

平成 29 年 5 月 19 日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K15023

研究課題名（和文）バイオイメージングによるエンドソーム ミトコンドリア相互作用の生理的意義の解明

研究課題名（英文）Investigation of a physiological role of endosome-mitochondrial interaction by fluorescence bioimaging

研究代表者

大場 雄介 (Ohba, Yusuke)

北海道大学・医学（系）研究科（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） 2,800,000円

研究成果の概要（和文）：我々は低分子量Gタンパク質Rasと標的分子PI3K複合体がエンドソームに局在し、エンドサイトーシスとウイルス粒子取込みを制御することを報告した。しかし、Ras-PI3K複合体がエンドソームに局在する分子機構は不明である。本研究では上記現象の原因となるアミノ酸配列を同定した。またその結合タンパク質のスクリーニングによりミトコンドリアタンパク質を同定した。このミトコンドリアタンパク質のノックダウンはRas-PI3Kのエンドソーム移行、エンドサイトーシス、ミトコンドリア エンドソーム相互作用を阻害したので、PI3Kとの結合がオルガネラ間相互作用を介してエンドサイトーシスを調節することが示唆された。

研究成果の概要（英文）：We have reported that the complex of small G protein Ras and its target molecule PI3K is localized in the endosomes and controls endocytosis and viral particle internalization. However, the molecular mechanism by which the Ras-PI3K complex is localized in the endosome remains unknown. In this study, the amino acid sequence responsible for the above phenomenon was identified. By screening the binding protein for the sequence, a mitochondrial protein was identified. Knockdown of this mitochondrial protein inhibited the translocation of Ras-PI3K complex to the endosome, endocytosis, and mitochondrial-endosome interaction, suggesting that binding of PI3K and the factor regulates endocytosis through interaction between organelles.

研究分野：細胞生理学

キーワード：細胞内小器官 シグナル伝達 エンドサイトーシス ミトコンドリア

1. 研究開始当初の背景

細胞内オルガネラは細胞生理機能に必須の役割を担っているが、それぞれが固有の機能に比べ、互いの相互作用については、一部の現象を除くとよく解っていない。

エンドサイトーシスは、様々な物質を細胞の外側から内側に輸送するための機構で、取り込まれる物質の種類およびそのメカニズムに基づいて、ピノサイトーシス（細胞飲用）および食作用（細胞摂食）に分けることができる。さらにエンドサイトーシス経路は、その調節機構、すなわち被覆ピットの裏打ちタンパク質に基づいて、レセプター媒介（またはクラスリン媒介）エンドサイトーシス、カベオラ依存性エンドサイトーシス、マクロピノサイトーシスおよび食作用の4つのカテゴリーに細分することができる。輸送される物質には低密度リポタンパク質、トランスフェリン、成長因子、抗体等がある。また、エンドサイトーシス経路を介して抗原提示細胞内に取り込まれた病原体は、食食による内在化後リソソームでの分解・消化を経て、その産物が細胞表面に提示される。赤痢菌、サルモネラ菌、および結核菌は、エンドサイトーシスによって細胞に侵入し、それらが増殖し得る環境に達する。バクテリア以外の非エンベロープウイルス（アデノウイルス）およびエンベロープウイルス（インフルエンザウイルス）は、エンドサイトーシスを介して細胞内に取り込まれ、その後ゲノムを複製のために細胞質に放出する。これら細胞外および外因性物質に加えて、膜タンパク質もエンドサイトーシスによって細胞に内在化され、最終的にシグナル伝達経路の調節に寄与する。一方、エンドサイトーシスは、phosphoinositide 3-kinase を含む様々なシグナル伝達経路によって制御される。脂質キナーゼ PI3K は、ホスホイノシチドのイノシトール環の3'位をリン酸化し、細胞成長、増殖、分化、運動性、生存、および細胞内膜輸送を含む様々な細胞機能を制御する。PI3Kの活性化は、少なくとも4つの独立した経路によって促進される。まず、PI3Kのp110 β 触媒サブユニットはGタンパク質共役受容体によって活性化される。他の経路はリガンドの結合を介した受容体チロシンキナーゼ（receptor tyrosine kinase, RTK）の活性化によって開始される。PI3Kの調節サブユニットp85中のSrc homology 2 (SH2)ドメインは、RTKs内のリン酸化チロシン(YXXM)に直接動員され、PI3Kの活性化を誘発する。p85はgrowth factor receptor binding protein 2 (Grb2) およびGRB2-associated binding protein 1 (GAB1)等のアダプタータンパク質を介して別のリン酸化チロシン含有モチーフ(YXN)にもリクルートされる。他の一つに経路は低分子量Gタンパク質Rasを介する経路である。Rasの活性化因子の一つson of sevenless (Sos)はGRB2と恒常的に結合しており、RTK活性化によるGrb2のリクルートは、Rasの活性化お

