

平成 21 年 6 月 1 日現在

研究種目：基盤研究 (C)
 研究期間：2007 ～ 2008
 課題番号：19590168
 研究課題名 (和文) アポトーシスに触発されるエンドサイトーシス系の膜輸送と脂質恒常性の機序
 研究課題名 (英文) Alteration of endocytic pathway and lipid homeostasis in H₂O₂-induced apoptosis.
 研究代表者
 松尾 浩民 (MATSUO HIROTAMI)
 就実大学・薬学部・准教授
 研究者番号：60274479

研究成果の概要：アポトーシスとエンドサイトーシスとの関連性を明らかにするために、エンドサイトーシス経路に対するアポトーシスの影響についてエンドソームの機能およびエンドソーム膜脂質の変化について動物細胞および酵母を用いた検討を行った。その結果、動物細胞、酵母のいずれにおいてもアポトーシスの誘導によりエンドサイトーシス経路に影響が及ぼされることが示唆された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2008 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・医療系薬学

キーワード：アポトーシス、エンドサイトーシス

1. 研究開始当初の背景

細胞内小胞輸送機構はあらゆる生命現象の基礎をなす機構であり、とりわけエンドサイトーシス経路は細胞内に取り込まれた内因性・外因性物質の選別輸送と分解に関わる重要な機構である。エンドサイトーシス経路はエンドソームを始めとする膜小胞を介して行われており、後期エンドソームは細胞内物質輸送の選別所として機能し、その形態が特徴的な多重小胞構造を示す。しかしながら、多重小胞構造の形成機構や内膜と外膜との関係については全く不明であった。近年、細胞内小胞輸送機構における脂質ドメインの重要性が示唆されている。動物細胞において後期エン

ドソームの内膜系にリゾビスホスファチジン酸 (LBPA) が局在し、後期エンドソーム内で特殊な領域を形成することが明らかとなり、この領域が多機能受容体の選別に関与することが示された。このように LBPA は後期エンドソームを介したタンパク質や脂質の輸送と密接に関連していることが明らかとなった。しかしながら、LBPA の機能やその調節因子については何ら解明されていなかった。そこで研究代表者は LBPA の機能を明らかにするとともに、その調節因子の探索および機能解析を行った。

In vitro 系にて LBPA の機能を検討した結果、後期エンドソームにおける多重小

胞構造の形成には LBPA 自身が形成因子として寄与し、内膜が形成されることが示唆された。さらに、LBPA の機能調節因子の同定を試みた結果、細胞質タンパク質であり、アポトーシス調節因子として機能する ALG-2-interacting protein X (Alix) が同定された。Alix の酵母ホモログである Bro1 (Vps31) はエンドソームソーティングの担い手である ESCRT 複合体の調節因子であることが知られている。多重小胞構造の形成における Alix の関与について動物細胞を用いた *in vivo* 系での検討の結果、siRNA 処理による Alix のノックアウトにより後期エンドソームの酸性化が抑制され、さらには多重小胞構造の形成も抑制されることが電子顕微鏡観察により確認された。加えて、生化学的解析では Alix のノックアウトにより後期エンドソームの形成およびエンドサイトーシス過程そのものが障害を受けることが明らかとなった。以上の結果より、研究代表者は動物細胞において LBPA は Alix との協同作業により細胞内に特殊な膜環境を形成し、エンドソームを介するタンパク質や脂質の輸送に重要な役割を果たすことを明らかにした。

エンドサイトーシス経路およびアポトーシス機構は動物細胞のみならず、単細胞生物である酵母においても共通する生命維持のための現象であり、エンドサイトーシス経路に関わる因子およびアポトーシス機構に関わる因子のいずれもが種を超えて保存されている。研究分担者である広島大学・船戸准教授のグループは出芽酵母を用いて、ESCRT 遺伝子群の破壊株がアポトーシス誘導剤により非常に強い生育障害を受けることを見出している。

以上の結果は、細胞が生存するために重要な機構であるエンドサイトーシス経路と細胞の自己消去システムであるアポトーシス機構が、動物細胞に限らず酵母においても種を超えて密接に関連することを強く示唆するものである。

2. 研究の目的

これまでのプロテオミクスによる検討の結果、ファゴサイトーシスにおける輸送小胞であるファゴソームおよび分泌経路における輸送小胞であるエクソソームにおいて Alix を始めとするアポトーシス関連因子の存在が認められている。さらに、研究代表者は Alix が後期エンドソームに特徴的な多重小胞構造の形成およびエンドサイトーシス経路そのものに関与することを報告した。細胞は生存するうえでホルモン、サイトカイン、活性酸素種、薬物など様々な外的・内的スト

