

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 6 月 23 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18H02436

研究課題名(和文)細胞表面イメージング技術で解明するエンドサイトーシスのグローバル制御機構

研究課題名(英文)Global regulatory mechanism of endocytosis revealed by cell-surface imaging technique

研究代表者

吉村 成弘 (Yoshimura, Shigehiro)

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) 13,100,000円

研究成果の概要(和文)：高速原子間力顕微鏡(高速AFM)と共焦点レーザ顕微鏡との相関イメージング法により、クラスリン依存性エンドサイトーシスの閉口過程では、膜変形活性を持つCIP-4タンパク質が、低分子量Gタンパク質を介してピット周辺に集合し、アクチン重合を促進することで近傍の細胞膜を変形させるという詳細な分子機構を解明することに成功した。さらに、ポリジメチルシロキサンを用いた超薄型ストレッチチャンバおよび細胞伸展装置を開発し、高速AFM装置に組み込むことに成功した。これを用いて一次元の伸展刺激がエンドサイトーシスに及ぼす影響を解析したところ、閉口過程と閉口過程の一部に張力依存性のステップを同定することに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでエンドサイトーシス機構の解析には、電子顕微鏡による膜形状の観察と、蛍光顕微鏡を用いたライブセルイメージングから得られるタンパク質局在解析に大きく依存していた。本研究では、高速原子間力顕微鏡と高分解能蛍光顕微鏡との相関ライブイメージング法を用いることで、エンドサイトーシスにおける細胞膜の形状とタンパク質局在を同時に解析することが可能となり、膜変形活性を持つタンパク質群がクラスリンピット周辺の細胞膜を変形させる詳細な分子メカニズムを解明することに成功した。これは、シグナル伝達研究分野における重要な知見であり、同技術の有用性を示すものである。

研究成果の概要(英文)：We established a correlative live-cell imaging system by combining high-speed atomic force microscopy (HS-AFM) and confocal laser-scanning microscopy and revealed the detailed morphological changes in the plasma membrane and protein localizations during the clathrin-mediated endocytosis. CIP4, which has membrane-deforming activity, is recruited to the plasma membrane via small G protein Cdc42, and promotes the assembly of actin, which induces a small membrane bulge near the clathrin pit. We also made an ultra-thin stretching cell chamber using polydimethylsiloxane and successfully installed into the above-mentioned correlative imaging system together with a thin stretching device. By using this live-cell stretching system, we analyzed how one-dimensional stretching stimulus affected the progress of clathrin-mediated endocytosis, and identified the tension-dependent steps in the initiation and closing steps.

研究分野：生物物理

キーワード：エンドサイトーシス 原子間力顕微鏡 細胞膜 シグナル伝達 表層骨格 ライブセルイメージング

1. 研究開始当初の背景

エンドサイトーシスは、細胞外の様々な物質を細胞内部に取り込む過程であり、シグナル伝達、免疫、発生、細胞運動、など多くの細胞活動において重要な役割を果たしている。クラスリン依存的経路(Clathrin-mediated endocytosis, CME)やカベオラ(Caveola)の他に、それらに依存しない経路(Clathrin-independent endocytosis, CIE)も同定されており、関与するタンパク質の同定および機能解析が進められている。個々の経路に関する解析が進む一方で、細胞レベルでエンド/エキソサイトーシス全体を俯瞰すると、各経路が独立して進行しているわけではなく、複数の経路や構造が、細胞膜、表層骨格、膜張力等の要素を介して、密接にリンクしながら進行・制御されているのも事実である。このことは、細胞表層が、複数の構成要素が構造的に繋がった動的構造システムであることを示唆する。よって、これまでのように、システム構成要素の個別の研究だけでは、細胞レベルでの細胞膜動態の全貌解明に繋がらないのは明らかである。

2. 研究の目的

細胞表層システムにおけるエンドサイトーシスのグローバル制御機構を理解する上で障壁となるのが、「細胞膜の形態」「細胞骨格の構造や動態」といった複数の異なる要因を統合的に解析する技術である。そこで、本研究課題では、当研究グループで独自に開発した生細胞観察用高速原子間力顕微鏡(高速 AFM)を用いてこの問題に挑む。当グループでは、この装置を用いて、細胞膜、表層骨格、タンパク質局在の3つの異なる構造情報を、生きた細胞の表層から同時に取得するイメージング技術を確立している。この唯一無二の技術を最大限に活用し、以下の目的を達成する。

