

令和 5 年 6 月 16 日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2021～2022

課題番号：21K19347

研究課題名（和文）オルガネラバイオロジーの新展開

研究課題名（英文）A new era in organelle biology

研究代表者

大場 雄介（Ohba, Yusuke）

北海道大学・医学研究院・教授

研究者番号：30333503

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,900,000円

研究成果の概要（和文）：エンドサイトーシスは細胞外物質を細胞内に取り込む機構である。我々は、初期と後期のエンドソームマーカーが同時局在する新規小胞を見出した。本研究では、蛍光ライブセルイメージング、変異体構築、各種阻害薬処理、および電子蛍光相関顕微鏡観察を用いて小胞を詳細に解析した。その結果、本小胞はマクロピノソームに類似した特徴を持つこと、エンドサイトーシス経路のうち分解経路に輸送されることを見出した。また、関与するキナーゼや低分子量Gタンパク質を同定した。さらに、その生理機能として、大きな内包物のエンドサイトーシスに寄与す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

本研究で解析したような遷移状態にあるオルガネラはこれまでに報告がなく、その特性、形成機序、および生理的機能の一部を明らかにしたことにより、今後のオルガネラ研究に新展開をもたらすと期待される。オルガネラの機能異常により生じるオルガネラ病の中には、未だ原因不明の疾患も少なくない。本研究結果により、これらの疾患の解明や治療困難な疾患に対する新たな知見を提供することも期待される。

研究成果の概要（英文）：Endocytosis is a mechanism by which extracellular substances are taken into the cell. We have identified a novel intracellular vesicle in which early and late endosomal markers are co-localized. In this study, we analyzed the vesicles in detail using fluorescence live cell imaging, mutant construction, various inhibitor treatments, and correlative electron and fluorescence microscopy. We found that the vesicles have properties similar to macropinosomes and are transported in the degradation pathway among the endocytosis pathways. Kinases and small G proteins involved in the formation of vesicles were also identified. Furthermore, we determined their physiological function as endocytosis of large-sized substances.

研究分野：細胞生理学

キーワード：細胞内小器官 バイオイメーjing

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

エンドサイトーシスは細胞外の物質を細胞内に取り込む機構であり、細胞に必須な生理機能の一つである。栄養物や病原体、細胞膜上の受容体がこの機構によって取り込まれると、エンドソームと呼ばれる小胞に内包される。エンドソームは細胞の状態や内包物に応じて、リソソームへ運ばれて分解される分解経路と、再び細胞膜に戻されるリサイクリング経路に振り分けられると考えられている。また、エンドソームは初期エンドソーム、後期エンドソーム、リサイクリングエンドソームといったいくつかの段階に分けられており、取り込まれた物質や受容体はこれらのエンドソームを通して適切に輸送されると考えられている。我々は最近、上皮増殖因子受容体 (epidermal growth factor, EGF) 刺激によってエンドサイトーシスを誘導した時、細胞膜から小胞が形成されて間もない段階で、初期エンドソームマーカーである Rab5 と後期エンドソームマーカーである Rab7 が同時に局在する小胞が存在することを見出した。このような遷移状態にあるオルガネラはこれまでに報告がなく、このオルガネラの役割や形成メカニズムは未知である。

### 2. 研究の目的

Rab5/Rab7 陽性小胞の特徴やカーゴを明らかにし、小胞形成に関わる因子を同定する。Rab5/Rab7 陽性小胞の形成メカニズムとこの小胞の生物学的意義の解明を目指す。

### 3. 研究の方法

A431 細胞に蛍光タンパク質タグが融合した Rab5 および Rab7、また他のエンドソームマーカーのプラスミドを遺伝子導入し、血清飢餓処理後に EGF で刺激して共焦点顕微鏡でタイムラプス観察した。免疫蛍光染色法を用いて内在性の Rab5/Rab7 陽性小胞を観察した。Dynamin 阻害剤である Dynasore、PI3K 阻害薬である PI-103、および Src 阻害薬である PP2 存在下で Rab5/Rab7 陽性小胞を観察した。Rab7 のリン酸化模倣変異体である Rab7 Y183E、およびリン酸化不全変異体である Y183F で発現プラスミドを作製し、これらを細胞に強制発現させて Rab5/Rab7 陽性小胞を観察した。画像解析ソフト MetaMorph を用いた解析により Rab5/Rab7 陽性小胞の大きさや数を定量した。Rab5/Rab7 陽性小胞の微細構造観察においては、光顕-電顕相関観察法を用いた。座標が刻印してあるカバーガラス上で、蛍光タンパク質タグが融合した Rab5 および Rab7 を発現した A431 細胞を培養した。血清飢餓処理後に EGF で刺激して固定し、Rab5/Rab7 陽性小胞の座標の位置を顕微鏡により記録した。これに該当する部分の超薄薄切を透過電子顕微鏡で観察した。