よびRasとp110のRas結合ドメイン(RBD)の結合を介して(p85とは独立して)p110を活性化する。我々はこれまでに、RasとPI3Kの複合体がエンドソームに移行し、このRasによるPI3K活性化がクラスリン非依存性エンドサイトーシスとインフルエンザウイルス感染の調節に重要であると報告している。

2. 研究の目的

Ras-PI3K複合体がエンドソームにリクルートされる分子メカニズムは不明であったので、その分子メカニズムを明らかにするため研究を行った。また、その責任配列と結合因子同定を試みた結果、予想外にもミトコンドリアタンパク質の関与が明らかになった。そこで、エンドソームとミトコンドリア相互作用のメカニズムと生理的意義の解明を目指した研究も行った。

3. 研究の方法

(1) 配列解析

PI3K p110 α (NP_006209.2), p110 β (NP_006210.1), p110 γ (NP_001269356.1), p110 δ (NP_005017.3), c-Raf1 (NP_002871.1), B-Raf (NP_004324.29), A-Raf (NP_001645.1), RalGDS (NP_006257.1), Rgl1 (NP_055964.3), Rgl2 (NP_004752.1), Rgl3 (NP_001155088.2) および Rlf (AAC52724.1) の配列は、National Center for Biotechnology Information (NCBI) のタンパク質データベースから得た。これらの配列から、NCBIのConserved Domain DatabaseのCD-Searchツールを使用してRBDを同定した。ClustalWを用いて複数の配列アライメントを行った。

(2) 試薬および抗体

組換えヒトEGFはPeproTechから購入した。マウス、ウサギまたはラット免疫グロブリンに対するAlexaFluor488、AlexaFluor594またはAlexaFluor647結合抗体、Hoechst 33342、AlexaFluor488またはAlexaFluor546標識デキストラン(10kDa)、AlexaFluor546標識トランスフェリンはThermo Fisher Scientificから購入した。マウス、ロバ、またはウサギ免疫グロブリンGに対するhorse radish peroxidase結合ヒツジ抗体は、GE Healthcareから、ヤギ免疫グロブリンGに対する西洋horse radish peroxidase結合ロバ抗体はPromegaから購入した。EEA1およびRalに対する抗体は、BD Biosciencesから入手した。ERK、リン酸化ERK、Aktおよびリン酸化Akt(S473、T308)に対する抗体は、Cell Signalingから入手した。Medical & Biological Laboratories (MBL)、Sigma-Aldrich および Roche からそれぞれc-Myc、FLAG および HA (3F10) に対する抗体を購入した。抗NP(ab20343)、抗Ras抗体はAbcamとOncogeneから入手した。

(3) 細胞培養

American Type Culture Collection から HEK293T、MDCK および A549 細胞を、Cos-1 細胞は医薬基盤・健康・栄養研究所の JCRB 細胞バンクから入手した。MDCK 以外の細胞は、10% ウシ胎仔血清 (Thermo Fisher Scientific) を添加したダルベッコ変法イーグ

ル培地 (DMEM) 中、37°Cで 5%CO₂の加湿環境下で維持した。MDCK 細胞は 10%ウシ胎仔血清を補充した最小必須培地 (MEM) (Sigma-Aldrich) で培養した。発現ベクターはポリエチレンイミン Max (Polysciences) を用いて細胞にトランスフェクションした。

