

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 22 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K14722

研究課題名(和文) エンドサイトーシスにおける膜形態変化とタンパク質局在との時空間的同時解析

研究課題名(英文) Spatiotemporal imaging of membrane morphology and protein localization during endocytic process

研究代表者

吉村 成弘 (Shigehiro, Yoshimura)

京都大学・生命科学研究科・准教授

研究者番号：90346106

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：項目Iでは、クラスリン依存性エンドサイトーシスに関与すると考えられているタンパク質群の局在・集積を共焦点レーザー顕微鏡で観察すると共に、高速AFMで細胞膜の形状を同時観察するシステムを構築し、タンパク質局在と膜の構造変化との関係を明らかにした。項目IIでは、従来から関与が報告されていたダイナミンの他に、アクチンが膜の動態変化に深く関与していることを示す新しい知見を得た。項目IIIでは、膜閉口過程で見られたアクチン依存性膜隆起の形成機構および閉口における役割を明らかにするために、アクチンの重合モデルと膜の連続体モデルとを組み合わせた解析を行った。

研究成果の概要(英文)：We established hybrid time-lapse imaging system by combining high-speed atomic force microscopy and confocal laser-scanning microscopy to simultaneously image membrane morphology and protein localization during clathrin-mediated endocytosis. Spatiotemporal assembly of proteins such as clathrin, dynamin, epsin and actin, were successfully revealed together with morphological changes of the membrane. The inhibition of actin dynamics affected assembly, maturation and closing steps, suggesting important roles of cortical actin dynamics in multiples steps of endocytic process. At the closing step, most of the pits were covered by a membrane swelling, which is induced by a quick burst of actin polymerization, and then irreversibly closed, whereas some pits were closed without these motions. By combining membrane model and dynamic actin polymerization model, the mechanism of the pit closure was analyzed.

研究分野：生物物理

キーワード：エンドサイトーシス シグナル伝達 細胞骨格 アクチン クラスリン 原子間力顕微鏡 ナノイメージング

### 1. 研究開始当初の背景

エンドサイトーシスに代表される細胞膜のダイナミクスは、細胞の環境応答、細胞間および細胞内情報伝達などにおいて重要な役割を果たしている。膜の陥入、膜小胞の分離、エンドソームとの融合、そして小胞の細胞膜への回帰、といった一連のプロセスには、脂質二重膜と相互作用するタンパク質群が関与している。これらのタンパク質や細胞内に取り込まれる受容体の局在および動態は、蛍光顕微鏡技術（全反射、超解像など）により明らかにされてきたが、これらの局在変化が膜の形状変化といかに関係しているかは不明である。

本研究代表者はこれまでに、高速原子間力顕微鏡（高速 AFM）を用いて DNA やタンパク質がはたらく姿をナノメートル・ミリ秒の時間分解能で解析する研究を行ってきた。また、オリンパス株式会社との共同研究により、生きた細胞の観察に特化した高速 AFM を用いて、細胞膜や細胞骨格の動的イメージングにも成功している。特に細胞膜の観察では、i) 穴が閉じる（膜小胞が切り離される）際に、隆起した膜が「穴をフタする」様子や、ii) クラスリン等の膜裏打ちタンパク質と局在と細胞膜の形態変化との間には数 10 秒のギャップが存在すること、などの興味深い現象が観察されている。これらの観察結果は、タンパク質の局在のみから描かれたエンドサイトーシスのモデルと必ずしも一致せず、新たな機構を示唆するものである。

### 2. 研究の目的

本研究課題では、これまでタンパク質の局在のみから理解されてきたエンドサイトーシスの諸過程に対して、高速 AFM による「細胞膜の形態変化」というこれまでにない時間的情報を追加し、その分子メカニズムの全貌解明に挑む。具体的には、高速 AFM と共焦点蛍光顕微鏡のハイブリッドシステムにより、  
( ) クラスリン等の膜裏打ちタンパク質や受容体の集合と膜の形態変化との時空間的關係、  
( ) 小胞の切り離し過程における裏打ちタンパク質の局在・機能と力発生機構、を解明すると共に、  
( ) 細胞膜の形状像から力学モデルを新たに構築することで、エンドサイトーシスの分子機構の全貌を明らかにする。

