

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 17 日現在

機関番号：32653

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23770148

研究課題名(和文) 初期エンドソームにおける脂質膜ダイナミクスの分子機構

研究課題名(英文) Molecular mechanisms of membrane dynamics at early endosomes

研究代表者

田邊 賢司 (TANABE, KENJI)

東京女子医科大学・医学部・テニュアトラック准教授

研究者番号：80423341

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円、(間接経費) 870,000円

研究成果の概要(和文)：初期エンドソームは細胞が外部から物質を取り込んだ際の最初の選別器官である。本研究では初期エンドソームでの輸送機構に関わる分子の同定・解析を進めた。その結果、関連分子としてダイナミン・コルタクチン・アクチンを同定した。更に脂質リン酸化酵素であるPI4KIIとその産生物であるPI(4)Pが初期エンドソームに局在し、輸送に関与することを見出した。これら一連の発見は、初期エンドソームにおける輸送機構を解明する上で重要な知見になると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Early endosomes are intracellular sorting station for internalized molecules. In this study, we tried to identify some associated proteins and analyzed its molecular functions at early endosomes. As a result, dynamin, cotactin and actin cytoskeleton were identified as key players at at early endosomes. Moreover, we found that a phosphatidylinositol kinase, PI4KIIalpha, and its enzymatic product, PI(4)P, localized on early endosomes and are required for the transport from early endosomes. These result s could be an important knowledge to understand the molecular mechanism of early endosomes.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・機能生物化学

キーワード：細胞内膜輸送 エンドソーム 細胞骨格 脂質膜

### 1. 研究開始当初の背景

初期エンドソームからの選別輸送は、細胞外から取り込んだ物質の選別を行う場として知られており、シグナル伝達においても重要な役割を果たしている。受容体型チロシンキナーゼなどを含む分子の選別は主にユビキチン化が担っていると考えられており、ESCRT 複合体などによる選別、膜変形などの詳細な分子メカニズムが明らかになりつつある。一方、初期エンドソームではユビキチン化を介さない膜の幾何学的な選別も知られており、受容体から乖離したリガンドの選別などで重要な働きを担っている。この幾何学的な選別においては特徴的な脂質膜のチューブ状の変形、切断を伴うが、その分子メカニズムは多くの謎が残されている。そこで本研究では、初期エンドソームの脂質膜変形/切断に関与する分子の同定/解析を目指した。

### 2. 研究の目的

本研究では初期エンドソームからの選別輸送に着目し、その脂質膜変形/切断に関与する分子の同定/解析を行う。多くの知見が得られているエンドサイトーシスの分子機構を参考に、選別輸送の実態解明を目指した。

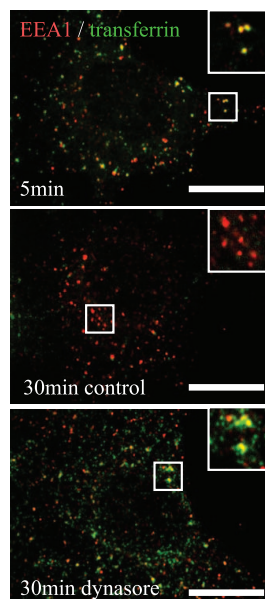
### 3. 研究の方法

- (1) HeLa 細胞に蛍光標識リガンド (EGF, トランスフェリン) を取り込ませた後、各種阻害剤を培地に添加した。一定時間後にライブイメージングまたは蛍光免疫染色を行った。
- (2) 各遺伝子の関与を解析するため HeLa 細胞に遺伝子特異的 siRNA を導入し、72 時間後に輸送アッセイを行った。遺伝子発現抑制効果の検討には免疫染色およびウェスタンブロットを用いた。

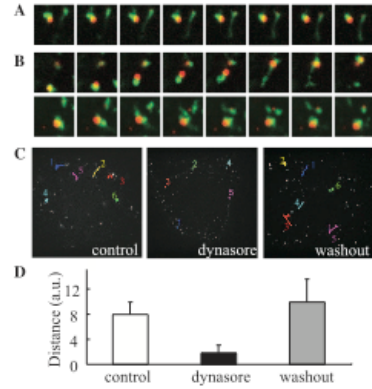
### 4. 研究成果

#### (1) 脂質膜切断を担うタンパク質の同定

エンドサイトーシスにおいて脂質膜切断に必須の分子として知られるダイナミンについて、初期エンドソームでも同様の機能を担っているか検証した。標識リガンド取り込み後にダイナミン阻害剤である Dynasore を培地に添加し、標識リガンドの細胞内輸送をライブイメージングおよび蛍光免疫染色によって解析した。その結果、dynasore 添加時に明らかな初期エンドソームでの



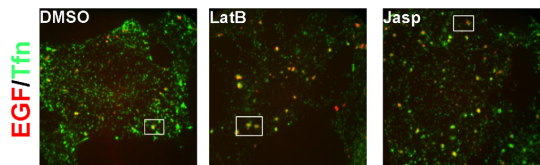
輸送遅延が観察された。更にライブイメージングで解析した結果、初期エンドソームからのチューブ状膜構造が多数見受けられたものの膜切断がほ