(4) プラスミド

pCXN2-Flag-H-Ras WT, pCXN2-Flag-p110 γ RBD-VC, pCXN2-Flag-H-Ras WT, pCXN2-Flag-H-Ras V12, pCAGGS-3 \times HA-PI3Kp110 γ , pCAGGS-Rab5 は当研究室で以前に作製したものを使用した。RAPEL を欠損した p110 γ RBD は PCR により合成し、pCXN2-Flag-p110 γ RBD-VC の *XhoI/NotI* サイトにサブクローニングして、pCXN2-Flag-p110 γ RBD Δ RAPEL-VC を得た。野生型 p110 γ RBD および p110 γ RBD Δ RAPEL も pCAGGS-3 \times HA ベクターの *XhoI/NotI* 部位にサブクローニングして、pCAGGS-3 \times HA-p110 γ RBD と pCAGGS-3 \times HA-p110 γ RBD Δ RAPEL を得た。PCR により、RAPEL およびその誘導体 (NT19, CT20, NT8, CT9, M11) の cDNA を増幅し、pCAGGS-3 \times HA と pCAGGS-ECFP の *XhoI/NotI* サイトにサブクローニングして、pCAGGS-HA-RAPELs と pCAGGS-ECFP-RAPELs を得た。QuikChange site-directed mutagenesis kit (Agilent Technologies) を用いて 1 つまたは 2 つのリジン残基をグルタミン酸で置換した変異型 RAPEL-M11 と p110 γ RBD を作製した、全ての PCR 産物はシーケンス解析により確認した。

(5) ウイルスの調整

MDCK 細胞を、MOI 0.0001 で A/Puerto Rico/8/34 (H1N1; PR8) で感染させた。37°Cで 48 時間培養後、得られた培養上清を高速遠心分離によって単離したウイルスをリン酸緩衝食塩水に再懸濁し、使用するまで -80°C で保存した。培養上清中のウイルス価は、プラークアッセイを用いて測定した。

(6) 蛍光顕微鏡

BioPoint MAC5000 フィルターおよびシャッターコントロールユニット (Ludl Electronic Products)、電動 XY ステージ (中央精機)、SOLA Light Engine (Lumencor) および Cool SNAP MYO 冷却 CCD カメラ (Photometrics) を実装した IX-81 顕微鏡 (オリンパス) を用いた。使用した励起・吸収フィルターは以下の通り。CFP: FF02-438/24, FF01-483/32 (Semrock); GFP, AlexaFluor488, FITC: FF01-500/24-25, FF01-542/27 (セムロック); ExRed, AlexaFluor546, AlexaFluor594: BP520-550, BA580IF (オリンパス); AlexaFluor647: FF02-628/40-25, FF01-692/40-25。蛍光画像および微分干渉画像の露光時間はそれぞれ 0.5 秒および 30 ミリ秒であった (2 \times 2 ビニング)。CCD カメラ、ステージ、照明、およびフィルタホイールの制御、ならびに細胞イメージングデータの解析には、MetaMorph (Universal Imaging) を使用した。

BiFC または他のイメージングおよびデータ解析は、以前に報告した通りに行った。概略は以下の通り。コラーゲンコートした 35 mm 径のガラス底ディッシュ (Asahi Techno Glass) 上に播種した細胞を発現ベクターでトラン

スフェクションした。24 時間後、細胞をフェノールレッド不含 DMEM/F12 (Thermo Fisher Scientific) 中で 4 時間血清飢餓状態にし、温度を 37°C に維持したステージトップインキュベーター (Live Cell Instrument) に入れた。蛍光画像を 30 秒間隔で記録した。撮像開始後 10~15 分に 100 ng/ml EGF で刺激した。

(7) 免疫蛍光

3%パラホルムアルデヒドで細胞を室温で 15 分間固定し、0.1% Triton X-100 を含む PBS を用いて室温で 4 分間透過処理し、次いで抗体の非特異的結合をブロックするために 1% ウシ血清アルブミンとインキュベートした。細胞を一次抗体 (NP, 1:1000 希釈; c-Myc, 1:1,000 希釈; HA, 1:1,000; EEA-1:1:1,000) と共にさらに 4°C でインキュベートし、その後免疫複合体を AlexaFluor488, AlexaFluor594 または AlexaFluor647 結合二次抗体 (1:250 希釈) を用いて室温で 1 時間インキュベート (暗所) することによって検出した。FV-10i 共焦点顕微鏡 (オリンパス) で画像取得した。