### 3. 研究の方法

2 年間の研究期間中に以下の 3 つの研究項目を実行することで、エンドサイトーシス過程の分子機構を解明する。

**項目**：膜陥入過程における膜形態変化とタンパク質局在の関係解明

-1 細胞膜の形状変化と裏打ちタンパク質の局在

-2 リガンド依存的膜受容体の取り込み過程におけるタンパク質局在と膜陥入の関係解明

**項目**：膜小胞切り離し過程における力発生

### 機構の解明

-1 切離しに関与するタンパク質の局在と膜形状変化

-2 膜小胞切り離し過程における力発生と膜融合機構

**項目**：膜形状像を用いた細胞膜力学モデルの構築

AFM で得られる細胞膜の形状情報から膜の構造モデルを構築する。構築したモデルは、**項目** 及び **項目** における膜の形態変化機構の解明に用いる。

### 4. 研究成果

**項目**

クラスリン依存的エンドサイトーシスに関与すると考えられているタンパク質群 (epsin, amphiphysin1, Arp2, BIN1, cortactin, GAK, Hip1R, N-WASP, SNX9, clathrin, dynamin, actin) の局在・集積を、共焦点レーザー顕微鏡を用いて蛍光経時観察する系を構築し、そのうちのいくつかに関しては、高速 AFM との同時観察に成功した (図 1)。

また、特異的な機能阻害剤を用いた実験から、クラスリン依存的エンドサイトーシスには、アクチン重合に関与する formin や Arp2/3 複合体が関与していることを明らかにした。細胞表層におけるアクチンの重合・脱重合のダイナミクスに関して解析した結果、表層アクチンの重合そのものは、formin や Arp2/3 には非依存的であった (図 2)。このことは、クラスリンピット周辺では、周囲の表層アクチンとは異なる制御機構でアクチンの重合が進行し、膜の変形を引き起こしていることを示す。

リガンドとしてトランスフェリンを用いて、受容体の取り込み量と細胞全体でのエンドサイトーシス頻度との関係を明らかにした。蛍光リガンドを用いた定量実験では、受容体の細胞内取り込みが増加したのに対し

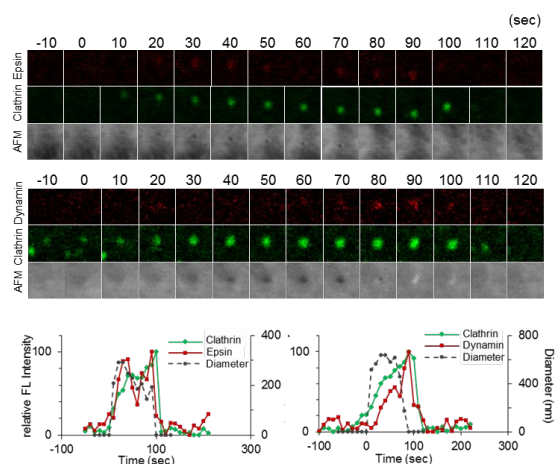


図 1: クラスリン依存的エンドサイトーシス過程におけるタンパク質局在と膜形状の同時観察。clathrin, epsin, dynamin の観察例 (上段) とその定量結果 (下段) を示す。

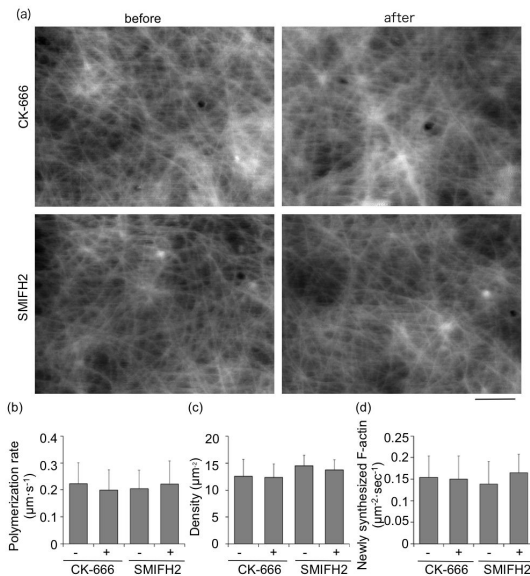


図 2: COS7 細胞の表層アクチン動態。アクチン重合に関与する Arp2/3 複合体および Formin の阻害剤(CK666 および SMIFH2)を添加したときの AFM 像(a)、重合速度(b)、密度(c)、合成頻度(d)を定量化した。

て、細胞表面でのエンドサイトーシス頻度に大きな変化はなかった。このことは、リガンドと受容体の結合自体がエンドサイトーシスの頻度を顕著に増加させることはないことを示唆する。

