

令和 2 年 6 月 2 日現在

機関番号：11301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2018～2019

課題番号：18H06120・19K21238

研究課題名(和文)シグナリングエンドソームにおける新たなレドックスシグナル経路の解明

研究課題名(英文)Clarification of molecular bases for signal transduction by "signaling endosomes"

研究代表者

堤 良平 (Tsutsumi, Ryouhei)

東北大学・薬学研究科・助教

研究者番号：50435872

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：多数のRTKを含む細胞膜受容体がエンドサイトーシス後に細胞内小胞を起点として情報伝達を惹起しているという「シグナリングエンドソーム(SE)」仮説が唱えられている。本研究ではSEの包括的理解をを目的とした。本研究の期間である1年半の成果として、磁性ナノ粒子を用いたSE単離法の更なる改良・最適化、血小板由来増殖因子PDGF刺激に起因するSEに多数の情報伝達タンパク質・代謝関連タンパク質が存在することの解明、タンパク質のサルフェン化ならびにパーチオサルフェン化検出のための実験手法の開発があげられる。以上とその関連成果を国内外での学会並びに学術誌にて発表した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細胞は外部からの刺激に応じて細胞内情報伝達を惹起し、増殖や分化、運動など様々な応答を示す。この情報伝達の以上はがんなどの様々な疾病の原因となるが、一方でその分子機構は必ずしも明らかにされていない。本研究では、従来の細胞膜からの情報伝達というモデルは十分ではないとする「シグナリングエンドソーム」モデルの解明を目指し、その詳細を検討した。得られた成果は上記のような疾患の原因を解明するうえで重要な知見となることが期待される。

研究成果の概要(英文)：Recently, the "signaling endosome (SE) model" has been proposed in which cell surface receptors evoke signaling not from the plasma membrane, but from endocytic vesicles. This project aimed to clarify molecular bases of such SEs.

Outputs during this term of grant support are; optimization of a method to isolate SEs using magnetic nano-particles, identification of many signaling- and metabolism-associated proteins at SEs, and development of a method to efficiently detect protein sulfenylation and perthiosulfenylation.

Results from this project including above were presented at domestic and international conferences and were published from scientific journals.

研究分野：細胞生物学

キーワード：エンドサイトーシス 細胞増殖因子 細胞内情報伝達

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

細胞外情報を細胞内に伝達する細胞膜受容体とその下流情報伝達機構は細胞の増殖・分化、ひいては生体の恒常性維持に重要な役割を果たし、がんなどの疾病の発症や悪性化に関与している。血小板由来増殖因子(PDGF) 受容体を代表とする RTK は、リガンド刺激により活性化・自己リン酸化し、多数の細胞膜型並びに細胞質内の情報伝達タンパク質と複合体を形成するとともに、速やかに受容体陥入(エンドサイトーシス) によって細胞内に取込まれる(2分~)。一方で、受容体の自己リン酸化や下流シグナルの亢進は受容体取込み後に最大(10-15分) となり、「細胞膜における受容体と下流経路の活性化」という従来の教科書的モデルとは齟齬が生じる。歴史的に受容体の細胞質への取り込みと最終的な分解は細胞表面の受容体数を低減するネガティブフィードバック機能であると考えられてきたが、近年、多数の RTK を含む細胞膜受容体がエンドサイトーシス後に細胞内小胞を起点として情報伝達を惹起(あるいは維持) しているという「シグナリングエンドソーム(SE)」仮説が唱えられている。申請者は、この SE の存在を支持する研究結果に加え、SE 上でリン酸化や ROS によるシステイン残基への可逆的酸化等様々な翻訳後修飾による情報伝達タンパク質の機能制御が行われている事を強く示唆する研究結果を得ていた。加えて、増殖因子刺激によるタンパク質の可逆的酸化はシステイン残基のサルフェン化(-SOH) とパーチオサルフェン化(-SSOH) の異なる状態が存在する事が示されている。しかしながら、SE がどのようなタンパク質で構成され、SE 上でどのような情報伝達が行われているのか、さらには SE の生物学的意義とは何であるのか等の SE の実態はこれまで明らかにされていなかった。

