

令和 3 年 5 月 15 日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2019～2020

課題番号：19K22506

研究課題名（和文）細胞膜動態の高分解能計測によるエンドサイトーシス超初期過程の分子基盤の解明

研究課題名（英文）Elucidation of the molecular basis of the ultra-early stage of endocytosis by high-resolution observation of cell membrane dynamics

研究代表者

大場 雄介（Ohba, Yusuke）

北海道大学・医学研究院・教授

研究者番号：30333503

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、ライブセル高速原子間力顕微鏡と蛍光顕微鏡に組み合わせたハイブリッド顕微鏡による相関イメージングを用いて、クラスリン依存性エンドサイトーシスに伴う細胞膜と分子の動態観測と解析を行った。増殖因子依存性エンドサイトーシスのピットは、細胞膜の限局した領域に出現すること、およびその形態は円形（球形）に限らず、楕円化したり分裂したりすることを見出した。またこの現象にSrcが関与することを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細胞内と細胞外環境を隔てる脂質二重膜であると同時に、細胞内外のコミュニケーションを司るインターフェースである細胞膜の3次元動的ダイナミクスに関する知見はこれまで限られていた。本研究では、これまでの動態観察の分解能を10倍向上した高速AFMを用いることで、細胞と組織の活動や運命の決定に重要な細胞外からの刺激に応じた細胞膜の形態と成分の動的変化の解析を可能とし、かつその分子メカニズムの一端を明らかにした。

研究成果の概要（英文）：In this study, we utilized correlative imaging by hybrid microscopy combined with live-cell high-speed atomic force microscopy and fluorescence microscopy to observe and analyze the dynamics of cell membranes and molecules associated with clathrin-dependent endocytosis. We found that clathrin-coated pit formation induced by growth factor stimulation appears in a certain localized region of the plasma membrane and the morphology of the pit is not limited to circular (spherical), but can also be elliptical and divisive. We also found that Src is involved in such phenomena.

研究分野：細胞生理学

キーワード：細胞膜 高速分子間力顕微鏡 薄層遮光照明法 相関イメージング

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

細胞膜は細胞内と細胞外環境を隔てる脂質二重膜であると同時に、細胞内外のコミュニケーションを司るインターフェースである。細胞外からの刺激に応じた細胞膜の形態と成分の動的変化が、細胞と組織の活動や運命の決定に重要である。細胞膜成分の動態は、蛍光顕微鏡技術（全反射、超解像など）によって明らかにされてきたが、膜形態の動的変化に関する情報は現在のところ限られており、その多くが電子顕微鏡で得られた静止画に基づいている。

我々は、生体膜のような柔らかい素材の観察用に開発されたライブセル高速原子間力顕微鏡（atomic force microscopy、AFM）を用いて、生きた細胞の頂端側細胞膜の微細構造とその動的変化を数秒の時間分解能と数10 nmの空間分解能で可視化することに成功した。さらに、高速AFMを共焦点顕微鏡に組み合わせたハイブリッド顕微鏡（correlative light and atomic force microscopy, CLAM）によって、クラスリン依存性エンドサイトーシスに伴う「タンパク質の局在変化（蛍光情報）」と「膜形態の変化（AFM情報）」を同時空間で取得可能な技術を確立した。この技術を用いて微小な頂端膜の動態を観察したところ、エンドサイトーシスが生じるのは頂端膜のうち限られた領域であることを新たに見出した。この発見は、膜上に均一に分布している受容体と基質の相互作用の結果、クラスリンが集積し膜形態変化が誘発されるという従来のモデルとは合致せず、頂端膜にはエンドサイトーシスを効率的に行うために予めプログラムされたドメイン（preprogrammed membrane domain、PMD）が存在することを示唆する。つまり、頂端膜上の膜構成成分（脂質や膜タンパク質）の不均一な分布が予想される。

