームへの輸送には機能していないことが示唆された。

次に、初期エンドソームから後期エンドソームへの輸送を検討する目的で、EGF と CD63 の共局在を経時的に観察した。その結果、コントロールでは EGF 取り込み後 30min 及び 60min で CD63 と高い共局在を示したものの、SH3YL1 RNAi ではいずれの時間においてもほとんど CD63 とは重ならなかった (図 3)。

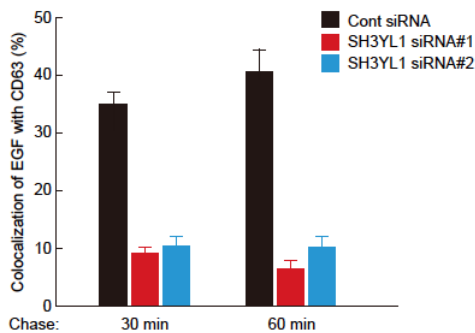


図 3. EGF と CD63 との共局在率

また、EGF 受容体の分解アッセイでも上記の実験結果と一致したデータが出ている。コントロールでは、EGF 刺激によって EGF 受容体は時間依存的に分解されるが、SH3YL1 RNAi ではその分解は著しく抑制されていた。これらの結果から、SH3YL1 は EGF のエンドサイトーシスで初期エンドソームから後期エンドソームの間で重要な役割を担っていることが強く示された。

(4) SH3YL1 RNAi による MVB 形成への影響

SH3YL1 はエンドソーム間で機能していることが推測されたので、次に MVB 形成に関与しているか検討した。MVB はエンドソーム上に窪みを形成し、それが中へ陥入しエンドソーム内に多数の小胞が局在するオルガネラで、その形成に ESCRT 分子が関わっていることがすでに知られている。その ESCRT 分子の幾つかに関して、SH3YL1 RNAi で局在及び発現変動を検討してみたが、抗体がうまく work せず、結果ははっきりしなかった。そこで、Rab5 (Q79L) を用いた MVB の模倣の実験系で検討することとした。Rab5 (Q79L) を発現させるとエンドソームが膨張し、それが MVB を模倣し、実際 EGF 受容体はその肥大したエンドソーム内に局在した。これは EGF 受容体が MVB 内に取り込まれていることを意味している。一方、SH3YL1 RNAi では、EGF 受容体が膨張したエンドソーム内ではなく、多くがその周りに局在していることが判明した (図 4)。すなわち、SH3YL1 RNAi では MVB 形成に欠落が生じており、その結果 EGF の輸送がその段階で停止していることが示唆された。

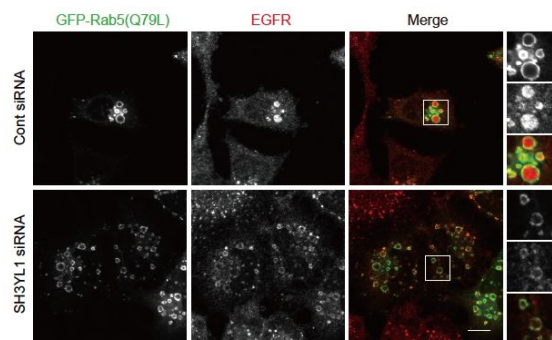


図 4. MVB 形成能への影響

以上の結果から、SH3YL1 は初期エンドソームと後期エンドソームの中間的な位置に局在しており、MVB 形成に極めて必須な分子であることが考えられた。今後は、*in vitro* の vesiculation 活性と MVB 形成の関連性を探るため、vesiculation 活性に必須なアミノ酸を同定し、その変異体を用いて MVB 形成への関与を検討するとともに、MVB 形成の

どの段階で SH3YL1 が機能しているのか、様々な ESCRT 分子との相互作用などを調査し、より詳細な SH3YL1 の機能解明を行っていく予定である。

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 5 件)

1. Phosphatidylinositol 4-phosphate in the Golgi apparatus regulates cell-cell adhesion and invasive cell migration in human breast cancer.
Tokuda E, Itoh T, Hasegawa J, Ijuin T, Takeuchi Y, Irino Y, Fukumoto M, Takenawa T. *Cancer Res.* in press (2014)
2. Antagonistic regulation of F-BAR protein assemblies controls actin polymerization during podosome formation.
Tsujita K, Kondo A, Kurisu S, Hasegawa J, Itoh T, Takenawa T. *J Cell Sci.* 126, 2267-2278 (2014)
3. Mechanistic insights into the regulation of circular dorsal ruffle formation.
Itoh T, Hasegawa J. *J Biochem.* 153, 21-29 (2013)
4. ARAP1 regulates the ring size of circular dorsal ruffles through Arf1 and Arf5.
Hasegawa J, Tsujita K, Takenawa T, Itoh T. *Mol Biol Cell.* 23, 2481-2489 (2012)
5. Quantification and visualization of phosphoinositides by quantum dot-labeled specific binding-domain probes.
Irino Y, Tokuda E, Hasegawa J, Itoh T, Takenawa T. *J Lipid Res.* 53, 810-819 (2012)

[学会発表](計 0 件)

[図書](計 1 件)

哺乳動物個体レベルでのオートファジーの意義と疾患とのかかわり
長谷川純矢、吉森保 *ファルマシア* 49 (6) 513-517 (2013)

[産業財産権]

○出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：

種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者
長谷川 純矢 (HASEGAWA JUNYA)

研究者番号：00533788

(2)研究分担者
()

研究者番号：

(3)連携研究者
()

研究者番号：