2. 研究の目的

受容体に対する刺激により、SE 上では情報伝達タンパク質のリン酸化、ユビキチン化、可逆的酸化を含む多様な翻訳後修飾が同時並行的に進行し、一方で、SE を起点として細胞全体への情報の伝播が惹起されると推測される。本研究では SE の包括的理解を目指し、1. SE の効率的単離法の確立、2. SE 構成タンパク質の網羅的同定、および、3. SE タンパク質の可逆的酸化を含む翻訳後修飾の同定法の確立と継時的定量により、SE の実態に迫ることを目的とした。

3. 研究の方法

3.1. シグナリングエンドソームの効率的単離法の確立

SE の存在と情報伝達における重要性が示唆されてきたものの、SE の簡便な単離法が確立されていなかったことから、SE を構成する情報伝達タンパク質群の網羅的解析やそれらの翻訳後修飾の検討はなされていなかった。申請者は 1) 磁気ビーズを用いた免疫単離法、ならびに 2) 磁性ナノ粒子を用いた独自に開発した PDGF 等の増殖因子刺激に起因する SE の単離法の更なる改良・最適化を図るとともに、異なる細胞刺激ならびに多様な細胞種を用いて SE 単離法の確立を目指した。

3.2. シグナリングエンドソームを構成する情報伝達タンパク質の網羅的同定

上記手法により単離した SE から質量分析を用いて SE を構成するタンパク質の網羅的同定を試みた。また、異なる時間増殖因子刺激を加えた細胞から SE を精製し、同様にプロテオミクス解析により SE 構成タンパク質の継時変化を検討予定であった。また、得られた結果をイムノプロットや細胞免疫蛍光染色により評価するとともに、それぞれの SE 構成タンパク質の機能を遺伝学的・薬理的に亢進・抑制し、SE 形成ならびに情報伝達への寄与を検討することを予定していた。

3.3. シグナリングエンドソームタンパク質の各種可逆的翻訳後修飾の同定法の確立と継時的定量

SE には複数のチロシンおよびセリン・スレオニンキナーゼ、ホスファターゼ、ユビキチンリガーゼなどが存在すると想定され、構成タンパク質がリン酸化やユビキチン化により制御されている事が予想されるとともに、SE で産生される ROS に由来する可逆的酸化を受けている可能性が高い。SE 上における個別のタンパク質それぞれについて上記翻訳後修飾の継時的変化を記述した「SE-Post-translational Modification-ome (SE-PTMome) Map」ともいえる網羅的かつ重層的なカタログの作成が理想ではあるものの、研究遂行上、まずは可逆的酸化に焦点を絞った。

4. 研究成果

3.1. シグナリングエンドソームの効率的単離法の確立

3.2. シグナリングエンドソームを構成する情報伝達タンパク質の網羅的同定

申請者は磁性ナノ粒子を用いた SE 単離法の更なる改良・最適化を行い、細胞破碎条件、緩衝液組成の検討等を行った結果、現状としては十分に使用に耐えうる手法の開発を完了した。また、この手法により PDGF 刺激に起因する SE に既知の小胞マーカーに加え、キナーゼ、ホスファターゼ、ユビキチンリガーゼ、ホスホリパーゼ、アダプタータンパク質、イノシトールリン酸キナーゼなど多数の情報伝達タンパク質が存在することを明らかにした。現在、これらの情報伝達タンパク質の増殖因子刺激依存的

な細胞内動態の解析、増殖因子依存的な細胞内情報伝達への受容体エンドサイトーシスの寄与などを Yale 大学の DeCamilli 教授に供与いただいたエンドサイトーシス不全細胞を用いて検討している。加えて、SE 上に多数の代謝関連酵素群を同定しており、今後この受容体エンドサイトーシスの細胞代謝制御への寄与に係る研究を進めていく予定である。