レスに曝されており、これらのストレスによりアポトーシス機構が誘導されることが明らかになっている。本研究課題は「アポトーシス機構の誘導によりエンドサイトーシス経路を介する細胞内物質輸送機構はどのような影響を受けるのか?」、また、その時に「エンドサイトーシス経路の担い手であるエンドソームの膜脂質はどのように変化するのか?」という疑問に対し、ストレス因子により誘導されたアポトーシス機構がエンドサイトーシス経路に及ぼす影響について動物細胞の形態と機能の両面から検討を行うとともに、酵母を用いた分子遺伝学的側面からも検討を行うことを目的とする。本研究課題により、アポトーシス機構が誘導されたときにエンドソーム-リソソーム（液胞）系を始めとする小胞輸送機構に認められる影響を明らかにする。また、その原因が細胞内小胞輸送機構の調節因子であるタンパク質に起因するのか、あるいは細胞膜やエンドソームを構成する膜脂質に起因するのかについて分子レベルで明らかにする手がかりを探る。

3. 研究の方法

【動物細胞を用いた検討】

動物細胞を用いた検討は仔ハムスター腎由来 BHK 細胞を用いて行う。

1) 酸化ストレスによるアポトーシスの誘導: BHK 細胞を過酸化水素存在下にて培養することにより、アポトーシスの誘導を試みる。アポトーシス誘導の確認は電気泳動や TUNEL 法による核 DNA の断片化の有無により行う。

2) アポトーシス誘導によるエンドサイトーシス経路の変化: 酸化ストレスによるアポトーシス誘導後、蛍光標識化デキストランをエンドサイトーシスマーカーとして用い、BHK 細胞に取り込ませた後のマーカーの局在性とエンドソームマーカーとの共在性について、蛍光顕微鏡を用いた観察を行う。また、アポトーシス誘導時における膜輸送の変化について、エンドサイトーシス追跡試薬による膜標識を行い、蛍光顕微鏡観察を行う。

3) 脂質ホメオスタシスに対するアポトーシス誘導の影響: 細胞内脂質輸送もエンドサイトーシス過程を介することから、アポトーシス誘導時におけるコレステロールの輸送について分子プローブを用いた蛍光染色法により正常細胞との比較検討を行う。

4) エンドソームの調製: 酸化ストレス存在下あるいは非存在下にて培養した BHK 細胞よりショ糖密度勾配遠心法にて初期エンドソームおよび後期エンドソームの調製を行う。

5) エンドソーム膜リン脂質組成に対する

アポトーシス誘導の影響：調製した各エンドソームよりクロロホルム/メタノール混液を用いて膜脂質の抽出を行う。膜リン脂質の変化については抽出した膜脂質を一次元薄層クロマトグラフィー法 (TLC) による分離を行い、発色により同定したリン脂質の分離パターンをもとに正常細胞との比較検討を行う。

6) アポトーシス誘導によるエンドソームタンパク質の変化：酸化ストレス存在下にて培養した BHK 細胞をホモジネート後、ショ糖密度勾配遠心法により初期および後期エンドソームを調製する。各エンドソームにおけるタンパク質を SDS-PAGE にて分離し、正常細胞より調製したエンドソームタンパク質との比較検討を行う。

【酵母を用いた研究】

1) 酸化ストレスによるアポトーシスの誘導：酵母を過酸化水素存在下にて培養し、アポトーシスの誘導を試みる。アポトーシス誘導の確認は培養後の生存率、ROS の蓄積、TUNEL 法による核 DNA の断片化、および電子顕微鏡観察によるクロマチン凝集の有無により行う。

2) アポトーシス誘導時のエンドサイトーシスの観察：酵母における膜輸送に対するアポトーシス誘導の影響について、エンドサイトーシス追跡試薬を用いた検討を行う。

3) アポトーシス誘導による細胞膜および液胞局在性タンパク質の局在：細胞膜および液胞に局在する GFP 融合タンパク質を発現する酵母を過酸化水素存在下あるいは非存在下で培養した後、その局在を蛍光顕微鏡により解析する。