#### 項目

「小胞切り離し過程に関与するタンパク質の局在と膜形状変化の関係解明」: 小胞の切り離しで主要な役割を果たしているダイナミンに関して、RNA 干渉で発現量を低下させた細胞を用いて AFM 観察を行った。時間分解能を従来の 10 秒から 2 秒に上げたイメージングでは、ピットが 2 段階の過程を経て閉じる様子が観察された。ダイナミンの発現量低下により、1 段階目から 2 段階目への移行時間に遅れが生じた。このことは、閉口過程前半のステップはダイナミン非依存的に進行すること、および、膜を最終的に括り切るステップでダイナミンの積極的な関与があることを示唆する。

siRNA を用いて、ダイナミンをノックダウンしたところ、i) 膜隆起を伴う閉口頻度の減少、ii) 二段階閉口頻度の増加、iii) 閉口時間の延長、が見られた。また、阻害剤を用いてアクチン動態の関与を調べたところ、i) 脱重合阻害による閉口頻度の低下、ii) 閉口時間の延伸、iii) 膜隆起を伴う閉口頻度の減少、iv) 再開口の減少などの顕著な効果が多く見られた(図 3)。これらの結果は、従来から関与が報告されていたダイナミンの他に、アクチンが膜の動態変化に深く関与していることを示す新しい知見である。

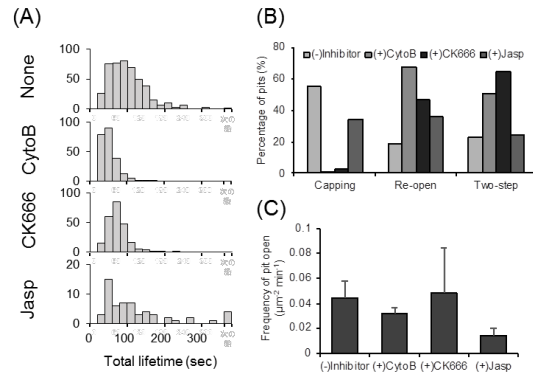


図 3: アクチン動態がクラスリン依存的エンドサイトーシスに及ぼす影響。アクチンの重合阻害剤(cytochalasin B, cytoB、Arp2/3 機能阻害剤(CK666)、およびアクチン脱重合阻害剤(Jasplakinolide, Jasp)を添加したときのクラスリンピットの閉口時間(A)、閉じ方の様式(B)、開口頻度(C)を定量比較した。

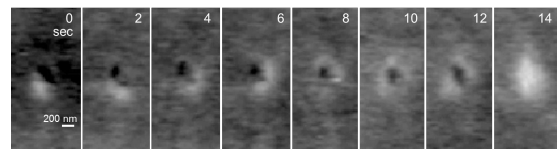


図 4: 2 秒ごとに撮影したクラスリン被覆ピットの閉口過程。穴の周囲に膜の非対称的な隆起が見られる。これはアクチンの局所的な重合によるものである。

#### 項目

膜閉口過程で見られた膜隆起に着目し、膜の形状を平面モデルに当てはめる試みを行った。ピットの片側から覆い被さるように隆起がフタをすと考えられてきたが、時間分解能の改善により、膜隆起がピットの周囲を取囲うようにして動く様子を捉えることに成功した(図 4)。これらの観察結果に基づき、アクチンの重合モデルと、膜の連続体モデルとを組み合わせ、アクチンの局所的な重合がいかにして膜隆起をもたらし、さらにはピットの閉口を引き起こすかに関するモデル構築に取り組んでいる。

#### 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 8 件)

0. Lolodi, H. Yamazaki, S. Otsuka, M. Kumeta and S.H. Yoshimura (2016) "Dissecting *in vivo* steady-state dynamics of karyopherin-dependent nuclear transport" *Mol. Biol. Cell* 27(1), 167-176, DOI: 10.1091/mbc.E15-08-0601.
- S.H. Yoshimura, and T. Hirano (2016) "HEAT repeats - versatile arrays of