(8) エンドサイトーシスの定量

クラスリン非依存性および依存性エンドサイトーシスの検出のために、コラーゲンコートしたガラス底培養皿上に播種した細胞を AlexaFluor 結合デキストランまたはトランスフェリンをインキュベートし、その後 PBS (デキストラン) または PBS/HCl (pH3.0、トランスフェリン) で十分に洗浄し、非内在化物質を除去した。可視化した小胞を、MetaMorph ソフトウェアの「granularity」機能を用いて抽出し、その蛍光強度を定量化した。

(9) インフルエンザウイルス感染アッセイ

血清飢餓処理した細胞に、IAV を 1 MOI で 4 時間感染させた。室温にて 3%パラホルムアルデヒドで 15 分間固定、抗 NP 抗体 (1:1,000 希釈) を用いて免疫蛍光染色を行った。核は Hoechst 33342 で染色した。核および NP の共局在の程度を MetaMorph ソフトウェアの「measure colocalization」機能により定量した。

(10) 統計分析

全てのデータは平均 \pm s.e.m で表示した。二群間の比較にはスチューデント t 検定を、それ以上の群間比較は一元配置分散分析とダネットのポストホック分析によって比較した。

4. 研究成果

(1) Ras-PI3K 複合体のエンドソーム局在に必要なアミノ酸配列の同定

Ras-PI3K 複合体は特異的にエンドソームに局在し、クラスリン非依存性エンドサイトーシスおよびインフルエンザウイルス感染の調節に寄与している。Ras-PI3K 複合体がエンドソームに局在する分子機構を解明するために、標的因子の RBD のアミノ酸配列を比較した。Raf (c-Raf1, B-Raf および A-Raf)、PI3K (PI3Kp110 α , p110 β , p110 γ および p110 δ) および RalGEF (RalGDS, Rlf, Rgl1, Rgl2 および Rgl3) を含む 3 つの主要な Ras エフェクターファミリーのアミノ酸配列、は NCBI

の Protein Database から得られ、RBD は Conserved Domain Database によって同定され、ClustalW を用いて系統樹を作成した。各メンバーが予想通りに異なるグループ (同じノード) を形成した。興味深いことに、PI3K 群は Raf および RalGEF とは別のノードを形成しており、PI3K の RBD は Raf および RalGEF のものとは進化的に異なることを示している。PI3Kp110 α 、p110 β 、および p110 γ の RBD 配列を c-Raf1 および RalGDS の RBD 配列と直接比較すると、PI3K RBD は約 20 アミノ酸の独特の N 末端の程度を有することが判明した。さらに、PI3K RBD の N 末端 28 アミノ酸領域は高い相同性を示したため、この領域が Ras-PI3K 複合体のエンドソーム局在化に及ぼす影響を調べた。

N 末端 28 アミノ酸を欠く PI3Kp110 γ -RBD (以下 PI3K RBD と略す) を調製すると、エンドソームにおける Ras-PI3K 複合体の局在化または蓄積が抑制され、複合体が核周囲領域に蓄積された。この変異型 RBD は Ras との結合性に変化はなかったため、この欠失した 28 アミノ酸は Ras と PI3K 複合体の局在についてユニークな機能を有していると考えられた。そこでこれを Ras-PI3K endosomal localization (RAPEL) 配列と命名した。

(2) RAPEL の発現によるエンドサイトーシスとインフルエンザウイルス感染の阻害

調節ドメインを含むタンパク質断片の過剰発現は、しばしば上流因子を抑制することによって下流シグナル伝達に負の効果を発揮する。そこで、RAPEL の発現がエンドサイトーシスに影響を与えるかどうかを調べた。クラスリン非依存性エンドサイトーシスの活性を評価するために、COS-1 細胞に、HA タグ付き RAPEL の発現ベクターをトランスフェクションし、蛍光標識デキストラン (MW = 10,000) の取り込みを評価した。予想通り、RAPEL の発現はデキストランの取り込みを有意に阻害した。このような阻害効果は、MDCK、293T、および A549 細胞においても観察された。これは、エンドサイトーシスに対する RAPEL の効果が、普遍的であることを示す。一方、RAPEL の発現は、トランスフェリン取り込みに関与するクラスリン依存性エンドサイトーシスには抑制行こうかを示さなかった。