## 2. 研究の目的

本研究課題では、「PMDを支える分子基盤」の解明へ向けて、頂端膜の「構成成分（膜裏打ちタンパク質等）」と「形態変化」を高感度に検出することで、上記問いに答えを得る。薄層斜光照明法（highly inclined and laminated optical sheet、HILO）による頂端側細胞膜の一分子イメージングと、蛍光異方性を用いた細胞膜の向きをモニターするバイオセンサーの両者を導入することで、回折限界を超えた膜動態観察系を構築する。この顕微技術を生きた細胞膜の形態と構成成分（膜タンパク質、脂質組成、膜裏打ちタンパク質等）とを、数秒の時間分解能と数10 nmの空間分解能で観察可能なハイブリッドイメージング技術を確立する。この技術を用いてPMDの分子基盤、すなわち基質が受容体と相互作用してから膜形態の変化が起きるまでの「エンドサイトーシス超初期過程の分子基盤解明」を最終到達点とする。

## 3. 研究の方法

以下の三つの研究項目を実行することで、目的であるPMDの分子機構を解明するという目標を達成する。

- 1) ハイブリッド顕微鏡によるPMDの可視化・解析
- 2) HILO顕微鏡と高速AFMによる頂端膜の物理的・光学的同時可視化
- 3) 蛍光偏光による膜形態計測系の開発（HILO顕微鏡への偏光照明の導入および蛍光タンパク質の異方性で細胞膜の向きを測るバイオセンサー開発）

#### 4. 研究成果

##### 1) ハイブリッド顕微鏡による PMD の可視化・解析

ライブセル高速 AFM と共焦顕微鏡のハイブリッド顕微鏡によって、クラスリンによってコートされた膜のくぼみ (Clathrin-coated pit, CCP) が高頻度に出現する膜のドメイン (PMD) の正体に迫った。CCP の同定方法を図 1 に示す。EGFP 融合型クラスリンを発現した細胞で取得した膜の形態とクラスリン局在の画像を重ね合わせたときに、クラスリンの蛍光スポットと重なるピットが CCP である (図 1 A)。

本研究課題の申請時点においては、上皮成長因子 (epidermal growth factor, EGF) 刺激でエンドサイトーシスを亢進させた場合、PMD に出現するピットの数が増加することが予備実験の結果から明らかとなっていた (図 1B)。高速 AFM による詳細な解析により、この増加はピット出現頻度の増加によるものであることがわかった (図 1C)。さらに PMD 内の個々の CCP のサイズと形状および経時変化に着目すると、CCP が時間をかけて大きく開口し楕円化する様子や、楕円化を経て分裂する様子が観察された (図 1D-G)。一方、未刺激の CCP の形状は円形であり、分裂は認められなかった (図 1D, F)。

これまで、エンドサイトーシスの過程で球状の膜小胞となる CCP は、円形の構造であると考えられてきた。しかし、高速 AFM による膜ナノ動態観察結果は、CCP がときに楕円化・分裂という想像もし得なかった振る舞いをすることを示している。そして、この膜ナノ動態の理解こそが PMD 解明への鍵となると考えた。つまり、CCP 楕円化と分裂の現象に関与する物理的要素を理解し、その要素に寄与する分子を同定できれば、PMD の分子機構の解明へとつながることが期待できる。