目的:「細胞膜の形態変化」「膜直下の表層骨格」「タンパク質局在」を生きた細胞で同時に可視化する技術を用いて、細胞表層システムにおけるエンドサイトーシスのグローバル制御機構を明らかにする。

3. 研究の方法

研究項目I: クラスリン依存的エンドサイトーシスにおける細胞膜と細胞骨格の動的協奏関係の解明

CME 経路にアクチンが関与することは古くから知られていたが、その役割に関しては、今まで明らかにされていない。研究代表者は、クラスリンピットが閉じる際にアクチン依存的にピット周辺の“細胞膜が隆起する”ことを捉えている。これは、細胞骨格により発生した力がCMEの進行に深く関与していることを示唆する。そこで本項目では、CMEと表層アクチンネットワークとの構造・機能的関係を明らかにする。

研究項目II: 各種エンドサイトーシス経路による細胞膜張力調節機構の解明

エンドサイトーシスは細胞膜の大規模な変形を伴う過程であり、その進行と膜張力とは密接な関係がある。ここでは、各エンドサイトーシス経路の進行と膜張力との関係を解明するとともに、細胞レベルでの膜張力維持におけるエンドソームサイクル(エンド/エキソサイトーシス)の役割を明らかにする。

研究項目III: 細胞運動時における膜の動的ロジスティクスの定量的時空間解析

細胞運動は、発生、免疫、がんの転移、傷修復などで重要な役割を果たしている。外部からの局所的シグナルに応じて細胞内シグナル伝達経路が活性化され、細胞骨格の大規模な再編が走化性を生み出す。このような細胞内部での構造再編の理解が進む一方で、細胞表層における細胞膜の時空間的動態、およびシグナル伝達・細胞骨格との関係性に関しては理解が進んでいない。ここでは、細胞運動に伴う脂質膜の動的ロジスティクスを、表層骨格との関係性に着目しながら解明する。

4. 研究成果

研究項目I: クラスリン依存的エンドサイトーシスにおける細胞膜と細胞骨格の動的協奏関係の解明

高速原子間力顕微鏡と共焦点レーザー顕微鏡との相関ライブイメージングにより、クラスリンエンドサイトーシスの閉口過程にアクチンが関与していることを示した。さらに、時間分解能の向上に取り組み、2秒/フレームを実現し、クラスリン依存的エンドサイトーシスの閉口過程における細胞膜の詳細な形態変化を追うことに成功した。それらの画像解析により、ピットが閉まる際に3種の異なるパターンが存在することが分かった。i) ピット側傍で細胞膜が隆起し、これが成長することで非対称的にピットが閉じる(全体の約85%)。ii) 膜の隆起は見られず、30nm程度の小さい開口径を経て完全に閉じる(全体の約10%)。iii) 膜隆起や小開口などの特徴的な構造が見られず、突然閉じる(全体の約5%)。アクチン阻害剤を用いた実験により、膜隆起がアクチン重合により引き起こされること、膜の隆起により小開口へと至ることが多いが、隆起が生じない場合でも小開口に至る経路が存在することが明らかになった。

ピット側傍におけるアクチン重合と膜隆起の分子機構を解明するために、RNA干渉を行っ

た。その結果、閉口時の非対称的膜隆起には、膜変形活性を持つ BAR ドメインを含むタンパク質 CIP4 が必要であることを突き止めた。CIP4 は、N 末端に F-BAR ドメイン、中央部に非構造領域、C 末端に SH3 ドメインを持つタンパク質である。このタンパク質の様々な変異体（点変異やドメイン欠損変異）を作成し、膜隆起との関係を精査することで、以下のことを明らかにした。i) 膜隆起の形成には N 末端の BAR ドメインと、中央の非構造領域の両方が必要である。ii) 非構造領域中央部の HR1 モチーフは二量体を形成し、非構造領域の自己集合を促進する。iii) 二量化した HR1 は活性化型 Cdc42 と相互作用し、N-WASP を活性化する。iv) N-WASP および CIP4 の SH3 ドメインが Arp2/3 を活性化し、局所的なアクチン重合が促進される。v) 中央部の非構造領域はブロック荷電ポリマーとしての性質が強く、in vitro で強く相分離し、その濃厚相には、G アクチンが選択的に取り込まれる。これらの成果は CIP4 がクラスリンピット周辺でアクチン重合を促進するメカニズムとして重要な発見である。またこれは、エンドサイトーシスの膜張力依存性を説明する仕組みになり得るものとして重要な知見である。