4) 小胞体-ゴルジ体間でのタンパク質とセラミドの輸送におけるアポトーシス誘導の影響：タンパク質の輸送はゴルジ体に局在する GFP 融合タンパク質の局在性 (蛍光顕微鏡観察) を指標に、セラミドの輸送はセラミド前駆体 (アイソトープ体) により標識される複合スフィンゴ脂質の合成量 (TLC による定量) を指標に解析する。

5) 膜輸送におけるカスパーゼの関与：酵母の膜輸送におけるカスパーゼの関与について、酵母カスパーゼ遺伝子破壊株のアポトーシス誘導時における膜輸送をエンドサイトーシス追跡試薬で解析する。また、細胞膜および液胞に局在する GFP 融合タンパク質を発現する破壊株を用いて、酸化ストレス時における局在を蛍光顕微鏡で観察する。

4. 研究成果

【動物細胞を用いた検討】

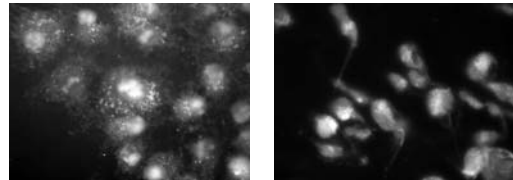
1) 酸化ストレスによるアポトーシスの誘導：BHK 細胞を過酸化水素存在下にて培養し、

アポトーシス誘導の有無について検討を行った結果、過酸化水素存在下で培養した BHK 細胞は TUNEL 陽性を示し、アガロースゲル電気泳動により DNA の断片化が観察された。

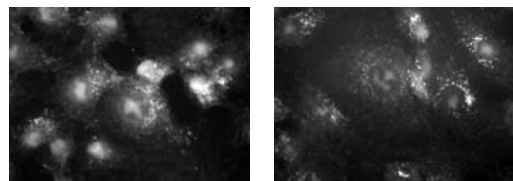
2) アポトーシス誘導によるエンドサイトーシス経路の変化：過酸化水素によるアポトーシス誘導時のエンドサイトーシス経路の変化について、蛍光標識化デキストランを用いた検討を行った。蛍光顕微鏡による観察の結果、輸送されるデキストランの量がアポトーシス誘導により減少することが示唆された (Fig. 1A)。さらに、エンドサイトーシス追跡試薬を用いた検討を行った結果、アポトーシス誘導により細胞内膜輸送の遅延が引き起こされる可能性が示された (Fig. 1B)。

A

Pulse (5 min)



Chase (40 min)

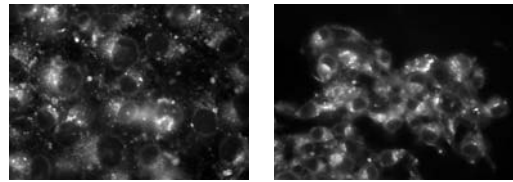


without H₂O₂

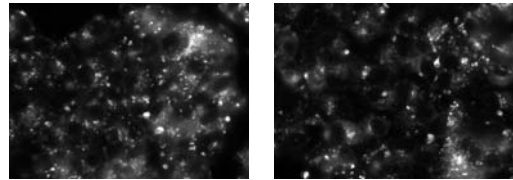
with H₂O₂

B

t = 30 min



t = 120 min



without H₂O₂

with H₂O₂

Fig. 1 Alteration of endocytic pathway in H₂O₂-treated BHK cells.

3) 脂質ホメオスタシスに対するアポトーシス誘導の影響：細胞内脂質輸送もエンドサイトーシスを介することから、アポトーシス

誘導によるエンドソーム内コレステロール蓄積量の変化について検討を行った。その結果、アポトーシス誘導時にエンドソーム内コレステロール蓄積量の減少が観察された。

4) エンドソーム膜リン脂質組成に対するアポトーシス誘導の影響：ショ糖密度勾配遠心法により調製したエンドソーム分画より膜脂質を抽出し、薄層クロマトグラフィー法により分離を行った結果、アポトーシス誘導時に後期エンドソームを構成するリン脂質の組成において変化が観察された。

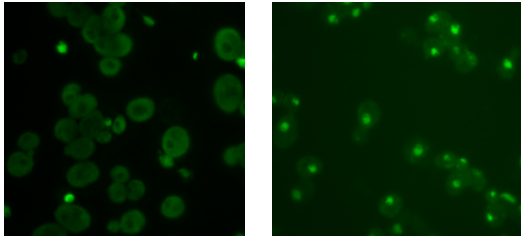
5) アポトーシス誘導によるエンドソームタンパク質の変化：過酸化水素処理あるいは非処理の細胞から初期および後期エンドソームを分画し、タンパク質を抽出した後、SDS-PAGE により分離した。その結果、アポトーシスの誘導により初期および後期エンドソームを構成するタンパク質に変化が認められた。