A 型インフルエンザウイルス (IAV) はクラスリン非依存性 (および依存性) エンドサイトーシスと Ras-PI3K シグナル伝達を介して宿主細胞に侵入することを報告した。そこで、RAPEL が IAV 感染を抑制したかどうかを検討した。HA-RAPEL を発現する COS-1 細胞に IAV を 4 時間感染し、複製ウイルス粒子をウイルス核タンパク質 (NP) に対する免疫蛍光染色で検出した。RAPEL 発現細胞における IAV 感染は、非発現細胞または対照細胞と比較して、明らかに阻害された。エンドソームへの Ras-PI3K 複合体の移行がインフルエンザウイルス粒子の取り込みにおいて役割を

果たすことを考えると、RAPEL はインフルエンザウイルス感染を、ウイルス内在化ステップを抑制して妨げていることが示唆される。

(3) RAPEL 結合因子の探索

RAPEL がエンドサイトーシスと Ras-PI3K 複合体のエンドソーム局在に対してドミナントネガティブ効果を示したことから、RAPEL に結合因子を探索した。酵母ツーハイブリッド法により 6 個の候補を同定した。これらのうち生化学的に結合を再確認したところ、ミトコンドリア外膜タンパク質は候補因子として残った。

(4) ミトコンドリア因子のエンドサイトーシス制御への関与

まず当該因子を siRNA 法によりノックダウンしたところ、予想通りエンドサイトーシスが抑制された。また逆に過剰発現によりエンドサイトーシスが亢進したことから、ミトコンドリアタンパク質がエンドサイトーシスの制御に関与する新知見を確認した。一方この分子は、哺乳動物において 3 つのファミリー分子があることが報告されている。そこで、結合の特異性を生化学実験により確認したところ、いずれのメンバーも PI3K と結合することが解った。一方、興味深いことに、それぞれの因子をノックダウンした際のエンドサイトーシス能を比較検討したところ、他の 2 因子はエンドサイトーシスの制御に関与しないことが明らかになった。したがって、同様に PI3K に結合するにもかかわらず、いかにして固有の機能をはききするかにしても、今後解析をすすめる必要があると考えられた。このファミリー分子は、アミノ酸配列において高い相同性・同一性を有しているが、ノックアウトマウスの表現形に大きな差異があると報告されている。今回得られた知見により各ファミリーが担う生理機能の特異性についても迫ることができるのではないかと期待される。

さらに、この因子の細胞内動態を検討するため、蛍光タンパク質を付加したコンストラクトを構築したところ、この操作により細胞内局在が正しく再現できないことが判明した。このてんは splitGFP 技術を応用することで本来の局在を示すコンストラクトを作製することで問題を解決した。

このコンストラクトを用いて、エンドソームとミトコンドリアの位置関係を定量的に解析したところ、両者は一定の確率で接触することがわかった。この接触は増殖因子刺激等で亢進する。さらにミトコンドリア局在因子のノックダウン細胞において両者の接触を定量解析したところ、正の制御因子のノックダウンで接触が抑制され、負の制御因子のノックダウンで亢進した。この結果から、エンドソームの成熟過程において、ミトコンドリアとの相互作用は何らかの意義を有しており、この相互作用に PI3K と当該因子の結合が関与するものと考えられた。