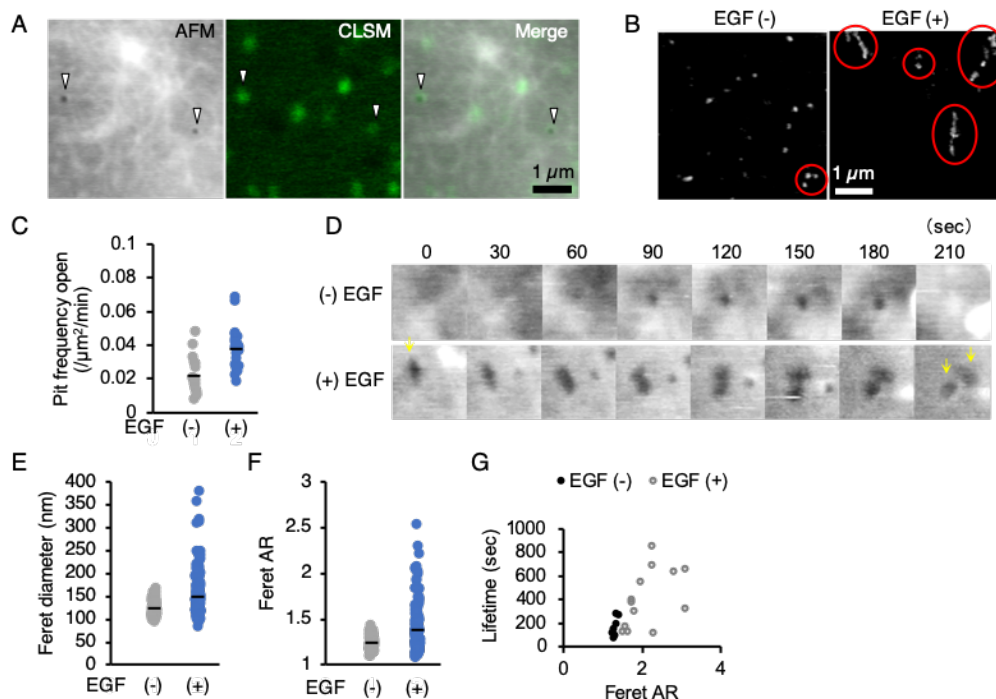


図 1 : (A) クラスリン局在と膜形態の同時観察。矢頭は CCP を示す。(B) EGF 刺激前後での一定時間内に出現した CCP (白) の積算画像。丸はエンドサイトーシスが集中的に生じる領域 (PMD) を示す。

(C) 単位時間、単位面積あたりの CCP の出現頻度のプロット。(D) EGF 刺激前後における CCP (黒) の形態の経時変化。矢印で示す CCP は楕円化を経て分裂する。(E) CCP のフェレー (Feret) 径、(F) フェレーのアスペクト比 (AR)、(G) CCP 開口時間とフェレーAR をプロットした図。

そこで、京都大学の立川正志准教授との共同研究により、CCP膜動態のポリゴン膜シミュレーションを行った。その結果、集積するクラスリンと膜張力を変化させた結果、CCPの楕円化・分裂は膜張力とクラスリンの集積が亢進している条件で起きうることを見出した。実際に、EGF刺激後の楕円化CCPへのクラスリンの集積は、未刺激時に比べ1.5倍亢進していることがクラスリンの蛍光シグナル輝度の解析から明らかとなり、シミュレーション結果と矛盾しない結果が得られている。

次の問いは、EGF刺激時に膜張力とクラスリン集積を亢進する責任分子は何かである。まず、EGFRから発せられるシグナルの関与を検証した。EGFRのノックダウンおよび阻害薬処理によってEGF刺激時のCCP動態変化（CCPの楕円化・分裂）が見られなくなったことから、EGFRシグナルの下流因子に関与することが確認できた（図2A、B）。次に、EGFRの下流因子の一つであるRasの関与をドミナントネガティブ変異体（RasN17）で検証したところ、Rasは関与しないことが明らかとなった（図2C、D）。そこで、EGF下流でクラスリンの集積と膜張力の制御の両者に関わる因子として、Srcに着目した。Srcはクラスリンの重鎖をリン酸化することでクラスリンの集積を亢進すること、細胞の力学応答に関与することが示唆されている。Srcの阻害薬処理によって、EGF刺激で誘発されるCCPの動態変化が生じなくなった（図2E、F）。つまり、CCPは円形で分裂せず、PMDでのピットの増加は認められなかった。以上から、EGFで誘発されるPMD形成の分子機構として、Srcの関与を初めて見出すことができた。