閉口過程におけるアクチンの重要性に関しては、これまで多くの議論がなされてきた。アクチン重合を阻害してもピットの閉口そのものは阻害されないため、閉口過程には複数のメカニズムが機能していると考えられる。高時間分解能の高速 AFM 観察に基づくと、クラスリンの集積が完了して大きな開口（U 型）構造が形成された後（50-100 秒）小胞が切り取られるまでの間に 型のの小さい開口構造が数秒間だけ存在し、すぐに閉口へと至る。これは、U 型から 型のへの変換に大きなエネルギーバリアが存在し、そのバリアを超えるのにアクチンが関与していることを示唆するものである。その力学的背景を明らかにするために、カリフォルニア大学サンディエゴ校の Padmini 博士との共同研究を開始し、そのモデル構築を行っている。

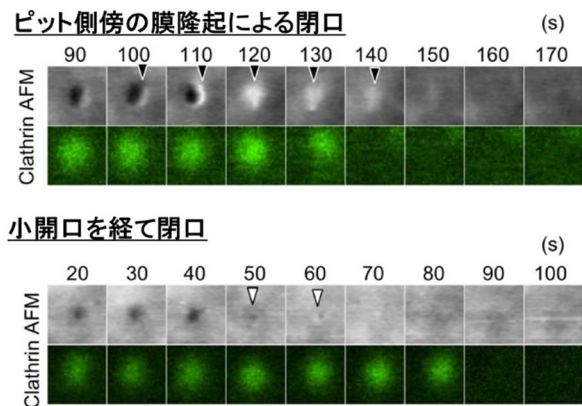


図 1: クラスリン依存的エンドサイトーシスの閉口過程に見られる細胞膜の形態変化。ピット側傍の細胞膜が隆起して穴を閉じる場合（上段）と、隆起は見られず、30nm 程度の小さな開口を経て閉じる場合が見られる。

研究項目II：各種エンドサイトーシス経路による細胞膜張力調節機構の解明

エンドサイトーシスの進行が膜張力により受ける影響を解析するために、高速 AFM のステージに搭載させるストレッチチャンバと伸展装置の設計・作成を行った。AFM ヘッドとステージの間は 8 ミリほどの隙間しかないため、これより薄い伸展装置を作成する必要がある（図）。ポリジメチルシロキサン (PDMS) を用いて、細胞培養可能な薄型角チャンバ（厚さ 2 ミリ）を設計・作成するとともに、スライドガラスとカバーガラスを組み合わせた伸展装置を作成し、全体の厚さを 3 ミリ程度に抑えた細胞伸展装置を高速 AFM ヘッドとステージ間に搭載することに成功した。さらに、これを用いたライブセルイメージングにも成功し、一次元の伸展刺激に対する細胞応答を可視化する技術を確立した。