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 17 件) 全て査読有り

1. Cell competition with normal epithelial cells promotes apical extrusion of transformed cells through metabolic changes. S. Kon, K. Ishibashi, H. Katoh, S. Kitamoto, T. Shirai, S. Tanaka, M. Kajita, S. Ishikawa, H. Yamauchi, Y. Yako, T. Kamasaki, T. Matsumoto, H. Watanabe, R. Egami, A. Sasaki, A. Nishikawa, I. Kameda, T. Maruyama, R. Narumi, T. Morita, Y. Sasaki, R. Enoki, S. Honma, H. Imamura, M. Oshima, T. Soga, J.I. Miyazaki, M.R. Duchon, J.M. Nam, Y. Onodera, S. Yoshioka, J. Kikuta, M. Ishii, M. Imajo, E. Nishida, Y. Fujioka, Y. Ohba, T. Sato and Y. Fujita. **Nat. Cell Biol.** 19(5):530-541,2017 (DOI: 10.1038/ncb3509.)
2. Improved FRET biosensor for the measurement of BCR-ABL activity in chronic myeloid leukemia cells. M. Horiguchi, M. Fujioka, T. Kondo, Y. Fujioka, X. Li, K. Horiuchi, A.O. Satoh, P. Nepal, S. Nishide, A. Nanbo, T. Teshima and Y. Ohba. **Cell. Struct. Funct.** 42(1): 15-26, 2017 (DOI: doi.org/10.1247/csf.16019)
3. Rab5-regulated endocytosis plays a crucial role in apical extrusion of transformed cells. S. Saitoh, T. Maruyama, Y. Yako, M. Kajita, Y. Fujioka, Y. Ohba, N. Kasai, N. Sugama, S. Kon, S. Ishikawa, T. Hayashi, T. Yamazaki, M. Tada and Y. Fujita. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** 114(12): E2327-E2336, 2017 (DOI: 10.1073/pnas.1602349114)
4. A leukemogenic kinase, FIP1L1-PDGFR α , and a SUMO E3 ligase, PIAS1, form a positive crosstalk via their enzymatic activities. M. Ibata, J. Iwasaki, Y. Fujioka, K. Nakagawa, S. Darmanin, M. Onozawa, D. Hashimoto, Y. Ohba, S. Hatakeyama, T. Teshima and T. Kondo. **Cancer Sci.** 108(2): 200-207, 2017 (国際共著, DOI: 10.1111/cas.13129)
5. Receptor activator of NF- κ B ligand induces cell adhesion and integrin α 2 expression via NF- κ B in head and neck cancers. T. Yamada, M. Tsuda, T. Wagatsuma, Y. Fujioka, M. Fujioka, A.O. Satoh, K. Horiuchi, S. Nishide, A. Nanbo, Y. Totsuka, H. Haga, S. Tanaka, M. Shindoh and Y. Ohba. **Sci. Rep.** 6:23545, 2016 (DOI: 10.1038/srep23545)
6. Attenuation of ligand-induced activation of angiotensin II type 1 receptor signaling by the type 2 receptor via protein kinase C. T. Inuzuka, Y. Fujioka, M. Tsuda, M. Fujioka, A.O. Satoh, K. Horiuchi, S. Nishide, A. Nanbo, S. Tanaka and Y. Ohba. **Sci. Rep.** 6: 21613, 2016 (DOI: 10.1038/srep21613)
7. Fluorescence bioimaging of intracellular signaling and its clinical application. Y. Ohba and Y. Fujioka. **J. Oral Biosci.** 58(4): 113-119, 2016 (DOI: doi.org/10.1016/j.job.2016.07.002)
8. Epstein-Barr virus exploits host endocytic machinery for cell-to-cell viral transmission rather than a virological synapse. A. Nanbo, K. Kachi, H. Yoshiyama and Y. Ohba. **J. Gen. Virol.** 97(11): 2989-3006, 2016 (DOI: 10.1099/jgv.0.000605.)
9. Tumour endothelial cells in high metastatic tumours promote metastasis via epigenetic dysregulation of biglycan. N. Maishi, Y. Ohba, K. Akiyama, N. Ohga, J.I. Hamada, H. Nagao-Kitamoto, M. Alam, K. Yamamoto, T. Kawamoto, N. Inoue, A. Taketomi, M. Shindoh, Y. Hida and K. Hida. **Sci. Rep.** 6: 28039, 2016 (DOI: 10.1038/srep28039)
10. Lypd8 promotes the segregation of flagellated microbiota and colonic epithelia. R. Okumura, T. Kurakawa, T. Nakano, H. Kayama, M. Kinoshita, D. Motooka, K. Gotoh, T. Kimura, N. Kamiyama, T. Kusu, Y. Ueda, H. Wu, H. Iijima, S. Barman, H. Osawa, H. Matsuno, J. Nishimura, Y. Ohba, S. Nakamura, T. Iida, M. Yamamoto, E. Umemoto, K. Sano and K. Takeda. **Nature** 532(7597): 117-121, 2016 (DOI: 10.1038/nature17406)
11. A role of the sphingosine-1-phosphate (S1P)-S1P receptor 2 pathway in Epithelial Defense Against Cancer (EDAC). S. Yamamoto, Y. Yako, Y. Fujioka, M. Kajita, T. Kameyama, S. Kon, S. Ishikawa, Y. Ohba, Y. Ohno, A. Kihara and Y. Fujita. **Mol. Biol. Cell** 27(3): 491-499, 2016 (DOI: 10.1091/mbc.E15-03-0161)
12. Fluorescent protein-based biosensors to visualize signal transduction beneath the plasma membrane. Y. Fujioka, A. Nanbo, S. Y. Nishide and Y. Ohba. **Anal. Sci.**, 31(4): 267-274, 2015 (DOI: 10.2116/analsci.31.267.)
13. Tyr724 phosphorylation of ELMO1 by Src is involved in cell spreading and migration via Rac1 activation. Y. Makino, M. Tsuda, Y. Ohba, H. Nishihara, H. Sawa, K. Nagashima and S. Tanaka. **Cell Commun. Signal.** 13: 42, 2015 (DOI: 10.1186/s12964-015-0113-y)
14. Molecular role of RNF43 in canonical and noncanonical Wnt signaling. T. Tsukiyama, A. Fukui, S. Terai, Y. Fujioka, K. Shinada, H. Takahashi, T.P. Yamaguchi, Y. Ohba and S. Hatakeyama. **Mol. Cell. Biol.** 35(11): 2007-2023, 2015 (DOI: 10.1128/MCB.00159-15.)
15. Adaptor protein CRK induces epithelial-mesenchymal transition and metastasis of bladder cancer cells through HGF/c-Met feedback loop. R. Matsumoto, M. Tsuda, L. Wang, N. Maishi, T. Abe, T. Kimura, M. Tanino, H. Nishihara, K. Hida, Y. Ohba, N. Shinohara, K. Nonomura and S. Tanaka. **Cancer Sci.** 106(6): 709-17, 2015 (DOI: 10.1111/cas.12662)
16. P18/Stathmin1 is regulated by miR-31 in ovarian cancer in response to taxane. M.K. Hassan, H. Watari, T. Mitamura, Z. Mohamed, S.F. EL-khamisy, Y. Ohba and N. Sakuragi.