【酵母を用いた研究】

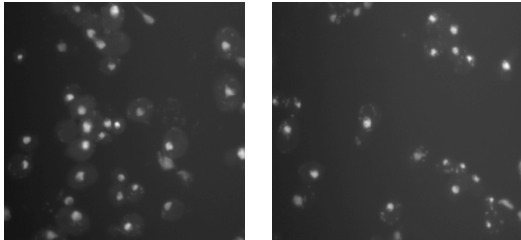
1) 酸化ストレスによるアポトーシスの誘導：過酸化水素処理による酵母のアポトーシス誘導について検討を行った。その結果、過酸化水素処理により酵母の生存率の低下、ROS の蓄積、DNA の断片化 (Fig. 2A)、およびクロマチンの凝集 (Fig. 2B) が確認された。

A

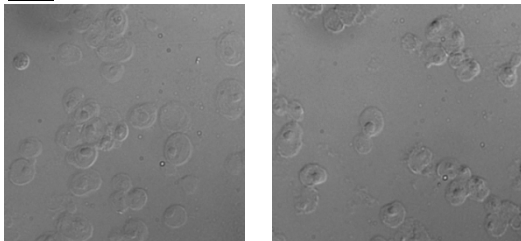
TUNEL



DAPI (nucleus)



DIC

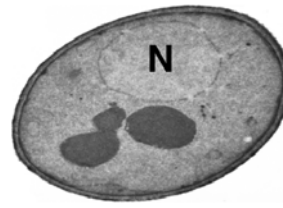


without H₂O₂

with H₂O₂

B

without H₂O₂



with H₂O₂



Fig. 2 TUNEL staining (A) and electron micrograph (B; chromatin condensation marked by arrow) of H₂O₂-treated yeast cells.

2) アポトーシス誘導時のエンドサイトーシスの観察：エンドサイトーシス追跡試薬を用いて液胞への小胞輸送におけるアポトーシスの影響を解析した結果、過酸化水素処理により輸送の遅延が観察された。

3) アポトーシス誘導による細胞膜および液胞局在性タンパク質の局在：細胞膜および液胞に局在する GFP 融合タンパク質の局在性における過酸化水素の影響について解析を行った結果、液胞への局在化に大きな変化が認められた。

4) 小胞体-ゴルジ体間でのタンパク質とセラミドの輸送におけるアポトーシス誘導の影響：小胞体からゴルジ体へ運ばれるタンパク質のゴルジ体での局在化、および小胞体で作られゴルジ体で複合スフィンゴ脂質に変換するセラミドの輸送に対し、アポトーシス誘導の影響はほとんど認められなかった。

5) 膜輸送におけるカスパーゼの関与：酵母カスパーゼ遺伝子の破壊株を用いた解析の結果、過酸化水素処理により認められたエンドサイトーシス追跡試薬の液胞への輸送遅延、および細胞膜および液胞に局在するタンパク質の液胞への局在変化に対し、カスパーゼは関与していない可能性が示された。

以上の動物細胞および酵母の成果より、アポトーシスの誘導によりエンドサイトーシス経路に影響が及ぼされること、エンドソームの脂質やタンパク質に変化が起ることが明らかになった。しかしながら、脂質やタンパク質の変化が何故起こるのか、また、どの

ように膜輸送と関わっているかについては不明である。これらの機序や関係について明らかにすることが今後の重要な課題であり、新規の膜輸送調節機構の解明につながると予想される。

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 0 件)

なし

〔学会発表〕(計 1 件)

宗岡哲也、渡邊有、梶原健太郎、村上卓、島本敏、鶴野正浩、船戸耕一：セラミドの蓄積による細胞死誘導機構の解析、酵母遺伝学フォーラム第 41 回研究報告会(札幌、2008 年 9 月 10 日)

〔図書〕(計 0 件)

なし

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0 件)

なし

○取得状況(計 0 件)

なし

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松尾 浩民 (MATSUO HIROTAMI)

就実大学・薬学部・准教授

研究者番号：60274479

(2) 研究分担者

船戸 耕一 (FUNATO KOUICHI)

広島大学・生物圏科学研究科・准教授

研究者番号：30379854

(3) 連携研究者

なし