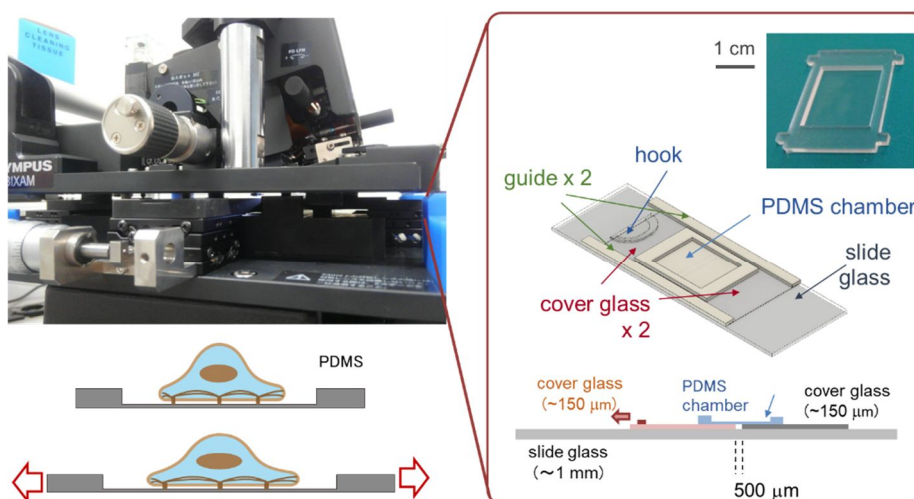


図 2: 高速 AFM に細胞伸展装置を組み込む。倒立顕微鏡のステージ上に AFM スキャナをセットすると、1 センチ以下の隙間しかない（左上）。この隙間に搭載可能な細胞伸展装置（右）を設計・作成した。PDMS を用いて 2 センチ角で厚さが 2 ミリ程度の細胞培養チャンバを作成した。これを、カバーガラス等で作成した伸展装置とを組み合わせ、厚さ 3 mm 程度の伸展システムを構築した。

伸展刺激を加えた細胞では、クラスリンピットの開口頻度の減少が見られるとともに、閉口過程で小開口（開口径~30nm）の時間の延長が見られた。これらの結果は、閉口過程と小開口から閉口へと至る過程に張力依存的機構が存在することを示す重要な結果である。閉口過程では、クラスリンが集積する前に膜を変形させる FcHO2 タンパク質などの関与が報告されており、その機能と膜張力との関係が示唆される。一方、小開口から閉口までの過程に関しては、RNA 干渉によりダイナミンをロックダウンした細胞では小開口の時間が長くなったことから、ダイナミンによる狭窄過程が張力に大きく依存していることを示唆する。

研究項目III：細胞運動時における膜の動的ロジスティクスの定量的時空間解析

細胞運動に伴う膜張力の変化、およびタンパク質局在の変化とエンドサイトーシスとの関係性を解明するために、クラスリン被覆ピットとカベオラに着目して解析を行った。カベオラは、クラスリン被覆ピットと異なり、caveolin1 と cavin1 の2種のタンパク質を主成分として形成される構造であり、膜張力に応じて細胞膜の面積を調節する緩衝作用があることが報告されていたが、その仕組みには不明である。そこで、これらのタンパク質に蛍光タンパク質を融合させて培養細胞に発現させ、細胞運動との関係性を調べる実験系を構築した。通常の細胞では、カベオラは 30-50nm 程度の小さい開口部を持ち、クラスリン被覆ピットよりも長い持続時間（数分）を持つことが分かった（図3）。また、線維芽細胞や骨芽細胞などの細胞種を用いた解析から、カベオラの数や開口時間は、細胞種間で大きな差があることが明らかになった。特に、筋芽細胞では、アクチン線維が少ない場所に多くのカベオラが見られた。これらの結果は、これまで形態的なアプローチが困難であったカベオラの形成機構の理解に貢献する重要で新しい知見である。