- Oncoscience** 2(3): 294-308, 2015 (国際共著, DOI: 10.18632/oncoscience.143)
17. Inhibition of multidrug transporter in tumor endothelial cells enhances antiangiogenic effects of low dose metronomic paclitaxel. K. Akiyama, N. Ohga, Y. Hida, N. Maishi, Y. Ohba, A.M. Towfik, T. Kawamoto, H. Ohmura, K. Yamada, C. Torii, M. Shindoh and K. Hida. **Am. J. Pathol.** 185(2): 572-580, 2015 (DOI: 10.1016/j.ajpath.2014.10.017)
[学会発表] (計 10 件)
 1. 大場 雄介、藤岡 容一朗、蛍光イメージングを用いた細胞内シグナル伝達によるエンドサイトーシスの制御機構の解析、第 122 回解剖学会、2017 年 3 月 28-30 日、長崎大学坂本キャンパス (長崎県 長崎市) 招待
 2. 大場 雄介、藤岡 容一朗、西出 真也、南保 明日香、蛍光イメージングで紐解くインフルエンザウイルス感染の分子基盤、第 54 回日本生物物理学会年会、2016 年 11 月 25-27 日、つくば国際会議場(茨城県 つくば市) 招待
 3. 大場 雄介、近藤 健、豊嶋 崇徳、慢性骨髄性白血病分子標的治療薬薬効評価のための FRET バイオセンサーの開発と改良、第 75 回日本癌学会学術総会、2016 年 10 月 6-8 日、パシフィコ横浜 (神奈川県 横浜市)
 4. 大場 雄介、藤岡 真理、堀口 美香、近藤 健、豊嶋 崇徳、生きた白血病細胞で BCR-ABL 活性を精密測定するための FRET バイオセンサーの改良、第 89 回日本生化学会大会、2016 年 9 月 25-27 日、仙台国際センター 東北大学川内北キャンパス (宮城県 仙台市)
 5. 大場 雄介、インフルエンザウイルス粒子の取り込みを制御するシグナル伝達機構、第 6 回北海道探索病理学研究シンポジウム、2016 年 9 月 17 日、ニューオータニイン札幌 (北海道 札幌市) 招待
 6. 西出 真也、藤岡 容一朗、堀内 浩水、堀口 美香、佐藤 絢、Prabha Nepal、王 セイ、南保 明日香、大場 雄介、ライブセル蛍光イメージングの口腔疾患予防への応用、第 58 回歯科基礎医学会学術大会、2016 年 8 月 24-26 日、札幌コンベンションセンター (北海道 札幌市)
 7. 佐藤 絢、藤岡 容一朗、堀内 浩水、西出 真也、Prabha Nepal、堀口 美香、Jing Wang、南保 明日香、大場 雄介、Ras-PI3K シグナルを介したエンドサイトーシス制御機構におけるミトコンドリアポアタンパク質の機能解析、第 68 回日本細胞生物学会、2016 年 6 月 15-17 日、京都テルサ(京都府 京都市)
 8. 堀内 浩水、藤岡 容一朗、佐藤 絢、Prabha Nepal、堀口 美香、Jing Wang、西出 真也、南保 明日香、小布施 力史、大場 雄介、Ras-PI3K 複合体の時空間制御を介したエンドサイトーシス調節因子の探索、第 68 回日本細胞生物学会、2016 年 6 月 15-17 日、京都テルサ(京都府 京都市)
 9. 藤岡 容一朗、西出 真也、佐藤 絢、堀内 浩

