

令和 6 年 6 月 25 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K06168

研究課題名(和文) エンドサイトーシスを引き起こす内在性分子群の多色超解像マップの作成

研究課題名(英文) Multicolor super-resolution mapping of endogenous proteins involved in receptor endocytosis

研究代表者

木内 泰 (Kiuchi, Tai)

京都大学・医学研究科・准教授

研究者番号：70443984

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：クラスリン被覆部位には、多種のタンパク質が局在し、膜受容体のエンドサイトーシスを引き起こしている。これらのタンパク質の局在は、免疫電子顕微鏡や超解像顕微鏡法で観察されてきたが、これらの分子群の局在は、同一のクラスリン被覆部位では比較されてこなかった。そこで本研究では、多色超解像顕微鏡法によって、クラスリン被覆部位での内在性タンパク質の空間分布を明らかにした。そのために抗血清から標的に結合解離する蛍光プローブの作製方法を開発した。そして、同一のサンプルで8つの内在性標的分子の超解像可視化に成功し、EGF刺激に応じてEGFRとGrb2の共局在する特定の領域を発見した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

クラスリン依存性のエンドサイトーシスは、膜受容体の取り込みの主要経路である。クラスリン被覆部位に局在するタンパク質は、長年に渡って電子顕微鏡、蛍光ライブイメージング、超解像顕微鏡法といった方法で観察されてきた。本研究は、高密度・多重染色超解像顕微鏡法IRISによって、クラスリン被覆部位に局在するタンパク質間の共局在関係を初めて明らかにした。EGF受容体といった増殖因子受容体のエンドサイトーシスの破綻は、細胞のがん化と関連しており、本研究の成果は、この分子メカニズムの一端を明らかにしている。今後、IRISによって、このメカニズムの詳細の解明が期待できる。

研究成果の概要(英文)：In clathrin-coated structures (CCSs), various proteins are localized for receptor endocytosis. Their localizations have been elucidated by immunoelectron microscopy and super-resolution microscopy, but they have not been compared in a single CCS. In this study, antiserum-derived probes, which associate and dissociate from the target, have been developed. These probes revealed the distribution of eight endogenous targets in a single CCS by multiplexed super-resolution microscopy. Notably, EGFR and Grb2 were colocalized in a special region within a CCS.

研究分野：細胞生物学

キーワード：超解像顕微鏡法 エンドサイトーシス EGF受容体 クラスリン

1. 研究開始当初の背景

クラスリン被覆部位でのエンドサイトーシスに関わるタンパク質は、出芽酵母の遺伝子破壊株の表現型の解析によって数多く同定されている (*Trends Cell Biol.*, 22: 1-13, 2012)。これらの分子の動態は、蛍光ライブイメージングによって可視化され、エンドサイトーシスの段階に応じて異なる時間差でクラスリン被覆部位に集積することも詳細に調べられている (*PLoS Biol.*, 9: e1000604, 2011)。しかし、個々のクラスリン被覆部位には、可視化できていない多数の内在性タンパク質が局在している。これらのタンパク質間の結合は、複雑な分子間相互作用ネットワークが提唱されている (*Nature*, 448, 883-888, 2007; *Nature reviews molecular cell biology*, 12, 517-533, 2011)。このため、クラスリン被覆部位に局在するタンパク質の配置は、複数種類の分子との相互作用で決まると予想される。そして、エンドサイトーシスの段階に応じて、その組み合わせや配置を変化させることで、膜受容体の取り込みという機能を発揮していると考えられる。

このエンドサイトーシスを引き起こす多分子複合体を研究するため、免疫電顕や超解像顕微鏡法によってクラスリン被覆部位内での構成分子の観察が行われてきた (*J Cell Biol.*, 24: 1219-1232, 2008; *Nat. Cell Biol.*, 19: 352-361, 2017; *Cell*, 174: 884-896, 2018)。しかし、免疫電顕や超解像顕微鏡法で使える金粒子のサイズや蛍光色素の種類数に限りがあるため、同一の細胞ではクラスリン被覆部位での構成分子の可視化は1~2種類に留まっている。さらに標的分子の標識密度が低い場合、多数のクラスリン被覆部位から得られた標的分子の分布の平均が解析されているにすぎない。また標識密度を高めるための外来からの標的分子の発現は、クラスリン被覆部位の大きさや数に影響を与えることが知られている。このためクラスリン被覆部位でエンドサイトーシスを引き起こす分子複合体を可視化するためには、複数の内在性タンパク質の多色標識が必要である。