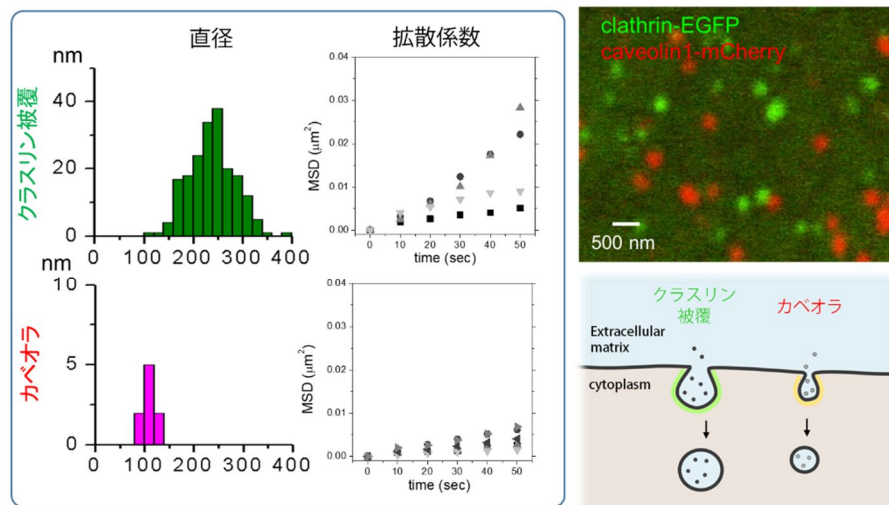


図3：クラスリン被覆ピットとカベオラの同時観察と構造解析。をEGFP融合クラスリンとmCherry融合カベオリンをCOS7細胞に同時に発現させ、共焦点レーザ顕微鏡と高速AFMで相関イメージングを行った。右上：クラスリンとカベオリンの蛍光シグナルは共局在しない。高速AFMの連続画像から、ピットの直径、拡散係数などを求めると、両者の間に大きな差が見られる（左）。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計11件（うち査読付論文 11件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Duic Ivana, Tadakuma Hisashi, Harada Yoshie, Yamaue Ryo, Deguchi Katashi, Suzuki Yuki, Yoshimura Shige H, Kato Hiroki, Takeyasu Kunio, Fujita Takashi	4. 巻 48
2. 論文標題 Viral RNA recognition by LGP2 and MDA5, and activation of signaling through step-by-step conformational changes	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nucleic Acids Research	6. 最初と最後の頁 11664 ~ 11674
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/nar/gkaa935	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 Yamaguchi Itsuki, Yoshimura Shige H., Katoh Hironori	4. 巻 295
2. 論文標題 High cell density increases glioblastoma cell viability under glucose deprivation via degradation of the cystine/glutamate transporter xCT (SLC7A11)	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 6936 ~ 6945
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1074/jbc.RA119.012213	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 Zhang Wanzhen, Watanabe Ryuji, Konishi Hide A., Fujiwara Takahiro, Yoshimura Shige H., Kumeta Masahiro	4. 巻 33
2. 論文標題 Redox-Sensitive Cysteines Confer Proximal Control of the Molecular Crowding Barrier in the Nuclear Pore	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 108484 ~ 108484
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2020.108484	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 H. Yamazaki, H. Kosako and *S.H. Yoshimura	4. 巻 1868
2. 論文標題 Quantitative proteomics indicate a strong correlation of mitotic phospho-/dephosphorylation with non-structured regions of substrates.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biochim. Biophys. Acta. Proteins Proteom.	6. 最初と最後の頁 140295
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbapap.2019.140295	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 -

1. 著者名 H.A. Konishi and S.H. Yoshimura	4. 巻 34
2. 論文標題 Interactions between non-structured domains of FG- and non FG-nucleoporins coordinate the ordered assembly of the nuclear pore complex in mitosis.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 FASEB J.	6. 最初と最後の頁 1532-1545
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1096/fj.201901669R	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 -

1. 著者名 K. Fumoto, H. Takigawa-Imamura, K. Sumiyama, S.H. Yoshimura, N. Maehara, A. Kikuchi	4. 巻 132
2. 論文標題 Mark1 regulates distal airspace expansion through pneumocyte flattening in lung development.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J. Cell Sci.	6. 最初と最後の頁 jcs235556
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1242/jcs.235556	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 -

1. 著者名 K. Nishimura, Y. Johmura, K. Deguchi, Z. Jiang, K.S.K. Uchida, N. Suzuki, M. Shimada, Y. Chiba, T. Hirota, S.H. Yoshimura, *K. Kono and *M. Nakanishi	4. 巻 10
2. 論文標題 Cdk1-mediated DIAPH1 phosphorylation maintains cortical tension during metaphase, which regulates inactivation of the spindle assembly checkpoint at anaphase onset.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nat. Commun.	6. 最初と最後の頁 981
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-019-08957-w	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 -