- 水、Prabha Nepal、堀口 美香、Jing Wang、南保 明日香、大場 雄介、インフルエンザウイルス宿主細胞侵入を制御する宿主側因子の同定、第 68 回日本細胞生物学会、2016 年 6 月 15-17 日、京都テルサ(京都府 京都市)
10. 西出 真也、藤岡 容一朗、堀内 浩水、堀口 美香、佐藤 絢、Prabha Nepal、Jing Wang、南保 明日香、大場 雄介、蛍光バイオセンサーを用いた時計タンパク質 BMAL1-CLOCK の細胞内動態の解析、第 68 回日本細胞生物学会、2016 年 6 月 15-17 日、京都テルサ(京都府 京都市)

[図書] (計 3 件)

1. Fujioka M, Asano Y, Nakada S and Ohba Y. SH2 domain-based FRET biosensor for measuring BCR-ABL activity in living CML cells. **Methods in Molecular Biology. SH2 domains** Kazuya Machida K and Liu BA (ed.) Springer, New York, (p513-534), 2017 (ISBN: 978-1-4939-6760-5)
2. Ras-PI3K シグナルによるエンドサイトーシスとウイルス粒子取り込みの制御機構。藤岡 容一朗、大場雄介. **生化学** 87(1): 91-100, 2015
3. シグナル伝達系. 大場雄介. (日本臨床腫瘍学会編) **新臨床腫瘍学[第 4 版]**, 南江堂:14-22(pp738)(2015)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 1 件)

名称: FRET 計測措置及び FRET 計測方法

発明者: 中田成幸、大場雄介ほか

権利者: 三井造船株式会社、北海道大学

種類: 特許

番号: 5695190

取得年月日: 2015 年 2 月 13 日

国内外の別: 国内

[その他]

ホームページ等

<http://cp.med.hokudai.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大場 雄介 (Yusuke Ohba)

北海道大学・大学院医学研究院・教授

研究者番号: 30333503

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

南保 明日香 (Asuka Nanbo)

北海道大学・大学院医学研究院・准教授

研究者番号: 60359487

西出 真也 (Shinya Nishide)

北海道大学・大学院医学研究院・助教

研究者番号: 40451398

藤岡 容一朗 (Yoichiro Fujioka)

北海道大学・大学院医学研究院・助教

研究者番号: 70597492

(4) 研究協力者

藤岡 真理 (Mari Fujioka)

堀内 浩水 (Kosui Horiuchi)

佐藤 絢 (Aya O. Satoh)