- amphiphilic helices working in crowded environments?" *J. Cell Sci.*, 129(21): 3963-3970, DOI: 10.1242/jcs.185710 .
3. G. Shrivastava, M. Hyodo, S.H. Yoshimura, H. Akita and H. Harashima (2016) "Identification of a nucleoporin358-specific RNA aptamer for use as a nucleus-targeting liposomal delivery system" *Nuc. Acid Ther.*, 26: 286-298, DOI: 10.1089/nat.2016.0604.
  4. Y. Zhang, A. Yoshida, N. Sakai, Y. Uekusa, M. Kumeta and S.H. Yoshimura (2017) "In vivo dynamics of the cortical actin network revealed by fast-scanning atomic force microscopy." *Microscopy*, 66(4): 272-282, DOI: 10.1093/jmicro/dfx015.
  5. H.A. Konishi, S. Asai, T. Watanabe and S.H. Yoshimura (2017) "In vivo analysis of protein crowding within the nuclear pore complex in interphase and mitosis" *Sci. Rep.*, 7(1): 5709, DOI: 10.1038/s41598-017-05959-w.
  6. M. Kumeta, H.A. Konishi, W. Zhang, S. Sakagami and S.H. Yoshimura (2018) "Prolines in the  $\alpha$ -helix confer the structural flexibility and functional integrity of importin  $\alpha$ " *J. Cell Sci.*, 131(1), jcs206326, DOI: 10.1242/jcs.206326.
  7. M. Kumeta, D. Takahashi, K. Takeyasu and S.H. Yoshimura (2018) "Cell type-specific suppression of mechanosensitive genes by audible sound stimulation." *PLOS One*, 13(1): e0188764, DOI: 10.1371/journal.pone.0188764.
  8. A. Yoshida, N. Sakai, Y. Uekusa, Y. Imaoka, Y. Itagaki, Y. Suzuki, and S.H. Yoshimura (2018) "Morphological changes of plasma membrane and protein assembly during clathrin-mediated endocytosis" *PLOS Biol.* (in press), DOI: 10.1371/journal.pbio.2004786.
- [学会発表](計 10 件)
1. 吉田藍子, 酒井信明, 植草良嗣, 桑田昌宏, 吉村成弘「高速原子間力顕微鏡による生体膜動態のライブセルイメージング」於生体膜と薬物の相互作用シンポジウム, 2016/11/17 (名古屋).
  2. 吉田藍子, 酒井信明, 植草良嗣, 張雁書, 桑田昌宏, 伊藤修一, 吉村成弘「高速原子間力顕微鏡を用いた生体膜と皮質アクチンネットワーク動態のライブセルイメージング」於第 39 回日本分子生物学会年会, 2016/11/30 (横浜).
  3. A. Yoshida, Y. Zhang, Y. Suzuki, Y. Itagaki, N. Sakai, Y. Uekusa, M. Kumeta and S.H. Yoshimura "Role of cortical actin dynamics in endocytic process revealed by fast-scanning atomic force microscopy." at IGER International Symposium on Now in actin study", 2016/12/12 (Nagoya).
  4. S.H. Yoshimura "Live-cell analysis of actin dynamics by fast-scanning atomic force microscopy." at Nuclear Actin in the regulation of transcription and nuclear structure, 2017/1/26, (Wakayama).
  5. A. Yoshida, N. Sakai, Y. Uekusa, Y. Zhang, M. Kumeta and S.H. Yoshimura "Involvement of actin dynamics in endocytic process revealed by fast-scanning atomic force microscope." at Biophysical Society 61<sup>st</sup> Annual Meeting, 2017/2/15 (New Orleans, USA).
  6. A. Yoshida, Y. Zhang, Y. Itagaki, M. Kumeta, Y. Suzuki, N. Sakai, Y. Uekusa and S.H. Yoshimura "Morphological analysis of clathrin-mediated endocytotic process by fast-scanning atomic force microscope" at 第 58 回日本植物生理学会年会, 2017/3/17 (鹿児島).
  7. 吉田藍子, 酒井信明, 植草良嗣, 桑田昌宏, 吉村成弘, 大場雄介「高速原子間力顕微鏡を用いた生体膜動態のライブセルイメージング」於第 97 回北海道医学大会生理系分科会 2017/9/2 (北海道).
  8. Y. Itagaki, Y. Zhang, A. Yoshida, N. Sakai, Y. Uekusa, M. Kumeta and S.H. Yoshimura "Live-cell imaging of actin dynamics in cortex and lamellipodium by high-speed atomic force microscopy." 於日本生物物理学会第 55 回年会 2017/9/20 (熊本).
  9. Y. Itagaki, Y. Zhang, A. Yoshida, M. Kumeta and S.H. Yoshimura "Live-cell analysis of actin network by high-speed atomic force microscopy." 於日本生物物理学会第 55 回年会 2017/9/20 (熊本).
  10. S.H. Yoshimura "Live-cell imaging by high-speed atomic force microscopy revealed protein and plasma membrane dynamics during endocytic process." at EMBO/EMBL symposium: Seeing is believing - Imaging the process of life, 2017/10/6 (Heidelberg).

〔図書〕(計 0 件)

〔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

・研究室のHP

<http://www.chrom.lif.kyoto-u.ac.jp/>

・研究成果を動画で配信

<https://www.youtube.com/watch?v=8i0rpg0T9n8>

[https://www.youtube.com/watch?v=9WgpVi\\_-dfk&t=128s](https://www.youtube.com/watch?v=9WgpVi_-dfk&t=128s)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

吉村 成弘 (YOSHIMURA Shigehiro)

京都大学・大学院生命科学研究科・准教授

研究者番号：90346106

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

安達 泰治 (ADACHI Taiji)

京都大学・ウイルス・再生医科学研究所・  
教授

研究者番号：40243323

### (4) 研究協力者

( )