上記の成果を国内外の学会で発表したことに加え、現在論文として投稿する準備を進めている。

3.3. シグナリングエンドソームタンパク質の各種可逆的翻訳後修飾の同定法の確立と継時的定量

本研究では最終的な質量分析による網羅的解析に耐えうる SE タンパク質のサルフェン化ならびにパーチオサルフェン化検出のための実験手法の検討を行った。タンパク質パーサルフィド化は不安定であり、その検出には使用するアルキル化剤や緩衝液 pH の最適化などが必要であることが明らかとなった。東北大学医学系研究科赤池教授、井田助教らとパーチオサルフェン化検出の最適条件の検討を行い、酸性条件下でのアルキル化剤 β -(4-hydroxyphenyl) ethyl iodoacetamide (HPE-IAM) 使用と保護剤としてチロシンを用いる手法を見出した。これらの結果を論文として Redox Biology 誌より発表した。

現在、上記のタンパク質サルフェン化の検出を網羅的手法に応用するため検討を行うとともに、今後手法のさらなる改良を試みている。

3.4 その他

SE における情報伝達の検討の過程で、一般的に Src homology domain-containing protein tyrosine phosphatase (SHP2) の特異的阻害剤として使用されている一連の活性中心標的型阻害剤が、非特異的に細胞内の複数のチロシンキナーゼを阻害することを明らかにし、PLOS open bio 誌より発表した。

また、細胞内への生体内希少元素セレン供給に受容体を介したエンドサイトーシスが寄与する血漿性タンパク質であるセレノプロテイン P に関する最新の知見、特に 2 型糖尿病や静脈性肺高血圧症などのヒト疾病との関与に関する研究を網羅した総論を Biological and Pharmaceutical Bulletin 誌から発表した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Tsutsumi Ryouhei, Saito Yoshiro	4. 巻 43
2. 論文標題 Selenoprotein P; P for Plasma, Prognosis, Prophylaxis, and More	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biological and Pharmaceutical Bulletin	6. 最初と最後の頁 366 ~ 374
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1248/bpb.b19-00837	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 該当する

1. 著者名 Hamid HA, Tanaka A, Ida T, Nishimura A, Matsunaga T, Fujii S, Morita M, Sawa T, Fukuto JM, Nagy P, Tsutsumi R, Motohashi H, Ihara H, Akaike T	4. 巻 21
2. 論文標題 Polysulfide stabilization by tyrosine and hydroxyphenyl-containing derivatives that is important for a reactive sulfur metabolomics analysis.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Redox Biology	6. 最初と最後の頁 101096
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.1016/j.redox.2019.101096	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 該当する

1. 著者名 Tsutsumi Ryouhei, Ran Hao, Neel Benjamin G.	4. 巻 8
2. 論文標題 Off-target inhibition by active site-targeting SHP2 inhibitors	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 FEBS Open Bio	6. 最初と最後の頁 1405 ~ 1411
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.1002/2211-5463.12493	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7件（うち招待講演 2件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Ryouhei Tsutsumi
2. 発表標題 Visualization of specific protein oxidation evoked by signaling ROS
3. 学会等名 The Gordon Research Conference on Oxygen Radicals 2020 (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 堤 良平
2. 発表標題 増殖因子依存的な活性酸素種産生性細胞内小胞の生成と情報伝達
3. 学会等名 レドックス・ライフイノベーション第170委員会20周年記念若手シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 堤 良平
2. 発表標題 新規可視化法により見えてきた「活性酸素種産生小胞」によるチロシンホスファターゼの時空間的制御
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会 シンポジウム「新たなシグナル検出法・アプローチに基づくリン酸化シグナル研究の新展開」（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 堤 良平, Benjamin G. Neel, 斎藤芳郎
2. 発表標題 可逆的酸化タンパク質の特異的可視化法の開発
3. 学会等名 第72回日本酸化ストレス学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 堤 良平
2. 発表標題 増殖因子刺激による活性酸素種産生性細胞内小胞の生成
3. 学会等名 日本生化学会東北支部第85回例会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ryouhei Tsutsumi, Benjamin G. Neel, Yoshiro Saito
2. 発表標題 Specific visualization of reversibly oxidized proteins
3. 学会等名 9th SFRR Asia Biennial Meeting 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 堤 良平
2. 発表標題 タンパク質可逆的酸化の特異的可視化による 増殖因子依存的「レドキシソーム」情報伝達の発見
3. 学会等名 第91回日本生化学会大会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
--	---------------------------	-----------------------	----