2. 研究の目的

本研究では、高密度・多重染色超解像顕微鏡法 IRIS を用いて、クラスリン被覆部位での分子複合体の可視化を行う。そこで、標的の様々なエピトープに対する抗体を含む抗血清から IRIS で用いる蛍光プローブを作製する。そしてクラスリン被覆部位でエンドサイトーシスを引き起こす分子複合体の構成マップを明らかにする。

3. 研究の方法

IRIS は、蛍光1分子の高精度な位置決めに基づく超解像顕微鏡法 PALM/STORM の原理を応用している (図1) (Kiuchi *et al.*, *Nat. Methods* 12, 743-746, 2015)。IRIS は、標的分子に結合し、離れない蛍光抗体や標的分子に融合した蛍光タンパク質に代わって、標的分子に結合解離する蛍光プローブ (IRIS プローブ) を用いる。IRIS プローブを固定し、膜可溶化した細胞に加えると、標的分子に結合したプローブは、蛍光1分子として捉えられる。その輝度分布をガウス関数でフィッティングすることで、光の回折限界を超えた精度でその中心点が決定される。この蛍光1分子の中心点を多数の蛍光1分子で積算することで、標的分子の分布の超解像画像が再構築される。この IRIS プローブは、標的分子に結合と解離を繰り返すため、標的分子の標識密度は、制限なく高めることができる。さらに IRIS プローブを洗い流し、別の標的に対する IRIS プローブを加えることで、連続的に複数の標的分子を標識することが可能である。これまで IRIS プローブは、標的分子に結合するタンパク質の断片が用いられてきた (Kiuchi *et al.*, *Nat. Methods* 12, 743-746, 2015)。またモノクローナル抗体の Fab 断片も報告されている (Miyoshi *et al.*, *Cell reports* 34, 108708, 2021)。

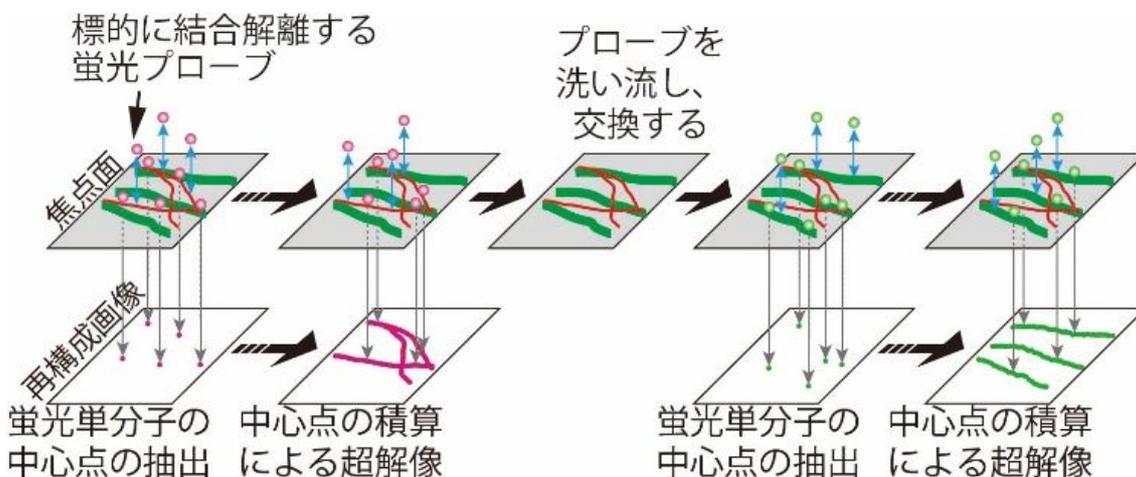


図1: 超解像顕微鏡法 IRIS の原理

本研究では、新たに抗血清から IRIS で使える Fab 断片の作製方法を確立した。抗血清には、標的分子の様々なエピトープに対するポリクローナル抗体が含まれている。このため、分子複合体を形成し、いくつかのエピトープが隠されている標的分子に対しても結合できることが期待される。本研究では、クラスリン被覆部位に局在する 8 つの内在性タンパク質に対する抗血清由来の Fab プローブを作製し、それらの多色超解像可視化を行った。