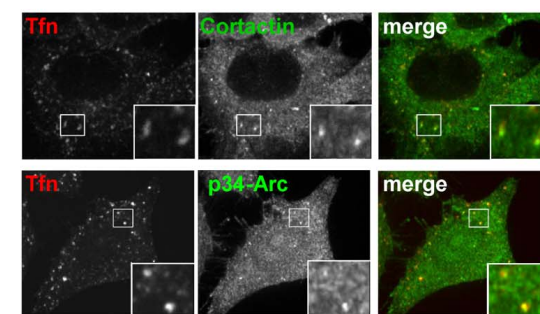
とんど観察されず、それに伴ってエンドソームのダイナミクスが低下していることが観察された。これらの結果は Dynasore が初期エンドソームからの膜切断を担うタンパク質を阻害している可能性を示唆している。

#### (2) 初期エンドソームの輸送にはアクチンとその関連分子が必要である

エンドサイトーシス小胞形成に伴う膜変形/切断にはアクチン細胞骨格が重要と考えられている。そこで初期エンドソームにおいても同様の分子機構が存在するか検証した。アクチン重合を阻害する LatrunculinB (LatB) あるいは脱重合を阻害する Jasplakinolide (Jasp) を添加した際の初期エンドソームからの輸送に与える影響を解析した。その結果、初期エンドソームの明らかな肥大が認められ、輸送が阻害されていることが認められた。さらに Dynasore 添



加時と同様にエンドソームのダイナミクス低下が認められ、アクチン細胞骨格も初期エンドソームの輸送に関与していることが考えられた。



更にアクチン関連分子である Cortactin, が初期エンドソームに局在し、その発現抑制が初期エンドソームの輸送を抑制することも見出し、アクチンと Cortactin が初期エンドソーム輸送の制御因子の一つであることが示唆された。

#### • PI4KII $\alpha$ /PI (4)P の役割

上記の分子は何らかの方法で初期エンド

ソーム上に局在しているが、その候補としてリン脂質が考えられる。そこでエンドソーム上に局在することが報告されている脂質リン酸化酵素の一つである PI4KII $\alpha$  について解析を行った。その結果、PI4KII $\alpha$  発現抑制細胞において初期エンドソームからの輸送遅延が認められた。さらに PI4KII $\alpha$  が産生する PI(4)P についても初期エンドソームへの局在が認められ、PI4KII $\alpha$ /PI(4)P が初期エンドソームの輸送制御を行っていると考えられた。

#### 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 10 件)

- (1) Matsudaira T, Uchida Y, Tanabe K, Kon S, Watanabe T, Taguchi T, Arai H. SMAP2 regulates retrograde transport from recycling endosomes to the Golgi. *PLoS ONE* 8, e69145 (2013) DOI: 10.1371/journal.pone.0069145 (査読あり)
- (2) Funaki T, Kon S, Tanabe K, Natsume W, Sato S, Shimizu T, Yoshida N, Wong WF, Ogura A, Ogawa T, Inoue K, Ogonuki N, Miki H, Mochida K, Endoh K, Yomogida K, Fukumoto M, Horai R, Iwakura Y, Ito C, Toshimori K, Watanabe T, Satake M. The Arf GAP SMAP2 is necessary for organized vesicle budding from the trans-Golgi network and subsequent acrosome formation in spermiogenesis. *Mol. Biol. Cell* 24, 2633-44 (2013) DOI: 10.1091/mbc.E13-05-0234 (査読あり)
- (3) Kon, S., Minegishi, N., Tanabe, K., Watanabe, T., Funaki, T., Wong, W. F., Sakamoto, D., Higuchi Y., Kiyonari H., Asano K., Iwakura Y., Fukumoto M., Osato M., Sanada M., Ogawa S., et al., Smap1 deficiency perturbs receptor trafficking and predisposes mice to myelodysplasia. *Journal of Clinical Investigation*. 123 1123-37 (2013) DOI: 10.1172/JCI63711 (査読あり)
- (4) Mai Suzuki, Hirokazu Tanaka, Akira Tanimura, Kenji Tanabe, Natsuko Oe, et al., The Clathrin Assembly Protein PICALM Is Required for Erythroid Maturation and Transferrin Internalization in Mice. *PLoS ONE* 7, e31854 (2012) DOI: 10.1371/journal.pone.0031854 (査読あり)
- (5) Yuji Henmi, Kenji Tanabe, and Kohji Takei. Disruption of microtubule network rescues aberrant actin comets in dynamin2-depleted cells. *PLoS ONE* 6, e28603 (2012) DOI: 10.1371/journal.pone.0028603 (査読あり)
- (6) Kenji Tanabe, Emiko Ohashi, Yuji Henmi, and Kohji Takei. Receptor sorting and actin dynamics at early endosomes. *CIB* 4, 742-4 (2011) DOI: 10.4161/cib.4.6.17628 (査読あり)
- (7) Emiko Ohashi, Kenji Tanabe, Yuji Henmi, Kumi Mesaki, Yuka Kobayashi, and Kohji Takei. Receptor Sorting within Endosomal Trafficking Pathway Is Facilitated by Dynamic Actin Filaments. *PLoS ONE* 6, e19942 (2011) DOI: 10.1371/journal.pone.0019942 (査読あり)
- (8) Kumi Mesaki, Kenji Tanabe, Masanori Obayashi, Natsuko Oe, and Kohji Takei. Fission of tubular endosomes triggers endosomal acidification and movement. *PLoS ONE* 6, e19764 (2011) DOI: 10.1371/journal.pone.0019764 (査読あり)
- (9) Tomo Funaki, Shunsuke Kon, Roger E Ronn, Yuji Henmi, Yuka Kobayashi, Toshio Watanabe, Keiko Nakayama, Kenji Tanabe, and Masanobu Satake. Localization of SMAP2 to the TGN and its function in the regulation of TGN protein transport. *Cell Struct. Funct.*, 36, 83-95 (2011) DOI: 10.1247/csf.10022 (査読あり)
- (10) Nobuhisa Ishida, Yuichi Nakamura, Kenji Tanabe, Shun-Ai Li, and Kohji Takei. Dynamin 2 associates with microtubules at mitosis and regulates cell cycle progression. *Cell Struct. Funct.* 36, 145-54 (2011) DOI: 10.1247/csf.10016 (査読あり)