### 4. 研究成果

#### (1) Rab5/Rab7 陽性小胞はマクロピノソームに類似した特徴を持つ

EGFP-Rab5、mCherry-Rab7 を発現させた A431 細胞を EGF で刺激したところ、細胞膜から小胞が形成される初期段階から Rab5 と Rab7 が共局在する小胞が観察された (以下この小胞を Rab5/Rab7 陽性小胞と呼ぶ)。Rab5/Rab7 陽性小胞は A431 細胞のほか、HEK293T 細胞、HeLa 細胞、MDCK 細胞においても観察された。この小胞は内在性の Rab5 と Rab7 を免疫染色した細胞でも確認され (図 1)、2-3  $\mu\text{m}$  直径の小胞の出現頻度が最も多かった (図 2)。また、この小胞は EEA1 および SNX5 と共局在しており、Rab5/Rab7 陽性小胞はマクロピノソームあるいはマクロピノソームに類似した構造体であることが示唆された。

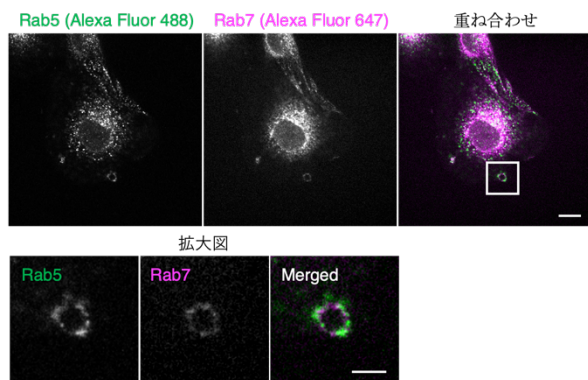


図 1: A431 細胞を EGF 刺激 10 分後に固定し、蛍光免疫染色法により内在性の Rab5 と Rab7 を可視化し、共焦点顕微鏡で観察した。

スケールバー: 10  $\mu\text{m}$  (上)、5  $\mu\text{m}$  (下)

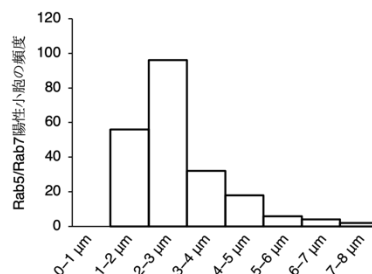


図 2: A431 細胞で観察された Rab5/Rab7 陽性小胞の直径の分布を示したグラフ。

(2) Rab5/Rab7 陽性小胞はエンドサイトーシスの分解経路に輸送される

Rab5/Rab7 陽性小胞によって取り込まれる物質を調べるために Rhodamine 標識 EGF を添加して細胞を固定し、Rab5 および Rab7 の抗体で免疫染色した。Rhodamine 標識 EGF は Rab5/Rab7 陽性小胞と共局在していたことから、EGF 受容体を取り込む小胞であることが示された。次に、リサイクリングエンドソームマーカーである Rab11、および後期エンドソーム/リソソームマーカーである LAMP1 を用いて Rab5/Rab7 陽性小胞のエンドサイトーシス経路を調べた。EGF 刺激により形成された Rab5/Rab7 陽性小胞をタイムラプス観察で追跡したところ、この小胞は Rab11 とは共局在せず (図 3 左)、LAMP1 と共局在したため (図 3 右)、分解経路に輸送される小胞であることがわかった。

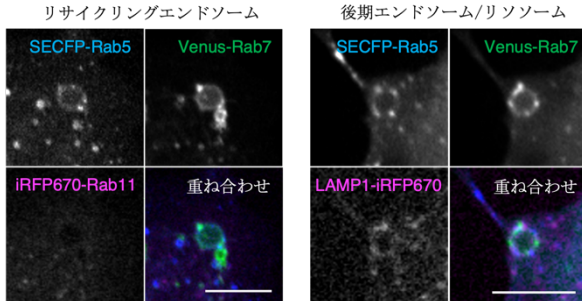
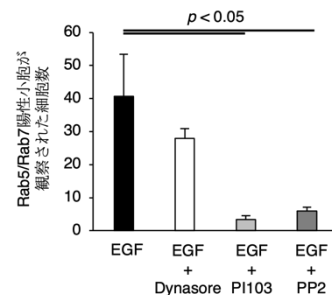


図 3 : SECFP-Rab5、Venus-Rab7、および iRFP670 が融合した Rab11 (左) または LAMP1 (右) を A431 細胞に発現させ、EGF 刺激後に形成された Rab5/Rab7 陽性小胞を追跡した。代表画像を示す。スケールバー : 10  $\mu$ m