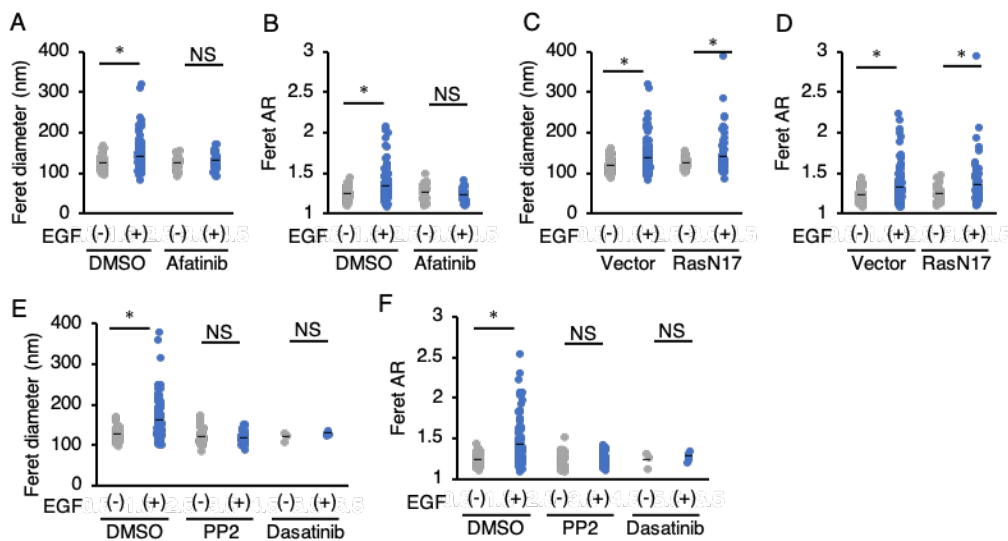


図2：EGFRの活性阻害条件下（Afatinib前処理）でEGF刺激前後に観察されたCCPのフェレー径（A）とフェレーAR（B）。Rasのドミナントネガティブ変異体（RasN17）発現下でのEGF刺激前後に観察されたCCPのフェレー径（C）とフェレーAR(D)。Srcの活性阻害条件下（PP2あるいはDasatinib前処理）でEGF刺激前後に観察されたCCPのフェレー径（E）とフェレーAR（F）。

## 2) 頂端側細胞膜の物理的・光学的同時スキャン法の確立

さらなるPMDの理解のために、膜成分（基質や受容体、脂質組成、膜裏打ちタンパク質等）と膜形態の光回析限界を超えた同時観察を可能とするべく、高速AFMと薄層斜光照明系（highly inclined and laminated optical sheet、HILO）のハイブリッド顕微鏡のセットアップを行った。HILO照明系の原理を図3Aに示す。全反射顕微鏡の原理を応用したもので、AFM観察面である頂端膜の局所的励起によって、高いシグナルノイズ比の画像取得を実現しうる。頂端膜の局所的励起の

精度と再現性を向上させるため、入射光の制御を電気的かつコンピュータ制御で自動化した。また、AFMを設置している既存の光学顕微鏡の限られたスペースに光学系を収めるために、光路長の大幅な短縮を行った。さらに、HILO照明で用いる対物レンズに対応したイメージング用ガラス基板を新たに設計し導入した。以上のことにより、頂端側細胞膜の物理的・光学的同時走査を達成した（図3B）。

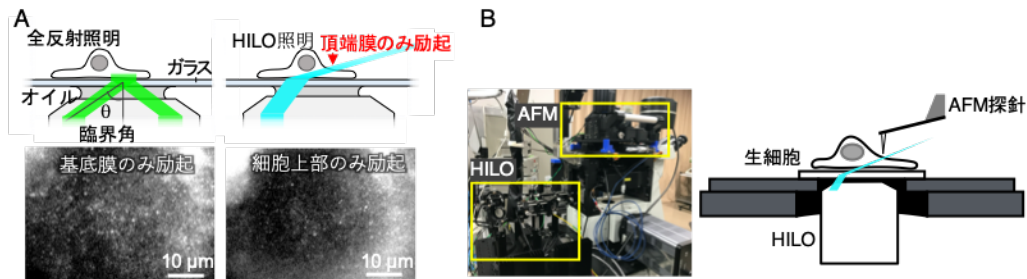


図3：(A) 照明法の原理と各照明法での同一細胞におけるクラスリンの局在観察。臨界角で励起光を導入すると全反射が起き、光のしみ出しによるエバネッセント場ができるが（左）、臨界角より少しだけ小さい角度では、境界面での屈折により薄層光が形成される（右）。これにより細胞の局所励起、すなわち全反射照明では基底膜のみを、HILO照明では頂端側細胞膜のみをそれぞれ励起できる。(B) 構築したHILO照明系と高速AFMのハイブリッド顕微鏡の外観（左）。HILO照明系を用いてAFM観察面と同じ頂端膜のみを励起し、高いシグナルノイズ比の蛍光画像取得をする（右）。