[学会発表] (計 10 件)

- (1) 田邊賢司、森川由章、逸見祐次、池田なるみ、大江夏子、目崎久美、竹居孝二、ホスファチジルイノシトール-4-キナーゼ II $\alpha$  による初期エンドソームの選別輸送制御、第 35 回日本分子生物学会、2012 年 12 月 11 日～2012 年 12 月 14 日、福岡
- (2) 鈴木麻衣、田中宏和、谷村 朗、田邊賢司、大江夏子、頼 晋也、昆 俊亮、福本学、竹居孝二、松村 到、金倉譲、渡邊利雄、クラスリン集合因子 CALM の欠損はトランスフェリンを介した鉄の取込みを減少させ造血障害を起こす。第 35 回日本分子生物学会、2012 年 12 月 11 日～2012 年 12 月 14 日、福岡
- (3) 昆俊亮、峯岸直子、田邊賢司、渡邊利雄、船木智、坂元大輔、樋口雄大、清成寛、浅野克敏、福本学、真田昌、小川誠司、中村卓郎、佐竹正延、クラスリン小胞形

成因子 SMAP1 の欠損は細胞内小胞輸送の異常をきたし、骨髄異型性症候群を誘引する。第35回日本分子生物学会，2012年12月11日～2012年12月14日，福岡

- (4) 原華苗、今井恵理、鈴木麻衣、昆俊亮、田邊賢司、船木智、佐竹正延、松居靖久、渡辺利雄，SMAP (Small Arf GAP) 1,2 両遺伝子欠損胚は胎生致死である。第35回日本分子生物学会，2012年12月11日～2012年12月14日，福岡
- (5) 田邊賢司、森川由章、池田なるみ、逸見祐次、大江夏子、目崎久美、竹居孝二，初期エンドソームのダイナミクスとシグナル伝達制御，新学術領域研究「細胞内ロジスティクス」第4回班会議，2012年06月13日～2012年06月15日，仙台
- (6) 田邊賢司、森川由章、逸見祐次、池田なるみ、大江夏子、目崎久美、竹居孝二，ホスファチジルイノシトール-4-キナーゼ II $\alpha$  は初期エンドソームにおける選別輸送を制御する。第53回日本生化学会中国・四国支部例会，2012年05月18日，岡山
- (7) 逸見祐次、田邊賢司、竹居孝二，ダイナミン2は微小管を介してアクチンコメットを制御する。第53回日本生化学会中国・四国支部例会，2012年05月18日，岡山
- (8) 田邊賢司，初期エンドソームにおける膜ダイナミクスの分子機構，東北大学グローバルCOE拠点セミナー，2011年11月18日，東北大学加齢医学研究所（仙台）
- (9) 田邊賢司、池田なるみ 他4名，Phosphatidylinositol 4-kinase II alpha is required for receptor sorting at early endosomes. 第63回日本細胞生物学会大会，2011年6月27～29日，北海道大学（札幌）
- (10) 田邊賢司，初期エンドソームのダイナミクスとシグナル伝達制御，新学術領域研究「細胞内ロジスティクス」班会議，2011年6月1～3日，鳥羽シーサイドホテル（鳥羽）

〔図書〕（計1件）

- (1) Kohji Takei and Kenji Tanabe, Etiological Role of Dynamin in Charcot-Marie-Tooth Disease. Peripheral Neuropathy, 3-20 (2012) INTECH

〔産業財産権〕

○出願状況（計 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 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

田邊賢司 (TANABE, Kenji)  
東京女子医科大学・医学部・テニユアトラ  
ック准教授  
研究者番号：80423341

##### (2) 研究分担者

なし

##### (3) 連携研究者

なし