(3) EGF 刺激依存的な Rab5/Rab7 陽性小胞の形成は PI3K および Src 阻害薬により抑制される

次に、どのような分子が Rab5/Rab7 陽性小胞の形成に関与するかを調べるため、Dynamin 阻害薬である Dynasore、PI3K 阻害薬である PI-103、Src 阻害薬である PP2 を用いて EGF 刺激後の Rab5/Rab7 陽性小胞を定量した。Dynasore 存在下では小胞形成に有意な差は認められず、PI-103 および PP2 存在下では顕著に小胞形成が抑制された (図 4)。これらの結果から、Rab5/Rab7 陽性小胞の形成に PI3K と Src が関与することが示唆された。

図 4: A431 細胞に各阻害薬を添加して 1 時間インキュベート後、EGF 刺激してタイムラプス観察した。Rab5/Rab7 陽性小胞が観察された細胞数をプロットした。



(4) Rab7 の脱リン酸化は Rab5/Rab7 陽性小胞の形成に関与する

次に、Rab7 のリン酸化模倣変異体である Rab7 Y183E、およびリン酸化不全変異体である Y183F を A431 細胞に強制発現させ、EGF 刺激後の Rab5/Rab7 陽性小胞を定量した。野生型 Rab7 発現細胞と比較して、リン酸化模倣変異体の発現により Rab5/Rab7 陽性小胞が減少し、リン酸化不全変異体の発現により小胞が増加する傾向が見られた (図 5)。この結果から、Rab5/Rab7 陽性小胞は Rab7 の脱リン酸化により小胞形成が制御されることが示唆された。

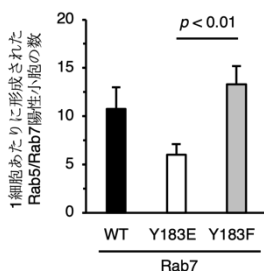


図 5 : A431 細胞に野生型 (WT)、リン酸化模倣変異体 (Y183E) およびリン酸化不全変異体 (Y183F) の Rab7 を発現させ、EGF で刺激してタイムラプス観察した。1 細胞あたりに形成された Rab5/Rab7 陽性小胞の平均値をプロットした。

(5) Rab5/Rab7 陽性小胞は大きな内包物のエンドサイトーシスに寄与する

最後に、Rab5/Rab7 陽性小胞の微細構造を明らかにするため、光顕-電顕相関観察を行った (図 6)。項目 (1) での計測結果と一致して、Rab5/Rab7 陽性小胞は  $\phi 2-5 \mu$ m だった。その内部には  $\phi 500$  nm 程度の細胞断片が見られたことから、未知のエンドサイトーシス様式を担う可能性が示された。また、Rab5/Rab7 陽性小胞の膜上もしくは近傍には、さらに小さな小胞や Rab7 陽性の構造として知られる多胞体 (MVB) が認められたことから、これらの形成や融合によって Rab5/Rab7 陽性小胞の成熟が進行する可能性が推測された。

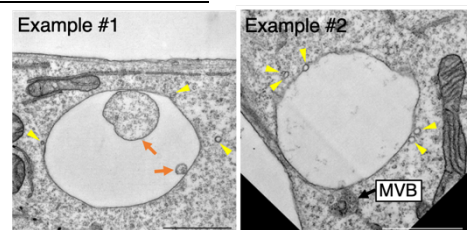


図 6: Rab5/Rab7 陽性小胞の透過電顕像。矢印で細胞断片を、矢尻で小胞を示す。スケールバー : 1  $\mu$ m

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Sato Aya O., Fujioka Yoichiro, Kashiwagi Sayaka, Yoshida Aiko, Fujioka Mari, Sasajima Hitoshi, Nanbo Asuka, Amano Maho, Ohba Yusuke	4. 巻 42
2. 論文標題 Interaction between PI3K and the VDAC2 channel tethers Ras-PI3K-positive endosomes to mitochondria and promotes endosome maturation	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 112229 ~ 112229
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2023.112229	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 Hamada Seijiro, Kano Satoshi, Murai Junko, Suzuki Takayoshi, Tsushima Nayuta, Mizumachi Takatsugu, Suzuki Masanobu, Takashima Tsuyoshi, Taniyama Daiki, Sakamoto Naoya, Fujioka Yoichiro, Ohba Yusuke, Homma Akihiro	4. 巻 12
2. 論文標題 Schlafen family member 11 indicates favorable prognosis of patients with head and neck cancer following platinum-based chemoradiotherapy	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Frontiers in Oncology	6. 最初と最後の頁 978875
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fonc.2022.978875	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 Hagiwara Hikaru, Watanabe Masaya, Fujioka Yoichiro, Kadosaka Takahide, Koizumi Takuya, Koya Taro, Nakao Motoki, Kamada Rui, Temma Taro, Okada Kazufumi, Moreno Jose Antonio, Kwon Ohyun, Sabe Hisakata, Ohba Yusuke, Anzai Toshihisa	4. 巻 19
2. 論文標題 Stimulation of the mitochondrial calcium uniporter mitigates chronic heart failure-associated ventricular arrhythmia in mice	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Heart Rhythm	6. 最初と最後の頁 1725 ~ 1735
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.hrthm.2022.05.034	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 該当する