### 3) 蛍光偏光による膜形態計測系の開発 (HILO顕微鏡への偏光照明の導入および蛍光タンパク質の異方で細胞膜の向きを測るバイオセンサー開発)

ライブセル高速AFMでは細胞表面の形態を探針で物理的に走査するため、探針の先端が届かない構造（オーバーハングを有する深いピットや膜小胞など）を画像化することができない。これを補完するため、バイオセンサーを開発し蛍光偏光による膜形態計測技術を導入した（図4）。蛍光タンパク質は励起光の偏光方向に応じて特異的に蛍光を発する性質を有している。したがって、蛍光タンパク質の発色団の向きと細胞膜の相対角度を一定に保つことで、細胞膜の動きを蛍光強度の変化として捉えることが可能になる。このように蛍光タンパク質の相対的向きを細胞膜に対して固定する手法を複数開発した。HILO照明系に偏光照明系を組み込み、これらバイオセンサーを発現する細胞の観察に取り組んでいる。

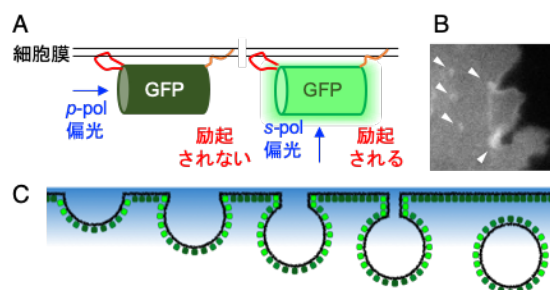


図5：(A) 膜形態測定用バイオセンサーの例。GFPを2ヶ所で細胞膜に固定し膜に対する相対的な向きを保持させた。(B) s-pol偏光の励起により、膜の変形部分(矢頭)が特異的に光る。(C) 本バイオセンサーによる膜変形可視化のモデル図。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Takeuchi Y, Narumi R, Akiyama R, Vitiello E, Shirai T, Tanimura N, Kuromiya K, Ishikawa S, Kajita M, Tada M, Haraoka Y, Akiyama Y, Ishitani T, Fujioka Y, Ohba Y, Yamada S, Hosokawa Y, Toyama Y, Matsui T, Fujita Y	4. 巻 30
2. 論文標題 Calcium Wave Promotes Cell Extrusion	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Current Biology	6. 最初と最後の頁 670 ~ 681.e6
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.cub.2019.11.089	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 該当する
1. 著者名 Kashiwagi Sayaka, Fujioka Yoichiro, Kondo Takeshi, Satoh Aya O., Yoshida Aiko, Fujioka Mari, Sasajima Hitoshi, Amano Maho, Teshima Takanori, Ohba Yusuke	4. 巻 44
2. 論文標題 Localization of BCR-ABL to Stress Granules Contributes to Its Oncogenic Function	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cell Structure and Function	6. 最初と最後の頁 195 ~ 204
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1247/csf.19033	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 Kashiwagi Sayaka, Fujioka Yoichiro, Satoh Aya O., Yoshida Aiko, Fujioka Mari, Nepal Prabha, Tsuzuki Atsushi, Aoki Ozora, Paudel Sarad, Sasajima Hitoshi, Ohba Yusuke	4. 巻 44
2. 論文標題 Folding Latency of Fluorescent Proteins Affects the Mitochondrial Localization of Fusion Proteins	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cell Structure and Function	6. 最初と最後の頁 183 ~ 194
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1247/csf.19028	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 Maishi Nako, Kikuchi Hiroshi, Sato Masumi, Nagao-Kitamoto Hiroko, Annan Dorcas A., Baba Shogo, Hojo Takayuki, Yanagiya Misa, Ohba Yusuke, Ishii Genichiro, Masutomi Kenkichi, Shinohara Nobuo, Hida Yasuhiro, Hida Kyoko	4. 巻 20
2. 論文標題 Development of Immortalized Human Tumor Endothelial Cells from Renal Cancer	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 4595 ~ 4595
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms20184595	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 Kondo T, Fujioka M, Fujisawa S, Sato K, Tsuda M, Miyagishima T, Mori A, Iwasaki H, Kakinoki Y, Yamamoto S, Haseyama Y, Ando S, Shindo M, Ota S, Kurosawa M, Ohba Y, Teshima T, The North Japan Hematology Study Group (NJHSG)	4. 巻 110
2. 論文標題 Clinical efficacy and safety of first-line nilotinib therapy and evaluation of the clinical utility of the FRET-based drug sensitivity test	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 International Journal of Hematology	6. 最初と最後の頁 482 ~ 489
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12185-019-02696-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 -