1. 著者名 A. Yoshida, N. Sakai, Y. Uekusa, Y. Imaoka, Y. Itagaki, Y. Suzuki, and S.H. Yoshimura	4. 巻 16
2. 論文標題 Morphological changes of plasma membrane and protein assembly during clathrin-mediated endocytosis	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 PLOS Biology	6. 最初と最後の頁 e2004786
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pbio.2004786	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 M. Kumeta, H.A.Konishi, W. Zhang, S. Sakagami and S.H. Yoshimura	4. 巻 131
2. 論文標題 Prolines in the -helix confer the structural flexibility and functional integrity of importin beta	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Cell Science	6. 最初と最後の頁 jcs206326
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1242/jcs.206326	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 -

1. 著者名 M. Kumeta, D. Takahashi, K. Takeyasu and S.H. Yoshimura	4. 巻 13
2. 論文標題 Cell type-specific suppression of mechanosensitive genes by audible sound stimulation.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 PLOS One	6. 最初と最後の頁 e0188764
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0188764	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 M. Kumeta, Y. Panina, H. Yamazaki, K. Takeyasu and S.H. Yoshimura	4. 巻 28
2. 論文標題 N-terminal dual lipidation-coupled targeting into the primary cilium	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Genes to Cells	6. 最初と最後の頁 715-723
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/gtc.12603	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 -

〔学会発表〕 計11件 (うち招待講演 10件 / うち国際学会 4件)

1. 発表者名 YU Y, YOSHIMURA SH
2. 発表標題 Correlative imaging of high-speed atomic force microscopy and fluorescence microscopy revealed asymmetric closing process of endocytosis.
3. 学会等名 EMBO Workshop, Seeing is Believing (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 吉村成弘
2. 発表標題 ライブセル高速原子間力顕微鏡による細胞表層骨格の可視化とメカノセンシング機構の解明
3. 学会等名 日本生体医工学会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 ZHANG Y, YOSHIDA A, SAKAI N, UEKUSA Y, KUMETA M, YOSHIMURA SH
2. 発表標題 In vivo dynamics of the cortical actin network revealed by fast-scanning atomic force microscopy.
3. 学会等名 第75回日本顕微鏡学会学術講演会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 S.H. Yoshimura
2. 発表標題 Protein-induced morphological changes of the plasma membrane during clathrin-mediated endocytosis and its dependency on the membrane tension revealed by live-cell fast-scanning atomic force microscopy.
3. 学会等名 EMBO workshop, Physics and Chemistry of Endocytosis (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 KONISHI H, YAMAZAKI H, YOSHIMURA SH
2. 発表標題 Promiscuous interactions between non-structured domains of nucleoporins coordinate the ordered assembly of the nuclear pore complex in mitosis.
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 KONISHI H, YAMAZAKI H, YOSHIMURA SH
2. 発表標題 Promiscuous interactions between non-structured domains of nucleoporins coordinate the ordered assembly of the nuclear pore complex in mitosis.
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 YOSHIMURA S.H.
2. 発表標題 How Clathrin-mediated Endocytosis Proceeds under Membrane Tension.
3. 学会等名 International Symposium on AMED "Mechanobiology" Project (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 S.H. Yoshimura
2. 発表標題 Non-invasive Live-cell Imaging of Plasma Membrane and Cortical Actin Dynamics in Endocytic Process by High-speed Atomic Force Microscopy
3. 学会等名 第61回顕微鏡学会シンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 S.H. Yoshimura
2. 発表標題 ライブセル高速原子間力顕微鏡によるエンドサイトーシス膜変形過程の可視化解析
3. 学会等名 第128回日本解剖学会学術集会 (招待講演)
4. 発表年 2018年～2019年

1. 発表者名 S.H. Yoshimura
2. 発表標題 Imaging morphological changes of the plasma membrane and protein assembly during clathrin-mediated endocytosis
3. 学会等名 FAOPS2019 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年～2019年

1. 発表者名 吉村成弘
2. 発表標題 核膜孔複合体の内部構造および機能における分子クラウディングの役割
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

https://www.youtube.com/watch?v=MbwfMo9kARE&t=22s

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			
スペイン	マドリード大学			
ドイツ	マックスプランク研究所	ヨーロッパ分子生物研究所		
米国	カリフォルニア大学サンディエゴ校	ジョンズホプキンス大学		