1. 著者名 Tamura Tomokazu, Torii Shiho, Kajiwaru Kentaro, Anzai Itsuki, Fujioka Yoichiro, Noda Kisho, Taguwa Shuhei, Morioka Yuhei, Suzuki Rigel, Fauzyah Yuzy, Ono Chikako, Ohba Yusuke, Okada Masato, Fukuhara Takasuke, Matsuura Yoshiharu	4. 巻 18
2. 論文標題 Secretory glycoprotein NS1 plays a crucial role in the particle formation of flaviviruses	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 PLOS Pathogens	6. 最初と最後の頁 e1010593
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.ppat.1010593	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 Fujioka Yoichiro, Kashiwagi Sayaka, Yoshida Aiko, Satoh Aya O., Fujioka Mari, Amano Maho, Yamauchi Yohei, Ohba Yusuke	4. 巻 47
2. 論文標題 A method for the generation of pseudovirus particles bearing SARS coronavirus spike protein in high yields	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cell Structure and Function	6. 最初と最後の頁 43 ~ 53
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1247/csf.21047	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 Tsuzuki Atsushi, Fujioka Yoichiro, Yoshida Aiko, Kashiwagi Sayaka, Amano Maho, Hira Tohru, Nakamura Akinobu, Miyoshi Hideaki, Atsumi Tatsuya, Ohba Yusuke	4. 巻 13
2. 論文標題 Direct visualization of glucagon like peptide 1 secretion by fluorescent fusion proteins	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Diabetes Investigation	6. 最初と最後の頁 1134 ~ 1139
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jdi.13800	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 藤岡容一朗, 天野麻穂, 大場雄介	4. 巻 280
2. 論文標題 ウイルスの細胞侵入を視る	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 医学のあゆみ	6. 最初と最後の頁 922-925
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 吉田藍子, 藤岡容一朗, 天野麻穂, 大場雄介	4. 巻 37
2. 論文標題 弱い相互作用のインターフェースと細胞応答の当時可視化を実現するイメージング技術	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Drug Delivery System	6. 最初と最後の頁 102-111
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 4件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Yusuke Ohba
2. 発表標題 Visualization, analysis, and manipulation of cell dynamics using bioimaging and optogenetics techniques and their applications
3. 学会等名 1st Material Symbiosis International symposium/3rd GI-CoRE/GSD International symposium/28th Pharmascience Forum (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Yusuke Ohba
2. 発表標題 Visualization of the field for virus-host cell interaction by correlative light and atomic force microscopy (CLAM)
3. 学会等名 U.S.-Japan Cooperative Medical Sciences Program (USJCMSP), International Conference on Emerging Infectious Diseases in the Pacific Rim, Acute Respiratory Infections (ARI) Panel Meeting (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 大場雄介
2. 発表標題 ウイルスの宿主細胞侵入過程のイメージング
3. 学会等名 遺伝子デリバリー研究会第21回シンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 鬼塚洋之進、藤岡容一朗、吉田藍子、柏木彩花、天野麻穂、大場雄介
2. 発表標題 オプトジェネティクスを用いたEGFRシグナル制御機構の解析
3. 学会等名 第74回日本細胞生物学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 小澤史弥、藤岡容一朗、吉田藍子、柏木彩花、天野麻穂、大場雄介
2. 発表標題 インフルエンザウイルス感染伝播機構の解明
3. 学会等名 第74回日本細胞生物学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 大場雄介
2. 発表標題 蛍光 - AFM相関観察によるウイルス - 宿主相互作用の可視化
3. 学会等名 第91回寄生虫学会大会（招待講演）
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 シュードタイプウイルス集団及びその製造方法	発明者 大場雄介，藤岡容一朗	権利者 北海道大学
産業財産権の種類、番号 特許、特願2021-125781	出願年 2021年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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
研究協力者	釜崎 とも子  (Kamasaki Tomoko)		
研究協力者	佐藤 絢  (Satoh Aya O)		

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
---------	---------