〔学会発表〕 計14件 (うち招待講演 3件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 柏木 彩花、藤岡 容一朗、佐藤 絢、吉田 藍子、藤岡 真理、Nepal Prabha、続木 惇、青木 大空、Paudel Sarad、笹島 仁、大場 雄介
2. 発表標題 蛍光タンパク質の成熟促進化はミトコンドリアマーカー本来の局在を阻害する
3. 学会等名 第97回日本生理学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 A. Yoshida A, N. Sakai, N. Takahashi, S. H. Yoshimura, Y. Ohba
2. 発表標題 Live-cell imaging and analysis of the plasma membrane dynamics during clathrin-mediated endocytosis by high-speed atomic force microscopy
3. 学会等名 ASCB EMBO 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 A. O. Satoh, Y. Fujioka, H. Sasajima, S. Paudel, A. Nanbo, Y. Ohba
2. 発表標題 Functional Analysis of Mitochondria-endosome Interaction in the Regulation of Endocytosis
3. 学会等名 ASCB EMBO 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 M. Amano, Y. Fujioka, A. O. Satoh, K. Horiuchi, A. Yoshida, H. Sasajima, C. Obuse, Y. Ohba
2. 発表標題 Irs4 Mediates Egf-dependent Upregulation of Endocytosis through the Recruitment of Ras-pi3k Complex to the Endosome.
3. 学会等名 ASCB EMBO 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 藤岡 容一郎、佐藤 絢、吉田 藍子、笹島 仁、Sarad Paudel、皆川 慶嘉、田端 和仁、野地 博行、大場 雄介
2. 発表標題 インフルエンザウイルス粒子の細胞取り込み機構の解析
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 天野 麻穂、藤岡 容一郎、佐藤 絢、堀内 浩水、吉田 藍子、笹島 仁、小布施 力史、大場 雄介
2. 発表標題 IRS4はRas PI3K複合体のエンドソーム局在化を介して依存性エンドサイトーシスを制御する
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Aiko Yoshida, Nobuaki Sakai, Naoki Takahashi, Shige H. Yoshimura, Yusuke Ohba
2. 発表標題 Probing in vivo dynamics of plasma membrane during clathrin-mediated endocytosis
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年



1. 発表者名 大場雄介
2. 発表標題 電位依存性Ca <sup>2+</sup> チャネルはシアル酸化依存的にA型インフルエンザヘマグルチニンと結合し宿主細胞へのウイルス粒子の取り込みを制御する
3. 学会等名 第92回日本生化学会学会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 吉田藍子、大場雄介
2. 発表標題 クラスリン依存性エンドサイトーシスに伴う細胞膜動態のライブセル可視化解析
3. 学会等名 第92回日本生化学会学会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大場雄介
2. 発表標題 細胞膜動態のcorrelative imaging
3. 学会等名 第57回日本生物物理学会年会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 吉田 藍子、酒井 信明、高橋 直希、吉村 成弘、大場 雄介
2. 発表標題 高速原子間力顕微鏡によるエンドサイトーシスに伴う細胞膜の形状変化の ライブセルイメージング
3. 学会等名 第71回日本細胞生物学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 佐藤 紇、藤岡 容一朗、笹島 仁、南保 明日香、大場 雄介
2. 発表標題 ミトコンドリアポアタンパク質を介したミトコンドリア _ エンドソーム間 相互作用によるエンドサイトーシス制御機構
3. 学会等名 第71回日本細胞生物学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 柏木 彩花、藤岡 容一朗、 笹島 仁、大場 雄介
2. 発表標題 蛍光タンパク質の成熟促進化はオルガネラマーカ-本来の局在を阻害する
3. 学会等名 第71回日本細胞生物学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大場雄介
2. 発表標題 Ras-PI3Kシグナルによるエンドサイトーシスの制御機構
3. 学会等名 第71回日本細胞生物学会
4. 発表年 2019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
---------------------------	-----------------------	----

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