4. 研究成果

抗血清由来 Fab プローブは、クラスリン被覆部位の構成分子として Clathrin light chain (CLC)、AP2 複合体のサブユニットである AP2 β 2、FCHo1/2、Eps15、intersectin-1、さらに膜受容体として EGFR、transferrin receptor (TfR)、シグナル分子として Grb2 に対して作製した。抗血清からポリクローナル抗体の精製は、抗原を接合させたアフィニティーカラムを用いた。HeLa 細胞を使って、内在性の標的を染色できる精製フラクションを決定した。さらにその精製抗体の蛍光標識方法を工夫することで、非特異的な染色の少ない蛍光抗体を得ることができた。この蛍光抗体をタンパク質分解酵素パピンで処理することで、抗原認識部位を 1 価にした Fab 断片を得る。そしてこの Fab 断片をさらに精製することで、標的に結合解離する IRIS プローブの作製が作製できた。加えて、本研究では、発現させた標的タンパク質の分布を超解像可視化するため、ナノボディーから、EGFP または mCherry に結合解離する IRIS プローブも作製した。

これらの Fab プローブを用いて、クラスリン被覆部位での内在性の標的分子の多色超解像可視化を行った。これらのプローブの標識密度は、抗体が結合できる最大密度を超え、高い忠実度で標的分布を可視化することができた。さらに本研究では、この高い標識密度を利用して、連続的に結合しているプローブの中心点を抽出するプログラムを作成した。この抽出された中心点の平均は、その中心点の数に応じて真の標的の位置に近づく。その平均中心点を積算した再構築画像では、その分解能は、約 2 倍に改善した。その結果、8 つの標的分子が 1 つのクラスリン被覆部位でクラスター状に分布していることが明らかになった。これらのタンパク質クラスターは、部分的に重なっていた。EGF 刺激に依存して EGFR と Grb2 の共局在する特定の領域が CLC と AP2 β 2 で可視化されるクラスリン被覆部位に観察された。しかし、EGFR と Grb2 クラスターは、部分的にしか重なり合っていなかった。これは、クラスリン被覆部位では、これらのタンパク質の結合相手が複数存在することを示唆している。加えて、それらの領域では、mCherry-SOS1 や cCbl-mCherry が共局在していた。これは、クラスリン被覆部位に集積した EGFR と Grb2 は、シグナル分子複合体を形成していることを示している。さらにこの EGFR クラスターは、TfR クラスターの部位とは分離していた。このことは、EGFR と TfR のエンドサイトーシス部位は異なることを示唆している。また FCHo1/2、Eps15 と intersectin-1 は、それぞれお互いに結合できることが報告されているが、FCHo1/2 と Eps15 の共局在部位と Eps15 と intersectin-1 の共局在部位が分かれていることが明らかになった。これらの成果から、クラスリン被覆部位では、局在するタンパク質は、それぞれの特定の結合相手と分子複合体を形成することで、特定の部位にすみ分けていることが示唆される。これらの成果は、論文にまとめ、国際雑誌に投稿中である。

本研究では、抗血清由来 Fab プローブに加えて、改変抗体やナノボディーの Fab 断片を用いた IRIS プローブも発表している (Zhang *et al. Cell reports Methods* 2, 100301, 2022)。

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Qianli Zhang, Akitoshi Miyamoto, Shin Watanabe, Takao Arimori, Masanori Sakai, Madoka Tomisaki, Tai Kiuchi, Junichi Takagi, Naoki Watanabe	4. 巻 2
2. 論文標題 Engineered fast-dissociating antibody fragments for multiplexed super-resolution microscopy	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cell Reports Methods	6. 最初と最後の頁 100301
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.crmeth.2022.100301.	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0件

〔図書〕 計0件

〔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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------